

На правах рукописи



Щекин Владимир Иванович

**Взаимодействие элементов микроокружения и опухолевых клеток в
неметастатической семиноме; прогностическое значение**

1.5.23. Биология развития, эмбриология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» и федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук
кандидат медицинских наук.

Демяшкин Григорий Александрович
Шегай Петр Викторович

Официальные оппоненты:

Низяева Наталья Викторовна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына», лаборатория патологии репродукции, заведующий лабораторией

Матвеев Всеволод Борисович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по инновационной деятельности

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «30» «января» 2026 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.37 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук



Миронцев Артем Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Герминогенные опухоли (ГО) – наиболее частые злокачественные новообразования у мужчин с пиком заболеваемости в 35 – 40 лет, из которых на долю семиномы приходится 50 – 60 % случаев [Каприн А.Д. и др. 2021]. Она характеризуется высокой чувствительностью к лечению и высокими показателями общей 5-летней выживаемости; однако у 15 % больных с нематастатической семиномой регистрируется рецидив заболевания. Согласно pTNM-системе, нематастатическая семинома включает в себя IA, IB, IS, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC стадии опухолевого роста [Матвеев В.Б. и др., 2024]. Предпосылки к возникновению ГО формируются задолго до появления герминогенной неоплазии *in situ* (англ. Germ cell neoplasia *in situ*, GCNIS) – еще в антенатальном периоде онтогенеза [Corbac K. et al., 2024; Fink C. et al., 2021]. Часть мигрирующих первичных половых клеток, заселяющих зачаток гонады (гоноциты), может «задерживаться в незрелом состоянии» и становится источником развития GCNIS [Leathlobhair M. et al., 2024; Ribatti D. et al., 2024; Pandey S. et al., 2023]. Эти клетки (так называемые атипичные герминогенные клетки) сохраняют иммунофенотип первичных половых клеток (экспрессируют PLAP, OCT3/4, CD117) и остаются в латентном состоянии до наступления пубертатного возраста. В период гормональной перестройки изменения со стороны элементов микроокружения создают условия для опухолевой трансформации этих клеток в семиному и/или несеминозные опухоли [Zhou L. et al., 2022].

Несмотря на благоприятный прогноз у пациентов с семиномой актуальной задачей остается поиск дополнительных факторов риска рецидива. В этом направлении перспективным представляется количественно-качественный анализ элементов опухолевого микроокружения [Голиченков, В.А. и др., 2004; Демяшкин Г.А. и др., 2025; Komi D. et al., 2020]. Известно, что в условиях неоплазии возрастает количество Tregs, в частности CD8 лимфоцитов, обладающих противоопухолевыми свойствами, высокая инфильтрация CD3⁺/CD8⁺ ассоциирована с лучшей выживаемостью при большинстве солидных опухолях [Seidel C. et al., 2020; Klein B. et al., 2016], поэтому целесообразно проведение сравнения численности CD4/CD8/CD19 в pT1- и pT2-стадии сеиномы, перитуморальной зоне и нормальном яичке.

Особый интерес представляет количественно-пространственный сравнительный анализ макрофагов и их фенотипических особенностей (CD68, CD163) в опухоли и ее перитуморальной зоне. По данным мета-анализов высокая плотность CD163 опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) связана с неблагоприятным прогнозом и более высоким метастатическим потенциалом при ряде солидных опухолей [Diaz-Flores L. et al., 2020]. В единичных исследованиях ОАМ при ГО выявлена их склонность к проявлению клеточной

пластичности [Chohan M. et al., 2023], однако в современной научной литературе отсутствуют данные о количественных изменениях этих иммунных клеток и их прогностической ценности при семиноме.

Изучение регуляторного значения тучных клеток (ТК) в развитии семиномы, несомненно, актуально, поскольку известна их роль в поддержании локального гомеостаза яичка в норме, а также стимулирующее влияние на экстрацеллюлярный матрикс и ремоделирование стенки извитых семенных канальцев [Baran J. et al., 2023]. Взаимоотношение ТК с атипичными клетками напрямую зависит от их типа, который определяется химическим составом медиаторов секрета: повышенная инфильтрация триптазы ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при некоторых солидных опухолях, поскольку этот белок участвует в ангиогенезе и ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, тогда как химаза и карбоксипептидаза-А3 способствуют деградации межклеточных контактов и стимуляции ангиогенеза [Sadek A. et al., 2024; Delen O. et al., 2021; Zhang M. et al., 2023]. Поэтому не исключено, что угнетение этих факторов в семиноме, в зависимости от ее стадии, также может нести прогностическое значение. Параллельно необходимо комплексно сопоставить их количественно-пространственное распределение в норме и в перитуморальной зоне опухоли на pT1- и pT2-стадиях, чтобы оценить степень активации компенсаторно-приспособительных и защитных факторов.

Резюмируя вышесказанное, данная проблема носит многогранный характер, а ее решение находится на стыке нескольких фундаментальных дисциплин, таких как – патологическая анатомия и клеточная биология. Вместе с тем анализ взаимосвязанных первопричин и их последствий, коренится в антенатальном онтогенезе – закладке и миграции предшественников половых клеток на ранних стадиях эмбриогенеза. Появление герминогенной аплазии как лидирующего триггера семиномы указывает на нарушение физиологических канонов биологии развития.

Степень разработанности темы исследования

В современной специальной литературе при изучении факторов риска рецидива у пациентов с нематастатической семиномой в основном придерживаются систематического подхода. Это, в свою очередь, требует более тщательного анализа используемых в рутинной практике клинико-морфологических параметров, таких как предоперационный уровень β -ХГЧ, инвазия в белочную оболочку и некроз опухоли [Ajike R. et al., 2025]. В данном контексте уместно рассматривать иммунные клетки как возможный прогностический фактор и проводить сравнение с нормальным яичком и перитуморальной зоной. Особый интерес представляют CD8 и CD19, поскольку сведения по этой теме крайне скудны либо противоречивы. По данным некоторых исследований отмечается высокое содержание CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в сочетании с

умеренной инфильтрацией В-клеток [Lu X. et al., 2023]. Характеристика CD68 и CD163 макрофагам представлена только в одной работе, где авторы обобщили все ГО без акцентирования на неметастатическую семиному, исследование не содержало сравнительного анализа между стадиями заболевания [Islam R. et al., 2024]. Данные о роли тучных клеток при семиноме ограничиваются лишь *in-vitro* исследованием, демонстрирующим активацию рецептора PAR-2 под влиянием триптазы [Tang K. et al., 2019], при этом известно, что индукционный механизм, запускающийся триптаза-позитивными тучными клетками, способствует поддержанию ключевых признаков злокачественного фенотипа, таких как пролиферация, инвазия и неоангиогенез [Klein B. et al., 2016].

Таким образом, разрозненность и противоречивость данных о количественных и качественных характеристиках элементов опухолевого микроокружения в неметастатической семиноме актуализирует необходимость комплексного исследования с использованием современных морфологических методов и онкологических подходов диагностики. Это позволит полноценно охарактеризовать опухолевое микроокружение, установить роль его элементов в прогрессии заболевания, дополнить анализ клинико-морфологическими факторами, тем самым повысив достоверность прогностических выводов. Ожидаемый результат обеспечит повышение индивидуальной точности прогноза, что позволит сделать персонализированный выбор между активным наблюдением и адъювантной терапией еще более точным, снизив долю неоправданной эскалации лечения и оптимизируя интенсивность последующего мониторинга.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – выявление взаимодействий элементов микроокружения и неопластических клеток в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий, их связь с локальной прогрессией.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный гистологический анализ нормального яичка и перитуморальной зоны сеиномы pT1- и pT2-стадий.
2. Провести клинико-морфологический анализ пациентов с неметастатической сеиномой pT1- и pT2-стадий, выявить ассоциации с риском рецидива.
3. Проанализировать митотическую активность (Ki-67), гибель (TUNEL-метод), роль транскрипционного фактора NF- κ B в сперматогенных клетках нормального яичка и в перитуморальной зоне, а также в атипичных клетках сеиномы pT1- и pT2-стадий.
4. Оценить степень локального иммунного ответа на основании характера лимфоцитарного (CD3, CD4, CD8, CD19) воспалительного инфильтрата и степени иммуносупрессии (FOXP3 Treg) в нормальном яичке, перитуморальной зоне и сеиноме pT1- и pT2-стадий.

5. Провести количественную и пространственную оценку CD68- и CD163-макрофагов в нормальной ткани яичка, перитуморальной зоне и семиноме pT1- и pT2-стадий; определить роль стимулов фенотипической пластичности (IL-10), участие в модуляции воспалительной реакции (TGF- β), влияние на ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса (MMP-3) и инициацию ангиогенеза (CD31) в опухолевой прогрессии.

6. Сопоставить количество CD163 макрофагов с частотой возникновения рецидива семиномы для определения прогностического значения.

7. Провести иммунофенотипический анализ профиля секрета тучных клеток – триптазы, химазы и СРАЗ, их роль в микроокружении сперматогенеза и семиномы pT1- и pT2-стадий.

Научная новизна

На основании сравнительного морфологического анализа сперматогенеза и его микроокружения, особенно иммунного компонента, а также при сопоставлении количественных и пространственных характеристик семиномы подтверждено значение эмбрионального фактора в развитии герминальной неоплазии, показана ключевая роль реактивных и адаптационных механизмов в прогрессировании опухоли.

Автором впервые показано увеличение экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B в миелоидных клетках (лимфоцитах, макрофагах) и атипичных клетках семиномы: с одной стороны, это влияет на интенсивность митотического деления этих клеток (Ki-67 \uparrow), с другой стороны – приводит к усилению воспалительной реакции и ангиогенезу (CD31 \uparrow), а также ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса (MMP-3 \uparrow). Данная активация NF- κ B в опухоли и ее микроокружении способствует инвазии и прогрессии. В нормальном яичке иммуномечение на NF- κ B наблюдается преимущественно в sustentоцитах и в меньшей степени в сперматогенных клетках и интерстициальных эндокриноцитах. При сравнении перитуморальной зоны семиномы выявлено увеличение количества CD3+, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов прямо-пропорциональное pT стадии, при отсутствии количественных изменений CD19+ В-лимфоцитов. Сравнительный анализ плотности лимфоцитарного инфильтрата в семиноме не продемонстрировал статистически значимых различий между стадиями; при этом численность всех субпопуляций была гораздо выше, чем в нормальном яичке. Доля Treg FOXP3 лимфоцитов, отвечающих за иммуносупрессию, была мезерной, что, по-видимому, влияет на благоприятный прогноз. Также показано, что иммунное микроокружение семиномы способствует фенотипической пластичности опухоль-ассоциированных макрофагов в проопухолевый/противовоспалительный подтип (CD163 \uparrow): их количество прямо пропорционально pT стадии, при этом отмечается тенденция к расположению в центральных зонах опухоли при неизменной численности CD68. Ко-экспрессия CD163 с IL-10 и взаимодействие данного фенотипа ОАМ с атипичными клетками, продуцирующими IL-10,

указывают на их лидирующую роль в иммуносупрессивных каскадах, направленных на модуляцию воспалительной реакции и приводящих к опухолевой прогрессии. Подтверждена ключевая проангиогенная роль CD163⁺ ОАМ в канцерогенезе семиномы при оценке распределения CD31⁺ кровеносных сосудов. В то же время маркировка на CD163 практически отсутствовала в перитуморальной зоне и интерстициальной ткани нормального яичка. Количество CD68 макрофагов в семиноме не изменяется в зависимости от ее стадии, а в перитуморальной зоне их численность сопоставима с нормальным яичком, но снижается на pT2-стадии. При сравнительном анализе семиномы выявлено увеличение доли TGF- β -иммунных клеток опухолевого микроокружения, прямо-пропорционально ее стадии. Обнаруженный признак в совокупности с данными распределения MMP-3 говорит об участии в местной воспалительной реакции и моделировании экстрацеллюлярного матрикса как факторов, в том числе усиливающих опухолевую прогрессию. Кроме того, впервые установлено, что количество Tryptase-, Chymase- и CPA3-позитивных тучных клеток снижается обратно-пропорционально pT-стадии неметастатической семиномы, что можно рассматривать в качестве одного из механизмов уклонения опухоли от дополнительного проопухолевого воздействия тучных клеток. Несмотря на преимущественно периваскулярное (Tryptase+CD31) расположение тучных клеток, их мизерное количество снижает реализацию ими проангиогенных свойств. Подтверждено большое количество ТК в норме в интерстициальной ткани яичка; впервые показано, что их численность резко возрастает в перитуморальной зоне семиномы на pT1-стадии, что указывает на мобилизацию эффекторного звена локального иммунитета, обеспечивающего ограничение распространения опухоли, но затем отмечается феномен стремительного падения их доли на pT2-стадии.

Автором впервые установлено, что повышение предоперационного уровня β -ХГЧ, инвазия в белочную оболочку и некроз опухоли совместно с параметрами модели EAU 2023 (размер/RTI/LVI) могут рассматриваться как стратификационные факторы риска развития рецидива при неметастатической семиноме. На основании количественной характеристики CD163 макрофагов выявлена вероятность возникновения рецидива неметастатической семиномы, что позволяет использовать данный показатель в качестве прогностического маркера, AUC которого = 0.64.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость научной работы прежде всего основывается на экскурсе в антенатальное развитие яичка и сопоставлении с биологией герминогенной опухоли – семиномы, «краеугольный камень» развития которой заложен на стадии индифферентной гонады. Отсутствие сустентоцитов препятствует своевременной дифференцировке примордиальных половых клеток, инициирует их неконтролируемое митотическое деление,

приводящее к кластеризации и неоплазии в постнатальном периоде онтогенеза. С другой стороны происходит сбой в механизмах пролиферации, дифференцировки и апоптоза ввиду нарушений молекулярных сигнальных путей, в том числе со стороны элементов микроокружения.

С другой стороны, в диссертационном исследовании расширены представления об участии иммунных клеток в поддержании локального гомеостаза в яичке в норме и мобилизации реактивных и адаптационных механизмов при возникновении неопластической трансформации сперматогенных клеток. Гистоархитектоника опухолевого микроокружения, преимущественно иммуносупрессивного характера, обусловлена, прежде всего, цитокиновой осью IL-10/TGF- β , тесно ассоциированной с CD163 опухоль-ассоциированными макрофагами.

Пространственный анализ иммунофенотипа макрофагов и тучных клеток нормальной, перитуморальной зоны и опухолевой ткани расширяет данные о гистотопографических паттернах и клеточной пластичности иммунных клеток, описывая регуляторные и интегративные механизмы, определяющие морфофункциональную целостность ткани в постнатальном периоде онтогенезе.

Таким образом, внесен определенный вклад в понимание биологии развития опухолевого микроокружения неметастатической семиномы в зависимости от pT стадии. Полученные количественно-пространственные характеристики лимфоидного инфильтрата (CD3, CD4, CD8 и CD19), макрофагов (CD68, CD163) и тучных клеток (Tryptase, Chymase, CPA3) при взаимодействии с нормальными и атипичными сперматогенными клетками (CD117, PLAP, OCT3/4) на фоне усиления ангиогенеза, уточняют фундаментальные закономерности сперматогенеза в постнатальном периоде онтогенеза и развитие герминальной неоплазии. На клеточном уровне, где ключевую роль играют механизмы морфогенеза, роста и межклеточных взаимодействий, включая индукционные эффекты при патологическом состоянии.

Практическая значимость работы заключается в дополнении существующих критериев стратификации на группы риска рецидива пациентов с неметастатической семиномой с использованием воспроизводимых в клинической практике критериев, таких как предоперационный уровень β -ХГЧ, инвазия в белочную оболочку и некроз опухоли.

В патоморфологической практике обосновано дополнительное использование панели иммуногистохимических маркеров CD68, CD163, Tryptase, Chymase и CPA3 с их количественной оценкой в дополнение к классическим факторам риска рецидива (RTI, LVI, размер).

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлены морфологические изменения элементов опухолевого микроокружения, их взаимодействие с атипичными герминогенными клетками неметастатической семиномы pT1- и

pT2-стадий, раскрыты механизмы мобилизации реактивных и адаптационных факторов в перитуморальной зоне и при опухолевой прогрессии; определен уровень прогностической значимости CD163 макрофагов.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование является ретроспективным, многоцентровым, неинтервенционным и выполнено с использованием архивных парафиновых блоков и электронной медицинской документации; протокол исследования соответствует рекомендациям STROBE и принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Включение образцов и данных не влияло на лечебную тактику.

В исследовании применяли следующие методы: гистологический, морфометрический, гистохимический, иммуногистохимический и статистические.

Личный вклад автора

Все этапы проведенного научного исследования: постановка цели и задач, выбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, а также новизны полученных результатов, выполнены автором самостоятельно. Автором лично проведены подбор и анализ научной литературы в русле выбранной темы, разработан дизайн исследования, скомплектованы базы данных и цифровой архив изображений: к анализу привлечен комплекс современных морфологических методов. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял анализ электронной медицинской документации, гистологическое, гистохимическое (окрашивание толуидиновым синим), морфометрическое и иммуногистохимическое исследования (PLAP, OCT3/4, CD117, Ki-67, TUNEL, NF-κB, CD3, CD4, CD8, CD19, FOXP3, CD68, CD163, Tryptase, Chymase, CPA3, IL-10, TGF-β, MMP-3, CD31, α-SMA, CD34), а также проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

1. Гистологический анализ перитуморальной зоны с интегрированной оценкой активности пролиферации (Ki-67), гибели (TUNEL) и статуса NF-κB в сперматогенных клетках выявил стадийную зависимость изменений клеточного состава и сдвиг баланса пролиферации/гибели/стресс-сигналинга. Воспалительная инфильтрация в перитуморальной зоне характеризуется стадийными колебаниями распределения лимфоцитов с преобладанием цитотоксического пула клеток, в то время как в интерстициальной ткани нормального яичка отмечено доминирование CD8+ Т лимфоцитов, а в опухоли абсолютное содержание CD3, CD4, CD8 и CD19 достоверно превышает аналогичные показатели перитуморальной зоны и не

зависит от стадии опухолевого роста. FOXP3 Treg не проявил свои иммуносупрессивные свойства в неметастатической семиноме.

2. Иммунное микроокружение в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий представлено значительной долей CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов при стабильном общем пуле (CD68). В перитуморальной зоне pT1 численность CD68 макрофагов сопоставима с их количеством в интерстициальной ткани нормального яичка и снижается на pT2-стадии. Иммуносупрессия в микроокружении и прогрессия опухоли обусловлены прежде всего активацией элементов цитокиновой оси – продукцией IL-10 в CD163+ и атипичных клетках, TGF- β в макрофагах, а участие MMP-3 вызывает ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса и увеличение плотности кровеносных сосудов.

3. Иммунофенотипирование тучных клеток, указывает на преобладание триптазы среди медиаторов секрета. Однако микросреда патологически детерминированных герминогенных клеток ограничивает их рекрутирование внутри опухоли, поэтому их мизерное количество, обратно пропорциональное стадии семиномы, снижает реализацию ими проангиогенных и провоспалительных свойств. В то же время стадие-зависимое повышение численности тучных клеток в перитуморальной зоне подчеркивает их возможную роль в функциональной «изоляции» опухоли.

4. Предоперационный уровень β -ХГЧ, темп инвазии в белочную оболочку и некроз опухоли находится в прямой зависимости от развития неметастатической семиномы. Выявленная прогностическая значимость CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов – AUC = 0.64 подтверждает их ключевую роль в формировании иммуносупрессивного микроокружения, ремоделировании матрикса и ангиогенеза.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация на тему «Взаимодействие элементов микроокружения и опухолевых клеток в неметастатической семиноме; прогностическое значение» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальностей: 1.5.23. Биология развития, эмбриология и 3.1.6. Онкология, лучевая терапия. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 2 и 3 паспорта научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология: пункту 2. Исследования биохимических, клеточных и молекулярно-генетических механизмов дифференцировки в онтогенезе и регенерации. Изучение механизмов реализации клеточной пластичности в онтогенезе, при регенерации и при патологических состояниях; пункту 3. Изучение молекулярных, клеточных и гистологических механизмов морфогенеза, роста, межклеточных взаимодействий и индукционных механизмов в индивидуальном развитии, регенерации и при патологических состояниях. Области исследования диссертационной работы соответствует пункту: 2 паспорта научной

специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия: пункт 2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.).

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу урологического отделения с химиотерапией Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения (использования) новой технологии б/н от 22.09.2025 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Научно-образовательного ресурсного центра «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» (Молекулярной морфологии) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки / научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология. Акт о внедрении б/н от 22.09.2025 г.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой из пациентов ($n = 96$) с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий и парафиновые блоки ($n = 21$) нормальных яичек. В работе применены современные методы: гистологический, гистохимический, иммуногистохимический (в том числе мультиплексное), статистические. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы.

Полученные статистические данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну. Нормальность распределения количественных переменных оценивали тестом Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данные представляли, как среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$); при отклонении от нормальности – как медиану и межквартильный интервал ($Me [Q1 - Q3]$). При сравнении двух независимых групп с нормальным распределением применяли t-критерий Стьюдента, а при сравнении данных с ненормальным распределением использовали U-критерий Манна-Уитни. Для категориальных признаков

использовали критерий χ^2 Пирсона; при сравнении трех независимых групп риска (низкий/промежуточный/высокий) анализ выполняли на таблицах сопряженности формата 3×2 (группа риска \times бинарный признак «да/нет»). Сила ассоциаций между бинарными переменными оценивалась по отношению шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом, рассчитываемым методом логистической регрессии. Все проверки – двусторонние; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Использованные в анализе сведения соответствуют первичной клинико-патологической документации и критериям включения протокола; обработка данных выполнялась в соответствии с дизайном ретроспективного многоцентрового неинтервенционного исследования и рекомендациями STROBE.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в изданиях из базы данных RSCI, 1 статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 1 публикация в сборнике материалов международных и всероссийских научных конференций, 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представляет собой рукопись на русском языке объемом 206 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материала и методов, главы, посвященной результатам собственного исследования, обсуждения результатов исследования и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 62 рисунками. Список цитируемой литературы включает 146 источников, из которых 12 отечественных, 134 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика исследования

Данное исследование является ретроспективным многоцентровым когортным неинтервенционным. Стадирование опухоли проводилось в соответствии с классификацией pTNM (8-е издание, UICC/AJCC). На основании клинико-морфологических данных пациентов, проходивших лечение в филиалах ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – урологическом отделении с химиотерапией МНИОИ им. П.А. Герцена и отделение лучевого и хирургического лечения урологических заболеваний с группой брахитерапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба были сформированы группы:

- I (n = 96, возраст от 20 до 63) – архивные парафиновые блоки операционного материала семиномы – МКБ-10 С62.1 («Злокачественное новообразование опустившегося яичка»), после орхифуникулэктомии, согласно pTNM-классификации были дополнительно поделены на подгруппы: Ia – pT1N0M0 (n = 54) и Ib – pT2N0M0 (n = 42);

- II (n = 21, возраст от 20 до 63) – аутопсийный материал нормальных яичек, полученный в течение 6 часов после констатации биологической смерти. При макроскопическом исследовании – опухолевого процесса и/или воспаления не отмечено. Причины смерти: язва желудка прободением и/или кровотечением, обструктивный пиелонефрит, панкреатит, аневризмы различной локализации, врожденные пороки развития, но не мочевыделительной и/или репродуктивной системы, летальные травмы.

В диссертационном исследовании условно можно выделить два блока – онкологический и морфологический, тесно переплетающихся между собой и, в комплексе, придающих научной работе максимальную информативность, что позволяет получить представление о клинико-морфологических изменениях в семиноме в зависимости от pT-стадии, а также сравнить регистрируемые изменения в перитуморальной зоне с нормальным яичком.

Методы исследования

В диссертационном исследовании использовали следующий комплекс методов: а) анализ клинических данных; б) гистологический – окраска гематоксилином и эозином; в) гистохимический – окраска толуидиновым синим для метахроматического выявления гранул секретора тучных клеток; г) иммуногистохимические реакции (PLAP, OCT3/4, CD117, Ki-67, TUNEL, NF-κB, CD3, CD4, CD8, CD19, FOXP3, CD68, CD163, Tryptase, Chymase, CPA3, IL-10, TGF-β, MMP-3, CD31, α-SMA, CD34); д) морфометрический; д) статистические.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление нормального яичка, перитуморальной зоны и семиномы позволяет проследить иммунные и стромально-сосудистые перестройки на клеточном и тканевом уровне, сопутствующие опухолевой прогрессии. Перитуморальная зона рассматривается как специализированная «переходная ниша» между иммуннопривилегированными структурами яичка и опухолевым микроокружением. Высокая частота выявления герминогенной неоплазии *in situ* в прилежащих участках указывает на диффузный характер изменений сперматогенного эпителия. Поэтому перитуморальная зона требует целенаправленного морфологического и иммунологического анализа в сопоставлении с нормой и опухолью.

Состояние сперматогенного эпителия в нормальном яичке и семиноме

В образцах яичек II-ой группы наблюдали нормальную гистоархитектонику с признаками физиологического сперматогенеза. Извитые семенные каналы содержали сперматогенные

клетки, расположенные послойно. Сустентоциты, выполняющие поддерживающую и трофическую функцию, характеризовались крупными овально-треугольными ядрами и светлой цитоплазмой. В интерстиции определялись интерстициальные эндокриноциты и единичные иммунные клетки без признаков воспалительной инфильтрации. В перитуморальной зоне выявлялись дистрофические изменения сперматогенного эпителия с участками субтотальной и тотальной герминальной аплазии. Во всех наблюдениях микропрепаратов I группы выявлена классическая семинома с признаками тотальной герминативной катаплазии – появлением слабодифференцированных или недифференцированных клеток, сходных с эмбриональными. Для pT1 характерно ограничение опухоли паренхимой яичка и сетью яичка без признаков сосудистой или лимфатической инвазии. Для pT2 характерны сосудистая и/или лимфатическая инвазия с прорастанием в белочную и во влагалищную оболочку, а также более выраженные отек и воспалительная инфильтрация. Во всех случаях отмечается PLAP- и OCT3/4-позитивное иммуномечение атипичных клеток.

Гемато-тестикулярный барьер и перитубулярный компартмент (CD34, α -SMA)

В нормальном яичке иммуномечение на CD34 обнаружили в эндотелии кровеносных сосудов мелкого калибра и в большинстве перитубулярных клетках. Сустентоциты были иммунонегативными. α -SMA формировал сплошной перитубулярный иммунопозитивный «слой» (миоидные клетки) и маркировал гладкомышечный компонент сосудистой стенки. Мультиплексная визуализация CD34 и α -SMA выявила неполное совпадение сигналов и наличие популяций CD34 \wedge α -SMA+, CD34+/ α -SMA- и CD34-/ α -SMA+. Это отражает гетерогенность перитубулярного компартмента и различия его функциональных подтипов. Для перитуморальной зоны количественные параметры CD34/ α -SMA в представленных данных не детализированы. В семиноме CD34 маркировал эндотелий, демонстрируя разветвленную тонкостенную сосудистую сеть. Локализация и интенсивность иммуномечения на α -SMA аналогично нормальному яичку. Мультиплексная картина CD34 \wedge α -SMA напоминала трехмерную сетчатую структуру.

Пролиферация (Ki-67) и гибель (TUNEL) сперматогенных клеток

В нормальном яичке Ki-67 маркировал преимущественно сперматогонии. Доля митотически активных клеток составила 58,8 %. В перитуморальной зоне отметили снижение Ki-67: pT1 – 33,1 %, pT2 – 18,9 % (p = 0,001). В семиноме обнаружили незначительное увеличение пролиферирующих опухолевых клеток между стадиями. В нормальном яичке при оценке TUNEL регистрировали единичные позитивные ядра (18,3 %), преимущественно – сперматогоний и первичных сперматоцитов. В перитуморальной зоне степень апоптоза усиливалась по мере прогрессирования опухоли. В pT2 доля TUNEL-позитивных сперматогенных клеток увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с pT1 (p = 0,001). В семиноме

доля TUNEL-позитивных опухолевых клеток между pT1 и pT2 была практически тождественной ($p = 0,175$).

Транскрипционный фактор NF-κB в нормальном яичке и семиноме

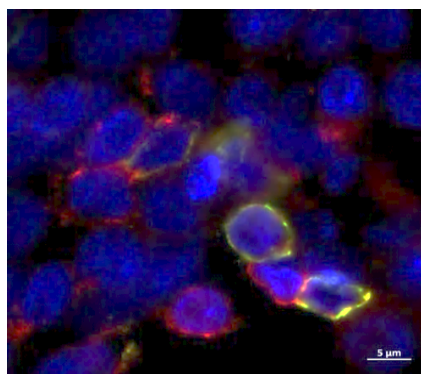
В нормальном яичке NF-κB экспрессировался преимущественно в сустентоцитах и в некоторых сперматогониях. Общее количество NF-κB позитивных клеток составило 3,92 на 1 мм². Численность NF-κB позитивных клеток в перитуморальной зоне при pT2 была в 1,4 раза больше, чем при pT1 ($p = 0,043$). В семиноме NF-κB-позитивные опухолевые клетки не обнаружили, сигнал регистрировали только в мононуклеарном инфильтрате ($p = 0,224$).

Сосудистый компонент и васкуляризация (CD31) в нормальном яичке и семиноме

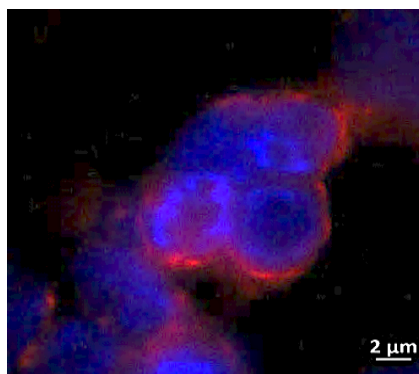
В нормальном яичке CD31 маркировал эндотелий кровеносных сосудов интерстициальной ткани; их плотность составила 15,03 сосудов/мм². В перитуморальной зоне обнаружили усиление степени васкуляризации, отмечена тенденция к более высокой плотности сосудов при pT1 по сравнению с pT2 (в 1,9 раза), без статистической значимости ($p = 0,077$). В семиноме плотность CD31-позитивных кровеносных сосудов была высокой в обеих стадиях и демонстрировала тенденцию к увеличению при pT2 ($p = 0,152$).

Характеристика лимфоцитарного инфильтрата (CD3, CD4, CD8, CD19, FOXP3) в нормальном яичке и семиноме

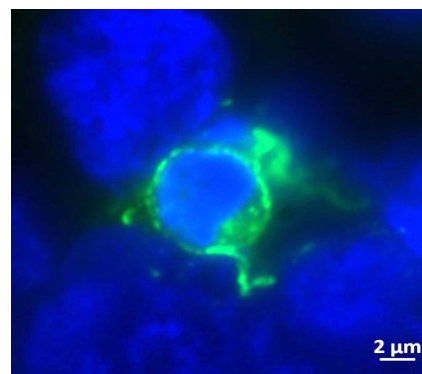
В нормальном яичке CD3⁺ клетки встречались крайне редко и локализовались преимущественно в интерстициальной ткани; чаще отмечалась ко-экспрессия CD8. В перитуморальной зоне наблюдали резкое нарастание Т-клеточного инфильтрата. Медиана CD3⁺ клеток превышала показатели нормы в 6,9 раза при pT1 и в 16,3 раза при pT2. Содержание CD19⁺ В-лимфоцитов оставалось крайне низким и статистически не различалось ($p = 0,429$). Пространственно формировались периваскулярные инфильтраты с преобладанием CD3⁺CD8⁺. В семиноме сохранялась выраженная Т-клеточная доминанта (Рисунок 1).



pT1-стадия, CD3⁺CD8⁺



pT1-стадия, CD3



pT2-стадия, CD4

Рисунок 1 – Семинома. Иммуногистохимическое окрашивание лимфоцитов в опухоли: CD3 – красное свечение; CD4 – зеленое свечение; CD8 – желтое свечение; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

Суммарная плотность Т-лимфоцитов примерно в 8,0 раза превышала в субпопуляцию лимфоцитов. Межстадийных различий по CD3, CD4, CD8 и CD19 не обнаружено ($p = 0,137$; $p = 0,504$; $p = 0,175$; $p = 0,575$). FOXP3 наблюдали только в CD4+ клетках. Доля CD4⁺FOXP3⁺ Treg не превышала 3 % и не различалась между стадиями ($p = 0,807$).

Пространственная характеристика CD68, CD163 макрофагов IL-10-, TGF-β-, MMP-3- позитивных элементов в нормальном яичке и семиноме

В нормальном яичке количество CD68+ макрофагов значительно преобладало над численностью CD163+ ($p = 0,001$), что указывает на доминирование основного фагоцитарного пула клеток. В перитуморальной зоне количество CD68+ макрофагов снижалось от pT1 к pT2 в 4,0 раза ($p = 0,001$). Для CD163+ макрофагов в перитуморальной зоне статистически значимых различий между pT1 и pT2 не получено ($p = 0,780$). В семиноме количественные различия по CD68+ ОАМ между pT1 и pT2 отсутствовали ($p = 0,423$). Инфильтрация CD163+ ОАМ при pT2 увеличивалась в 3,4 раза ($p = 0,001$) (Рисунок 2А). Доля CD163+ клеток в радиусе 50 мкм от CD31+ сосудов возрастала в 1,5 раза ($p = 0,001$). Иммуносупрессивная активность нарастала по оси IL-10. Доля CD68⁺IL-10⁺ ОАМ увеличивалась незначительно ($p = 0,012$). Аналогично возрастала доля CD68⁺CD163⁺IL-10⁺ ($p = 0,005$) (Рисунок 2Б). Усиливалась пространственная ассоциация TGF-β и MMP-3.

ROC-анализ показал умеренную прогностическую ценность CD163+ ОАМ на вероятность риска рецидива: AUC 0,64 (95 % ДИ 0,44-0,84) (Рисунок 2В).

Имунофенотипическая и пространственная характеристика тучных клеток в нормальном яичке и семиноме

В перитуморальной зоне количество тучных клеток, окрашенных толуидиновым синим, Tryptase, Chymase и CPA3 увеличивалось в pT1-стадии по сравнению с нормальным яичком от 1,7 раз ($p = 0,010$) до 2,1 ($p = 0,001$). При оценке количества тучных клеток в перитуморальной зоне в сравнении pT1 и pT2 стадий отмечали их снижение от 2,0 раз ($p = 0,001$) до 3,1 ($p = 0,001$) (Рисунок 5). Мультиплексный анализ продемонстрировал преобладание фенотипа Tryptase⁺Chymase⁺ тучных клеток при малой доле Tryptase⁺Chymase⁺CPA3⁺. В нормальном яичке доля Tryptase-позитивных клеток в радиусе 50 мкм от CD31+ кровеносных сосудов составляла $56,2 \pm 9,1$ %, так как в большей степени они локализовались перитубулярно. Периваскулярная локализация сохранялась: $62,4 \pm 10,3$ % при pT1 и $64,6 \pm 6,3$ % при pT2 (Рисунок 3). Различия не достигли статистической значимости. В семиноме количество тучных клеток резко уменьшалось при pT2-стадии. При окрашивании толуидиновым синим, Tryptase, Chymase и CPA3 отмечали снижение от 4,3 раз ($p = 0,010$) до 10,4 ($p = 0,001$). Мультиплексная иммуногистохимическая оценка демонстрирует преобладание Tryptase⁺ тучных клеток, при этом взаимодействие с PLAP-позитивными опухолевыми клетками не выявлялось. Более 98 %

всех тучных клеток располагалось в радиусе 50 мкм от кровеносных сосудов, без статистически значимых различий в pT1- и pT2-стадии ($p = 0,810$) (Рисунок 4).

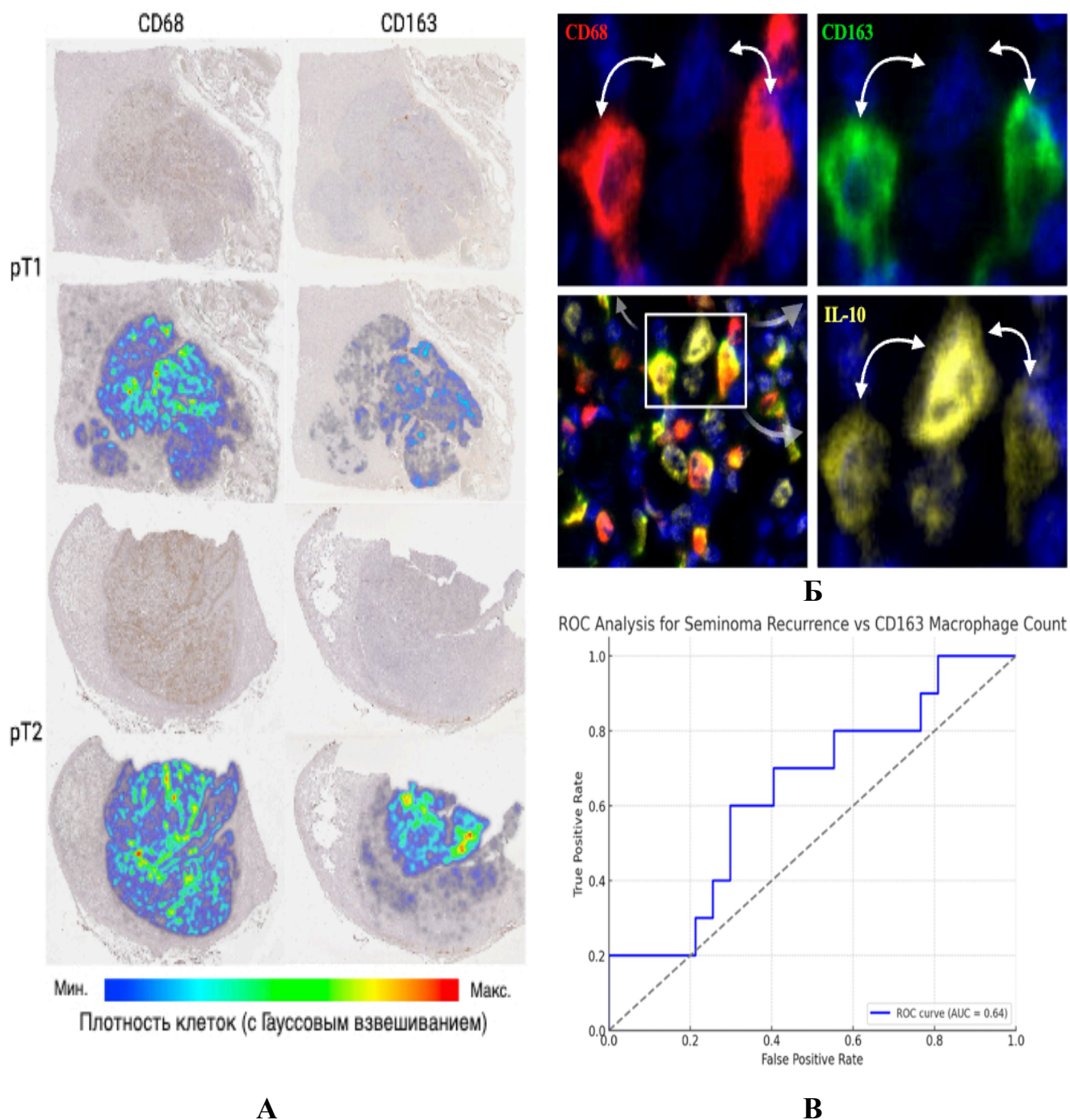


Рисунок 2 – Иммуноморфологические и прогностические характеристики CD68/CD163 макрофагов при семиноме pT1- и pT2-стадии. А – карта плотности. Пространственное распределение CD68 и CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов; Б – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 (красное свечение), CD163 (красное свечение) и IL-10 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD68+CD163+IL-10. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$; В – ROC-кривая. Взаимосвязь количества CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов (клетки/мм²) с вероятностью возникновения рецидива. AUC = 0,64

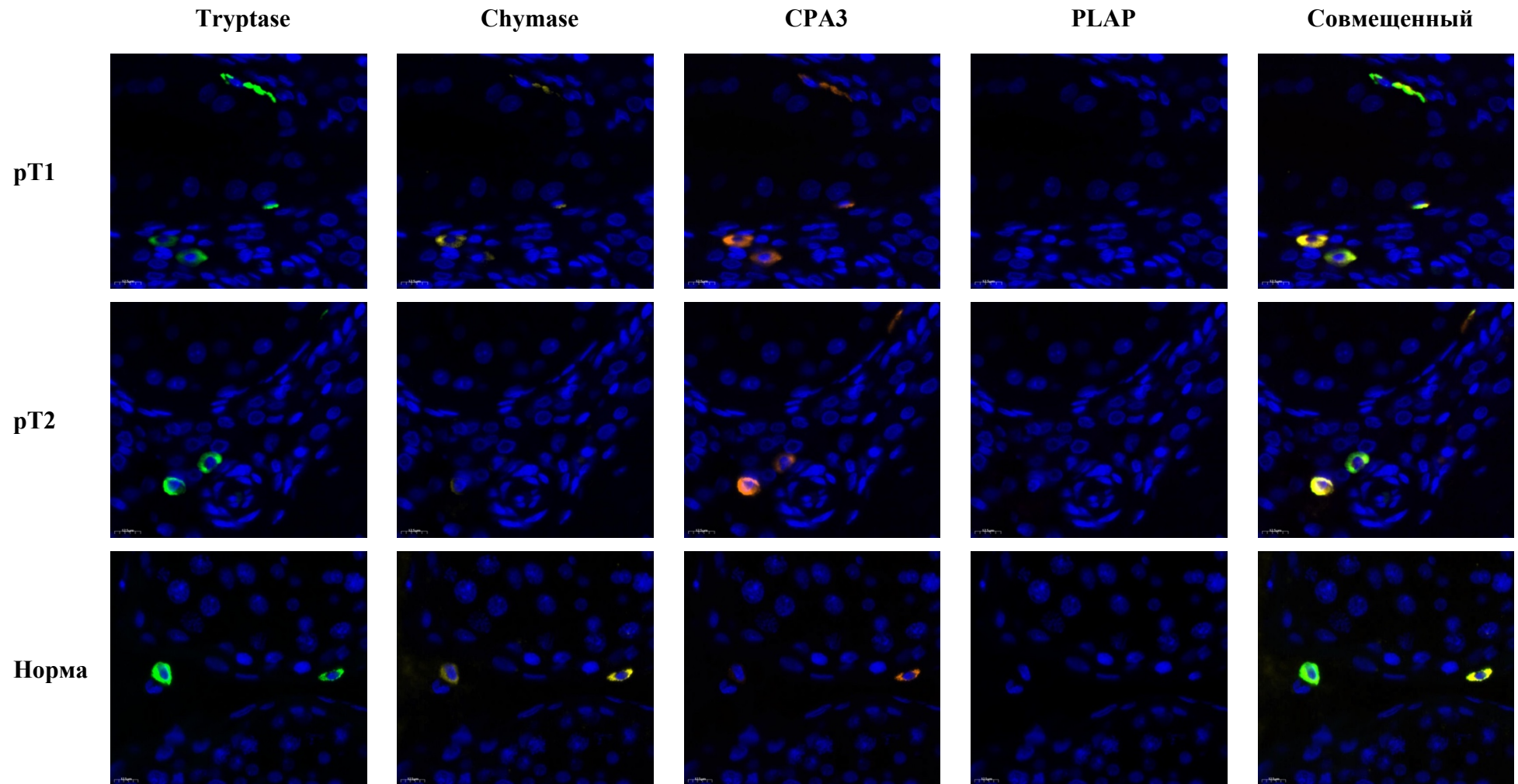


Рисунок 3 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Тryptase (зеленое свечение), Chymase (желтое свечение), CPA3 (оранжевое свечение) и PLAP (розовое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Тryptase+Chymase+CPA3+PLAP. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

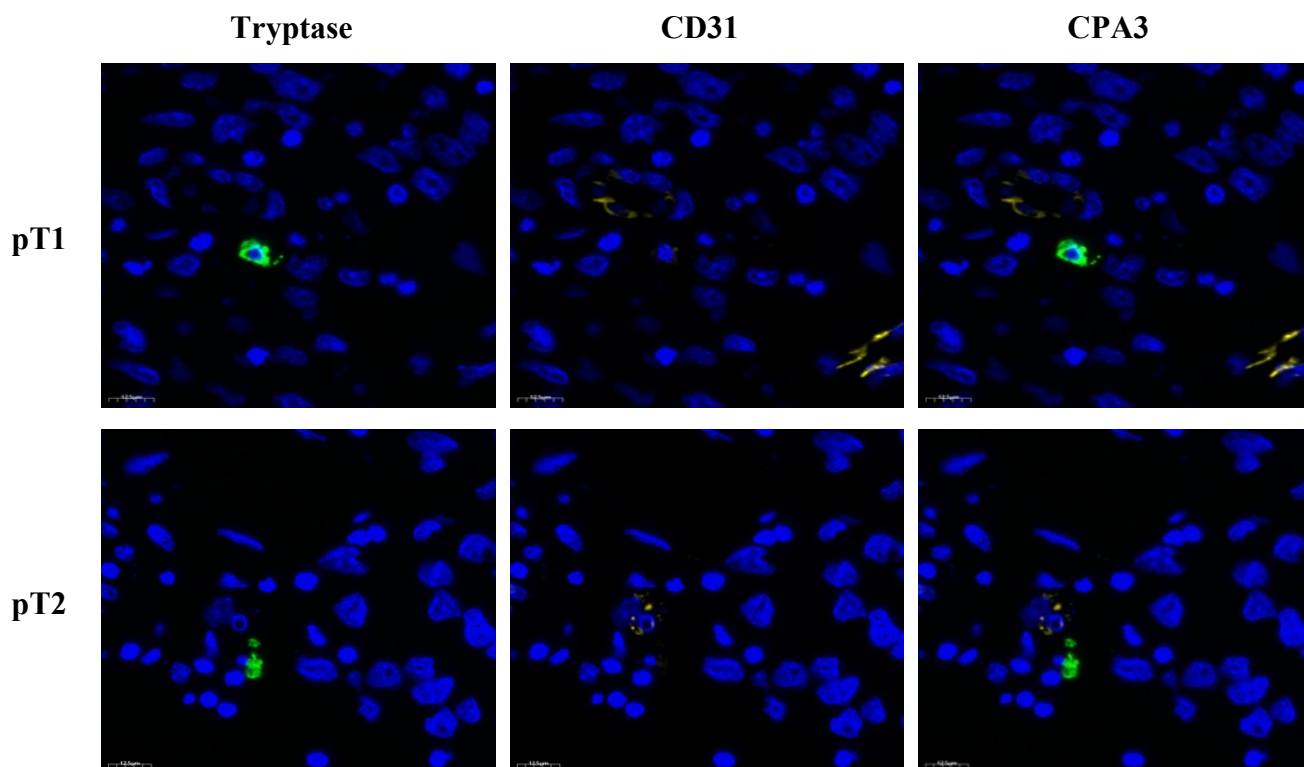


Рисунок 4 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), CD31 (желтое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

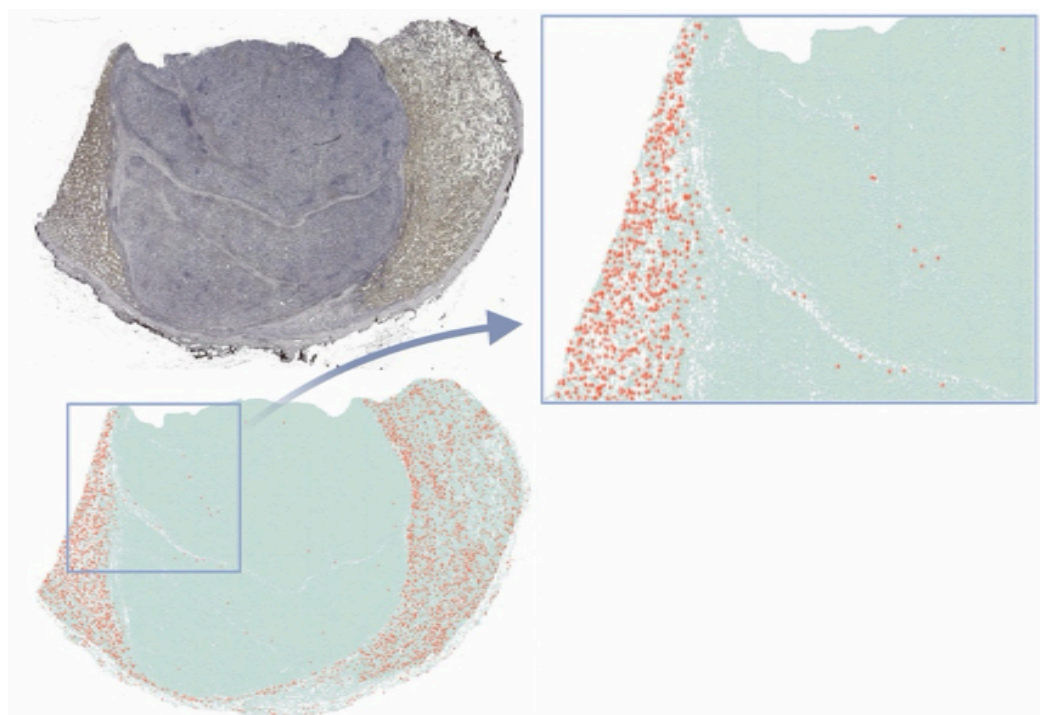


Рисунок 5 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. Картирование семиномы. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Tryptase. Сверху – гистоскан. Снизу – точечная диаграмма, отображающая распределение триптаза-положительных тучных клеток в микропрепарате. (оранжевые точки – триптаза-положительные клетки, зеленые – триптаза-негативные клетки)

Клинико-морфологические параметры семиномы и стратификация риска рецидива

Среди 96 пациентов семинома pT1-стадии (56 %) была диагностирована в 1,3 раза чаще, чем pT2 (44 %). Частота повышения предоперационного уровня β -ХГЧ в 7,3 раза на pT2-стадии, чем на pT1-стадии ($p = 0,001$), что подтверждается низким значением отношения шансов (ОШ = 0,09; 95 % ДИ 0,02 – 0,32). Статистически значимых различий частоты повышения предоперационного уровня АФП и ЛДГ между стадиями не выявлено. Опухоли более 5 см встречались при pT2 в 2,0 раза чаще ($p = 0,004$). Инвазия в белочную оболочку и в сеть яичка регистрировалась чаще при pT2 (в 1,4 раза и в 1,7 раза; $p = 0,04$). При анализе ассоциаций категориальных клинико-морфологических параметров с группами риска рецидива семиномы были выявлены статистически значимые критерии, связанными с высоким риском рецидива: инвазия в белочную оболочку ($p = 0,001$), некроз опухоли ($p = 0,038$) и повышенный предоперационный уровень β -ХГЧ ($p = 0,001$) (Рисунок 6).

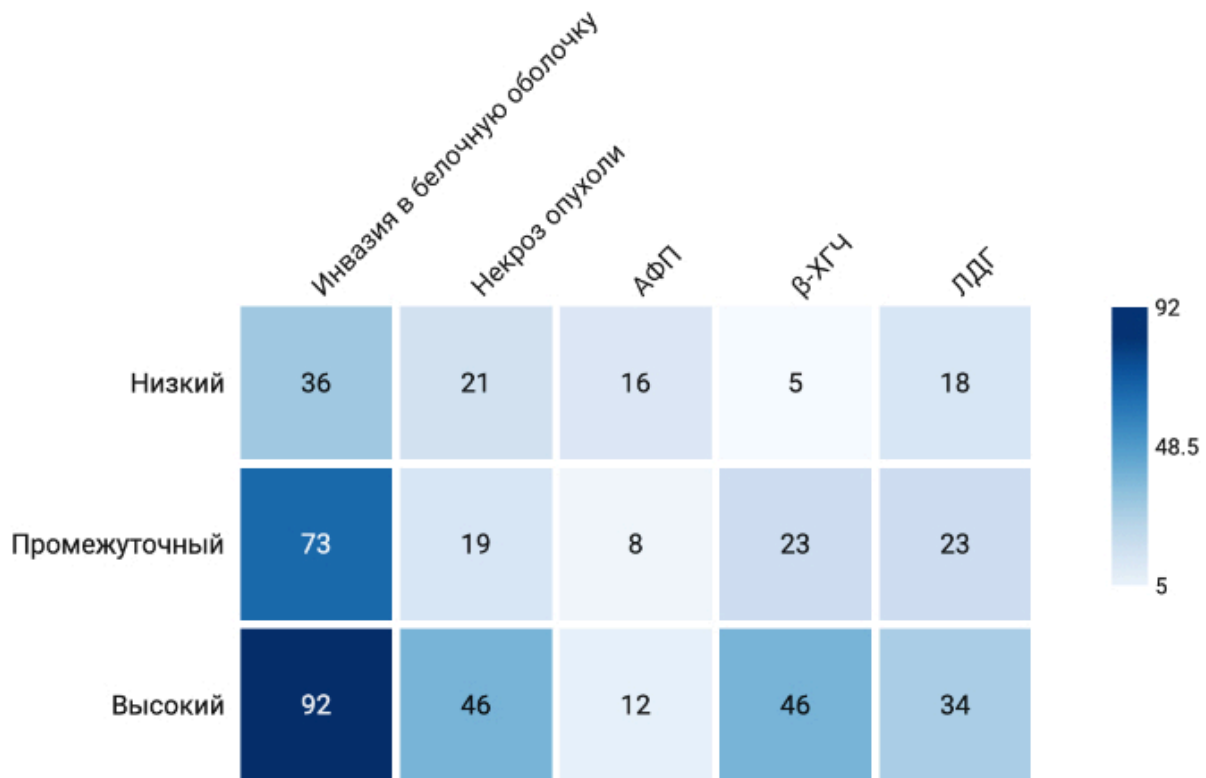


Рисунок 6 – Тепловая карта статистически значимых ассоциаций морфологических и лабораторных параметров с группами риска рецидива у пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

Резюме

Сравнительный параметрический анализ нормального яичка, перитуморальной зоны и собственно опухоли семиномы, что наиболее ранние и выраженные клеточные и тканевые перестройки происходят в условной «переходной нише». Здесь выявляется угасание сперматогенеза (вплоть до тотальной герминальной аплазии), снижение Ki-67 и усиление

TUNEL сигнала в сперматогенных клетках с нарастанием Т-клеточной инфильтрации и ремоделирование сосудистого русла. В семиномы показатели пролиферации и гибели атипичных клеток на pT1 и pT2 стадиях практически одинаковые. При этом опухолевый прогрессия характеризуется увеличением доли CD163+ ОАМ и усилением IL-10/TGF- β /MMP-3 оси, что поддерживает иммунное и стромально-сосудистое ремоделирование и отражает прогностический потенциал элементов микроокружения семиномы.

Итоги выполнения диссертационной работы

Настоящее исследование было задумано как ответ на продолжающуюся дискуссию о морфологических изменениях и ключевых этапах биологии развития человека – прежде всего сперматогенеза и его нарушений, а также как попытка сопоставить эмбриональные и опухолевые структуры на клеточном и тканевом уровнях.

В качестве «модельного объекта» была выбрана семинома: ее «пограничное» положение между эмбриональной программой герминативной линии и неоплазией позволяет наблюдать биологию опухоли в динамике, определить где нормальная траектория развития яичка отклоняется в сторону герминальной неоплазии.

Диссертационное исследование выстроено от морфологической характеристики нормального яичка через перитуморальную зону к неоплазии. Сначала описаны тканевая гистоархитектура яичка и ключевые барьерные механизмы, поддерживающие иммунопривилегию и обеспечивающие физиологический сперматогенез; затем через призму эмбриогенеза показано, как «остановка созревания» первичных половых клеток и сперматогенных клеток формирует латентный субстрат герминальной неоплазии. Такой переход от исходной дифференцировки к ее «сбою» позволил рассматривать семиному как закономерный исход незавершенной дифференцировки клеток.

Ключевыми инструментами послужили гистологический, гистохимический и иммуногистохимический методы исследования, которые при комплексном подходе позволяют, с одной стороны, отслеживать характер межклеточных взаимодействий, а с другой – выявить маркеры неоплазии и иммунных клеток, уточняя механизмы дедифференцировки и дисплазии половых клеток. Особое внимание уделено эпигенетическим изменениям как вероятным модераторам перехода от латентного онкофетального состояния к инвазивному росту.

Тем самым получена целостная картина: эмбриональное развитие гонады служит неким триггером, определяющим вероятность реализации неопластического потенциала, а фенотипические сдвиги соматических клеток и иммунных задают скорость и направление опухолевой эволюции.

Таким образом, изучение взаимодействия атипичных сперматогенных клеток семиномы с элементами микроокружения подтверждает высокую ее пластичность и двойственную роль

иммунной системы в ее развитии. С одной стороны, иммунитет длительно сдерживает опухоль (от GCNIS до ограниченной семиномы), с другой – постепенно перестраивается под ее влиянием, создавая условия для дальнейшей прогрессии. Расшифровка этих тонких механизмов открывает путь к новым прогностическим маркерам и потенциальным терапевтическим мишеням (например, модуляция макрофагальной поляризации или сохранение функции тучных клеток) с целью предотвратить метастазирование.

ВЫВОДЫ

1. В перитуморальной зоне семиномы отмечаются дистрофические изменения сперматогенного эпителия с очагами субтотальной герминальной аплазии и воспалительной инфильтрации, степень выраженности которых нарастает с увеличением стадии развития семиномы.

2. Повышенный предоперационный уровень β -ХГЧ ($> 5,3$ мЕД/мл), инвазию в белочную оболочку (да / нет) и некроз опухоли (да / нет) совместно с параметрами модели EAU 2023 (размер/RTI/LVI) следует рассматривать в качестве стратификационных факторов риска возникновения рецидива при неметастатической семиноме. Частота возникновения рецидива у пациентов, завершивших лечение более 36 месяцев назад, составила 16,9 % от общей численности данной подгруппы.

3. Митотическая активность (Ki-67) и гибель (TUNEL) опухолевых клеток в семиноме статистически значимо не различались между pT-стадиями ($p = 0,504$; $p = 0,175$), а в сперматогенных клетках перитуморальной зоны соотношение Ki-67/TUNEL снижалось обратно-пропорционально pT-стадии ($p = 0,001$). В семиноме транскрипционный фактор NF- κ B экспрессируется преимущественно в лимфоцитах и макрофагах, а его количество статистически значимо не различается на pT1- и pT2-стадиях ($p = 0,224$). В нормальном яичке NF- κ B экспрессируется (в порядке убывания): в сустентоцитах, сперматогенных клетках и интерстициальных эндокриноцитах, а в перитуморальной зоне количество NF- κ B+ сперматогенных клеток увеличивается прямо пропорционально pT-стадии ($p = 0,043$).

4. Статистически значимых различий количества T- и B-лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19 в зависимости от pT-стадии неметастатической семиномы не выявлено, со значением p-value от 0,137 до 0,575. В то время как в перитуморальной зоне зарегистрировано увеличение количества T-лимфоцитов в 2,4 раза ($p = 0,001$) прямо-пропорционально pT-стадии, при полном отсутствии B-лимфоцитов. Иммуносупрессивный маркер FOXP3 не продемонстрировал статистически значимых различий в семиноме pT1- и pT2-стадий.

5. На pT2-стадии неметастатической семиномы наблюдается повышение количества CD163 макрофагов в 3,4 раза, по сравнению с pT1-стадией ($p < 0,001$); количество CD68 макрофагов при этом не изменяется ($p = 0,423$). В перитуморальной зоне на pT1- и pT2-стадиях

и в нормальном яичке CD163 макрофаги практически отсутствуют. Количество CD68 макрофагов снижается в 4,0 раза на pT2-стадии по сравнению с pT1-стадией ($p < 0,001$), где их значение соответствует норме.

6. При мультиплексном иммуногистохимическом анализе раскрыт один из превалирующих механизмов иммуносупрессивного каскада, приводящего к опухолевой прогрессии: выявлено прямо-пропорциональное увеличение доли ко-экспрессии CD68⁺IL-10⁺ с 89,279 % до 93,041 % ($p = 0,012$) и CD68⁺CD163⁺IL-10⁺ с 86,315 % до 91,728 % ($p = 0,005$); доля CD68⁺CD163⁺ опухоль-ассоциированных макрофагов, имеющих одну и более IL-10⁺ опухолевую клетку в радиусе пространственного соседства (25 мкм), достигает 96,842 % и 98,193 % (pT1 и pT2; $p = 0,164$). В то время как данный показатель для CD68⁺ OAM регистрируется в диапазоне от 47,563 % и 58,274 % (pT1 и pT2; $p < 0,001$). Доля пространственного взаимодействия (25 мкм) иммунных и атипичных клеток, экспрессирующих TGF- β и MMP-3 возрастает с 79,184 % и 88,967 % (pT1 и pT2; $p = 0,002$), оказывая тем самым иммуносупрессивно-ремоделирующее влияние на опухолевый рост.

7. При иммуногистохимическом исследовании отмечена тенденция к увеличению плотности CD31-позитивных кровеносных сосудов в семиноме ($p = 0,152$). В совокупности с результатами мультиплексного иммуногистохимического анализа проангиогенная роль элементов иммунного микроокружения косвенно подтверждается следующими данными: доля Tryptase-позитивных тучных клеток, расположенных в пределах 50 мкм от кровеносных сосудов, достигала 99 % в обеих стадиях; доля CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов, расположенных в пределах 50 мкм от кровеносных сосудов, на pT2-стадии увеличивалась в 1,5 раза, достигая 69,852 % ($p < 0,001$).

8. В неметастатической семиноме количество Tryptase-, Chymase- и CPA3-позитивных тучных клеток снижается обратно пропорционально pT стадии от 4,29 до 10,43 раз (при p-value от 0,010 до $< 0,001$). В перитуморальной зоне pT1 наблюдается их увеличение по данным экспрессии указанных маркеров в сравнении с pT2-стадией от 2,0 до 2,7 раз ($p < 0,001$). Tryptase-, Chymase-, CPA3-позитивные тучные клетки в нормальном яичке располагаются в интерстициальной ткани, преимущественно вокруг извитых семенных канальцев.

9. При оценке влияния количества CD163 макрофагов на вероятность возникновения рецидива неметастатической семиномы выявлена средняя прогностическая ценность данного маркера, AUC = 0,64.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При патоморфологическом исследовании микропрепаратов сеиномы, особенно у пациентов группы промежуточного риска рецидива, целесообразно дополнительно применять панель иммуногистохимических антител к CD68, CD163, Tryptase, Chymase и CPA3 с

последующей количественной оценкой. Снижение маркеров тучных клеток при одновременном увеличении CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов следует рассматривать как признак более высокого риска рецидива и основание для отнесения пациента к соответствующей группе. При стратификации пациентов с семиномой после хирургического лечения врачом-онкологом, помимо параметров модели EAU 2023 (размер/RTI/LVI), следует учитывать повышение предоперационного уровня β -ХГЧ ($> 5,3$ мЕД/мл), наличие инвазии в белочную оболочку и наличие некроза опухоли. Эти признаки необходимо оценивать совместно с параметрами модели EAU 2023 (размер/RTI/LVI). При наличии одного изолированного признака либо сочетания нескольких признаков пациента следует относить к группе более высокого риска.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морфологические и лабораторные факторы, ассоциированные с риском рецидива при неметастатической семиноме pT1-pT2 стадий: ретроспективный анализ / **Щекин В.И.**, Заборский И.Н., Сафиуллин К.Н., Карякин О.Б., Каравайцева А.А., Коренева П.А., Подкидышев И.А., Бабич С.Л., Крашенинников А.А., Воробьев Н.В., Демяшкин Г.А., Шегай П.В., Каприн А.Д. // **Исследования и практика в медицине**. – 2025. – № 3. – С. 8-20. [RSCI]
2. Количественная характеристика тучных клеток в семиноме / **Щекин В.И.** // **Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины**. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 52-57.
3. Phenotypic and Spatial Characterization of Tumor-Associated Macrophages in Non-Metastatic Seminoma: Association with Local Tumor Progression // Demyashkin G.; **Shchekin V.**; Belokopytov D.; Borovaya T.; Zaborsky I.; Safiullin K.; Karyakin O.; Krasheninnikov A.; Vorobyev N.; Shegay P.; Kaprin A. // **Medical Sciences**. – 2025, 13, 129. [Scopus]
4. **Shchekin VI**, Krasheninnikov AA, Belokopytov DV, Volchenko NN, Shegay PV, Kaprin AD, Demyashkin GA. Immunophenotypic characteristics of mast cells in non-metastatic seminoma. **Russian Journal of Archive of Pathology**. 2025;87(5):46-53. [Scopus]
5. **Щекин В.И.** Прогностическая характеристика тучных клеток в неметастатической семиноме. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медицинская весна – 2025», сборник материалов. Москва. – 2025. – С. 2113-2115.
6. **Патент на изобретение № RU 2851418 C1** «Способ установления pT стадии неметастатической сеиномы» / Демяшкин Г.А., Ингель И.Э., **Щекин В.И.**, Белокопытов Д.В., Шегай П.В., Каприн А.Д. Номер заявки 2025109273; заявл. 14.04.2025; опуб.24.11.2025. **Бюл. № 33**. – 8 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФП – альфа-фетопротеин
- ГО – герминогенные опухоли
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИМТ – индекс массы тела
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТК – тучные клетки
- β-ХГЧ – бета-хорионический гонадотропин
- AUC – площадь под кривой (англ. area under the curve)
- CD – кластер дифференцировки (англ. cluster of differentiation)
- СРА3 – карбоксипептидаза А3 (англ. carboxypeptidase A3)
- CTL – цитотоксические Т-лимфоциты (англ. cytotoxic T lymphocytes)
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола (англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole)
- EMT – эпителиально-мезенхимальный переход (англ. epithelial–mesenchymal transition)
- FOXP3 – транскрипционный фактор FOXP3 (англ. forkhead box P3)
- GCNIS – герминогенная неоплазия in situ (англ. germ cell neoplasia in situ)
- IL-10 – интерлейкин-10 (англ. interleukin 10)
- Ki-67 – маркер пролиферативной активности (англ. Ki-67 antigen)
- LVI – лимфоваскулярная инвазия (англ. lymphovascular invasion)
- MMP-3 – матриксная металлопротеиназа-3 (англ. matrix metalloproteinase-3)
- NF-κB – ядерный фактор κB (англ. nuclear factor kappa B)
- OCT3/4 – октамер-связывающий транскрипционный фактор 3/4 (англ. octamer-binding transcription factor 3/4)
- PAR – протеаз-активируемые рецепторы (англ. protease-activated receptors)
- PLAP – плацентарная щелочная фосфатаза (англ. placental alkaline phosphatase)
- pTNM – патоморфологическая классификация по системе TNM (англ. pathologic tumor–node–metastasis staging system)
- RTI – инвазия сети яичка (англ. rete testis invasion)
- STROBE – рекомендации по представлению результатов наблюдательных исследований (англ. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology)
- TGF-β – трансформирующий фактор роста β (англ. transforming growth factor beta)
- Treg – регуляторные Т-лимфоциты (англ. regulatory T cells)