

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Натальи Викторовны Низяевой на диссертационную работу Щекина Владимира Ивановича на тему «Взаимодействие элементов микроокружения и опухолевых клеток в неметастатической семиноме; прогностическое значение», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 1.5.23. Биология развития, эмбриология; 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Актуальность избранной темы

Герминогенные опухоли остаются наиболее частыми злокачественными новообразованиями у мужчин молодого возраста. Несмотря на высокую эффективность лечения и благоприятную 5-летнюю выживаемость, у пациентов с семиномой I стадии сохраняется риск рецидива (до 15 %), что делает актуальным поиск дополнительных прогностических факторов.

В работе обоснованно подчёркивается значение эмбрионального этапа в патогенезе сеиномы, когда первичные половые клетки могут прекращать нормальную дифференцировку, сохранять эмбриональные антигены (PLAP, OCT3/4, CD117) и длительно находиться в латентном состоянии, а их последующая реактивация, вероятно, связана с гормональными изменениями пубертата. Такой подход корректно связывает нарушения биологии развития яичка и сперматогенных клеток с появлением герминогенной неоплазии *in situ*. В период данной трансформации особая роль принадлежит количественным и качественным изменениям со стороны элементов микроокружения. В связи с этим автор аргументированно выбирает в качестве ключевого объекта анализа тканевое опухолевое микроокружение, включая иммунный компонент, сосудистое русло и продуценты экстрацеллюлярного матрикса. В контексте данных литературы о значении Т-клеточного инфильтрата и варибельной роли CD4/FOXP3 Treg особый интерес представляет количественно-пространственное изучение макрофагов и их фенотипов (CD68, CD163 и др.), а также оценка тучных клеток, потенциально вовлечённых в ремоделирование матрикса и регуляцию тканевого гомеостаза.

Не менее важным является сопоставление сперматогенеза в норме и перитуморальной зоне, а также оценка его неопластической трансформации в сеиноме.

Разрозненность и противоречивость морфологических данных об элементах тканевого опухолевого микроокружения при герминогенной неоплазии *in situ*

актуализирует необходимость комплексного исследования, направленного не только для решения фундаментальной задачи биологии развития, но и имеющей важное практическое значение для онкологии.

Таким образом, диссертационная работа Щекина Владимира Ивановича является актуальной и представляет научный интерес и несет важную теоретическую и практическую значимость.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой 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 мультиплексный), 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. Используются: тест Шапиро–Уилка; среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$); медиана и межквартильный интервал ($Me [Q1 - Q3]$); t-критерий Стьюдента; U-критерий Манна–Уитни; критерий χ^2 Пирсона; формат – группа риска \times бинарный признак «да/нет»; отношение шансов с 95 % доверительным интервалом, рассчитанное методом логистической регрессии. Все проверки – двусторонние; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

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

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

На основании проведенного сравнительного морфологического анализа сперматогенеза и его микроокружения, тканевого 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.

Впервые показано, что увеличение экспрессии NF-κB в иммунных и атипичных клетках семиномы влияет на интенсивность митотического деления этих клеток, приводит к усилению воспалительной реакции и ангиогенезу, ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса. В нормальном яичке иммуномечение на NF-κB наблюдается преимущественно в сустентоцитах 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 мизерной, что, по-видимому, влияет на благоприятный прогноз. Автором впервые показано, что элементы тканевого иммунного микроокружения способствуют фенотипической пластичности макрофагов. 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. Также впервые 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.

Впервые установлено, что количество Tryptase-, Chymase- и СРАЗ-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. В ходе исследования выявлено 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. Также, 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.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Значимость для науки диссертационной работы В.И. Щекина 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.

Автором внесен существенный теоретический вклад в понимание биологии развития опухолевого микроокружения нематастатической 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.

Диссертационное исследование открывает широкие перспективы для развития персонализированной противоопухолевой терапии, например в иммунологическом аспекте, основываясь на раскрытых механизмах опухолевой прогрессии.

Таким образом, в результате проведенного диссертационного исследования, В.И. Щекиным решена актуальная научная задача – выявлены морфологические изменения элементов опухолевого микроокружения, их взаимодействие с атипичными герминогенными клетками нематастатической 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация на тему «Взаимодействие элементов микроокружения и опухолевых клеток в нематастатической 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 и пункту 2 паспорта научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Полнота освещения результатов диссертации в печати. Количество публикаций в журналах Перечня ВАК РФ и индексируемых в международных базах данных

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.

Оценка содержания работы, ее завершенности в целом

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.

Во введении автор подчеркивает актуальность темы диссертации и степень ее разработанности, формулирует цель и задачи, показывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, представляет основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе, которая содержит обзор литературы о современном состоянии проблемы, автор приводит данные о роли эмбриональных факторов в развитии семиномы и о формировании локального тканевого микроокружения в семиноме и при других солидных опухолях, акцентирует внимание на потенциальных прогностических маркерах. В заключении главы автор объединяет в логическую конструкцию результаты других исследований и подчеркивает необходимость более детального анализа элементов иммунного микроокружения семиномы, ввиду

перспектив их использования в качестве мишеней для таргетной терапии и прогностических признаков.

Во второй главе, которая традиционно посвящена материалам и методам исследования, автором приводится комплекс современных методик с подробным их описанием. Отдельно следует подчеркнуть современность выбранных методик, в частности – мультиплексного иммуногистохимического исследования с флюоресцентной микроскопией, позволяющего провести пространственный анализ элементов тканевого микроокружения, взаимодействие клеток различного генеза, оценить внутриклеточные сигналы и протеомику при нормальном сперматогенезе, в перитуморальной зоне и на начальных стадиях герминальной неоплазии – семиномы.

Далее следует глава, посвященная собственным результатам, где автор проводит параллели с эмбриональным периодом развития яичка, подростковым периодом онтогенеза – манифестации сперматогенеза, подчёркивает иммунопривилегированность органа, и, главное, акцентирует внимание на нарушении дифференцировки сперматогенных клеток, которое создаёт предпосылки к герминогенной неоплазии *in situ*. При комплексном анализе элементов опухолевого микроокружения в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий выявлен ряд закономерностей, подчеркивающих особый иммунный статус яичка.

В диссертационном исследовании автором охарактеризована роль различных интратестикулярных регуляторов в сравнении с нормальным яичком, перитуморальной зоной и семиномой. Так, описан жизненный цикл сперматогенных клеток (маркеры – Ki-67, NF-κB; TUNEL-метод), степень васкуляризации (CD34) и состояние компонентов гемато-тестикулярного барьера (CD34, α-SMA); продемонстрировано изменение количества субпопуляций T- и B-лимфоцитов – CD3, CD4, CD8, FOXP3 Treg и CD19 в указанных условиях. При фенотипическом и пространственном анализе автор повествует о клеточной пластичности макрофагов, проявляющейся увеличением численности CD163 OAM в семиноме pT2-стадии по сравнению с pT1, а также о пространственной зависимости со-локализации CD163⁺IL-10⁺ и TGF-β⁺. При мультиплексном иммуногистохимическом анализе триптаза, химаза и карбоксипептидаза A3, локализованные в гранулах секретома ТК, отражают их многопрофильные эффекторные и регуляторные функции в

поддержании гомеостаза, иммунных и тканевых реакций, а также обратно-пропорциональное снижение количества изучаемых маркеров при семиноме.

В главе «Обсуждение полученных результатов» автор сопоставляет данные своего диссертационного исследования с имеющимся малым количеством работ других учёных по заявленной проблеме. Особый интерес вызывает рубрика «Эмбриональный фактор в развитии герминальной неоплазии», где автор обсуждает различные этапы нормального и патологического сперматогенеза, начиная с закладки первичных половых клеток в эпибласте, дифференцировки и взаимодействия с элементами микроокружения, влияния различных факторов (OCT3/4, PLAP, NANOG, SOX2 и др.), до морфологических предпосылок развития герминальной неоплазии. В других рубриках автор также критично анализирует и сопоставляет полученные и имеющиеся в специализированной литературе результаты с раскрытием механизмов внутригонадной регуляции сперматогенеза, анализируя роль NF-κB, CD3, CD4, CD8, FOXP3 Treg, CD19, CD68, CD163, IL-10, TGF-β, Trypsin, Chymase и CPA3.

В заключении автор подытоживает результаты проведенной научной работы, где абсолютно справедливо подчёркивает многогранный характер заявленной проблемы, решение которой находится на стыке нескольких фундаментальных дисциплин (патологическая анатомия, клеточная биология). При этом он обоснованно подчёркивает значимость поддержания иммунопривилегированности и целостности межклеточных коммуникаций, рассматривая их как ключевые условия нормы (в биологии развития, эмбриологии). Их срыв, напротив, является ключом к опухолевому росту — семиноме (патобиологии развития яичка).

Таким образом, диссертационная работа Щекина Владимира Ивановича отличается логичностью, целостностью и последовательным изложением материала, четкостью и ясностью формулировок цели, задач и положений, выносимых на защиту. Работа выполнена профессионально, методически грамотно подана с большим количеством высококачественного иллюстративного материала. Заключение и выводы, представленные по итогам проведенного комплексного исследования, соответствуют поставленной цели и задачам.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат диссертационной работы полностью соответствует рукописи диссертации. В автореферате отражены ключевые результаты исследования, доказывающие выносимые на защиту положения. Приведены иллюстративные материалы по результатам всех использованных автором методов исследования, а также предоставлены важнейшие результаты статистического анализа.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация В.И. Щекина не вызвала принципиальных замечаний.

В ходе изучения диссертационной работы возникли следующие вопросы:

1) Уточните, как Вы дифференцировали тучные клетки от атипичных сперматогенных и опухолевых клеток при использовании CD117, учитывая его позитивность и в тучных клетках. Достаточно ли было триптазы, химазы и СРА3 как подтверждающих маркёров, или применялись дополнительные окраски/маркёры и морфологические критерии? Как Вы объясните обратную взаимосвязь количества тучных клеток со стадийностью опухоли?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Щекина Владимира Ивановича на тему: «Взаимодействие элементов микроокружения и опухолевых клеток в метастатической семиноме; прогностическое значение» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи современной медицинской науки – выявлены наиболее важные количественные изменения элементов микроокружения и особенности их взаимодействия с неопластическими клетками в метастатической семиноме, имеющей существенное значение для 1.5.23. Биология развития, эмбриология (медицинской науки) и 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинской науки).

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов представленная диссертация полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном

