

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

Демяшкин Григорий Александрович

кандидат медицинских наук,

Шегай Петр Викторович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Клинико-эпидемиологическая характеристика семиномы	21
1.2. От нарушений пренатального онтогенеза к развитию семиномы	22
1.3. Роль лабораторных и морфологических исследования в диагностике и прогнозировании семиномы	25
1.4. Элементы иммунного микроокружения и их роль в прогрессии семиномы... ..	27
1.5. Стромально-сосудистый компонент и элементы гемато-тестикулярного барьера	28
1.6. Баланс пролиферации и гибели сперматогенных клеток	30
1.7. Роль NF-κB в регуляции апоптоза и воспаления: от гомеостаза яичка к канцерогенезу.....	31
1.8. CD31+ кровеносные сосуды, влияние элементов микроокружения на ангиогенез.....	33
1.9. Лимфоцитарный иммунный ландшафт: субпопуляции, баланс эффекторных и регуляторных клеток.....	34
1.10. Опухоль-ассоциированные макрофаги при семиноме.....	36
1.11. Иммуносупрессивные и проинвазивные медиаторы семиномы: TGF-β, IL-10 и MMP-3	38
1.12. Иммунофенотипическая характеристика тучных клеток.....	40
1.13. Заключение по обзору литературы	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Общая характеристика исследования	46
2.2. Методы исследования	48
2.2.1. Анализ медицинской документации.....	48
2.2.2. Гистологическое исследование	50
2.2.3. Гистохимическое исследование	50
2.2.4. Иммуногистохимическое исследование.....	51

2.2.5. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование	53
2.2.6. Анализ двуцепочечных разрывов ДНК	59
2.2.7. Морфометрическое исследование	59
2.2.8. Статистические методы	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.1. Морфологическое исследование нормального яичка и перитуморальной зоны – основа для понимания канцерогенеза семиномы.....	63
3.2. Иммуногистохимическая оценка стромально-сосудистого компонента и состояния гемато-тестикулярного барьера перитуморальной зоны и нормального яичка.....	66
3.3. Оценка пролиферации и гибели сперматогенного эпителия перитуморальной зоны и нормального яичка.....	69
3.4. Оценка фактора NF-κB в перитуморальной зоне и нормальном яичке	71
3.5. Оценка распределения CD31-позитивных кровеносных сосудов в перитуморальной зоне и нормальном яичке	72
3.6. Анализ лимфоцитарного инфильтрата в перитуморальной зоне и нормальном яичке.....	73
3.7. Фенотипическая характеристика макрофагов в перитуморальной зоне и нормальном яичке.....	78
3.8. Иммунофенотипический профиль тучных клеток и их проангиогенная роль в перитуморальной зоне и нормальном яичке	81
3.8.1. Комбинация маркеров Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP (мультиплексное иммуномечение)	84
3.8.2. Комбинация маркеров Tryptase+CD31 (диплексное иммуномечение)	84
3.9. Клиническая характеристика пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий	96
3.10. Гистологическое исследование неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий	99
3.11. Ассоциация клиничко-морфологических параметров и групп риска рецидива	104

3.12. α -SMA+ и CD34+ клетки в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий.....	108
3.13. Оценка пролиферации и гибели опухолевых клеток неметастатической сеиномы pT1- и pT2-стадий	110
3.14. Оценка фактора NF- κ B в неметастатической сеиномы pT1- и pT2-стадий.....	111
3.15. Оценка CD31-позитивных кровеносных сосудов в неметастатической сеиномы pT1- и pT2-стадий	113
3.16. Анализ лимфоцитарного инфильтрата неметастатической сеиномы pT1- и pT2-стадий.....	114
3.16.1. Комбинация маркеров CD4+CD8+FOXP3 (триплексное иммуномечение)	118
3.17. Фенотипическая и пространственная характеристика опухоль-ассоциированных макрофагов в неметастатической сеиноме pT1- и pT2-стадий.....	121
3.18. Оценка роли опухоль-ассоциированных макрофагов в формировании иммуносупрессивного микроокружения неметастатической сеиномы pT1- и pT2-стадий.....	128
3.18.1. Комбинация маркеров CD68+CD163+CD117 (триплексное иммуномечение)	129
3.18.2. Комбинация CD163+CD31 (диплексное иммуномечение).....	130
3.18.3. Комбинация маркеров CD68+CD163+IL-10 (триплексное иммуномечение)	130
3.18.4. Комбинация TGF- β +MMP-3 (диплексное иммуномечение).....	131
3.19. Оценка прогностической значимости CD163 макрофагов.....	141
3.20. Иммунофенотипический профиль тучных клеток и их проангиогенная роль в неметастатической сеиноме pT1- и pT2-стадий.....	142
3.20.1. Комбинация маркеров Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP (мультиплексное иммуномечение)	148
3.20.2. Комбинация маркеров Tryptase+CD31 (диплексное иммуномечение)	148

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	153
4.1. Эмбриональный фактор в развитии герминальной неоплазии	153
4.2. Пролиферативная активность: норма, перитуморальная зона и семинома ...	159
4.3. Двухпочечные разрывы ДНК: норма, перитуморальная зона и семинома..	160
4.4. Фактор NF-κB: норма, перитуморальная зона и семинома.....	162
4.5. Васкуляризация: норма, перитуморальная зона и семинома	163
4.6. Стромально-сосудистый компонент и элементы гемато-тестикулярного барьера: норма, перитуморальная зона и семинома.....	165
4.7. Лимфоциты: норма, перитуморальная зона и семинома	166
4.8. Макрофаги: норма, перитуморальная зона и семинома	169
4.9. Иммуносупрессивные медиаторы: норма, перитуморальная зона и семинома.....	172
4.10. Тучные клетки: норма, перитуморальная зона и семинома	174
4.11. Итог выполненной работы.....	176
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	179
ВЫВОДЫ	181
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	184
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	185
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	187
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	206

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Герминогенные опухоли (ГО) – наиболее частые злокачественные новообразования у мужчин с пиком заболеваемости в 35 – 40 лет. На долю семиномы приходится 50 – 60 % случаев ГО [3]. Она характеризуется высокой чувствительностью к лечению и высокими показателями общей 5-летней выживаемости; однако у 15 % больных с неметастатической семиномой регистрируется рецидив заболевания. Согласно pTNM-системе, неметастатическая семинома включает в себя IA, IB, IS, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC стадии опухолевого роста [8].

Предпосылки к возникновению ГО формируются задолго до появления герминогенной неоплазии *in situ* (англ. Germ cell neoplasia *in situ*, GCNIS) – еще в антенатальном периоде онтогенеза [48, 83]. Часть мигрирующих первичных половых клеток, заселяющих зачаток гонады (гоноциты), может «задерживаться в незрелом состоянии» и становиться источником развития GCNIS [49, 142, 146]. 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 [58].

Прогноз у пациентов с семиномой, особенно при локализованной форме, как правило, благоприятный и определяется рядом клинических и морфологических критериев. В первую очередь – это отсутствие метастатического поражения и нормальный дооперационный уровень АФП. Вместе с тем актуальной задачей остается поиск дополнительных факторов риска рецидива. В этом направлении перспективным представляется анализ количественно-качественных

характеристик элементов микроокружения и опухолевых клеток, а также состояние питающих опухоль кровеносных сосудов и тканевого матрикса стромы [8, 9, 106].

Известно, что в условиях неоплазии возрастает количество Tregs и, в частности CD8 лимфоцитов, обладающих противоопухолевыми свойствами. Однако количественно-пространственные сравнения CD4/CD8/CD19 в норме, в перитуморальной зоне и на pT1- и pT2-стадии семиномы ранее не проводились. Вместе с тем, по данным ряда исследований – высокая инфильтрация CD3+/CD8+ ассоциирована с лучшей выживаемостью при большинстве солидных опухолей, тогда как роль CD4/FOXP3 Treg варьирует в зависимости от локализации [54, 114].

Особый интерес представляет количественно-пространственный сравнительный анализ макрофагов и их фенотипических особенностей (CD68, CD163, CD206, CD86, iNOS) в опухоли и ее перитуморальной зоне. По данным мета-анализов высокая плотность CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) связана с неблагоприятным прогнозом и более высоким метастатическим потенциалом при ряде солидных опухолей [96]. В единичных исследованиях ОАМ при ГО выявлена их склонность к проявлению клеточной пластичности [99], 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 [75]. Взаимоотношение ТК с атипичными клетками напрямую зависит от их типа, который определяется химическим составом медиаторов секретома: 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 ТК способствуют деградации межклеточных контактов и стимуляции ангиогенеза [74, 103, 139]. Поэтому не исключено, что угнетение этих механизмов в семиноме, в зависимости от ее стадии, также может иметь

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.

Бесспорно, что в развитии любой неоплазии (в том числе – семиномы) ключевую роль играет состояние локального иммунного процесса, разыгрывающегося в самой опухоли, так и в перитуморальной зоне: ее структурные элементы способны либо сдерживать распространение опухоли, либо способствовать ее прогрессии [13, 32, 114].

Известно, что в физиологическом морфогенезе семенных канальцев важнейшая роль принадлежит взаимоотношению первичных половых клеток с клетками микроокружения, в первую очередь – с сустентоцитами. При формировании условий опухолевого роста для «отклонившихся от заданного курса развития» первичных половых клеток элементы микроокружения также могут иметь потенциально важное значение, поскольку способны участвовать в инициации их неконтролируемого размножения и нарушении дифференцировки [11, 117, 118].

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 [94].

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 [108].

Лишь в одной научной работе авторы охарактеризовали CD68 и CD163 макрофаги, однако, обобщая при этом все ГО без акцентирования на неметастатическую семиному, исследование не содержало сравнительного анализа между стадиями заболевания [114].

Данные о роли тучных клеток при семиноме ограничиваются лишь *in-vitro* исследованием, демонстрирующим активацию рецептора PAR-2 под влиянием триптазы [82]. Индукционный механизм, запускающийся триптаза-позитивными тучными клетками, способствует поддержанию ключевых признаков злокачественного фенотипа, таких как пролиферация, инвазия и неоангиогенез [111].

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 адьювантной терапией еще более точным, снизив долю неоправданной эскалации лечения и оптимизируя интенсивность последующего мониторинга.

Цели и задачи исследования

Цель исследования – выявление взаимодействий элементов микроокружения и неопластических клеток в нематастатической 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 клиничко-морфологический анализ пациентов с нематастатической сеиномой pT1- и pT2-стадий, выявить ассоциации с риском рецидива.

3. Проанализировать митотическую активность (Ki-67), гибель (TUNEL-метод), роль транскрипционного фактора NF-κB 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 сеиноме 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 сеиномы 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.

Впервые показано увеличение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB в миелоидных клетках (лимфоцитах, макрофагах) и атипичных клетках семиномы: с одной стороны, это влияет на интенсивность митотического деления этих клеток (Ki-67↑), с другой стороны – приводит к усилению воспалительной реакции и ангиогенезу (CD31↑), а также ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса (MMP-3↑). Данная активация NF-κB в опухоли и ее микроокружении способствует инвазии и прогрессии. В нормальном яичке иммуномечение на NF-κB наблюдается преимущественно в sustentоцитах и в меньшей степени в сперматогенных клетках и интерстициальных эндокриноцитах.

Впервые 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.

Впервые показано, что иммунное микроокружение семиномы способствует фенотипической пластичности опухоль-ассоциированных макрофагов в проопухолевый/противовоспалительный подтип (CD163[↑]): 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.

Впервые 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.

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.

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.

Впервые 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 сустенгоцитов 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 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.

Практическая значимость работы заключается в дополнении существующих критериев стратификации на группы риска рецидива пациентов с нематастатической 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- κ B 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 научных специальностей

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 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) ФГАОУ ВО «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 нематастатической 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 источника, из которых 12 отечественных, 134 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Современные клинико-морфологические данные подчеркивают уникальность клеточного состава иммунного микроокружения семиномы по сравнению с другими герминогенными опухолями, а также указывают на недостаточность существующих стратификационных критериев факторов риска для обоснованного назначения адъювантной химиотерапии отдельной когорте пациентов.

В этой связи изучение элементов опухолевого микроокружения и их роли в прогрессии нематастатической семиномы pT1-pT2 стадий представляется исключительно актуальным. Требуется более детальный анализ индукционных межклеточных взаимодействий, клеточно-тканевой организации и пластичности компонентов локального иммунного микроокружения, что может способствовать уточнению прогностических критериев и персонализации терапии.

1.1. Клинико-эпидемиологическая характеристика семиномы

Герминогенные опухоли (ГО) яичка, к которым относится семинома, являются наиболее распространенными злокачественными новообразованиями у мужчин молодого возраста. Семинома составляет ~ 50 – 60 % всех ГО, а пик заболеваемости регистрируется в 35 – 40 лет. Несмотря на низкую общую заболеваемость (около 7 – 10 случаев на 100 тыс. мужчин), в последние десятилетия отмечается рост числа случаев, особенно в индустриально развитых странах [3]. Семинома характеризуется высокой чувствительностью к лечению и благоприятным прогнозом: ~ 80 % пациентов с I стадией заболевания достигают стойкой ремиссии, а общая 5-летняя выживаемость достигает 95 – 99 %. Тем не менее, у ~ 15 % больных после хирургического лечения регистрируется рецидив заболевания, как правило в первые 2 года [8]. Таким образом, несмотря на благоприятный прогноз, существует когорта пациентов с семиномой, у которых исход заболевания менее благоприятен.

1.2. От нарушений пренатального онтогенеза к развитию семиномы

Понимание нормального эмбрионального развития яичка и дифференцировки примордиальных половых клеток имеет принципиальное значение для раскрытия механизмов формирования ГО. Нарушения ранних этапов закладки и созревания гонады, ведущие к сохранению эмбрионального фенотипа половых клеток и изменению их микроокружения, рассматриваются как ключевой патогенетический фон для возникновения герминогенной неоплазии *in situ* (англ. Germ cell neoplasia *in situ*, GCNIS) и последующей малигнизации [48, 83].

Развитие яичка начинается в составе полового гребня. Кратковременная экспрессия SRY инициирует SOX9-зависимую дифференцировку sustentоцитов, формирование семенных тяжей и подавление овариальной программы (WNT4/RSP01). Секретируемые sustentоцитами факторы DHH и FGF9 координируют рекрутирование перитубулярных миоидных клеток и организацию семенных тяжей, закладывая архитектуру будущих семенных канальцев [49, 142, 146].

Параллельно примордиальные половые клетки мигрируют к зачатку гонады и проходят фазу глобальной эпигенетической перестройки – геномного деметилирования и ремоделирования хроматина; после колонизации гонады они пролиферируют как первичные половые клетки и сохраняются в мейотическом покое до пубертатного периода [42]. В условиях нормального развития sustentоциты формируют специализированную «нишу», обеспечивая переход примордиальных половых клеток в сперматогонию и последующую инициацию сперматогенеза. При их неполной дифференцировке или функциональной несостоятельности формируется дисгенетическое микроокружение канальцев, в котором часть герминативных клеток персистирует с эмбриональным фенотипом и экспрессией онкофетальных маркеров. Данное состояние рассматривается как ключевое звено формирования герминогенной неоплазии *in situ* и последующего развития ГО [11, 117, 118]. По мере созревания sustentоцитов формируется гемато-тестикулярный барьер, разделяющий базальный и адлюминальный компартменты;

его целостность является необходимым условием нормального сперматогенеза. В пубертатном периоде завершается морфогенез канальцев, активируется сперматогенез и устанавливается функциональная зрелость яичка, зависящая от согласованного взаимодействия соматических и сперматогенных клеток, стромального компонента и эндокринной регуляции [49, 117].

Таким образом, ключевые факторы риска развития ГО – крипторхизм (включая случаи после орхипексии), нарушения развития гонады, синдром Клайнфельтера и другие варианты нарушений полового развития – формируются уже на этапе пренатального онтогенеза и связаны с нарушением созревания примордиальных половых клеток; дополнительный вклад вносит наследственная предрасположенность [117, 118]. На молекулярном уровне семинома характеризуется типичной цитогенетической аномалией – изохромосомой 12p, выявляемой более чем у 80 % больных и рассматриваемой как предрасполагающий фактор развития ГО [83, 112, 126]. Изохромосома 12p обогащена генами плюрипотентности и пролиферации (в том числе NANOG, DPPA3), что способствует малигнизации герминогенной неоплазии *in situ*, из которой в большинстве случаев развивается семинома [48, 83].

Важным драйверным механизмом возникновения семиномы являются активирующие мутации гена *KIT*, кодирующего рецептор стволовых клеток c-KIT: по данным молекулярно-генетических исследований, они выявляются приблизительно у 18 – 25 % пациентов и приводят к конститутивной активации сигнального каскада Ras/Raf/MEK/ERK, усиливая пролиферацию опухолевых клеток [46, 76, 101]. Реже обнаруживаются мутации в генах семейства *RAS* и компонентах пути PI3K/AKT, обеспечивающие альтернативные драйверные сигналы опухолевой прогрессии [53, 77, 101].

Эмбриональные антигены, экспрессируемые клетками семиномы, отражают ее происхождение от примордиальных половых клеток и формируют характерный профиль иммуногистохимических маркеров. Плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP) – мембранный фермент трофобласта плаценты, который гиперэкспрессируется опухолевыми клетками и широко используется как

высококчувствительный иммуногистохимический маркер ГО [84]. Иммуногистохимическое исследование с антителами к PLAP используют преимущественно как диагностический метод, демонстрирующий сохранение эмбрионального, недифференцированного фенотипа половых клеток, а не как самостоятельный драйвер опухолевой трансформации.

Ключевым транскрипционным фактором плюрипотентности при ГО является OCT3/4, стабильно экспрессирующийся в карциноме *in situ*, семиноме и эмбриональной карциноме, поддерживая плюрипотентный и недифференцированный статус опухолевых клеток. В норме его экспрессия ограничена эмбриональными стволовыми и примордиальными половыми клетками, тогда как в дифференцированном сперматогенном эпителии OCT3/4 не выявляется [84].

Важно, что эмбриональные маркеры относятся к онкофетальным, то есть иммунологически «собственным» антигенам: в пренатальном онтогенезе при формировании яичка они экспрессируются примордиальными половыми клетками и, соответственно, в последующем не распознаются иммунной системой как чужеродные. Это приводит к формированию иммунной толерантности и обуславливает относительно низкую эффективность Т-клеточного противоопухолевого ответа [49, 78]. Для ряда факторов плюрипотентности доказана прямая роль в иммунном ускользании: так, NANOG формирует транскрипционный профиль, снижающий чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическому воздействию NK-клеток [142]. Это согласуется с современными представлениями о том, что ГО сочетают выраженную иммунную инфильтрацию с различными механизмами иммунной регуляции, а особенности эмбрионального фенотипа опухолевых клеток являются одним из ключевых элементов их взаимодействия с компонентами иммунного микроокружения [58].

В совокупности семинома представляет собой опухоль, сохраняющую фенотип примордиальных половых клеток: ее иммуногистохимический профиль с экспрессией эмбриональных транскрипционных факторов (OCT3/4, SALL4, NANOG) и плацентарной щелочной фосфатазы (PLAP) не только подтверждает

герминогенное происхождение, но и объясняет механизмы иммунного ускользания, что делает изучение ее иммунного микроокружения особенно актуальным [58, 84].

1.3. Роль лабораторных и морфологических исследования в диагностике и прогнозировании семиномы

На амбулаторном этапе диагностики пациентов с подозрением на ГО яичка, помимо комплекса инструментальных исследований, обязательным является определение сывороточных опухолевых маркеров – альфа-фетопротеина (АФП), бета-хорионического гонадотропина (β -ХГЧ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Согласно клиническим рекомендациям, эти показатели необходимо оценивать до орхифуникулэктомии и в динамике лечения, поскольку они имеют как диагностическое, так и прогностическое значение [6, 8, 9, 40, 106].

АФП является секреторным продуктом опухолей желточного мешка и доли эмбриональных карцином, а при семиноме не повышается. Поэтому клинически значимая гиперпродукция АФП у пациента с морфологически верифицированной семиномой трактуется как признак наличия несеминозного компонента и служит основанием для переклассифицирования процесса в ГО несеминозного типа или смешанную опухоль [40, 35, 107, 119]. Напротив, умеренное повышение β -ХГЧ при семиноме допустимо за счет очагов синцитиотрофобластических гигантских клеток; по данным различных исследований, его повышение регистрируется примерно у 20 – 30 % пациентов с семиномой [19, 35]. При этом уровень β -ХГЧ отражает преимущественно общий размер опухоли и наличие метастатического поражения, а не принципиально отличительную биологию опухоли: в проспективных когортах β -ХГЧ-позитивные и β -ХГЧ-негативные сеиномы демонстрировали сопоставимую выживаемость при проведении стандартной терапии [51, 107].

ЛДГ рассматривается как неспецифический маркер, уровень которого зависит от размера опухоли и тканевой деструкции; его повышение чаще

наблюдается при распространенных стадиях и включено в систему S-стадирования как один из критериев неблагоприятного прогноза заболевания [106]. В совокупности чувствительность классических сывороточных маркеров (АФП, β -ХГЧ, ЛДГ) при семиноме ограничена (не превышает 40 – 50 %), что подчеркивает необходимость их интерпретации в сочетании с данными морфологического исследования [35, 106, 107].

Стандартом лечения неметастатической семиномы является радикальная орхифуникулэктомия с последующим патоморфологическим исследованием опухолевого материала. По результатам морфологической оценки выполняют стадирование по системе рTNM с учетом инвазии в кровеносные и лимфатические сосуды, вовлечения регионарных лимфатических узлов и уровня опухолевых маркеров. На следующем этапе, в соответствии с действующими клиническими рекомендациями, пациентов стратифицируют на три группы риска рецидива (низкий, промежуточный, высокий), что определяет тактику наблюдения или необходимость адъювантной терапии [8, 9, 40, 106].

Помимо классической семиномы выделяют ее атипичные морфологические варианты. Прежде всего, к ним относят анапластическую семиному, характеризующуюся более высоким митотическим индексом, выраженной ядерной атипией и нередко скудным лимфоидным инфильтратом. Однако в ретроспективных исследованиях показано, что анапластический вариант не демонстрирует худших показателей выживаемости по сравнению с классической семиномой; поэтому в современных руководствах он рассматривается как морфологический подтип без самостоятельного прогностического статуса [40].

Одним из атипичных вариантов является семинома с синцитиотрофобластическим компонентом: эти опухоли морфологически схожи с классической семиномой, но содержат гигантские синцитиотрофобластические клетки и, как правило, сопровождаются повышением β -ХГЧ [19].

1.4. Элементы иммунного микроокружения и их роль в прогрессии семиномы

Семинома формируется в исходно иммунопривилегированном органе, в котором в норме функционирует сложная система протекции сперматогенного эпителия от аутоиммунных реакций [2]. На этом фоне особенно показательно, что для семиномы, в отличие от большинства других солидных опухолей и несеминозных ГО, характерно выраженное воспалительное микроокружение с богатым Т-клеточным инфильтратом [13, 57, 114]. Поэтому изучение клеточного состава и функционального состояния опухолевого микроокружения семиномы приобретает ключевое значение для понимания ее биологии и причин различий клинического течения по сравнению с другими ГО.

Микроокружение семиномы включает инфильтрирующие иммунные клетки (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, тучные клетки и др.), стромальные элементы (фибробласты, миофибробласты, перициты), кровеносные сосуды и экстрацеллюлярный матрикс. Между опухолевыми клетками и элементами микроокружения реализуются двунаправленные сигнальные взаимодействия: семинома выделяет цитокины, факторы роста и протеазы, которые ремоделируют стромальный компонент, стимулируют ангиогенез и могут подавлять противоопухолевый иммунитет; в ответ клетки микроокружения модулируют пролиферацию, инвазию и выживание опухолевых клеток [13, 57]. Для семиномы описан высокоиммуногенный фенотип: в большинстве случаев выявляется значительное количество различных типов иммунных клеток [114].

Особый интерес представляет перитуморальная зона – область, которая способна как ограничивать опухолевую прогрессию, так и, напротив ей способствовать. Сопоставление экспрессии исследуемых маркеров в перитуморальной зоне и в нормальном яичке позволит выявить механизмы клеточно-тканевой перестройки и их роль в опухолевой прогрессии [32].

1.5. Стромально-сосудистый компонент и элементы гемато-тестикулярного барьера

Особый интерес в контексте опухолевого микроокружения семиномы представляет анализ стромально-сосудистого компонента, в котором ключевую роль играют маркеры CD34 и α -SMA, отражающие архитектуру «каркаса» опухоли и перитуморальной зоны.

CD34 – трансмембранный сиаломуциновый гликопротеин, классически рассматриваемый как маркер гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, но также экспрессируемый эндотелием, интерстициальными стромальными клетками и рядом опухолевых стволовых клеток. Его экспрессия визуализирует как сосудистый, так и стромальный компонент ткани и ассоциирована с процессами пролиферации, миграции и адгезии клеток. В нормальном яичке CD34 экспрессируется, прежде всего, эндотелием микрососудов и интерстициальными стромальными клетками, формирующими периваскулярную и перитубулярную сеть, тогда как α -SMA+ перитубулярные и периваскулярные миофибробласты в основном CD34-негативны, что подчеркивает функциональное разделение этих популяций [107, 131].

Современные исследования трактуют CD34+ стромальные клетки яичка преимущественно как телоциты: они образуют разветвленные сети с длинными телоподиями, контактируют с клетками Лейдига, перитубулярными миоидными клетками и эндотелием, а также участвуют в поддержании структурной организации интерстиция [93, 107, 116, 131]. Экспериментальные работы на 3D-моделях регенерации семенных канальцев демонстрируют, что CD34+ клетки формируют каркас для реконструкции интерстиция и тесно взаимодействуют с клетками Лейдига, тогда как инактивация взаимодействия CD34+ клеток с VCAM1 нарушает формирование упорядоченной структуры канальцев и интерстициальной ткани [145].

В онкоморфологической практике CD34 широко используется для оценки микрососудистой плотности. При ряде солидных опухолей (колоректальный рак,

опухоли головы и шеи и др.) высокая CD34-позитивная микрососудистая плотность коррелирует с большим размером опухоли, инвазией в кровеносные сосуды и неблагоприятным прогнозом [144]. Для ГО данные ограничены: в исследовании X. Lu и соавт. Показано, что по мере прогрессии семиномы возрастает относительная площадь экспрессии CD31/CD34 и микрососудистая плотность [108].

Практически отсутствуют работы, в которых CD34 анализировался бы как маркер стромальных CD34+ клеток/телоцитов в перитуморальной зоне семиномы. Для колоректального рака показано, что в перитуморальной зоне преобладают CD34+ стромальные фибробласты, тогда как в опухолевой строме они утрачивают CD34 и приобретают α -SMA+ миофибробластный фенотип [113, 144]. Можно предположить аналогичный сдвиг от CD34+ стромальных клеток к α -SMA+ миофибробластам при прогрессии семиномы; однако прямые данные, особенно с учетом pT-стадий и сравнением опухоли с перитуморальной зоны отсутствуют.

α -SMA (α -smooth muscle actin) – изоформа актина, характерная для гладкомышечных клеток сосудов, перицитов, перитубулярных миоидных клеток и миофибробластов. В морфологической практике α -SMA служит основным маркером гладкомышечных и миофибробластных элементов стромы, а в онкоиммунологии – одним из ключевых маркеров опухоль-ассоциированных фибробластов (CAF), участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса и формировании инвазивного фенотипа опухоли. В нормальном яичке α -SMA экспрессируется в перитубулярных миоидных клетках, формирующих концентрические слои вокруг семенных канальцев, и в гладкомышечных клетках сосудистых стенок; при этом, в отличие от интерстициальных CD34+ стромальных клеток, эти элементы не экспрессируют CD34, что подтверждено морфометрическими исследованиями [109, 131]. Экспериментальные данные на моделях грызунов свидетельствуют, что перитубулярные миоидные клетки обладают не только сократительной, но и секреторной активностью, участвуя в синтезе компонентов базальной мембраны и продукции цитокинов и факторов роста, влияющих на клетки Лейдига и сперматогенный эпителий [41].

В условиях опухолевого роста α -SMA приобретает значение маркера реактивных миофибробластов и CAF. Для ряда эпителиальных опухолей показано, что при переходе от нормальной ткани к инвазивной карциноме CD34+ фибробласты стромы замещаются CD34-/ α -SMA+ миофибробластами; этот фенотипический сдвиг, сопровождающийся уплотнением матрикса и разрастанием стромального компонента, хорошо описан при колоректальном раке [113]. Для семиномы экспрессия α -SMA, как правило, оценивают косвенно – по характеру фиброзных септ и реактивной стромы, тогда как систематические количественные данные по α -SMA+ миофибробластам и CAF в опухоли и перитуморальной зоне отсутствуют.

1.6. Баланс пролиферации и гибели сперматогенных клеток

Ki-67 – ядерный белок, экспрессируемый в фазах G1, S, G2 и митозе, что делает его одним из наиболее надежных маркеров пролиферации нормальных и опухолевых клеток и стандартным инструментом количественной оценки пролиферативной активности в онкоморфологии [18, 89].

В нормальном яичке Ki-67 выявляется преимущественно в сперматогониях; более дифференцированные элементы сперматогенного эпителия в большинстве своем Ki-67-негативны [109]. Доля Ki-67-позитивных сперматогоний у взрослых мужчин остается относительно низкой и отражает физиологический уровень пролиферации стволового и пролиферирующего пулов сперматогенных клеток [92, 109]. В перитуморальной зоне при семиноме экспрессия Ki-67, как и в норме, ограничена сперматогониями и отдельными соматическими клетками; пролиферативная активность может снижаться на фоне атрофии и склероза семенных канальцев. При этом исследования Ki-67-позитивных клеток в перитуморальной зоне семиномы отсутствуют.

В научной литературе показано, что семиномы характеризуются более низким пролиферативным индексом по сравнению снесеминомами, при высокой межиндивидуальной вариабельности. В единичных исследованиях повышенное

количество Ki-67-позитивных клеток ассоциировано с большим размером опухоли и/или метастазированием, однако данные о сравнении экспрессии между pT-стадиями, а также о сопоставлении перитуморальной зоны с нормальным яичком к настоящему времени отсутствуют.

TUNEL-окрашивание (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) маркирует фрагментированные цепи ДНК, что является признаком инициации апоптотической гибели клеток. Совместный анализ Ki-67 и TUNEL позволяет оценить баланс пролиферации и гибели. Данные по TUNEL в нормальном яичке ограничены; однако в исследовании N. Aden и соавт. показано, что у препубертатных пациентов доля TUNEL-позитивных сперматогенных клеток варьирует примерно от 15 % до 30 %, отражая физиологическую элиминацию избыточного пула герминативных клеток [47].

Для семиномы TUNEL-анализ представляет интерес в связи с выраженной лимфоидной инфильтрацией и относительно благоприятным прогнозом. В работе E. Yakirevich и соавт. показано, что уровень TUNEL-позитивной гибели опухолевых клеток при семиноме выше, чем при несеминозных герминогенных опухолях [17]. Эти наблюдения согласуются с представлением о более выраженном противоопухолевом иммунном ответе при семиноме, для которой характерен активный Т-клеточный инфильтрат, тогда как несеминомы чаще формируют иммуносупрессивное микроокружение [117]. В то же время количественная характеристика TUNEL-позитивных клеток в зависимости от pT-стадии сеиномы, а также сравнение перитуморальной зоны и нормального яичка в научной литературе отсутствуют.

1.7. Роль NF-κB в регуляции апоптоза и воспаления: от гомеостаза яичка к канцерогенезу

NF-κB представляет собой семейство димерных транскрипционных факторов (прежде всего комплексы p65/RelA-p50), регулирующих воспаление, клеточную выживаемость, пролиферацию и ремоделирование тканей. В онкологии

данный маркер рассматривают как ключевое звено, связывающее хроническое воспаление с опухолевой прогрессией: активация NF-κB способствует ускользанию опухолевых клеток от апоптоза, а также повышению их инвазивного и метастатического потенциала [79].

В нормальном яичке NF-κB конститутивно экспрессируется в сустентоцитах, однако его транскрипционная активность в покое остается низкой [105, 136]. При патологических состояниях (крипторхизм, токсические воздействия, ишемия) отмечается усиление ядерной локализации NF-κB в сустентоцитах, сопровождающееся апоптозом сперматогенных клеток. Р. Yao и соавт. показали, что это ассоциировано с повышением экспрессии FasL и Fas-опосредованной гибелью сперматогенных клеток [137]. Другие работы подтверждают, что ингибирование NF-κB снижает апоптотическую гибель сперматогенного эпителия, что подчеркивает его роль в модуляции пролиферативно-апоптотического баланса сперматогенного эпителия [91, 100]. В совокупности NF-κB в нормальном яичке выполняет двойную функцию: поддерживает гомеостаз и одновременно при патологических состояниях инициирует элиминацию поврежденных сперматогенных клеток. Данные о распределении и активности NF-κB в перитуморальной зоне семиномы и других солидных опухолей в научной литературе отсутствуют.

При исследовании ГО продемонстрирована функциональная роль NF-κB, в частности, в экспериментальной работе D. Ozata и соавт.: активация NF-κB способствовала экспрессии генов выживания и устойчивости опухолевых клеток к апоптотической гибели [68]. Высокая экспрессия PEG3 и ядерного p50 в большинстве ГО подтверждает системную активацию NF-κB-зависимых путей в данной группе новообразований. Аналогичные ассоциации описаны при других солидных опухолях: в раке предстательной железы ядерная локализация NF-κB коррелирует с более высокой степенью злокачественности и прогрессированием [129], а в раке желудка – повышается прямо-пропорционально стадии заболевания. При гепатоцеллюлярной карциноме высокая ядерная экспрессия p65 и активация комплексов CARMA3/NF-κB ассоциированы с инвазией, метастазированием и

неблагоприятным прогнозом [25]. Эти наблюдения согласуются с концепцией NF-κB как интегратора воспалительных и онкогенных сигналов, поддерживающего выживание опухолевых клеток, ангиогенез и иммуносупрессивные характеристики микроокружения [79].

Для семиномы отсутствуют систематические исследования, оценивающие экспрессию и субклеточную локализацию NF-κB в опухоли и перитуморальной зоне с учетом pT-стадии.

1.8. CD31+ кровеносные сосуды, влияние элементов микроокружения на ангиогенез

CD31 – трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый в высоком количестве на мембранах эндотелиальных клеток. В нормальном яичке CD31 окрашивает эндотелий как зрелых, так и вновь сформированных сосудов, являясь основным маркером морфологической оценки ангиогенеза в опухоли [23].

Количественные данные о сосудистой плотности в перитуморальной зоне семиномы и других ГО в научной литературе отсутствуют. Однако существуют данные об оценке плотности кровеносных сосудов при опухолях гортани: CD31 оценивали отдельно в опухоли и перитуморальной зоне. При этом количественные различия между этими зонами и их клиническая значимость трактуются неоднозначно, а единый подход к интерпретации результатов пока не сформирован [59].

В ряде исследований ГО был проведен сравнительный анализ CD31+ кровеносных сосудов в семиноме, несеминозных опухолях и Лейдигоме; однако авторы ограничивались описанием характера сосудистой сети без сравнения pT-стадий или прогностического анализа [35]. В одном из исследований показано, что плотность кровеносных сосудов в различных ГО не имеет статистической значимости [36].

В специализированной литературе CD31+ кровеносные сосуды лучше изучены при других солидных опухолях. Показано, что их высокая плотность

ассоциируется с более агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, желудка, печени и ряде других новообразований. В обзорных работах подчеркивается, что CD31 может выступать независимым прогностическим фактором и потенциальным предиктором ответа на антиангиогенную терапию, хотя результаты различных исследований неоднородны [135].

1.9. Лимфоцитарный иммунный ландшафт: субпопуляции, баланс эффекторных и регуляторных клеток

Основные звенья лимфоцитарного иммунного ответа составляют Т- и В-лимфоциты. Общий пул Т-клеток в ткани идентифицируют антителами к CD3, тогда как В-клетки маркируют антителами к CD19. Среди Т-лимфоцитов CD4⁺ Т-хелперы координируют иммунный ответ, распознавая антиген, секретируя цитокины и активируя В-клетки, макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты; CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) реализуют эффекторную, цитотоксическую функцию.

FOXP3 – ключевой транскрипционный фактор Т-регуляторных клеток (Treg), преимущественно ко-экспрессируемый в CD4⁺ Т-лимфоцитах и модулирующий их супрессивные свойства. FOXP3⁺ лимфоциты ограничивают избыточные иммунные реакции, поддерживают толерантность к собственным антигенам и снижают уровень воспаления. Клиническим подтверждением значимости этого пути является синдром IPEX (иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия), обусловленный мутациями гена FOXP3 и сопровождающийся генерализованным аутоиммунным процессом [56, 115].

В нормальном яичке лимфоцитарный инфильтрат минимален: CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки встречаются редко, CD19⁺ В-клетки практически отсутствуют, а FOXP3⁺ Treg выявляются единично, что отражает иммунопривилегированный статус органа [26]. Экспериментальные данные подтверждают, что FOXP3⁺ Treg и

локальные иммунорегуляторные механизмы являются важным фактором защиты сперматогенного эпителия от аутоиммунного повреждения [56, 115].

В научной литературе отсутствуют данные о количественной характеристике CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ и FOXP3+ в перитуморальной зоне семиномы и других солидных опухолях.

Отличительной особенностью семиномы в сравнении с другими ГО является выраженная лимфоидная инфильтрация, которая в отдельных случаях количественно превосходит популяцию опухолевых клеток. По данным литературы, в семиноме Т-лимфоциты преобладают над В-лимфоцитами, а среди Т-клеток доминируют цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты, способные распознавать опухолевые антигены. Показано, что CTL в семиномах функционально активны: они экспрессируют маркеры цитотоксичности (CD69, IFNG, IL-2 и др.) и демонстрируют признаки клональной экспансии [108]. Современные обзоры иммунного микроокружения ГО подчеркивают, что для семиномы характерен более «иммуногенный» фенотип с высоким уровнем CD8+ инфильтрации и относительно низкой долей FOXP3+ Treg, в отличие от несеминомы, где чаще преобладает иммуносупрессивный компонент (Treg, макрофаги M2 и др.) [54, 114].

В исследованиях колоректального рака, рака молочной железы, легкого и других солидных новообразований выявляют высокую плотность CD3+, CD4+ и CD8+ лимфоцитов, ассоциированную с лучшей выживаемостью и меньшим риском рецидива [50, 95, 97, 132]. Важную роль играет и соотношение субпопуляций: низкий индекс FOXP3+/CD8+ в опухоли и стромальном компоненте коррелирует с более благоприятным прогнозом и снижением частоты рецидивов при колоректальном раке, опухолях головы и шеи, тройном негативном раке молочной железы [14, 61, 63, 133]. Для семиномы сопоставимые данные о соотношении FOXP3+/CD8+ и роли CD19+ В-клеток отсутствуют; при этом в других солидных опухолях их повышение рассматривается как маркер активного противоопухолевого иммунитета [26].

В совокупности CD3, CD4, CD8, CD19 и FOXP3 являются ключевыми маркерами для оценки про- и противоопухолевого, а также иммунорегуляторного компонента лимфоцитарного ответа. Отсутствие данных о сравнении количественных характеристик соответствующих субпопуляций между pT-стадиями семиномы, а также о сопоставлении перитуморальной зоны с нормальным яичком подчеркивает существенный пробел в изучении иммунного микроокружения данной опухоли и обосновывает необходимость дальнейших исследований, основанных на стандартизированной количественной оценке лимфоцитарного инфильтрата.

1.10. Опухоль-ассоциированные макрофаги при сеиноме

Опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми элементами иммунного микроокружения и характеризуются выраженной фенотипической пластичностью, позволяющей им адаптироваться к сигналам локального тканевого микроокружения. В опухоли их условно подразделяют на два полярных фенотипа: M1 и M2. M1-макрофаги (классически активированные) обладают противоопухолевой активностью, продуцируют провоспалительные цитокины, фагоцитируют опухолевые клетки и представляют антигены T-лимфоцитам. M2-макрофаги (альтернативно активированные) участвуют в тканевой регенерации, ангиогенезе и противовоспалительной регуляции, тем самым способствуя опухолевой прогрессии. CD68 рассматривается как пан-макрофагальный маркер, выявляющий как M1-, так и M2-клетки, тогда как CD163 является основным маркером M2-фенотипа [28]. В большинстве злокачественных новообразований показано, что опухолевое микроокружение поляризует макрофаги преимущественно в подтип M2, что сопровождается секрецией факторов, поддерживающих рост опухоли и ремоделирование стромального компонента. При мультиплексном иммуногистохимическом анализе различных солидных опухолей отмечена высокая доля ко-экспрессии CD163 и PD-L1 [86], что подчеркивает их вклад в формирование иммуносупрессивного микроклимата. В

одном из исследований показано, что семиномы содержат больше PD-L1⁺ ОАМ, чем несеминомы [85], что может способствовать более выраженному противовоспалительному макрофагальному микроокружению.

В нормальной ткани яичка CD68⁺ макрофаги встречаются в небольшом количестве, преимущественно в интерстициальных межканальцевых пространствах, тогда как CD163⁺ клетки единичны либо вовсе отсутствуют [124, 140]. Это согласуется с представлением о яичке как об иммунопривилегированном органе с ограниченным числом эффекторных иммунных клеток. IL-10 в нормальном яичке продуцируют макрофаги, тучные клетки, sustentоциты, клетки Лейдига и Treg, поддерживая иммунопривилегированный статус и защищая сперматогенный эпителий от аутоиммунного повреждения.

Иммуногистохимические исследования CD68⁺ и CD163⁺ макрофагов в перитуморальной зоне сеиномы отсутствуют. В единичных научных статьях показано, что плотность CD68⁺ и CD163⁺ макрофагов в перитуморальной зоне меланомы и рака предстательной железы существенно ниже, чем в опухолевой ткани, что трактуется как менее иммуносупрессивное окружение по сравнению с собственно опухолевым очагом [99, 140].

В сеиноме макрофаги формируют значимую часть воспалительного инфильтрата. На функциональном уровне ОАМ могут способствовать прогрессии опухоли несколькими взаимосвязанными путями. Во-первых, они секретируют факторы роста (VEGF, EGF, IGF, TGF- β), стимулирующие пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, а также ангиогенез. Во-вторых, они продуцируют металлопротеиназы, включая MMP-3, которые разрушают базальную мембрану и компоненты внеклеточного матрикса, облегчая инвазию в сосуды и окружающие ткани. В-третьих, через продукцию хемокинов (CCL17, CCL22 и др.) ОАМ рекрутируют дополнительные супрессорные популяции – регуляторные T-лимфоциты, тучные клетки и другие иммунные клетки, усиливая иммуносупрессивную среду в опухоли. В совокупности M2-поляризованные макрофаги в сеиноме могут выступать важным драйвером опухолевой прогрессии, а стратегии таргетной реполяризации ОАМ в противоопухолевый M1-

фенотип или их селективной элиминации рассматриваются как перспективное направление иммунотерапии.

Кроме того, отсутствуют данные о сравнительном анализе количества CD68+ и CD163+ ОАМ на разных pT-стадиях семиномы, а также не изучена прогностическая роль CD163+ ОАМ в отношении безрецидивной выживаемости. При исследовании других солидных опухолей высокая плотность CD163+ макрофагов устойчиво ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и прогрессией заболевания [99]. В контексте семиномы это может быть особенно актуально для пациентов группы промежуточного риска рецидива, у которых нередко отмечается выраженная макрофагальная инфильтрация.

1.11. Иммуносупрессивные и проинвазивные медиаторы семиномы: TGF- β , IL-10 и MMP-3

Трансформирующий фактор роста бета (англ. transforming growth factor beta, TGF- β) – плеiotропный цитокин, который в условиях опухолевой прогрессии преимущественно проявляет иммуносупрессивные и проинвазивные свойства. Опухолевые клетки семиномы могут экспрессировать TGF- β или индуцировать его продукцию клетками микроокружения. Избыток TGF- β способствует поляризации макрофагов в иммуносупрессивный M2-фенотип, рекрутированию Treg и формированию толерогенной, «индифферентной» для иммунной системы среды, благоприятной для опухолевой прогрессии. Кроме того, TGF- β индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (EMT, англ. epithelial–mesenchymal transition), усиливая инвазивный потенциал опухолевых клеток [123]. Особый интерес представляет возможная функциональная роль β -ХГЧ в усилении агрессивности ГО через активацию TGF- β -зависимых сигнальных путей [52], что позволяет предполагать участие β -ХГЧ не только в ангиогенезе, но и в формировании иммуносупрессивного, проинвазивного микроклимата.

Интерлейкин-10 (англ. interleukin 10, IL-10) – ключевой противовоспалительный цитокин, выступающий иммуносупрессивным

медиатором канцерогенеза и ограничивающий противоопухолевый иммунитет. Для семиномы описан высокий уровень экспрессии IL-10 в опухолевых и стромальных клетках, ассоциированный с формированием толерогенного микроокружения [108]. Избыток IL-10 подавляет созревание дендритных клеток, снижает активность эффекторных CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток, а также способствует экспансии FOXP3⁺ Treg, которые, в свою очередь, дополнительно секретируют IL-10 и TGF-β, формируя «порочный круг» иммунной толерантности. Параллельно IL-10 совместно с IL-4 и TGF-β способствует поляризации ОАМ в M2-фенотип и сдвигу иммунного ответа в сторону Th2, что сопровождается снижением противоопухолевой активности Th1/CTL и усилением выживания опухолевых клеток [39]. В совокупности IL-10 в семиноме следует рассматривать как один из центральных медиаторов, поддерживающих иммуносупрессивный, толерогенный микроклимат и способствующих иммунному ускользанию опухоли, что делает его потенциальной мишенью для иммунотерапевтических воздействий.

Данные исследований других солидных опухолей подтверждают важную роль IL-10-продуцирующих ОАМ: при раке поджелудочной железы, мочевого пузыря, желудка и других локализациях значительная часть CD68⁺ макрофагов ко-экспрессирует IL-10, однако точная доля CD68⁺IL-10⁺ не приводится [25, 62, 81, 110]. Как правило, авторы отмечают связь высокого уровня IL-10⁺ОАМ⁺ с иммуносупрессивным фенотипом опухоли и неблагоприятным прогнозом. CD163, являясь маркером M2-фенотипа, дополнительно подчеркивает этот профиль: показано, что CD68⁺CD163⁺ макрофаги характеризуются повышенной ко-экспрессией IL-10 и формируют выраженную иммуносупрессивную среду; при раке поджелудочной железы большая часть CD163⁺ ОАМ ко-экспрессирует IL-10, хотя количественные показатели также не детализируются [81, 110].

Матриксная металлопротеиназа-3 (англ. matrix metalloproteinase-3, MMP-3) – протеаза внеклеточного матрикса, расщепляющая коллагены, фибронектин, ламинин и другие компоненты стромы и рассматриваемая как важный проинвазивный фактор. В одном из исследований транскриптомного анализа выявлено повышение экспрессии MMP-3 (наряду с MMP-1 и WNT5A) в

метастатической семиноме по сравнению с неметастатической, что коррелирует с более агрессивным фенотипом опухоли [138]. Также в специализированной литературе описано, что повышенная экспрессия MMP-3 в эмбриональной карциноме ассоциирована с сосудистой и лимфатической инвазией, а также метастазированием. В то же время в доступной литературе фактически отсутствуют количественные морфометрические данные по экспрессии TGF- β , MMP-3 и IL-10 в сеиноме и других ГО. В ряде исследований глиом, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, молочной железы экспрессия этих маркеров оценивалась преимущественно ПЦР-методом в тканевых гомогенатах, а их повышение ассоциировалось с иммуносупрессивной средой и неблагоприятным прогнозом [55, 120, 121, 122].

1.12. Иммунофенотипическая характеристика тучных клеток

Тучные клетки (ТК) – эффекторные иммунные клетки, выполняющие двоякую функцию: они участвуют в поддержании тканевого гомеостаза (ангиогенез, ремоделирование стромы) и одновременно вовлечены в широкий спектр иммунных реакций, включая аллергическое и хроническое воспаление. В систематических обзорах описана функциональная роль медиаторов ТК в регуляции сосудистой проницаемости и ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, что потенциально может способствовать опухолевой прогрессии [75].

Для выявления общего пула ТК традиционно используют гистохимическое окрашивание толуидиновым синим. Этот катионный краситель метахроматически окрашивает гранулы тучных клеток за счет связывания с гепарином и другими сульфатированными гликозаминогликанами. Таким образом, толуидиновый синий маркирует не белки ТК, а кислые протеогликаны, однако благодаря высокой концентрации гепарина в мастоцитах является первоочередным скрининговым маркером, позволяющим надежно идентифицировать большую часть этих клеток. Однако данный подход не позволяет дифференцировать фенотипы ТК, поэтому для

точного иммунофенотипирования применяют иммуногистохимические маркеры гранулярных протеаз секретома – триптазы, химазы и СРАЗ.

Иммуногистохимическое исследование позволяет классифицировать ТК на фенотипы в зависимости от протеазного профиля гранул секретома: Tryptase-позитивные клетки, а также популяции Tryptase⁺Chymase⁺ и Tryptase⁺Chymase⁺СРАЗ⁺. В современных транскриптомных исследованиях выявлено более 7 устойчивых фенотипов ТК, различающихся по набору протеаз и сигнальных молекул [21, 139]. Это подчеркивает, что иммунофенотип ТК отражает их функциональную специализацию и определяется особенностями тканевого микроокружения.

Триптаза – сериновая протеаза, специфичная для тучных клеток и составляющая основной компонент их гранул. Она участвует в деградации компонентов экстрацеллюлярного матрикса, активации протеаз-активируемых рецепторов (PAR, англ. protease-activated receptors) на эндотелии и других клетках, а также в модуляции воспаления и ремоделировании тканей. Антитела к триптазе рассматриваются как «пан-маркер» ТК и используются для их количественной оценки в различных тканях.

Химаза – гранулярная сериновая протеаза ТК, расщепляющая фибронектин, протеогликаны и другие компоненты экстрацеллюлярного матрикса, а также участвующая в ремоделировании стромального компонента, регуляции воспаления и ангиогенеза [70, 143].

Карбоксипептидаза А3 (англ. carboxypeptidase A3, СРАЗ) – гранулярная металлопротеаза семейства цинк-зависимых карбоксипептидаз, специфичная для тучных клеток. СРАЗ вместе с триптазой и химазой формирует «триаду» основных протеаз ТК и участвует в ремоделировании тканей, деградации биологически активных пептидов и регуляции воспаления [29].

Гетерогенность протеазного профиля ТК подтверждается результатами транскриптомных и морфометрических исследований. В органах респираторной системы описаны популяции ТК с высокой экспрессией СРАЗ при относительно низком уровне химазы, тогда как в других анатомических областях наблюдается

обратное соотношение [21, 69]. В этой связи СРАЗ рассматривают как маркер ТК с акцентом на их протеазный потенциал, особенно информативный при изучении ремоделирования тканей, хронического воспаления и опухолевой прогрессии.

В нормальном яичке мастоциты локализуются в интерстициальных межканальцевых пространствах, преимущественно периваскулярно и перитубулярно, влияя на проницаемость гемато-тестикулярного барьера и выделяя главным образом иммуносупрессивные медиаторы [71]. Увеличение количества мастоцитов описано при ряде патологических состояний – фиброзе, азооспермии, нарушении сперматогенеза; при этом их плотность положительно коррелирует с выраженностью интерстициального фиброза и степенью нарушения сперматогенеза [37, 71].

Данные о фенотипах, степени дегрануляции и распределении мастоцитов в перитуморальной зоне семиномы и других герминогенных опухолей отсутствуют. В единичных исследованиях рака желудка показано, что ТК локализуются в стромальном компоненте опухоли и периваскулярно, а максимальная степень их дегрануляции отмечается на границе опухоли с перитуморальной зоной [64]. При колоректальном раке и меланоме высокая плотность ТК ассоциируется с усилением ангиогенеза, лимфангиогенеза и прогрессией заболевания [22, 74]. В ряде обзорных работ подчеркнута тесная взаимосвязь между числом мастоцитов, плотностью кровеносных сосудов и неблагоприятными клиническими исходами [64, 139].

По данным научной литературы ТК в семиноме располагаются в непосредственной близости от кровеносных сосудов и соединительнотканых перегородок, а их количество существенно варьирует между наблюдениями: по отдельным данным, общее число ТК в ГО ниже, чем при различных патологических состояниях яичка. Дегранулируя, ТК высвобождают гистамин, факторы роста (VEGF, FGF-2 и др.) и протеазы, комплексно влияющие на опухолевый процесс. Гистамин и факторы роста стимулируют ангиогенез и повышают проницаемость сосудов, а протеазы способствуют разрушению

межклеточного матрикса и базальных мембран, обеспечивая инвазию опухолевых клеток [111].

Помимо прямого участия в ангиогенезе и ремоделировании стромы, тучные клетки способны модулировать иммунный ответ. Они секретируют хемоаттрактанты, привлекающие другие иммунные клетки в опухоль, и одновременно при хроническом опухолевом воспалении продуцируют иммуносупрессивные цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , подавляя активность Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. В экспериментальных работах доказано, что мастоциты стимулируют экспрессию контрольных точек иммунного ответа и способствуют формированию локально толерогенного микроклимата, особенно в сочетании с опухоль-ассоциированными макрофагами и Treg [24, 73].

При иммуногистохимическом исследовании ТК в меланоме, колоректальном раке и ряде других солидных опухолей показано, что их высокая плотность коррелирует с неблагоприятным прогнозом, усилением неоангиогенеза и метастазированием [22, 74]. Для семиномы сопоставимые клинико-прогностические корреляции не описаны, и систематические данные о зависимости плотности ТК от pT-стадии отсутствуют.

В совокупности тучные клетки в семиноме целесообразно рассматривать как часть проангиогенного и иммуносупрессивного опухолевого микроокружения. Потенциальное снижение их влияния – например, посредством стабилизаторов мембран ТК или таргетной инактивации ключевых сигнальных путей – теоретически может рассматриваться как терапевтический подход, однако клинические данные об эффективности подобных стратегий при ГО отсутствуют [72, 139]. Особый исследовательский интерес представляет сравнительная характеристика мастоцитов в семиноме pT1- и pT2-стадий с учетом протеазных фенотипов и взаимосвязей с опухолевыми клетками, макрофагами, лимфоцитами и кровеносными сосудами.

1.13. Заключение по обзору литературы

Проанализированные данные подтверждают, что семинома является особой иммуногенной ГО. При относительно низкой заболеваемости и благоприятном прогнозе данное новообразование остается клинически значимой проблемой, поскольку поражает мужчин молодого возраста, а примерно у 20 % пациентов после хирургического лечения регистрируется рецидив заболевания.

Патогенез семиномы тесно связан с нарушениями эмбрионального развития гонады: незавершенная дифференцировка сустентоцитов, дисгенез семенных канальцев и персистенция примордиальных половых клеток приводят к формированию герминогенной неоплазии *in situ* как предиктора семиномы. Цитогенетические и молекулярные изменения, а также стойкая экспрессия эмбриональных маркеров поддерживают плюрипотентный статус опухолевых клеток и способствуют иммунному ускользанию, поскольку онкофетальные антигены не распознаются иммунной системой как чужеродные.

Принципиальное отличие семиномы от большинства солидных опухолей других локализаций связано с ее развитием в изначально иммунопривилегированном органе и формированием специфического иммунного микроокружения. Для семиномы характерен выраженный Т-клеточный инфильтрат с преобладанием CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов при относительно низкой доле FOXP3⁺ Treg, что отличает ее от несеминозных ГО. Наряду с этим выявляются иммуносупрессивные и проинвазивные компоненты: M2-поляризованные CD163⁺ макрофаги, тучные клетки с выраженным протеазным профилем, экспрессия IL-10, TGF- β , MMP-3, активация NF- κ B. Существенный вклад в биологию развития опухоли вносят стромально-сосудистые элементы (CD31, CD34, α -SMA), телоциты, перитубулярные миоидные клетки, а также соотношение пролиферации и гибели опухолевых клеток (Ki-67, TUNEL).

Особый интерес представляет комплексный гистологический, морфометрический и иммуногистохимический анализ элементов иммунного микроокружения в нормальном яичке, перитуморальной зоне и сеиноме при

сравнении pT-стадий. Ожидается, что полученные данные позволят уточнить механизмы локальной прогрессии, идентифицировать потенциальные прогностические маркеры и модифицировать стратификационные критерии риска рецидива. В перспективе элементы иммунного микроокружения семиномы могут быть рассмотрены как мишени для таргетной терапии, влияние на которые повысит эффективность лечения и качество жизни пациентов за счет деэскалации терапии. Интеграция фундаментальных знаний в клиническую практику представляет важный этап на пути к персонализированной терапии в онкоурологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проводили на базах федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы и федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2.1. 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-патологических данных пациенты были разделены на следующие группы:

- Группа I (n = 96, возраст от 20 до 63) – архивные парафиновые блоки операционного материала семиномы, после орхифуникулэктомии, согласно pTNM-классификации:

- подгруппа Ia: pT1N0M0 (n = 54);

- подгруппа Ib: pT2N0M0 (n = 42).

- Группа II: нормальные яички (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.

Анализ клинических данных пациентов с неметастатической семиномой pT1N0M0 и pT2N0M0 стадий проводили в филиалах «НМИЦ радиологии» Минздрава России: урологическом отделении с химиотерапией Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена и в отделение лучевого и хирургического лечения урологических заболеваний с группой брахитерапии МРНЦ имени А.Ф. Цыба.

Потенциальные случаи для включения идентифицировали при поиске по электронным медицинским картам учреждений с использованием кода МКБ-10 С62.1 («Злокачественное новообразование опустившегося яичка»); далее выполнялась ручная верификация клинических и патологоанатомических данных.

Критерии включения: возраст 20 – 63 лет; операция – орхифуникулэктомия; заключение патологоанатомического исследования – семинома pT1N0M0 или pT2N0M0, в том числе на основании иммуногистохимических реакций с антителами к PLAP и OCT3/4; отсутствие предшествующей системной терапии (химио-/ лучевой).

Критерии исключения: признаки метастатической болезни (N+ / M+); системные заболевания, влияющие на иммунную систему (например, саркоидоз, системный васкулит); материал, непригодный для анализа (деградация ткани, отсутствие необходимых клинических данных).

Комплекс морфологических исследований выполняли на парафиновых блоках пациентов с неметастатической семиномой pT1N0M0 и pT2N0M0 стадий в Научно-образовательном ресурсном центре «Инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» (Молекулярной морфологии) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Исследование одобрено Этическим комитетом по клиническим испытаниям МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России (протокол № 676, от 15.02.2022). Все процедуры соответствовали Хельсинкской декларации и рекомендациям STROBE.

2.2. Методы исследования

В диссертационном исследовании использован следующий комплекс методов (Рисунок 2.1):



Рисунок 2.1 – Методы исследования

2.2.1. Анализ медицинской документации

Информация о пациентах, проходивших лечение в филиалах «НМИЦ радиологии» Минздрава России в период с 2020 по 2025 год, извлекалась из электронных амбулаторных карт при использовании медицинской

информационной системы «Асклепиус». Для пациентов, проходивших лечение ранее, с 2015 по 2020 год данные извлекали из стационарных и амбулаторных медицинских карт.

Для исследования использовали следующие клинические данные: возраст, антропометрические данные с расчетом индекса массы тела (ИМТ, кг/м²), сторону поражения (правое/левое яичко; при наличии – двустороннее поражение), сведения о протезировании яичка, курение (да/нет), сопутствующие заболевания яичек (в т. ч. крипторхизм в анамнезе, микролитиаз и др.);

Всем пациентам на амбулаторном этапе было проведено инструментальное исследование мошонки для определения размера и структуры опухолевого образования (УЗИ или МРТ).

Клинический пример. Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия, подгруппа Ib. Клинический диагноз: С62.1. Рак правого яичка cTxN0M0 S0, I ст.

Поступил с жалобами на новообразование яичка; дооперационный уровень онкомаркеров в пределах референсных значений. МР-картина мягкотканного образования, субтотально замещающего ткань яичка с вовлечением капсулы и распространением на головку придатка яичка, неоднородно накапливающее контрастный препарат, общими размерами до 37×19×31 мм (Рисунок 2.2).

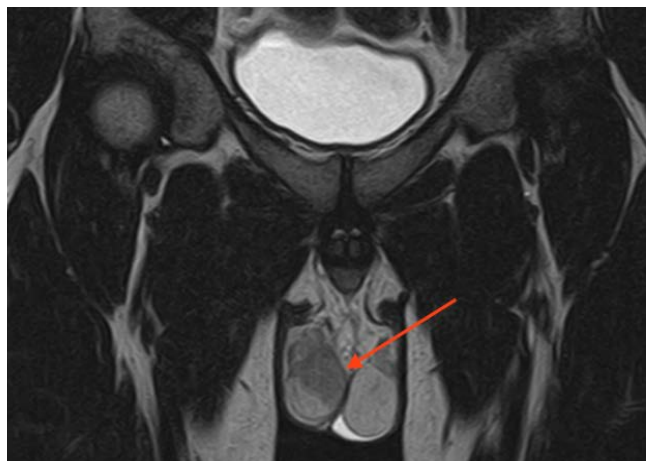


Рисунок 2.2 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия, подгруппа Ib. МРТ органов малого таза с внутривенным контрастным усилением. Размер правого яичка – 37×19×31 мм, размер герминогенной опухоли (стрелка) – 30×22×20 мм с неоднородным накоплением контрастного препарата; размер левого яичка – 33×26×20 мм

Пациенту выполнена орхифуникулэктомия. По результатам гистологического исследования: семинома pT2N0M0 S0, пациент относится к группе высокого риска рецидива по причине наличия лимфоваскулярной инвазии и инвазии в сеть яичка. Проведен 1 курс АХТ Карбоплатином АУС 7.

Предоперационный уровень специфических опухолевых маркеров с категоризацией «повышен/не повышен» (относительно референсных значений лаборатории): альфа-фетопротеин (АФП) (0,5 – 7,0 МЕ/мл), бета-хорионический гонадотропин (β -ХГЧ) (0 – 5,3 мЕД/мл) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (130 – 220 Ед/л).

2.2.2. Гистологическое исследование

Серийные срезы толщиной 3 мкм изготавливали из парафиновых блоков на автоматизированном ротационном микротоме (Leica RM2255, Германия) для последующего гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследования. Предметные стекла с фиксированным микропрепаратом окрашивали гематоксилином Майера и эозином, дополнительные срезы наносили на адгезивные предметные стекла с покрытием поли-L-лизином для проведения гистохимических и иммуногистохимических исследований (подробные методики описаны ниже).

2.2.3. Гистохимическое исследование

Гистохимическое исследование выполняли методом метахроматического окрашивания толуидиновым синим, выявляющим секреторные гранулы тучных клеток, содержащих гепарин; гранулы окрашивались в интенсивно темно-фиолетовый (метахроматический) цвет.

2.2.4. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование выполняли вручную. Для восстановления антигенных свойств ткани после фиксации в формалине применяли метод тепловой индукции эпитопного восстановления (HIER). После удаления парафина и последовательной регидратации срезы инкубировали в 10 мМ универсальном растворе для демаскировки антигенов (Trilogy, 920P-07, «Cell Marque», США) в водяной бане с использованием микропроцессорной системы pT Link (Dako, Дания) при температуре 95°C в течение 40 минут, после чего охлаждали в том же растворе при 20°C в течение 20 минут. Затем препараты трижды по 5 минут промывали в буферном растворе для удаления избыточных реагентов (Trilogy, 935B-09, «Cell Marque», США). Далее контуры срезов обводили гидрофобным маркером Elite Pap Pen (Dako, Дания) и наносили раствор Hydrogen Block Peroxidase (Trilogy, 925B-03, «Cell Marque», США) при 20°C с двукратной инкубацией по 5 минут. После этого срезы инкубировали с первичными антителами класса IgG, специфичными к исследуемым маркерам, в течение 1 часа (Рисунок 2.3).

Далее срезы трижды промывали по 5 минут в буферном растворе для удаления избытка реагентов (Trilogy, 935B-09, «Cell Marque», США). В качестве вторичных антител применяли универсальную двухкомпонентную систему детекции HiDef Detection™ HRP Polymer system («Cell Marque», США), включающую анти-IgG мыши/кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и хромоген DAB в качестве субстрата. Для каждого из маркеров обязательным этапом было проведение контрольных реакций, направленных на исключение ложноположительных и ложноотрицательных результатов. В качестве положительных контролей использовали ткани с высоким содержанием клеток, экспрессирующих изучаемые маркеры, что обеспечивало интенсивное специфическое окрашивание и подтверждало валидность реакции. Отрицательные контроли включали срезы, обработанные без добавления первичных антител и с использованием изотипической сыворотки, что позволяло оценить уровень

фонового окрашивания и неспецифическую активность хромогена. Характер окрашивания в контрольных препаратах полностью соответствовал результатам, полученным на исследуемых срезах, что свидетельствовало о высокой воспроизводимости и надежности применяемого метода. Титры антител подбирали эмпирически с использованием стандартного буфера для их разведения, что обеспечивало оптимальные условия реакции (см. рисунок 2.3).

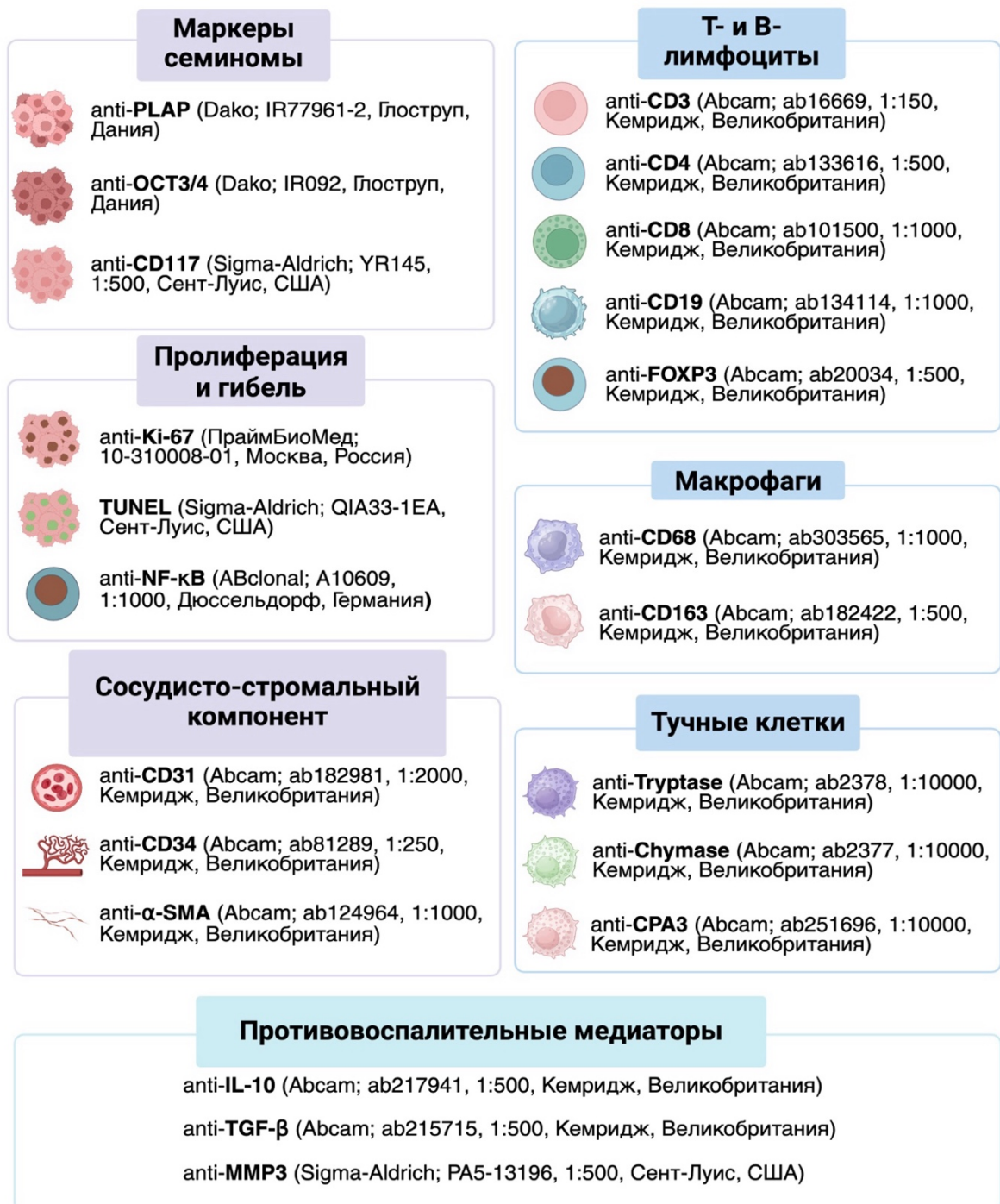


Рисунок 2.3 – Иммуногистохимическое исследование, характеристика антитела

Визуализация. Иммуногистохимический анализ препаратов проводили с использованием исследовательского микроскопа Zeiss Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany) при увеличениях свыше $\times 400$. В зависимости от задач анализа применяли иммерсионные объективы Zeiss alpha Plan-Apochromat 100 \times /1.46 Oil DIC M27 и Zeiss Plan-Apochromat 150 \times /1.35 Glys DIC Corr M27. Для регистрации изображения использовали цифровую камеру Zeiss AxioCam 712 color (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany).

Для получения полномасштабных изображений препаратов выполняли полноформатное светлопольное сканирование стекол на цифровом гистологическом сканере KF-PRO-005 (Ningbo, ZheJiang, China). Полученные сканы гистологических препаратов использовали для анализа всего среза и морфометрической обработки.

2.2.5. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование

Для мультиплексного иммунофлуоресцентного мечения тканей применяли 7-цветный набор Opal (Akoya Biosciences, Marlborough, MA), все этапы выполняли в строгом соответствии с инструкцией производителя. После удаления парафина и последовательной регидратации срезов проводили демаскировку антигенов в растворе R-UNIVERSAL, помещая препараты в микроволновой термостат при 95 $^{\circ}$ C на 20 минут. Затем осуществляли инактивацию эндогенной пероксидазной активности.

Комбинация α -SMA + CD34 (дуплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к α -SMA с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором этапе мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD34, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с фторофором Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация CD3+CD4+CD8 (триплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к CD3 с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором и третьем этапах мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD4 и CD8, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с соответствующими фторофорами Opal555 и Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация CD4+CD8+FOXP3 (триплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к CD4 с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем

повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором и третьем этапах мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD8 и FOXP3, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с соответствующими фторофорами Opal555 и Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация CD68+CD163+CD117 (триплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к CD68 с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором и третьем этапах мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD163 и CD117, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с соответствующими фторофорами Opal555 и Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация CD163+CD31 (диплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к CD163 с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10

мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором этапе мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD31, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с фторофором Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация TGF- β +MMP-3 (дуплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к TGF- β с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором этапе мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к MMP-3, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с фторофором Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация CD68+CD163+IL-10 (триплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к CD68 с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с

инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором и третьем этапах мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD163 и IL-10, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с соответствующими фторофорами Opal555 и Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация маркеров Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP (мультиплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к Tryptase с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором и третьем этапах мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к Chymase, CPA3 и PLAP, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с соответствующими фторофорами Opal555, Opal647 и Opal780 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Комбинация Tryptase+CD31 (дуплексное иммуномечение). На первом этапе мультиплексного окрашивания на тканевые срезы наносили первичные антитела к Tryptase с экспозицией 1 час, после чего последовательно добавляли полимерный конъюгат Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 мин) и фторофор Opal480 с инкубацией 10 мин. По завершении стадии детекции сформировавшиеся иммунные комплексы (первичные и связанные с ними вторичные антитела) удаляли путем повторного высокотемпературного воздействия в микроволновом термостате в растворе R-UNIVERSAL, как указано выше.

На втором этапе мультиплексного окрашивания на срезы последовательно наносили первичные антитела к CD31, после чего проводили 30-минутную инкубацию с полимерной системой Opal Anti-Ms + Rb HRP. Далее наносили флуоресцентную метку, инкубируя препараты с фторофором Opal647 в течение 10 минут. По завершении иммунных реакций клеточные ядра дополнительно контрастировали DAPI (5 минут), а затем препараты заключали в среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Визуализация. Мультиспектральный анализ препаратов проводили с использованием исследовательского микроскопа Zeiss Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany) при увеличениях свыше $\times 400$. В зависимости от задач анализа применяли иммерсионные объективы Zeiss alpha Plan-Apochromat 100 \times /1.46 Oil DIC M27 и Zeiss Plan-Apochromat 150 \times /1.35 Glyc DIC Corr M27. Для регистрации изображения использовали цифровые камеры Zeiss AxioCam 712 color и Zeiss AxioCam 712 mono (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany).

Для получения полномасштабных изображений препаратов выполняли полноформатное сканирование стекол на цифровом гистологическом сканере KF-PRO-005 (Ningbo, ZheJiang, China). Полученные сканы гистологических препаратов использовали для анализа всего среза, морфометрического анализа и сопоставления с результатами высокоразрешающей многоспектральной микроскопии.

2.2.6. Анализ двуцепочечных разрывов ДНК

Обнаружение двуцепочечных разрывов ДНК выполняли с использованием метода TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). После стандартных этапов депарафинизации и последовательной регидратации парафиновые срезы подвергали ферментативной обработке: на каждый препарат наносили по 100 мкл раствора протеиназы К (20 мкг/мл) с экспозицией 20 минут при комнатной температуре. Затем предметные стекла помещали в фосфатный буфер для удаления избытка протеиназы К в течение 5 минут. Затем на срезы наносили 100 мкл рабочего раствора $1\times$ TdT из набора Thermo Fisher Scientific (США) и инкубировали в увлажненной камере при 37°C в течение 90 минут. По окончании инкубации реакционный раствор удаляли, препараты повторно промывали в фосфатно-буферном растворе. Для контрастирования ядер выполняли дополнительное окрашивание DAPI (синий спектр, Thermo Fisher Scientific, США).

Визуализация. Для получения полномасштабных изображений препаратов выполняли полноформатное сканирование стекол на цифровом гистологическом сканере KF-PRO-005 (Ningbo, ZheJiang, China). Полученные сканы гистологических препаратов использовали для анализа всего среза и морфометрической обработки.

2.2.7. Морфометрическое исследование

Количественная оценка. Полномасштабные изображения анализировали с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом для цифровой патологии QuPath v0.5.1. Количество иммунопозитивных клеток оценивали в полуавтоматическом режиме с нормированием на площадь (клетки/мм²).

Визуализация пространственного распределения. Пространственное распределение CD68 и CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов, визуализировали с помощью карт плотности (Density Maps), построенных с

использованием встроенных инструментов QuPath v0.5.1 с применением Гауссового взвешивания для сглаживания

Для анализа пространственного распределения координаты иммунопозитивных тучных клеток и иммунонегативных клеточных популяций экспортировали и визуализировали в Microsoft Excel (версия 16.103.1, Microsoft Corporation, 2024). Картирование выполняли с помощью инструмента «Точечная диаграмма (Scatter)»: иммунонегативные клетки отображали зелеными маркерами, иммунопозитивные – оранжевыми. Точки размещали строго по их декартовым координатам X и Y, что обеспечивало корректную геометрическую репрезентацию и позволило провести количественный анализ пространственного распределения изучаемых популяций.

Оценка ко-экспрессии. Для оценки одновременной экспрессии специфических макрофагальных маркеров и противовоспалительного цитокина IL-10 на опухоль-ассоциированных макрофагах рассчитывали долю клеток, ко-экспрессирующих CD68⁺IL-10 в общем пуле CD68-позитивных клеток, а также долю CD68⁺CD163⁺IL-10 клеток среди популяции CD68⁺CD163-позитивных макрофагов. Результаты представлены в виде относительных величин и выражены в процентах (%).

Оценка взаимодействия элементов микроокружения и опухолевых клеток. Для количественной характеристики пространственных взаимодействий опухолевых клеток, опухоль-ассоциированных макрофагов, тучных клеток, кровеносных сосудов и компонентов внеклеточного матрикса использовали расстояние между иммунопозитивными маркерами как критерий потенциальной функциональной связи.

2.2.8. Статистические методы

Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 16.103.1, Microsoft Corporation, 2024). Нормальность распределения

количественных данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данные представляли в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD); сравнение двух независимых групп выполняли с использованием t-критерия Стьюдента.

В случаях отклонения распределения от нормального применяли непараметрические методы, в частности критерий Манна-Уитни для парных сравнений. Сравнение распределения категориальных признаков между тремя независимыми группами риска (низкий, промежуточный, высокий) проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона на таблицах сопряженности формата 3×2 (группа риска × бинарный признак «да/нет»).

Для оценки силы ассоциаций между бинарными переменными рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) на основе логистической регрессии. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Визуализация числовых значений. Построение графиков осуществлялось с использованием онлайн-платформы BioRender (BioRender.com). Для визуализации применялась актуальная на момент проведения работы версия веб-интерфейса BioRender с доступом через стандартный браузер. Исходные численные данные для построения графиков предварительно обрабатывались в электронных таблицах Microsoft Excel (версия 16.103.1, Microsoft Corporation, 2024). Затем данные экспортировались в табличном формате и использовались в качестве основы для формирования графических элементов в BioRender.

Применялись встроенные инструменты для построения столбчатых и линейных графиков, а также средства аннотирования для выделения ключевых участков и оформления подписей осей. Масштаб осей, подписи к осям (включая единицы измерения и обозначения переменных), а также легенды настраивались вручную в соответствии с принятыми в статье обозначениями. Цветовые палитры выбирались из стандартных наборов BioRender с учетом контрастности и удобства восприятия при черно-белой печати. Готовые графики экспортировались из

BioRender в формате JPEG с разрешением не менее 300 dpi для последующей вставки в рукопись.

Оценка прогностической значимости CD163-позитивных опухоль-ассоциированных макрофагов. Прогностическую значимость количества CD163-позитивных опухоль-ассоциированных макрофагов оценивали в когорте пациентов, завершивших хирургическое лечение не менее чем за 36 месяцев до момента включения в исследование и имеющих полный объем клинической информации о последующем течении заболевания ($n = 59$). Среди них выделяли подгруппу пациентов с документированным рецидивом заболевания ($n = 10$). Безрецидивную выживаемость определяли как интервал от даты завершения первичного лечения до даты первого подтвержденного рецидива либо до даты последнего наблюдения при отсутствии признаков прогрессирования (цензурированные наблюдения).

Для оценки прогностической значимости CD163-позитивных опухоль-ассоциированных макрофагов в отношении риска развития рецидива семиномы применяли метод ROC-анализа. В качестве зависимой переменной использовали бинарный исход («наличие рецидива» / «отсутствие рецидива»), в качестве независимой – непрерывный показатель количества CD163-позитивных макрофагов (клетки/мм²). По результатам ROC-анализа определяли площадь под кривой (AUC) с расчетом 95 % доверительного интервала, а также чувствительность и специфичность при различных пороговых значениях исследуемого показателя; критический уровень статистической значимости для всех анализов принимали равным $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная глава посвящена комплексному анализу морфологических и клинико-лабораторных данных пациентов с нематастатической семиномой pT1- и pT2-стадий. Параллельно, используя арсенал описанных методик, выполнена количественная и качественная оценка элементов иммунного микроокружения перитуморальной зоны, что позволяет уточнить вклад местных иммунных реакций в течение заболевания.

Отдельное внимание уделено нормальному яичку, гистологический и иммуногистохимический анализ которого необходим для понимания механизмов, поддерживающих иммунопривилегированный статус органа.

Наконец, проанализирована роль сперматогенного эпителия в неопластическом процессе и формировании герминогенной опухоли.

Такое сопоставление структур нормального яичка и перитуморальной зоны позволяет выявить ключевые изменения в иммунном ландшафте и связать их с патогенезом сеиномы.

3.1. Морфологическое исследование нормального яичка и перитуморальной зоны – основа для понимания канцерогенеза сеиномы

Исследование нормального яичка – ключ к пониманию механизмов развития герминогенной неоплазии *in situ*, ранняя диагностика которой повышает вероятность ее своевременного выявления.

В образцах яичек II-ой группы наблюдали нормальную гистоархитектонику с признаками физиологического сперматогенеза. Снаружи яичко покрыто белочной оболочкой, развивающейся из мезенхимы полового валика. Извитые семенные каналы (мезотелиального происхождения) различного диаметра, содержат сперматогенные клетки, расположенные на разных ярусах: на базальной мембране – сперматогонии (A_{св.}, A_{темн.}, B), выше – первичные (в длительной профазе мейоза) и вторичные (короткоживущие) сперматоциты, ближе к просвету,

в адлюминальном отсеке располагаются сперматиды (от круглых до удлинённых) и сперматозоиды. Суспендоциты, выполняющие поддерживающую и трофическую функцию, характеризовались крупными овально-треугольными ядрами и светлой цитоплазмой. Между канальцами располагается интерстициальная ткань, содержащая группы интерстициальных эндокриноцитов с крупными овальными ядрами и светлой оксифильной цитоплазмой. Здесь же можно было обнаружить единичные иммунные клетки без признаков воспалительной инфильтрации. Кровеносные сосуды хорошо определяются (Рисунок 3.1).

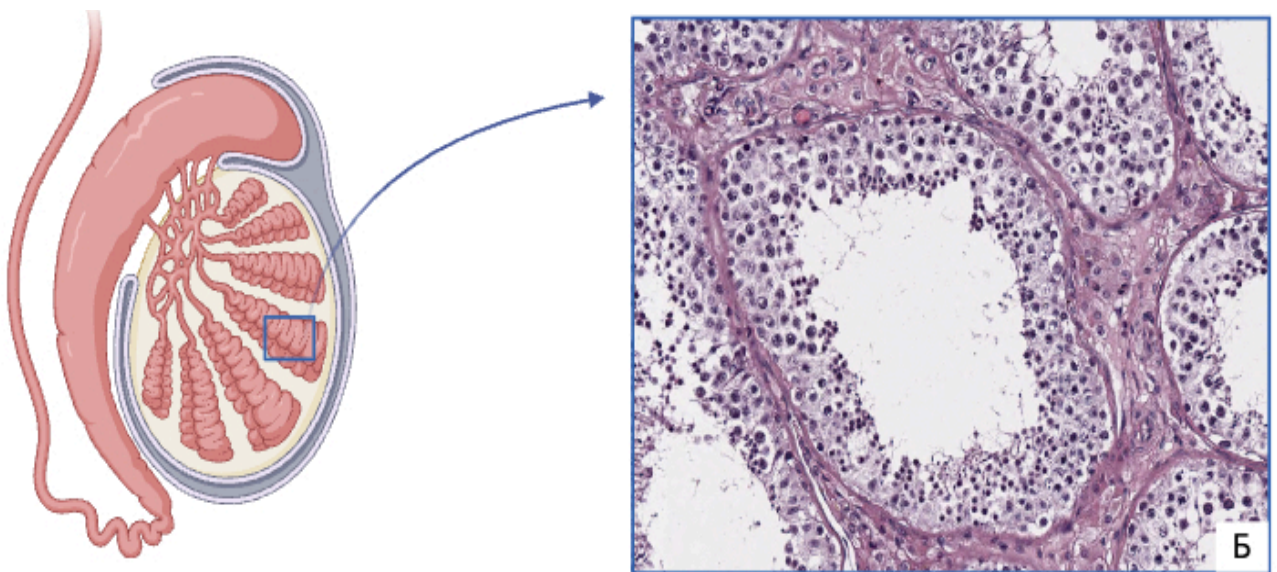


Рисунок 3.1 – Нормальное яичко. Окрашивание: гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$

Таким образом, исследование сперматогенного эпителия в период постнатальной дифференцировки с «отсылкой» на характеристику аналогичных сигналов и механизмов во внутриутробном периоде способствует пониманию развития герминогенной неоплазии *in situ* и биологии семиномы.

Перитуморальная зона семиномы по-прежнему остается предметом пристального изучения, так как именно она представляет морфологически и функционально специализированную «переходную нишу» между иммунопривилегированными структурами нормального яичка, опухолевым микроокружением и неопластическими клетками.

Опухолевая прогрессия – многоэтапный процесс, который включает не только динамику роста атипичных клеток, но и изменения в прилежащей паренхиме – перитуморальной зоне. Диффузный характер различных гистологических, молекулярно-биологических и генетических перестроек внутри яичка и, прежде всего, в сперматогенном эпителии, подтверждается высокой частотой выявления герминогенной неоплазии *in situ* в соседних участках. Поэтому, обоснованно считать, что перитуморальная зона также вовлечена в события на начальных этапах канцерогенеза (Рисунок 3.2).

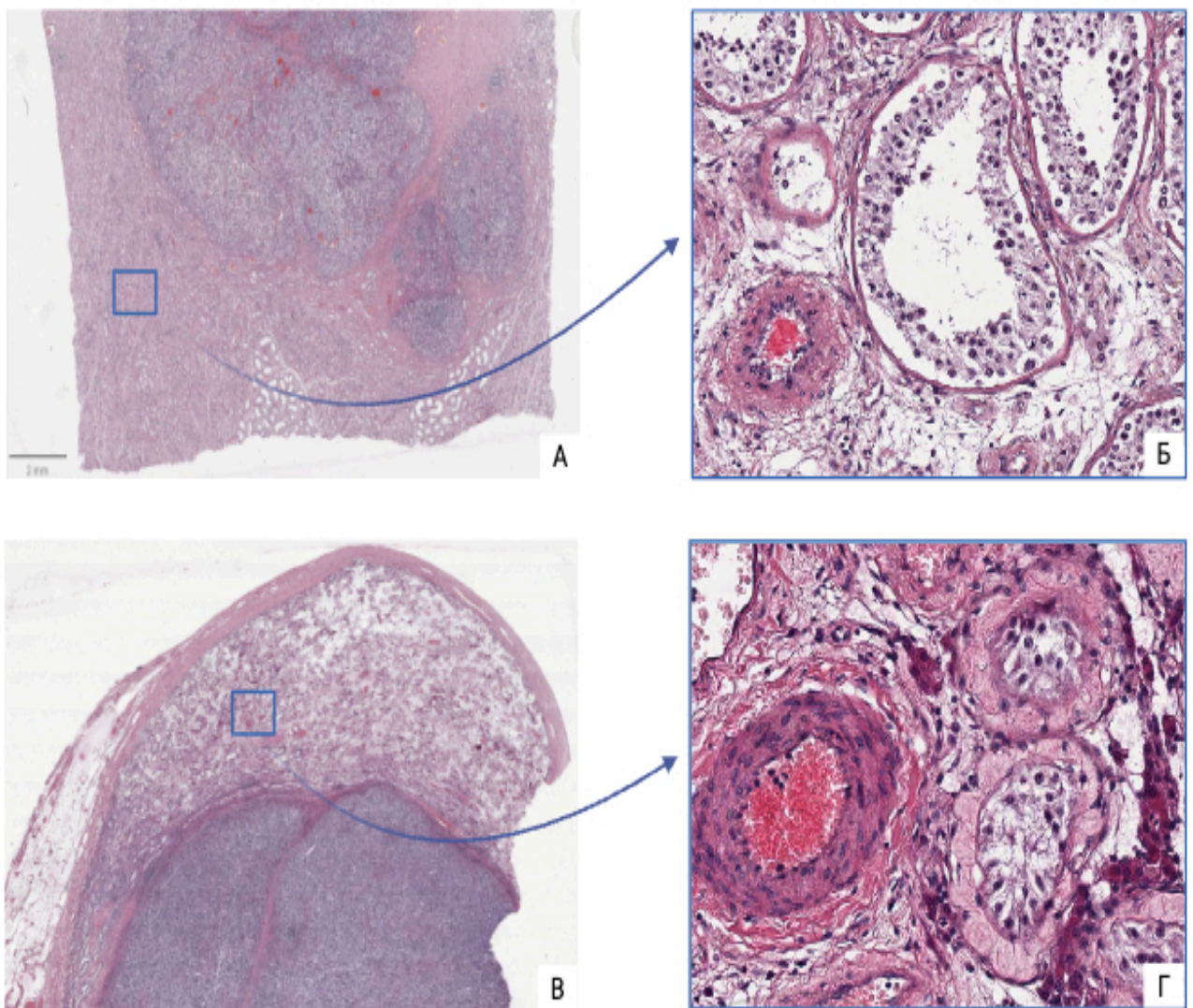


Рисунок 3.2 – Перитуморальная зона. Сверху – Пациент С., 23 года. Семинома pT1-стадия. А – гистоскан; Б – перитуморальная зона. Снизу – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. В – гистоскан; Г – перитуморальная зона. Окрашивание: гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$

Следовательно, перитуморальная зона семиномы выступает одним из ключевых участников взаимодействия атипичных клеток и элементов микроокружения и требует целенаправленного морфологического и иммунологического анализа. С другой стороны, особый интерес представляет сопоставление перитуморальной зоны и сперматогенного эпителия нормального яичка для оценки клеточно-тканевого ответа.

3.2. Иммуногистохимическая оценка стромально-сосудистого компонента и состояния гемато-тестикулярного барьера перитуморальной зоны и нормального яичка

Состояние гемато-тестикулярного барьера оценивали на основании иммуногистохимических реакций на ключевые маркеры, входящие в его состав – это прежде всего – перитубулярные клетки и кровеносные сосуды.

При иммуногистохимическом исследовании нормального яичка экспрессия CD34 отмечена в двух основных компартментах: эндотелии кровеносных сосудов мелкого диаметра, включая гемокапилляры, венулы и артериолы, что отражает участие сосудистых и эндотелиальных прогениторных клеток в ангиогенезе и ремоделировании микроокружения; большинстве перитубулярных клеток, располагающихся цепочками на периферии, формируя наружную стенку семенных канальцев, ассоциированную с базальной мембраной. Данный паттерн окрашивания может отражать состояние элементов наружной части поддерживающей структуры гемато-тестикулярного барьера. Однако, sustentоциты, непосредственно формирующие гемато-тестикулярный барьер, были иммунонегативными.

Для дополнительной характеристики перитубулярного слоя и оценки сократительного компонента использовали иммуногистохимическое окрашивание на α -SMA, которые образовывали сплошной слой вокруг извитых семенных канальцев, соответствующий миоидным клеткам, а также отчетливо маркировали гладкомышечный компонент стенок сосудов (внутренний контроль реакции).

Мультиплексная визуализация CD34+ α -SMA демонстрирует гетеротопическое иммуномечение: экспрессия CD34 не полностью совпадала с α -SMA+ перитубулярными клетками: часть клеток, формирующих наружную часть стенки извитых семенных канальцев, ко-экспрессировала оба маркера, тогда как другая часть была CD34+/SMA- или CD34-/SMA+. Это указывает на гетерогенность перитубулярного клеточного компартмента, включающего как дифференцированные сократительные миоидные клетки, так и CD34+ клетки с признаками предшественников/стромальных поддерживающих элементов, участвующих в структурной организации семенного канальца, поддержании ниши сперматогониальных стволовых клеток и иммунопривилегированного статуса яичка (Рисунок 3.3).

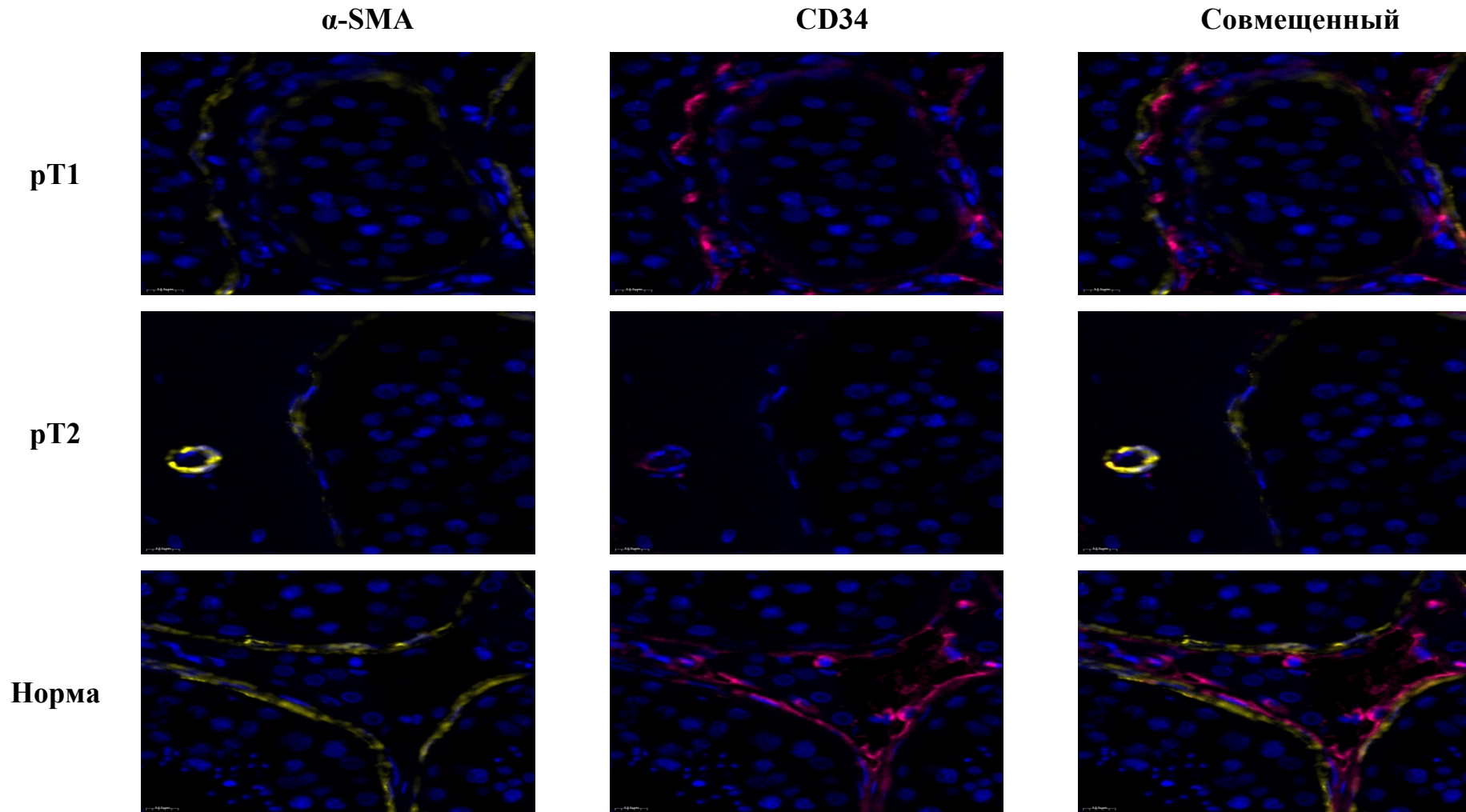


Рисунок 3.3 – Перитуморальная зона, (семинома pT1 и pT2) стадии и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к α -SMA (желтое свечение), CD34 (розовое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения α -SMA +CD34. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

3.3. Оценка пролиферации и гибели сперматогенного эпителия перитуморальной зоны и нормального яичка

Пролиферативную активность сперматогенных и соматических клеток в нормальной яичке и перитуморальной зоне семиномы pT1- и pT2-стадий оценивали иммуногистохимическим методом с использованием антител к Ki-67 – маркеру G1, S, G2 и M фазах клеточного цикла.

В нормальной ткани яичка Ki-67 выявляется преимущественно в сперматогониях – активно вступающих в митотический цикл, расположенных на базальной мембране извитых семенных канальцев. В более дифференцированных сперматогенных клетках, переходящих в митоз, включая первичные сперматоциты, экспрессия Ki-67, как правило, не была обнаружена.

Полученные количественные данные показывают, что в нормальном яичке доля митотически активных клеток составила 58,8 %, что соответствует сохраненной физиологической пролиферации сперматогенного эпителия. В перитуморальной зоне семиномы отмечено обратное пропорциональное снижение уровня экспрессии Ki-67. В подгруппе pT1 доля Ki-67 составила 33,1 %, тогда как в подгруппе pT2 показатель был существенно ниже – 18,9 %. Различия между подгруппами были статистически значимыми ($p = 0,001$). Такая динамика согласуется с постепенной утратой сперматогенного эпителия по мере прогрессирования опухоли и нарастанием тканевой дезорганизации, приводящей к снижению числа пролиферирующих клеток (Таблица 3.1) (Рисунок 3.4).

Оценка гибели клеток проводилась с использованием метода TUNEL, выявляющий фрагментацию ДНК – один из ключевых цитологических признаков апоптоза. В нормальном яичке физиологическая гибель необходима для поддержания баланса между генерацией сперматогенных клеток и их элиминацией, однако его уровень остается низким. Это отражается в редких TUNEL-позитивных ядрах (<0,5 %), преимущественно среди сперматогоний и ранних сперматоцитов; при этом sustentоциты и интерстициальные эндокриноциты были преимущественно иммунонегативны.

Таблица 3.1 – Доля пролиферации и гибели сперматогенных клеток перитуморальной зоны и нормального яичка, %

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
Ki-67	33,1 [28,2 – 38,0]	18,9 [14,2 – 22,7]	0,001*	58,7 [51,8 – 63,0]**
TUNEL	22,7 [17,4 – 26,3]	31,3 [26,8 – 37,0]	0,001*	18,3 [14,1 – 21,2]**

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2. ** – p < 0.001) по сравнению с pT1 и pT2.

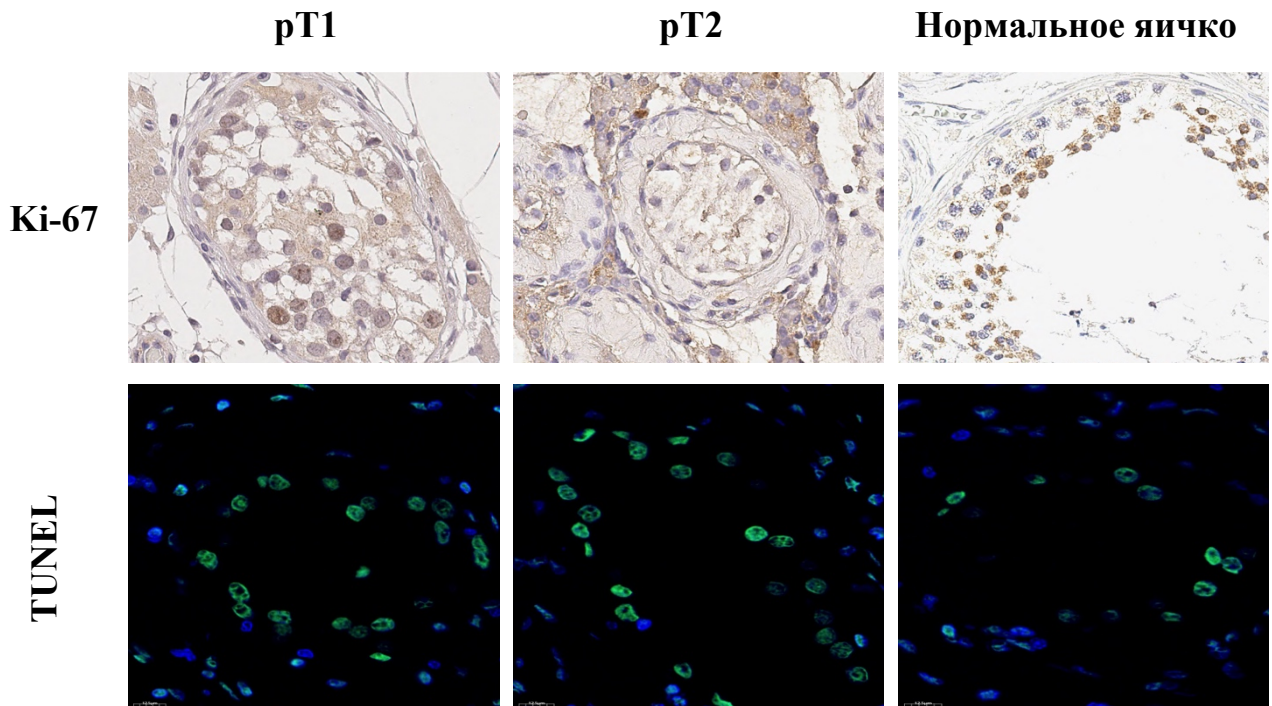


Рисунок 3.4 – Перитуморальная зона, (семинома pT1 и pT2) стадии и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67 и TUNEL, увеличение $\times 400$. Ki-67 – ядерная реакция (коричневая метка), докрасивание ядер – гематоксилином; TUNEL – зеленое свечение, DAPI – ядра, синее свечение. Световая и флуоресцентная микроскопия

При иммунофлуоресцентном анализе доля TUNEL-позитивных клеток в структурах нормального яичка составила 18,3 %. Однако по мере прогрессирования опухолевой стадии отмечали повышение уровня апоптоза в перитуморальной зоне сеиномы. В pT2 доля TUNEL-позитивных сперматогенных клеток увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с pT1-стадией ($p = 0,001$). Рост числа

TUNEL-позитивных клеток по мере прогрессирования опухоли указывает на усиление гибели сперматогенного эпителия в ответ на компрессионное воздействие опухоли, ишемию, изменение цитокинового профиля и связанную с этим деградацию микроокружения (Таблица 3.1) (Рисунок 3.4).

3.4. Оценка фактора NF-κB в перитуморальной зоне и нормальном яичке

При иммуногистохимических реакциях нормального яичка экспрессия NF-κB была выявлена преимущественно в sustentocитах и, в меньшей степени, в сперматогенном эпителии – преимущественно в сперматогониях. Редкое иммуномечение обнаружили в интерстициальных эндокриноцитах. Общее количество NF-κB-позитивных клеток на 1мм² составило – 3,92.

В перитуморальной зоне семиномы pT1- и pT2-стадий количество NF-κB-позитивных клеток значительно возросло. Наибольшую экспрессию демонстрировали иммунные клетки, прежде всего лимфоциты. В тоже время, доля иммунопозитивных клеток сперматогенного эпителия была значительно выше, чем в микропрепаратах нормального яичка и увеличивалась по мере приближения к опухолевой ткани.

При сравнительном количественном анализе NF-κB-позитивных клеток в перитуморальной зоне отмечали прямо пропорциональное их увеличение в 1,4 раза в группе pT2, по сравнению с pT1-стадией (p = 0,043) (Таблица 3.2) (Рисунок 3.5).

Таблица 3.2 – Количественная характеристика NF-κB-позитивных клеток в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке на 1мм²

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
NF-κB	44,85 [32,94 – 51,09]	61,01 [44,59 – 80,56]	0,043*	3,92 [2,49 – 5,46]**

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]

* – по сравнению pT1 с pT2. ** – p < 0.001) по сравнению с pT1 и pT2.

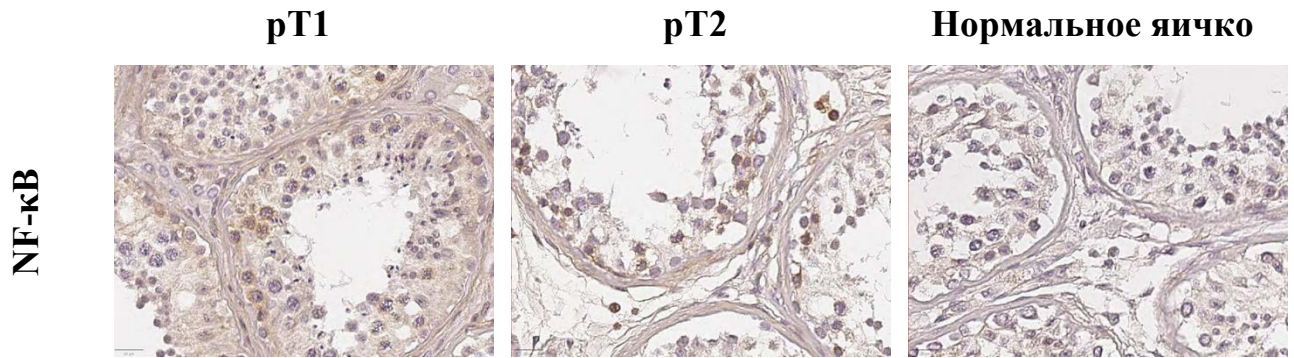


Рисунок 3.5 – Перитуморальная зона, (семинома pT1 и pT2) стадии и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NF-κB, докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

Резюме

В перитуморальной зоне выявлены дистрофические изменения сперматогенного эпителия с зонами субтотальной и тотальной герминальной аплазии, с увеличением фрагментации ДНК в сперматогенных клетках на фоне снижения их пролиферации.

3.5. Оценка распределения CD31-позитивных кровеносных сосудов в перитуморальной зоне и нормальном яичке

При иммуногистохимическом исследовании нормального яичка с использованием антител к CD31 отмечали выраженное мембранное окрашивание эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. В нормальном яичке кровеносные сосуды локализовались преимущественно в интерстициальной ткани между семенными каналцами; их количество составило 15,03 кровеносных сосудов/ мм^2 .

В перитуморальной зоне сеиномы наблюдалось усиление васкуляризации, степень которой увеличивалась прямо-пропорционально pT-стадии. При количественном анализе экспрессии CD31 отметили существенное увеличение плотности кровеносных сосудов по сравнению с нормальным яичком и наличие межгрупповых различий в зависимости от pT-стадии. В подгруппе pT1 обнаружили тенденцию к увеличению степени васкуляризации в 1,9 раза по сравнению с pT2-стадией ($p = 0,077$) (Таблица 3.3) (Рисунок 3.6).

Таблица 3.3 – Плотность распределения кровеносных сосудов в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке на 1мм²

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
CD31	18,55 [14,71 – 21,99]	33,74 [28,11 – 37,29]	0,077*	15,03 [12,49 – 17,90]**
Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3] * – по сравнению pT1 с pT2. ** – p < 0.001) по сравнению с pT2.				

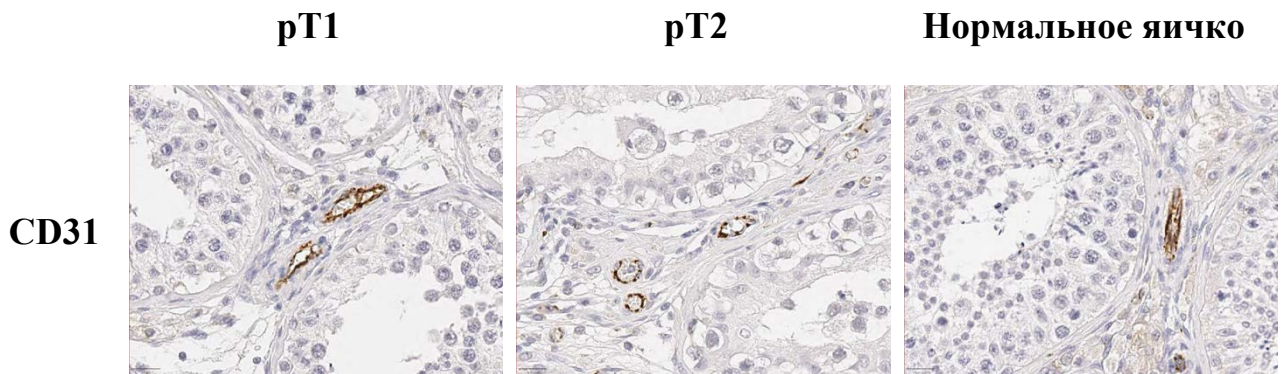


Рисунок 3.6 – Перитуморальная зона, (семинома pT1 и pT2) стадии и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD31, докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение ×400

3.6. Анализ лимфоцитарного инфильтрата в перитуморальной зоне и нормальном яичке

Опухолевый рост сопровождается воспалением различной степени выраженности. Вовлечение сперматогенного эпителия при этом может приводить к его прогрессирующей дистрофии и аплазии.

Для оценки баланса эффекторных и регуляторных факторов, выполнен количественный анализ CD3 Т-лимфоцитов и его субпопуляций CD4 и CD8, а также CD19 В-лимфоцитов в перитуморальной зоне семиномы и в нормальном яичке. Динамика распределения лимфоцитов служит индикатором степени утраты иммунопривилегированного статуса яичка и вероятных механизмов иммунного уклонения, а также нарастания иммунного контроля.

Сопоставление количественных показателей субпопуляций лимфоцитов в перитуморальной зоне и в нормальном яичке позволяет выявить признаки перестройки локального иммунного гомеостаза, которые потенциально могут определять направление опухолевой прогрессии.

В этом отношении особый интерес представляет иммунный статус нормального яичка в сравнении с перитуморальной зоной неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий для понимания активности регуляторных механизмов, направленных на мобилизацию иммунных клеток.

Во всех образцах лимфоциты легко идентифицировались по характерным цитологическим признакам: мелкие мононуклеарные клетки округлой формы с ровным контуром, где ядро занимает большую часть, а цитоплазма представлена узким ободком. Для иммунофенотипической верификации T- и B-лимфоцитов, обладающих различной функциональной ролью в иммунном ответе (маркер общего T-лимфоцитарного пула, T-хелперы, T-цитотоксические) и использовали иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3, CD4, CD8 и CD19.

Медиана численности CD3+ клеток в перитуморальной зоне была выше приблизительно в 6,9 раз при pT1 и в 16,3 раза при pT2, что подчеркивает выраженное нарастание T-клеточного воспалительного инфильтрата в опухолевом микроокружении.

При иммуногистохимическом анализе распределения CD3, CD4 и CD8 T-лимфоцитов в перитуморальной зоне семиномы отмечалось их повышение в зависимости от pT стадии. плотность CD3+ T-лимфоцитов при pT2-стадии увеличилась в 2,4 раза по сравнению с pT1-стадией ($p < 0.001$). Количество CD4 иммунопозитивных клеток превышало значения в pT2-стадии в 2,9 раза по сравнению с pT1-стадией ($p < 0.001$). Маркирование CD8 цитотоксических T-лимфоцитов демонстрировало повышение их количества в 2,18 раза в pT2-стадии по сравнению с pT1 ($p < 0.001$). Количественный анализ T-лимфоцитов в перитуморальной зоне продемонстрировал их увеличение по сравнению с нормальным яичком: численность CD3 лимфоцитов в перитуморальной зоне pT1- и pT2-стадий была выше, чем в нормальном яичке, в 6,9 и 16,3 раза ($p < 0,001$), CD4

– в 13,1 и 35,3 раза ($p < 0,001$), CD8 – в 11,0 и 24,1 раза ($p < 0,001$) соответственно (Таблица 3.4) (Рисунок 3.7).

Таблица 3.4 – Количественная характеристика CD3, CD4, CD8 и CD19 лимфоцитов в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке на 1мм^2

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
CD3	23,94 [15,83 – 30,42]	56,95 [45,54 – 64,25]	0,001*	3,50 [2,39 – 4,83]**
CD4	3,74 [2,77 – 5,02]	10,03 [5,73 – 14,72]	0,001*	0,28 [0,12 – 1,15]**
CD8	13,62 [7,57 – 20,31]	29,73 [14,96 – 44,37]	0,001*	1,23 [0,12 – 1,74]**
CD19	0,04 [0,02 – 0,06]	0,02 [0,02 – 0,03]	0,429*	0,04 [0,30 – 0,60]

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2. ** – $p < 0,001$ по сравнению с pT1 и pT2.

Количественное содержание CD19 В-лимфоцитов в перитуморальной зоне pT1- и pT2-стадий семиномы и нормальном яичке было крайне мало и не представляло статистической значимости при сравнении ($p = 0,429$) (Таблица 3.4).

Визуализация CD3+CD4+CD8 позволяет наглядно представить общий Т-клеточный лимфоцитарный пул (CD3) с фенотипической оценкой его функциональных подтипов: Т-хелперы (CD4) и Т-цитотоксические (CD8), а также оценить их баланс и пространственную организацию.

В нормальном яичке отмечено редкое иммуномечение в интерстициальной ткани CD3-лимфоцитов с преобладающей ко-экспрессией CD8.

В перитуморальной зоне возрастает CD3-лимфоцитарная нагрузка, также с преобладанием ко-экспрессии CD3+CD8 в формирующихся периваскулярных инфильтратах в межканальцевых пространствах (Таблица 3.4) (Рисунок 3.8).

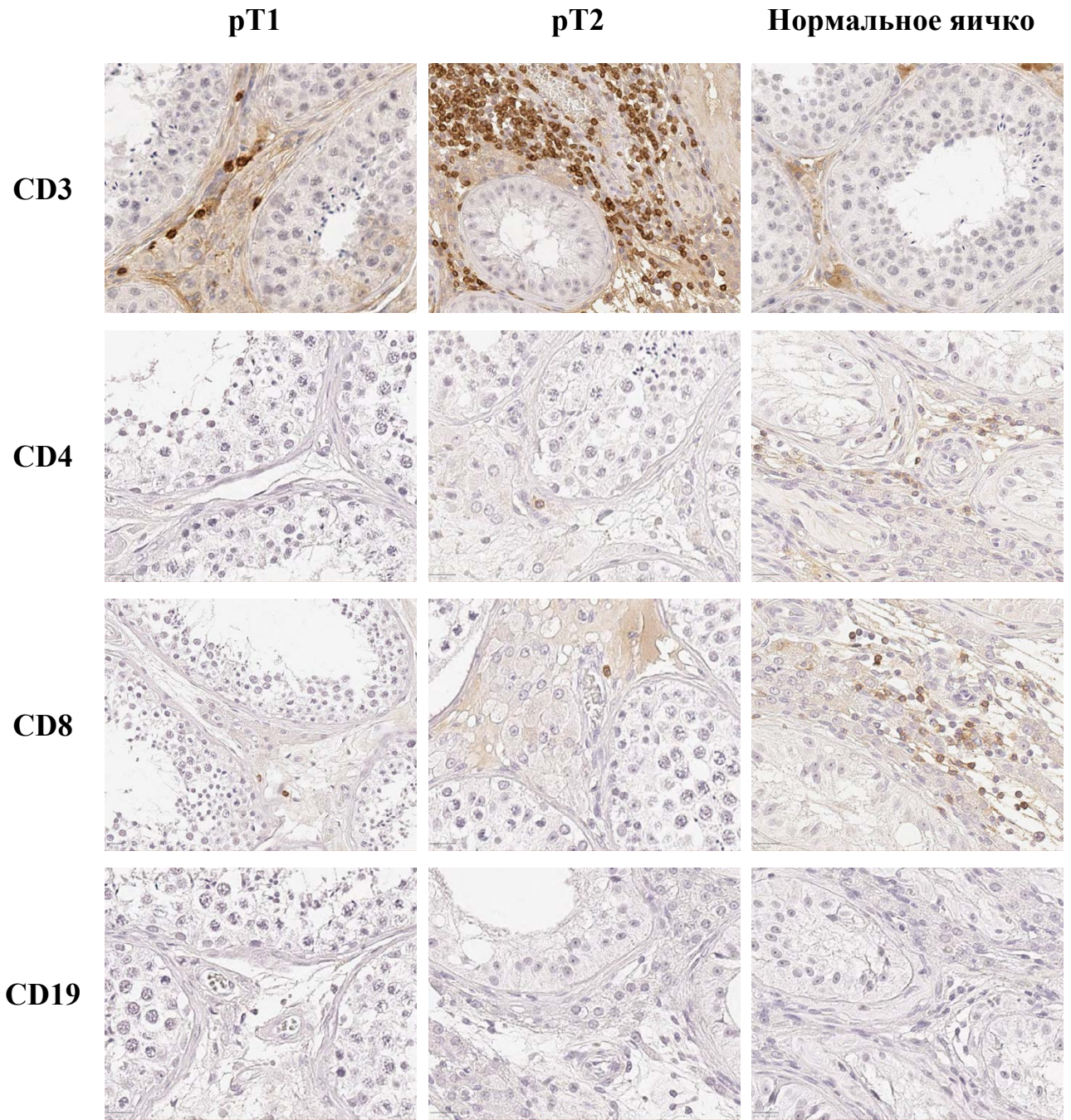
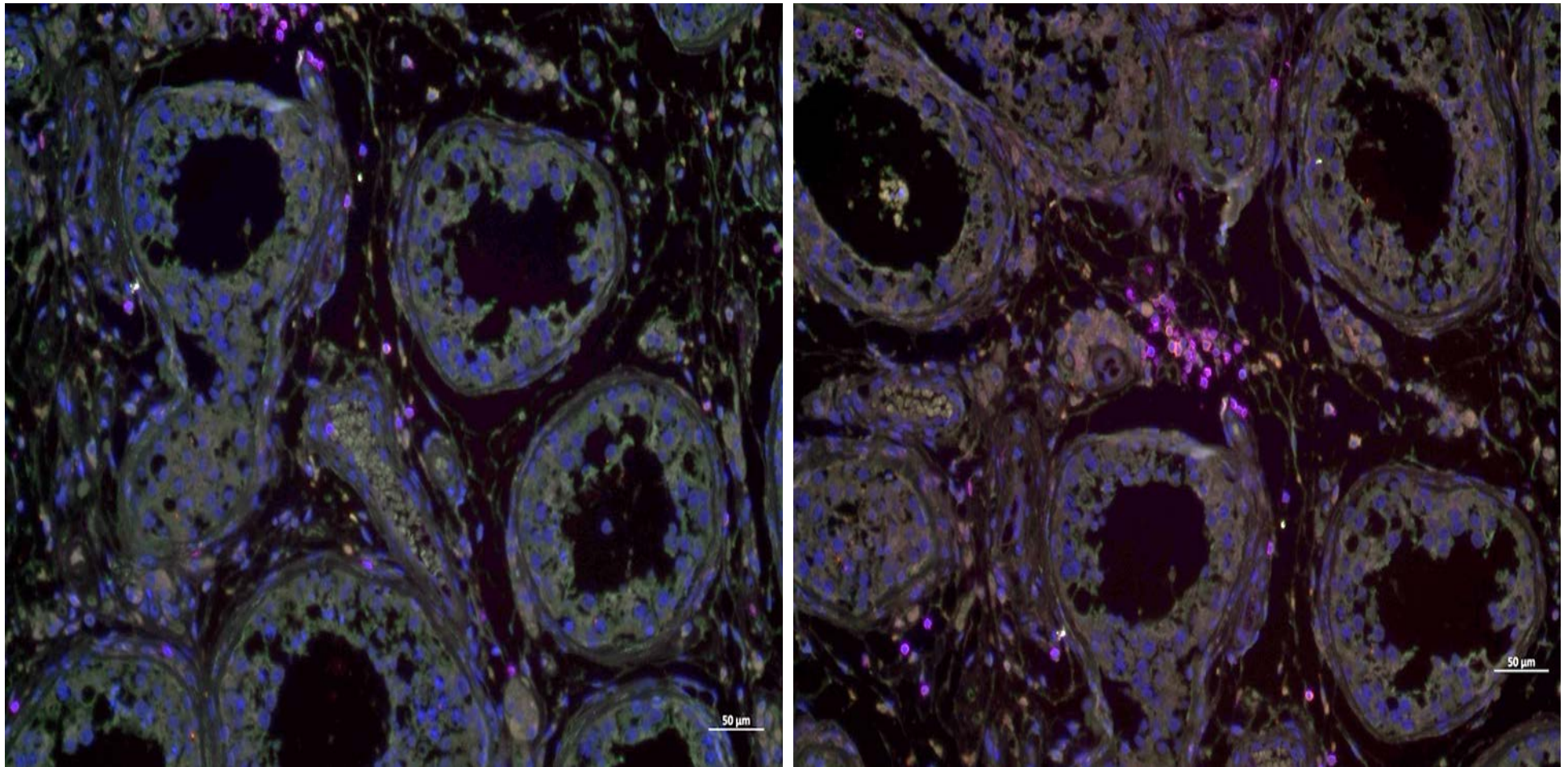


Рисунок 3.7 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3, CD4, CD8 и CD19; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$



pT1

pT2

Рисунок 3.8 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2). Мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3 (желтое свечение), CD4 (оранжевое свечение), CD8 (розовое свечение). DAPI – ядра, синее свечение. Совмещенное изображение, флуоресцентная микроскопия

3.7. Фенотипическая характеристика макрофагов в перитуморальной зоне и нормальном яичке

Для оценки механизмов реализации клеточной пластичности выполнен анализ фенотипов макрофагов в перитуморальной зоне и в нормальном яичке. Соотношение подтипов макрофагов отражает характер иммунного ответа и может указывать на опухолевую прогрессию и риск метастазирования. При этом были использованы маркеры: CD68 – интерстициальный фагоцитарный пул макрофагов; CD163 – противовоспалительный/репаративный фенотип макрофагов.

В перитуморальной зоне семиномы и в нормальном яичке макрофаги были крупными клетками округлой, овальной или неправильной формы с обильной мелкозернистой либо пенистой цитоплазмой. Их ядра, как правило, располагались эксцентрично, и имели почковидную форму. Они локализовались преимущественно в интерстициальной ткани.

При иммуногистохимическом анализе CD68 макрофагов в перитуморальной зоне семиномы отмечено снижение их количества в 4,0 раза на pT2-стадии по сравнению с pT1 ($p < 0,001$); количество CD68 макрофагов в нормальном яичке было в 1,2 раза больше, чем при pT1-стадии ($p = 0,182$), и в 4,7 раза больше, чем при pT2-стадии ($p < 0,001$) (Рисунок 3.9, Рисунок 3.10).

В то же время количественный сравнительный анализ инфильтрации CD163 макрофагами между pT2 и pT1-стадиями неметастатической семиномы не выявил статистически значимых различий ($p = 0,780$), как и при сравнении с микропрепаратами нормального яичка ($p = 0,595$) (Таблица 3.5).

Сравнительный фенотипический анализ количества CD68 иммунопозитивных клеток в норме демонстрирует значительное их преобладание над CD163 макрофагами ($p < 0,001$).

В совокупности данные указывают на выраженное снижение CD68 при переходе от pT1 к pT2 и на неизменные уровни CD163 в обеих подгруппах по сравнению с нормой, практически сводились к нулю.

Таблица 3.5 – Количественная характеристика CD68 и CD163 макрофагов в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке на 1мм²

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
CD68	36,83 [20,34 – 51,40]	9,35 [8,05 – 10,64]	0,001*	43,90 [35,41 – 54,38]**
CD163	0,14 [0,03 – 0,18]	0,13 [0,04 – 0,17]	0,780*	0,17 [0,07 – 0,22]

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]

* – по сравнению pT1 с pT2.

** – p < 0.001) по сравнению с pT2.

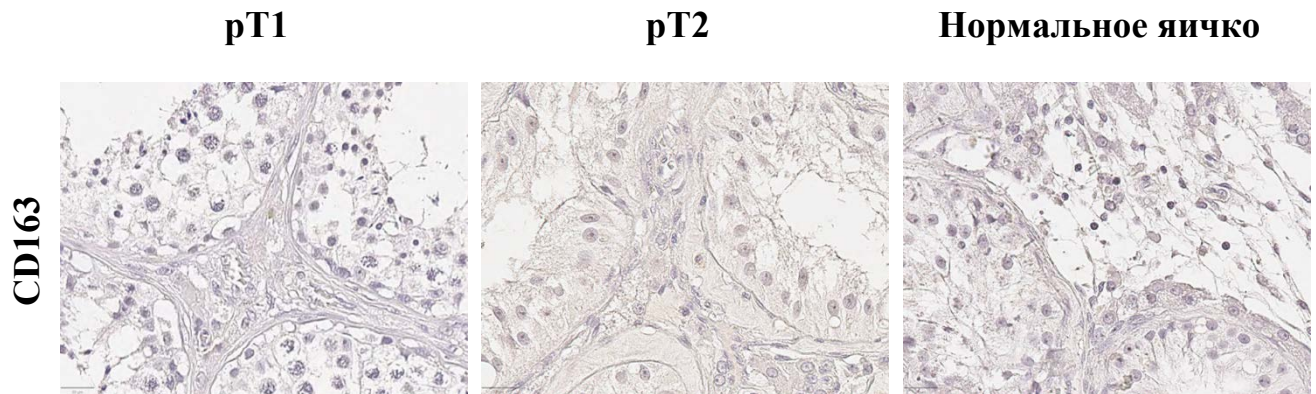


Рисунок 3.9 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD163; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение ×400

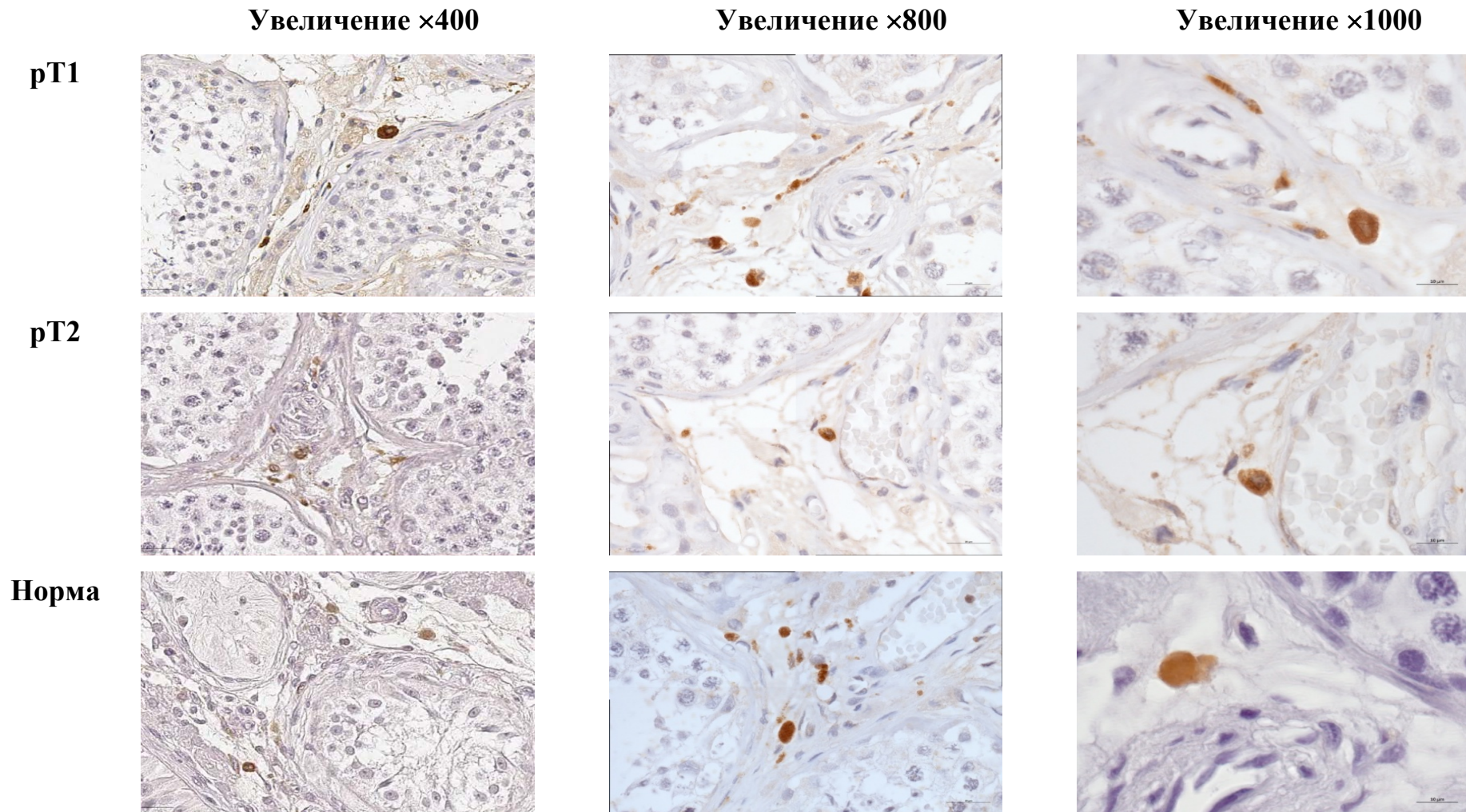


Рисунок 3.10 – Перитуморальная зона, семинома (рТ1, рТ2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68; докрасивание ядер – гематоксилином

3.8. Иммунофенотипический профиль тучных клеток и их проангиогенная роль в перитуморальной зоне и нормальном яичке

С целью оценки адаптационных механизмов выполнен иммунофенотипический анализ тучных клеток в перитуморальной зоне и в нормальном яичке. Соотношение их подтипов и степень их активации отражают характер местного иммунного ответа, влияние на неоангиогенез и ремоделирование стромального компонента, что может указывать на риск инвазии и метастазирования. Для оценки использованы маркеры: Тryptase – универсальный маркер тучных клеток; Chymase и CPA3, позволяющие дифференцировать подтипы ТК и судить об их функциональном состоянии и взаимодействии с другими иммунными и сперматогенными клетками.

В перитуморальной зоне семиномы pT1- и pT2-стадий и в нормальном яичке выявлено умеренное количество ТК, располагающихся преимущественно в межканальцевых пространствах и белочной оболочке (Рисунок 3.11).

Гистохимический анализ образцов, окрашенных Тoluидиновым синим показал снижение количества ТК в перитуморальной зоне при pT2-стадии в 3,1 раза по сравнению с pT1-стадией ($p < 0,001$); их количество в нормальном яичке превышало значения в перитуморальной зоне pT2-стадии в 1,5 раза ($p < 0,001$) и было меньше, чем в pT1-стадии, в 2,0 раза ($p < 0,001$).

При иммуногистохимическом анализе Тryptase-позитивных ТК обнаружили увеличение их количества в перитуморальной зоне при pT1-стадии в 2,7 раза по сравнению с pT2-стадией ($p < 0,001$); их количество в нормальном яичке превышало значения в перитуморальной зоне pT2-стадии в 1,6 раза ($p < 0,001$) и было меньше, чем в pT1-стадии в 1,7 раза ($p < 0,001$).

При иммуногистохимическом анализе Chymase-позитивных ТК выявлено увеличение их количества в перитуморальной зоне при pT1-стадии в 2,0 раза, в сравнении с pT2-стадией ($p < 0,001$); их численность в нормальном яичке было меньше значения в перитуморальной зоне pT1-стадии в 2,1 раз ($p < 0,001$) и практически соответствовало значениям перитуморальной зоне pT2 ($p = 0,392$).

При иммуногистохимическом анализе СРАЗ-позитивных ТК выявлено увеличение их количества в перитуморальной зоне при pT1-стадии в 3,0 раза по сравнению с pT2-стадией ($p < 0,001$); их количество в нормальном яичке практически соответствовало перитуморальной зоне pT1-стадии ($p = 0,121$) и было больше, чем в pT2-стадии, в 3,4 раза ($p < 0,001$) (Таблица 3.6) (Рисунок 3.11).

Таким образом, проведенный иммунофенотипический анализ тучных клеток в перитуморальной зоне семиномы демонстрирует увеличение их количества на pT1-стадии при значениях практически равных нормальному яичку, в pT2-стадии.

Таблица 3.6 – Количественная характеристика маркеров тучных клеток в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке на 1мм^2

Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
Толуидиновый синий	13,0 [8,84 – 16,35]	4,21 [1,35 – 6,96]	0,001*	6,41 [5,72 – 6,55]**
Tryptase	14,94 [10,04 – 17,18]	5,55 [3,05 – 7,70]	0,001*	8,84 [7,91 – 9,49]**
Chymase	11,72 [10,04 – 13,93]	5,77 [3,14 – 7,75]	0,001*	5,34 [4,94 – 5,75]**
СРАЗ	3,91 [2,32 – 6,49]	1,26 [0,78 – 2,91]	0,001*	4,37 [3,38 – 5,18]

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]
 * – по сравнению pT1 с pT2.
 ** – $p < 0.001$ по сравнению с pT1.

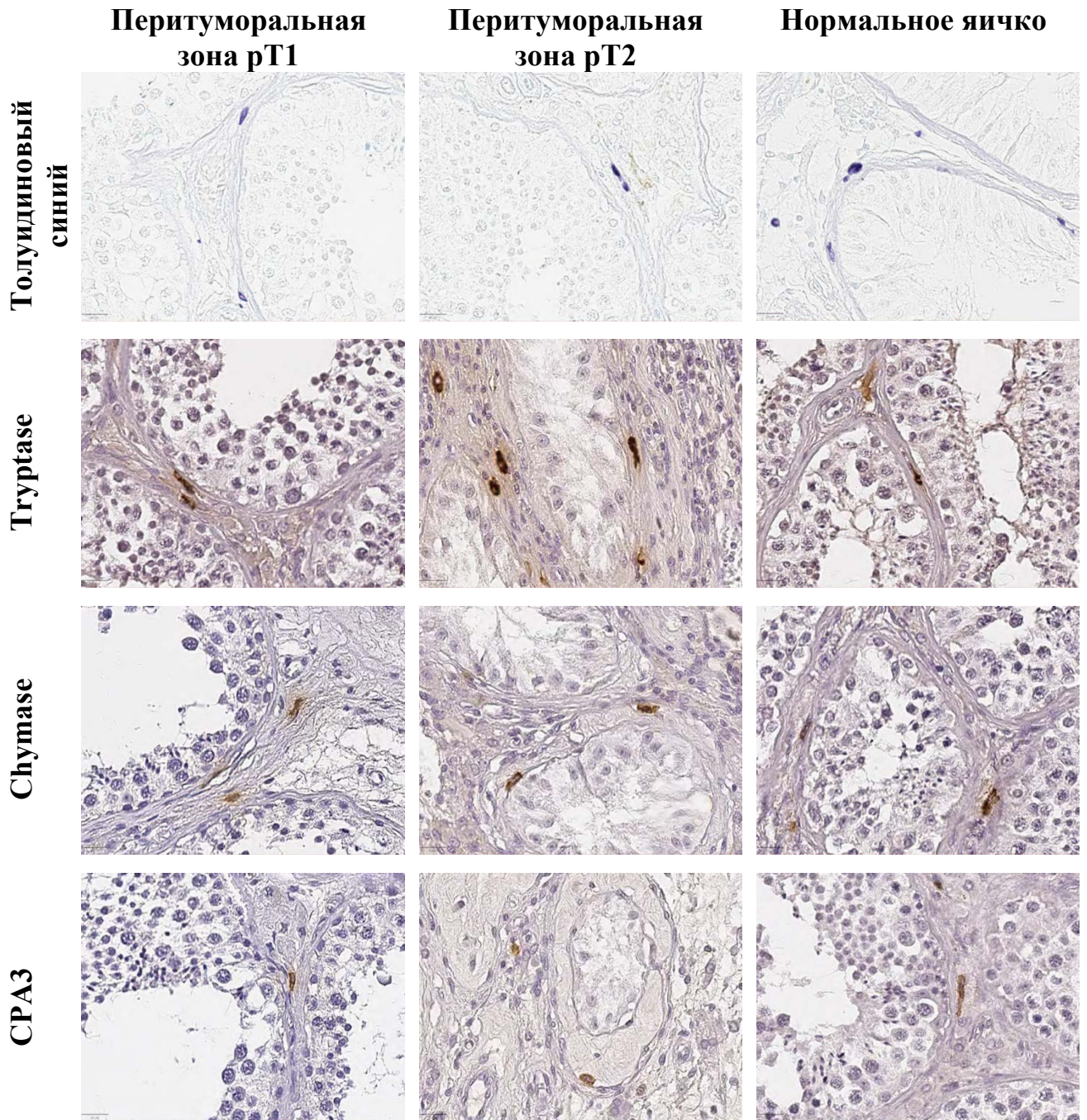


Рисунок 3.11 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Гистохимическое окрашивание с Толуидиновым синим. Иммуногистохимические реакции с антителами к Tryptase, Chymase, CPA3; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

Для комплексной визуализации ко-локализации гранул секрета тучных клеток в нормальном яичке и перитуморальной зоне сеиномы pT1- и pT2-стадий использовали мультиплексный иммуногистохимический метод, позволяющий иммунофенотипировать тучные клетки на основании разделения флуорофоров

(Tryptase, Chymase, CPA3). Кроме того, проанализировали взаимодействие ТК с эндотелием кровеносных сосудов (CD31+), а также наличие атипичных герминогенных клеток (PLAP).

3.8.1. Комбинация маркеров Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP (мультиплексное иммуномечение)

При анализе ко-экспрессии Tryptase⁺Chymase⁺CPA3⁺PLAP в нормальном яичке выявили различные подтипы тучных клеток, формирующие физиологический «референс»: Tryptase-позитивные (Tr⁺), Tryptase⁺Chymase-позитивные (Tr⁺Ch⁻) и Tryptase⁺Chymase⁺CPA3-позитивные (Tr⁺Ch⁺CPA3⁻). При анализе нормального яичка отмечено преобладание трижды позитивных тучных клеток (Tr⁺Ch⁺CPA3⁺). Сперматогенный эпителий оставался полностью PLAP-негативным – отсутствовало иммуномечение на эмбриональный маркер.

При оценке ко-локализации иммунопозитивных гранул ТК в перитуморальной зоне семиномы pT1- и pT2-стадий отмечено изменение их качественного состава: преобладал Tr⁺Ch⁺ фенотип ТК, при крайне малом количестве Tr⁺Ch⁺CPA3⁺. Указанные сдвиги долей согласуются с достоверными различиями исходной экспрессии маркеров между перитуморальной зоной и нормой при моноплексной пероксидазной иммуногистохимической реакции (Таблица 3.7) (Рисунок 3.12 – Рисунок 3.15).

3.8.2. Комбинация маркеров Tryptase+CD31 (диплексное иммуномечение)

Данная панель позволяет одновременно оценить топологию Tryptase-позитивных ТК относительно CD31+ кровеносных сосудов и их взаимодействие.

Для количественной оценки периваскулярной локализации ТК использовали показатель, отражающий долю Tryptase-позитивных ТК в радиусе 50 μm от CD31-

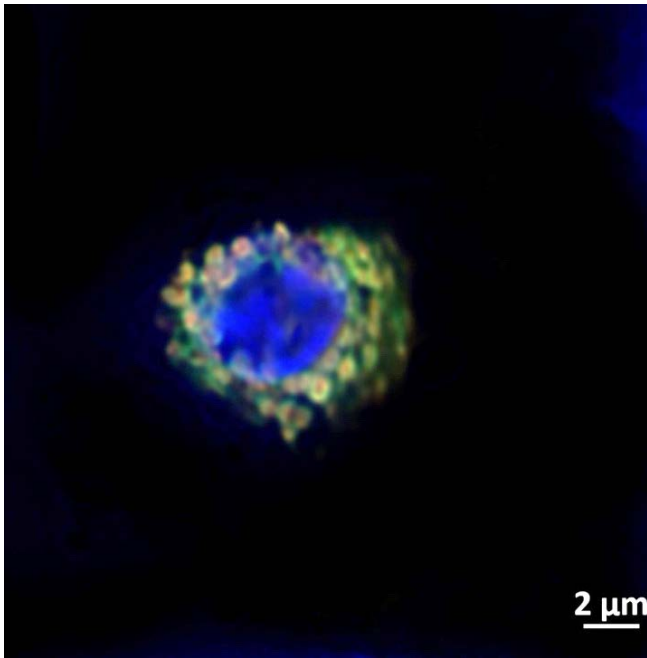
позитивных кровеносных сосудов, клеток, то есть клеток находящихся в непосредственном контакте, либо вплотную к сосудистой стенке.

В норме Тryptase-позитивные ТК склонны к перитубулярной и периваскулярной локализации, доля которых в непосредственном соседстве с кровеносными сосудами составляла $56,2 \pm 9,1$ %.

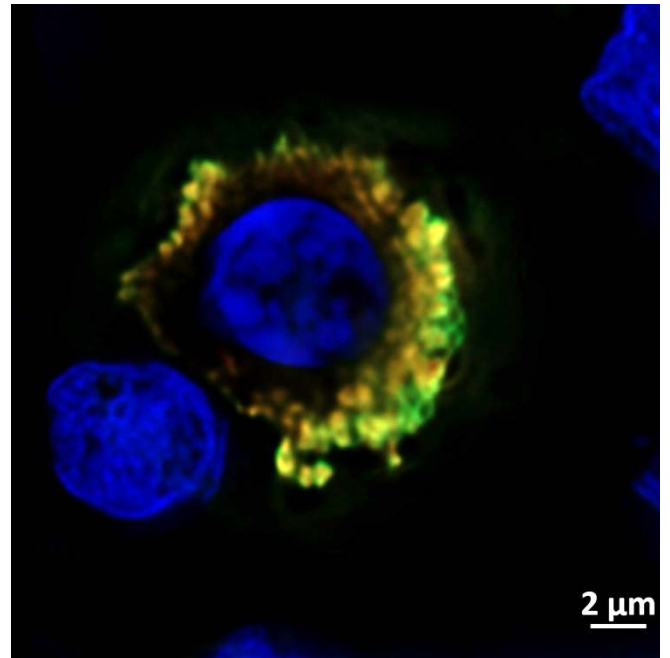
В перитуморальной зоне характер распределения тучных клеток носил аналогичный характер. Значительная часть из которых располагалась в непосредственной близости (в радиусе 50 мкм) от кровеносных сосудов, в pT1-стадии их доля составила $62,4 \pm 10,3$ %, а в pT2-стадии – $64,6 \pm 6,3$ %. Отмечалась тенденция к большему удельному содержанию таких клеток на pT2-стадии по сравнению с pT1, однако различия не достигали статистической значимости ($p = 0,069$) (Таблица 3.7) (Рисунок 3.16 – Рисунок 3.21).

Таблица 3.7 – Оценка доли Тryptase-позитивных тучных клеток, расположенных в радиусе 50 мкм от CD31-позитивных кровеносных сосудов в перитуморальной зоне семиномы и нормальном яичке

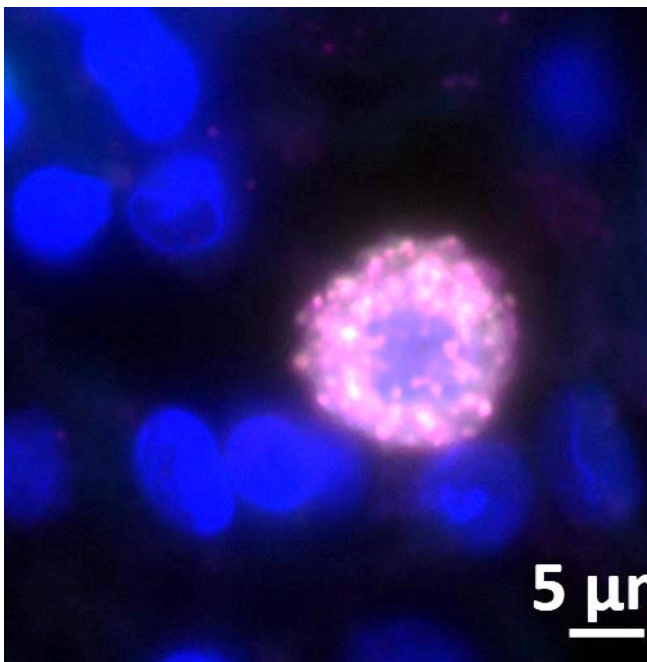
Маркер	Перитуморальная зона		p-value	Группа II (Нормальное яичко)
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)		
Tryptase ≥ 1 CD31 в 50 мкм, %	$62,4 \pm 10,3$	$64,6 \pm 6,3$	0,690*	$56,2 \pm 9,1$
Примечание: количественные данные представлены в виде $M \pm SD$ * – по сравнению pT1 с pT2.				



Яичко, норма.

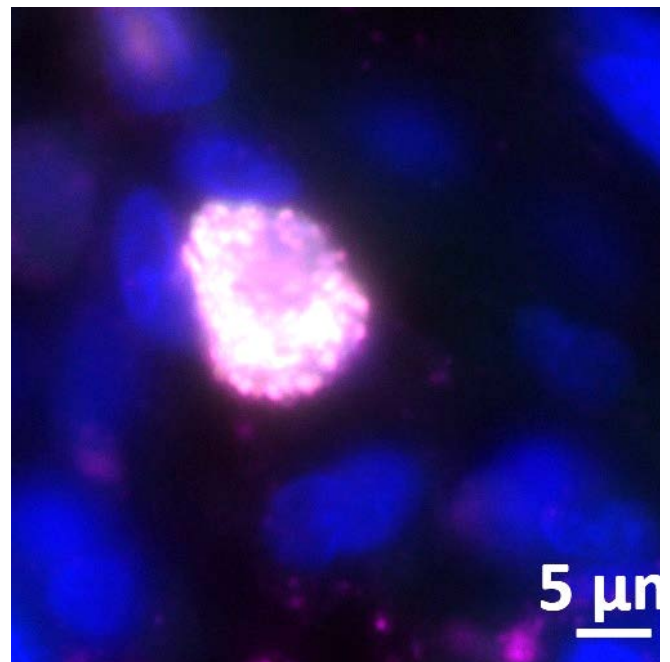


Яичко, норма.



Перитуморальная зона, семинома

pT1



Перитуморальная зона, семинома

pT2

Рисунок 3.12 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание секретома тучных клеток – комбинация Tryptase+Chymase+CBA3. Tryptase – зеленое свечение; Chymase – розовое свечение; CBA3 – желтое свечение. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

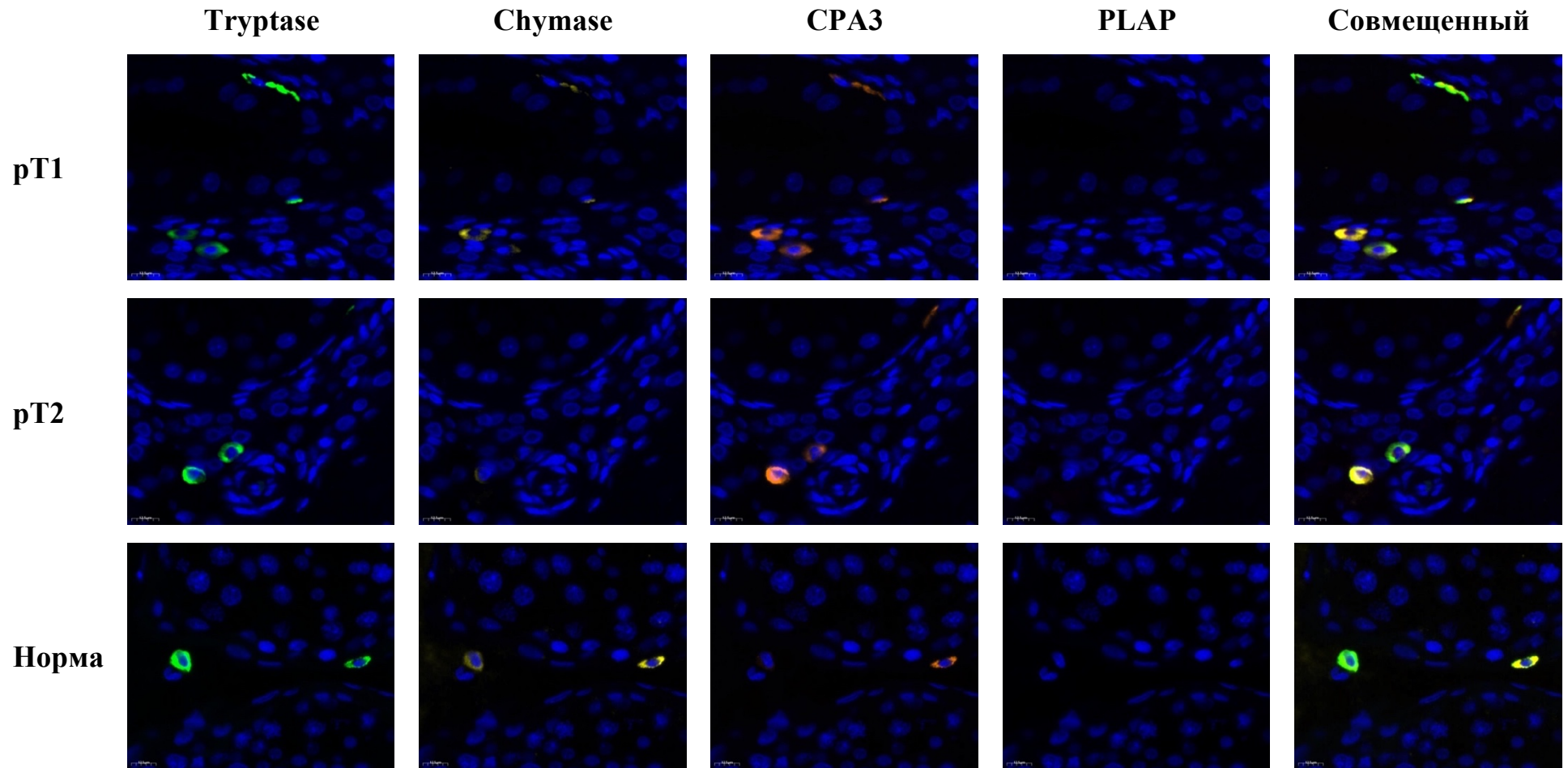
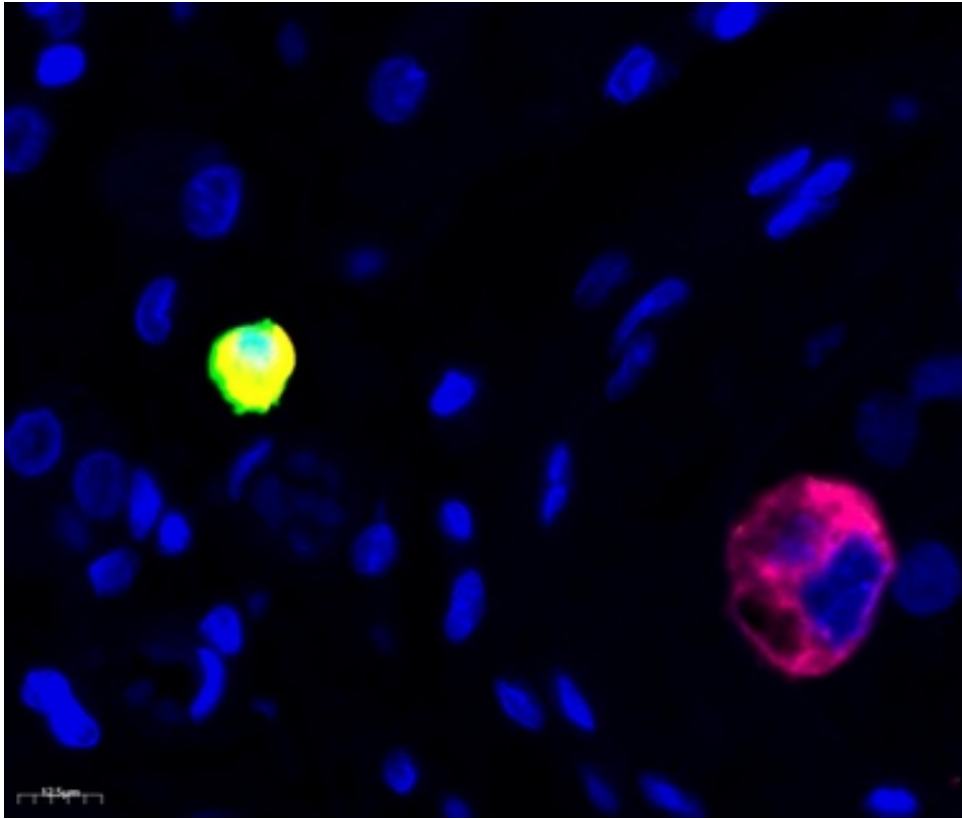
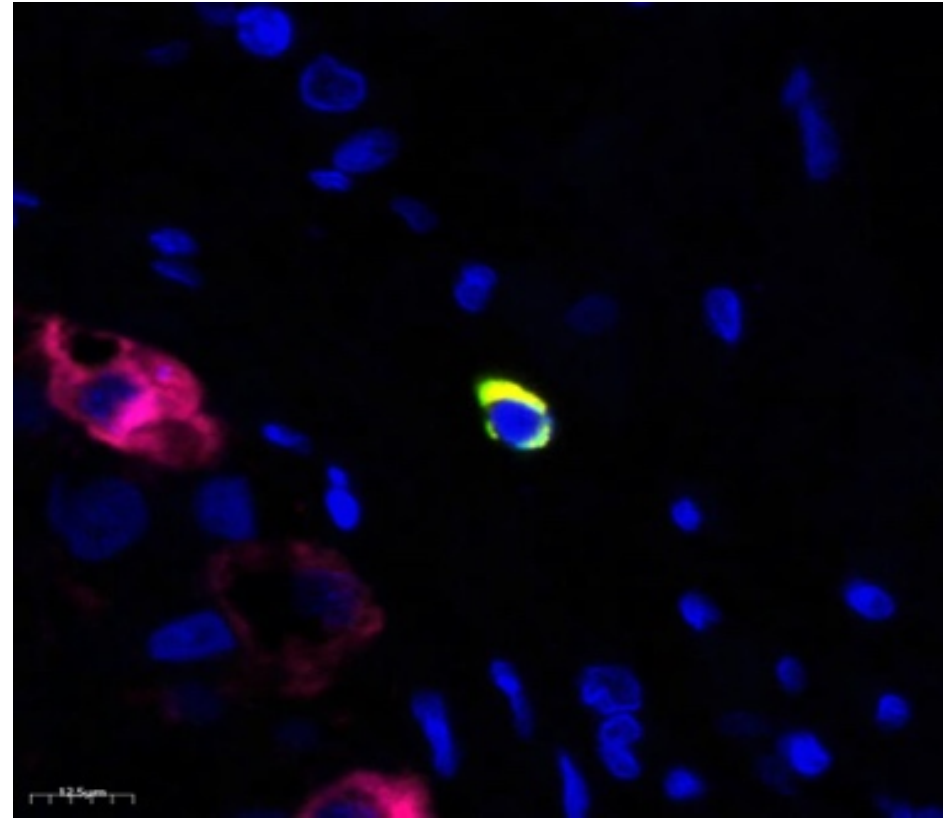


Рисунок 3.13 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), Chymase (желтое свечение), CPA3 (оранжевое свечение) и PLAP (розовое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

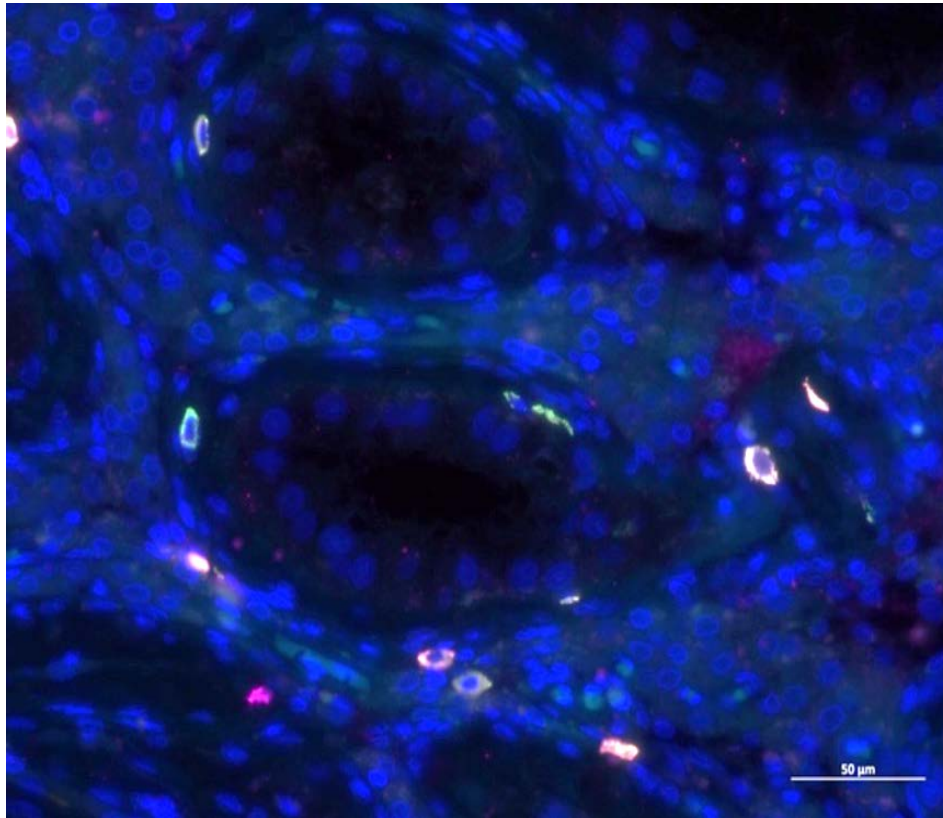


**Перитуморальная зона, семинома pT1.
Tryptase+Chymase+CPA3**

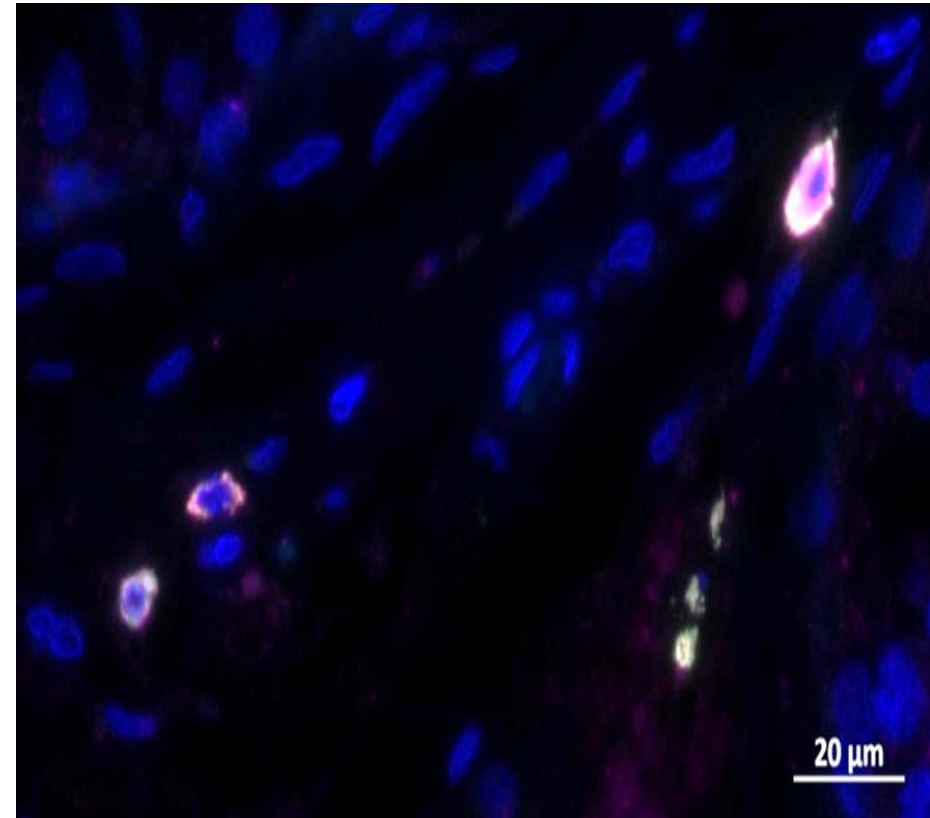


**Перитуморальная зона, семинома pT2.
Tryptase+Chymase+CPA3**

Рисунок 3.14 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), Chymase (желтое свечение), CPA3 (оранжевое свечение) и PLAP (розовое свечение). Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия. Обращает внимание на наличие PLAP+ клеток в сперматогенном эпителии, что говорит о наличии герминальной неоплазии



**Перитуморальная зона, семинома pT1.
Tryptase+Chymase+CPA3**



**Перитуморальная зона, семинома pT2.
Tryptase+Chymase+CPA3**

Рисунок 3.15 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), Chymase (желтое свечение), CPA3 (оранжевое свечение). Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+Chymase+CPA3. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

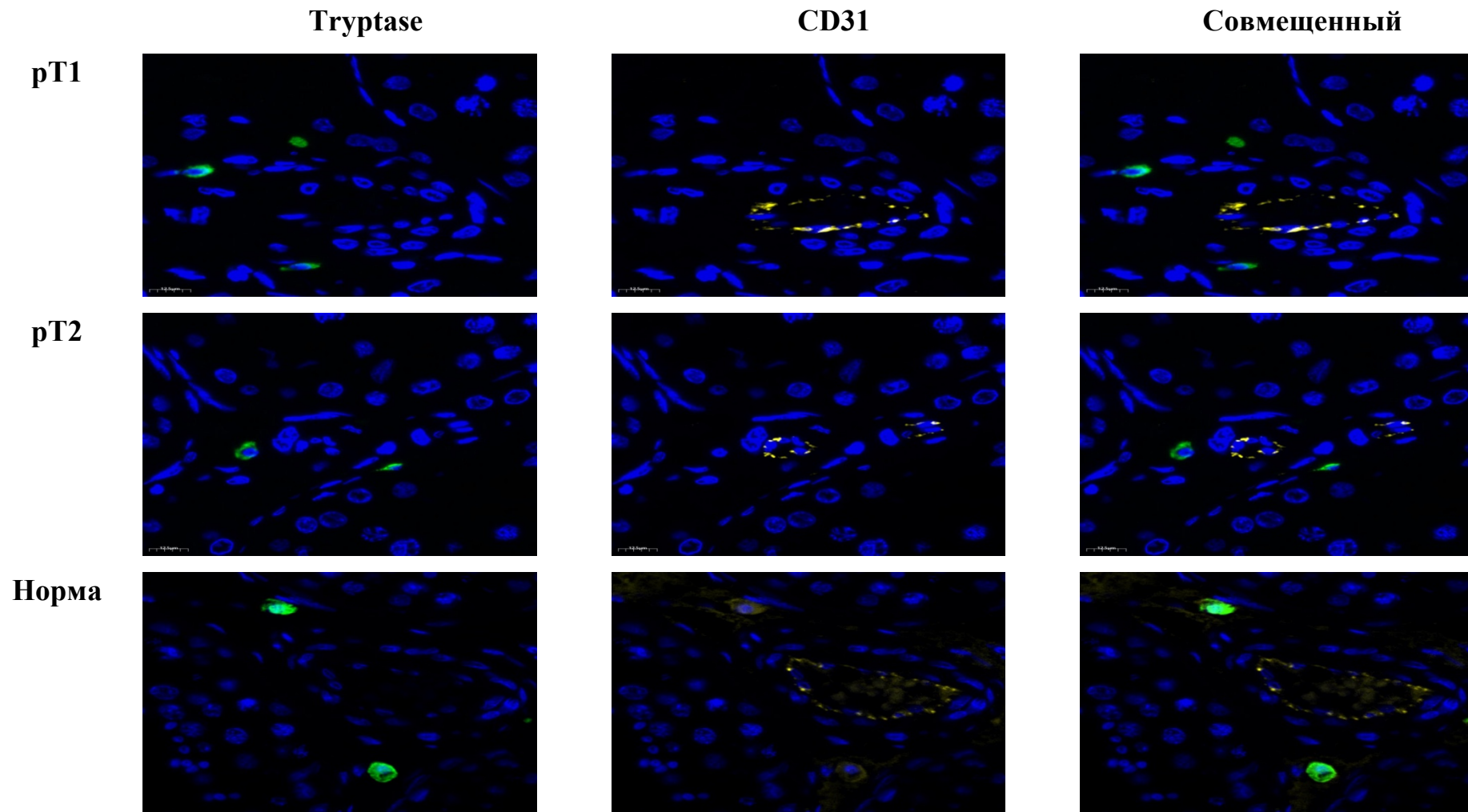


Рисунок 3.16 – Перитуморальная зона, семинома (pT1, pT2) и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), CD31 (желтое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

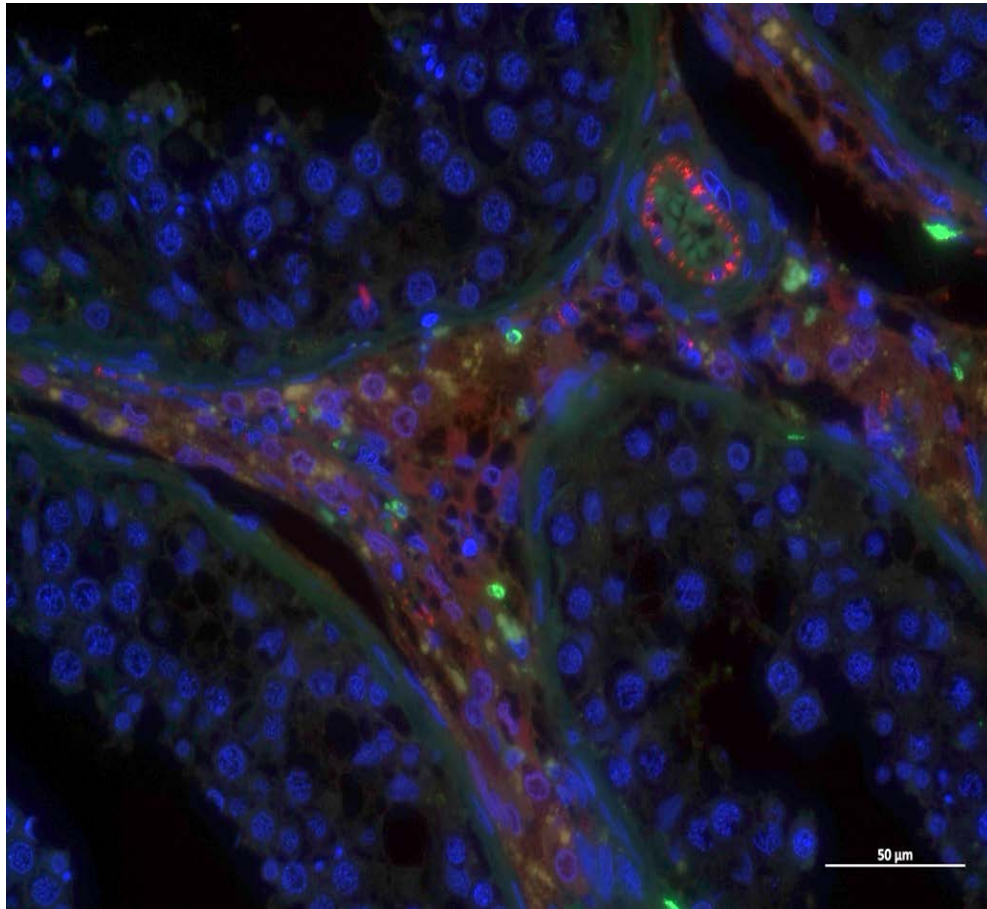
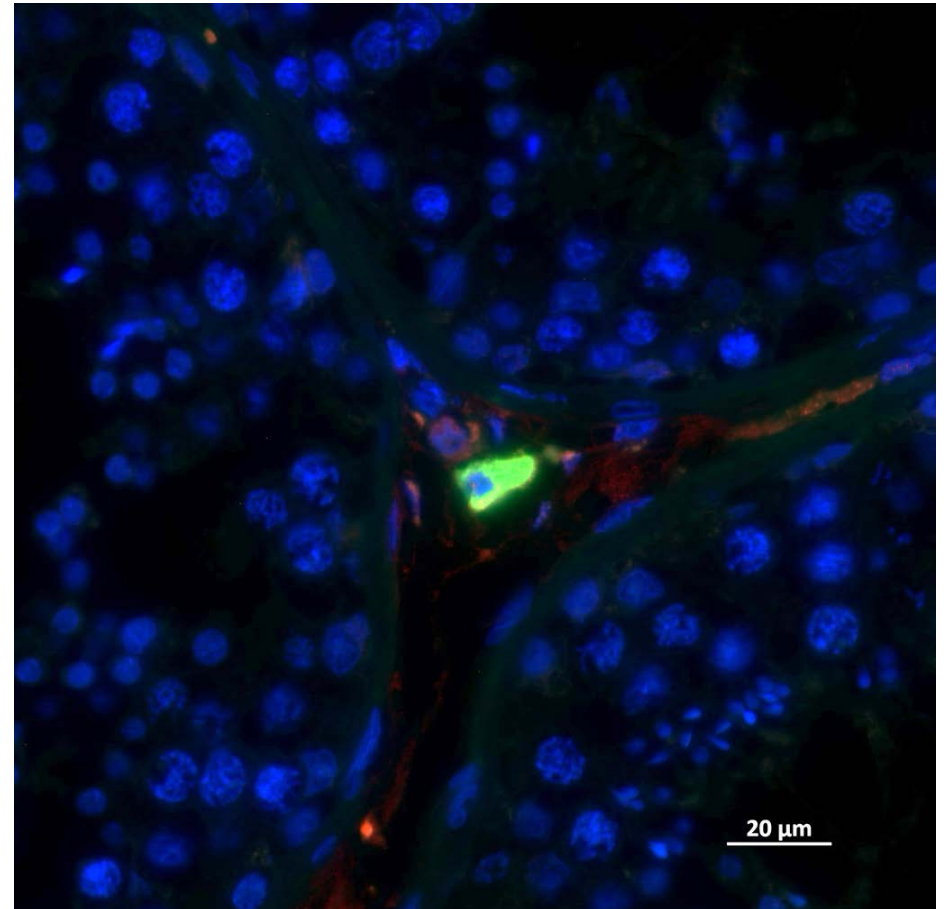
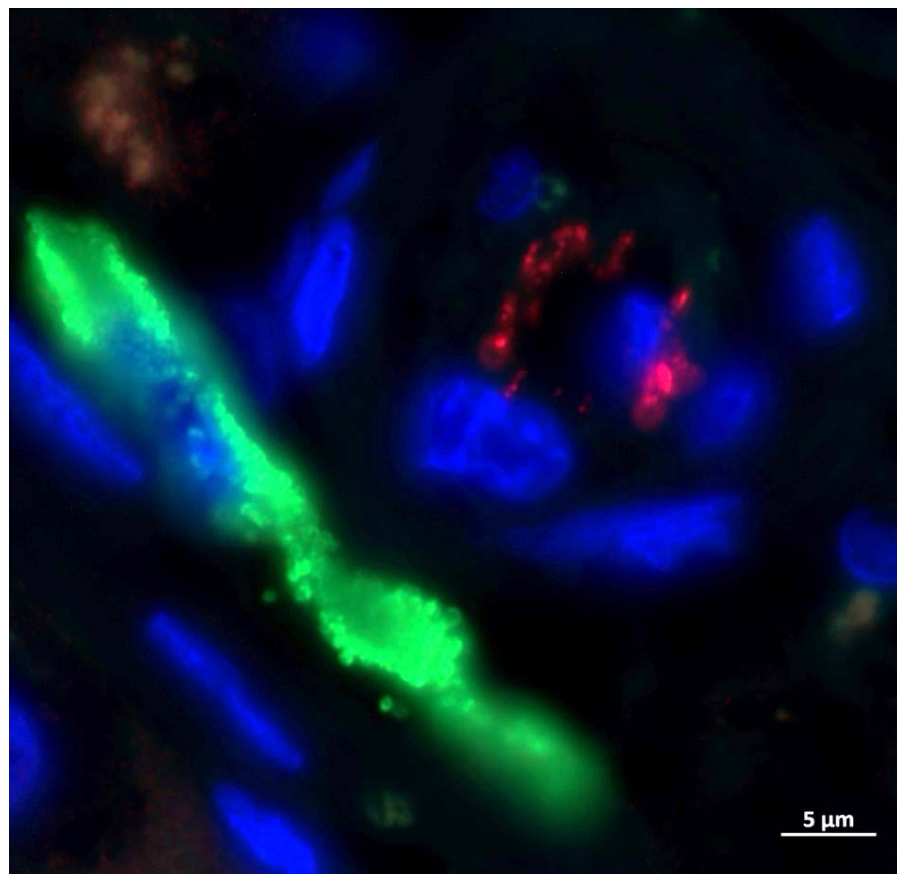
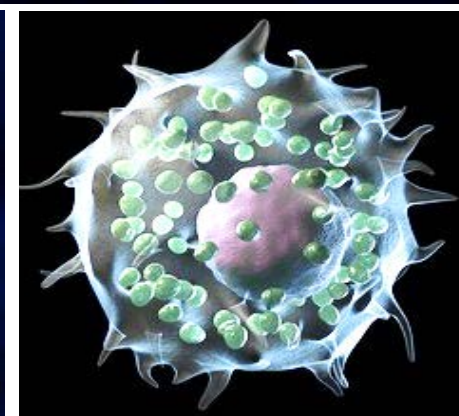
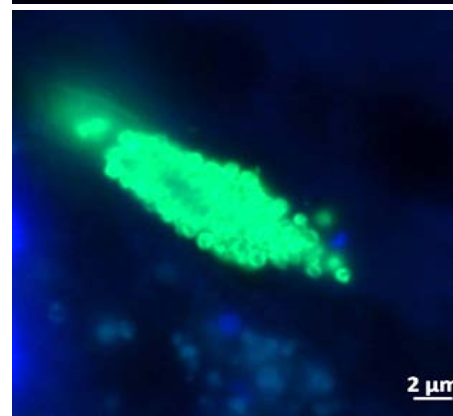
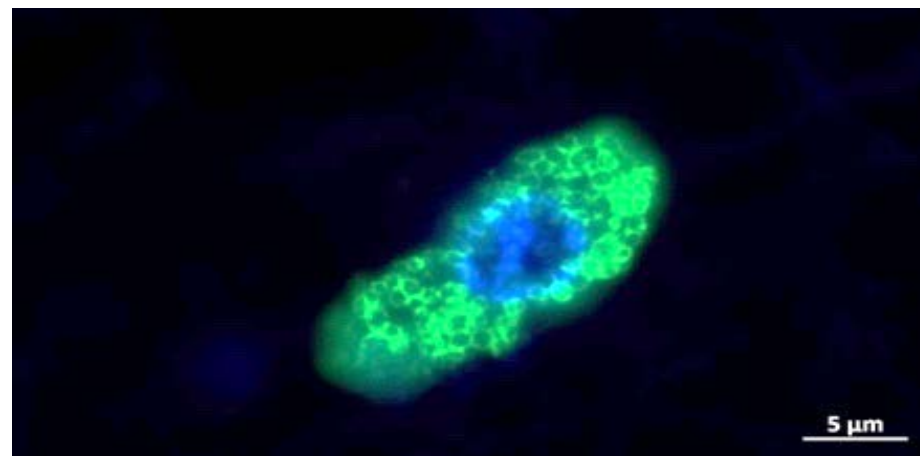
**Tryptase+CD31****Tryptase+CD31**

Рисунок 3.17 – Яичко, норма. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток (зеленое свечение) и эндотелия (CD31 – красное свечение) кровеносных сосудов. Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

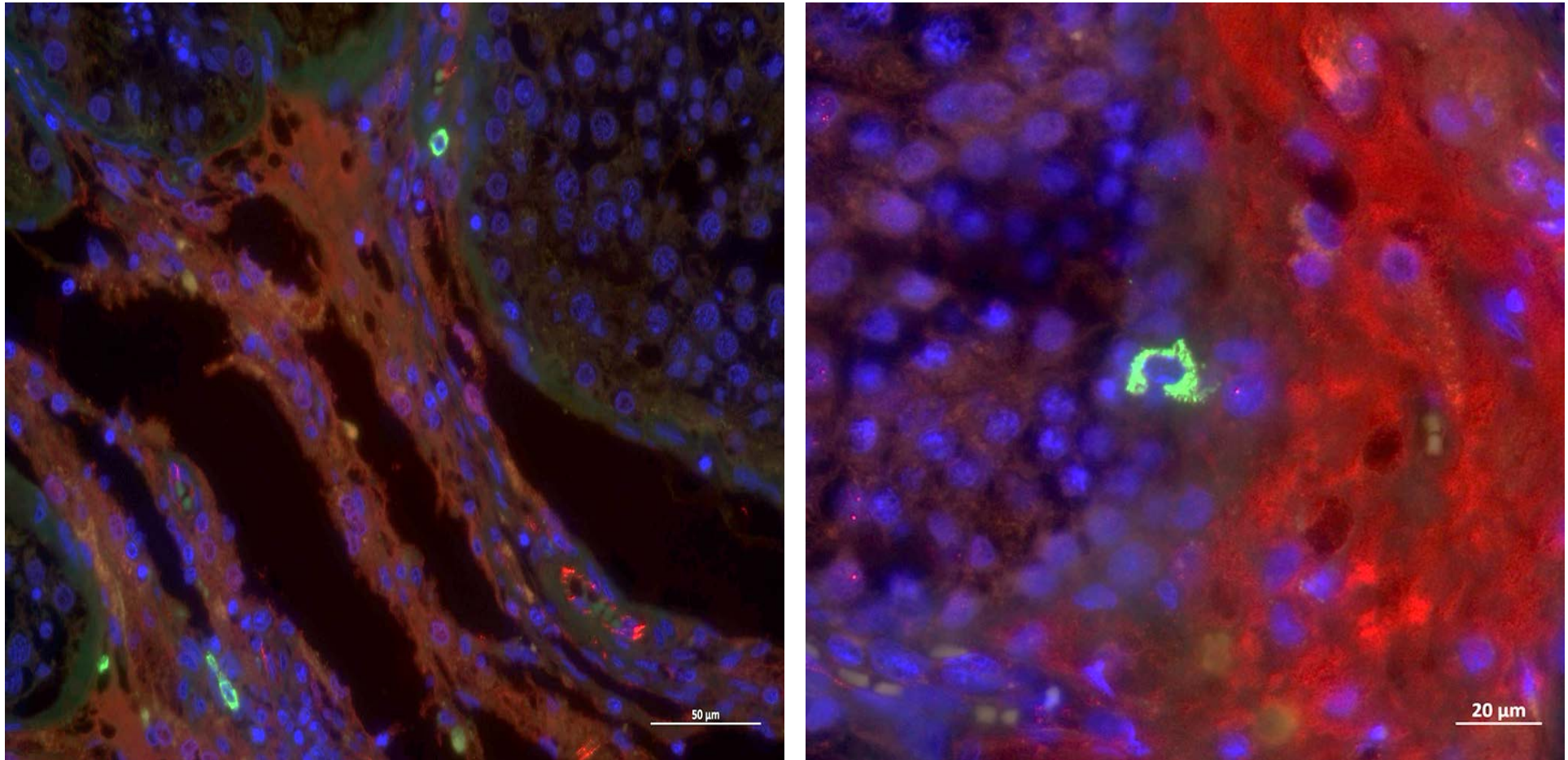


Tryptase+CD31



Tryptase+CD31

Рисунок 3.18 – Яичко, норма. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток (зеленое свечение) и эндотелия (CD31 – красное свечение) кровеносных сосудов. Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия. Справа внизу – рисунок-схема тучной клетки с гранулами триптазы



Перитуморальная зона, семинома pT1. Tryptase+CD31 **Перитуморальная зона, семинома pT2. Tryptase+CD31**

Рисунок 3.19 – Перитуморальная зона семиномы. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток (зеленое свечение) и эндотелия (CD31 – красное свечение) кровеносных сосудов. Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

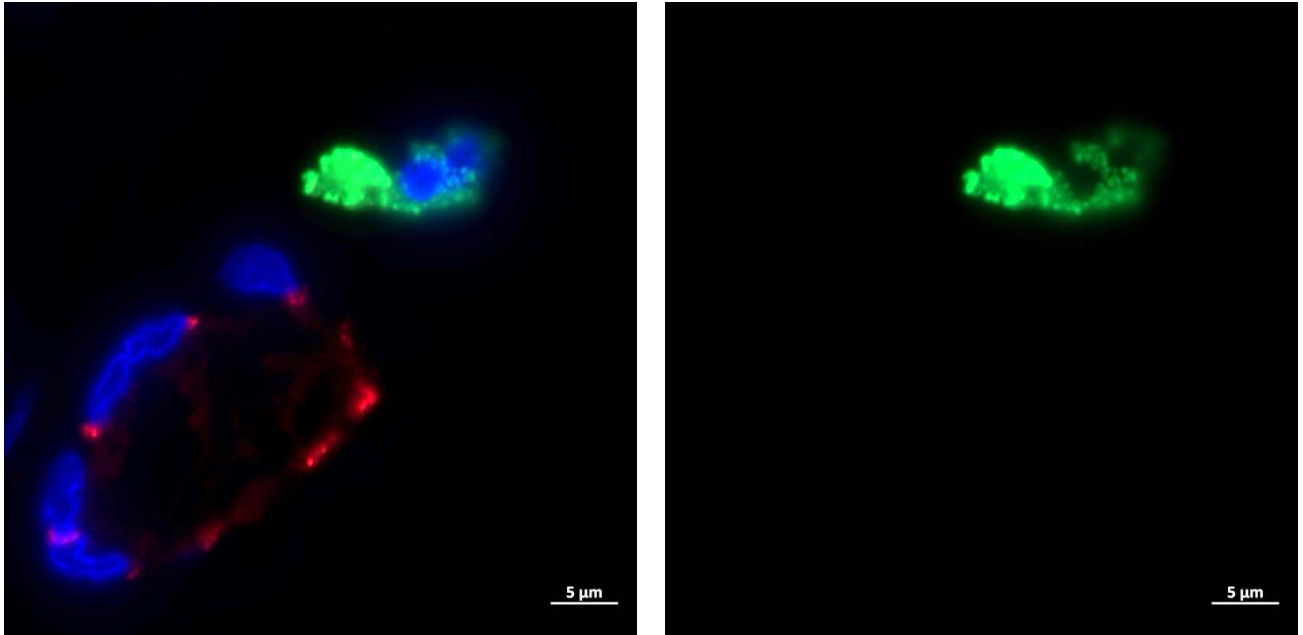


Рисунок 3.20 – Перитуморальная зона семиномы pT1. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток (зеленое свечение) и эндотелия (CD31 – красное свечение) кровеносных сосудов. Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

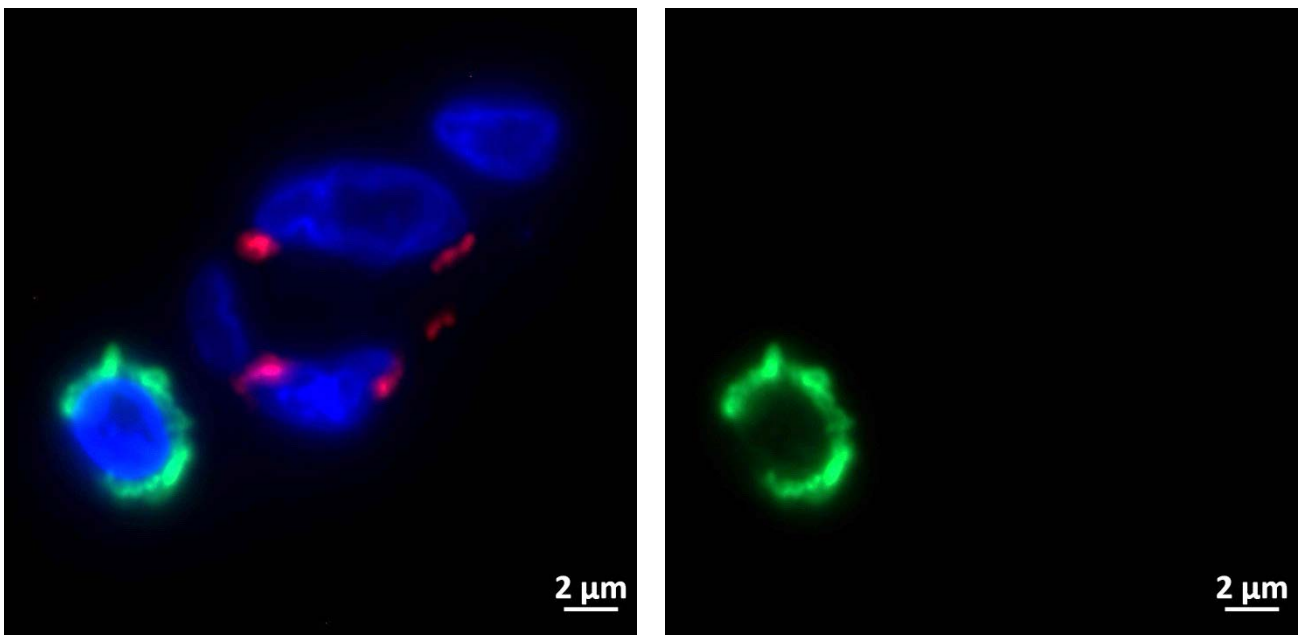


Рисунок 3.21 – Перитуморальная зона семиномы pT2. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток (зеленое свечение) и эндотелия (CD31 – красное свечение) кровеносных сосудов. Представлены совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

Резюме главное

При анализе перитуморальной зоны неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий выявлен ряд структурно-функциональных изменений по сравнению с нормальным яичком. Установлены органоспецифические особенности ремоделирования в условиях увеличения количества иммунных клеток, прежде всего CD8 и CD4. CD163 практически отсутствуют в перитуморальной зоне pT1- и pT2-стадий и в нормальном яичке, тогда как количество CD68 макрофагов снижается. В нормальном яичке Tryptase-, Chymase-, CPA3-позитивные, а также окрашенные Толуидиновым синим тучные клетки располагаются в интерстициальной ткани, преимущественно вокруг извитых семенных канальцев.

Таким образом, перитуморальная зона является ключевой структурно-функциональной областью, в которой наиболее рано проявляются и закрепляются изменения иммунного и стромально-сосудистого ответа на опухоль. Вероятно, именно характеристики этой зоны в наибольшей степени определяют биологическое поведение семиномы – интенсивность инвазии, вероятность прогрессирования и риск последующего метастазирования. Поэтому оценка перитуморальной зоны может рассматриваться как перспективный источник прогностических маркеров и мишеней для персонализации терапии.

Семинома – клинически и морфогенетически показательная «модель» герминогенной опухоли, ассоциированная с герминогенной неоплазией *in situ* и формирующаяся в условиях иммунопривилегированного статуса яичка на фоне нарушений механизмов пренатального развития. Особый интерес вызывает выраженный характер воспалительного инфильтрата, отличающий семиному от несеминозных опухолей яичка.

В норме дифференцировка половых клеток обеспечивается скоординированной работой соматических элементов стенки извитых семенных канальцев, а при малигнизации первыми на сдвиг гомеостаза реагируют «поддерживающие» клетки: снижается функция гемато-тестикулярного барьера, изменяются состав и поляризация иммунных клеток, сосудистая архитектура, а также происходит ремоделирование матрикса.

В данном контексте семинома характеризуется утратой иммунной привилегии и перестройкой ниши сперматогенеза. Анализ взаимодействий атипичных сперматогенных клеток с иммунными и элементами стромального компонента позволяет выявить механизмы, регулирующие биологию сеиномы.

3.9. Клиническая характеристика пациентов с неметастатической сеиномой pT1- и pT2-стадий

Анализ клинической документации проводили у 96 пациентов с неметастатической сеиномой pT1- и pT2-стадий.

Средний возраст всех пациентов составил $38,5 \pm 9,8$ года (медиана – 34,0 года; диапазон 23-63 года). Большинство из них ($\approx 70\%$) были моложе 37 лет, что согласуется с эпидемиологическими данными о герминогенных опухолях в популяции.

Сеинома стадии pT1 была диагностирована у 54 (56 %) пациентов, стадии pT2 – у 42 (44 %), то есть pT1 встречалась в 1,3 раза чаще. Таким образом, преобладали случаи опухолей, ограниченных яичком и rete testis (без инвазии tunica vaginalis и признаков лимфоваскулярной инвазии), что указывает на своевременную диагностику у значительной части пациентов. Средний возраст пациентов в подгруппах: $37,7 \pm 9,8$ года при pT1 и $39,4 \pm 9,9$ при pT2 ($p = 0,393$).

При анализе антропометрических данных выявлено статистически значимое различие по индексу массы тела: у пациентов со стадией pT2 средний ИМТ был выше ($28,1 \pm 4,8$ кг/м²) по сравнению с pT1 ($26,0 \pm 3,50$ кг/м²; $p = 0,019$). Анатомо-топографическое распределение стороны поражения статистически значимо не различалось: при pT1 правое яичко – 50 %, левое – 46 %, двустороннее поражение – 4 %; при pT2 правое яичко было поражено у 52 %, а левое у 48 % соответственно ($\chi^2 = 1,59$; $p = 0,452$). Частота имплантации протеза яичка, распространенность курения ($\sim 1/3$ пациентов) и сопутствующих заболеваний яичек (включая крипторхизм в анамнезе, микролитиаз и др.) между стадиями существенно не отличались ($p > 0,05$) (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Сравнительная характеристика эпидемиологических и клиничко-анамнестических данных пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

Количественные параметры	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	p-value	
Возраст, лет			0,393	
Среднее ± SD	37,7 ± 9,8	39,4 ± 9,9		
Медиана [Q1 – Q3]	37 [30 – 45]	37 [31 – 48]		
Индекс массы тела, кг			0,019*	
Среднее ± SD	28,1 ± 4,8	26,0 ± 3,5		
Медиана [Q1 – Q3]	28 [24 – 31]	27 [24 – 28]		
Категориальные параметры	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	χ^2	p-value
Молодой возраст	39 (72 %)	29 (69 %)	0,115	0,735
<i>Сторона поражения</i>				
Правое яичко	27 (50 %)	22 (52 %)	1,591	0,452
Левое яичко	25 (46 %)	20 (48 %)		
Двухстороннее поражение	2 (4 %)	0 (0 %)		
Протезирование	13 (24 %)	7 (16 %)	0,786	0,376
Курение	14 (26 %)	16 (30 %)	1,628	0,202
Соматические заболевания яичек	10 (19 %)	10 (24 %)	0,401	0,527
Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).				

Таким образом, результаты клинического и эпидемиологического анализа демонстрируют отсутствие статистически значимых различий среди большинства сравниваемых характеристик между стадиями pT1 и pT2, за исключением антропометрических данных и уровня ИМТ, что может указывать на некоторые различия в распределении пациентов по стадиям заболевания.

Частота повышения уровня β -ХГЧ была значительно выше в группе pT2 по сравнению с pT1. Этот показатель был в 7,3 раза выше на более поздней стадии заболевания ($p < 0,001$), что подтверждается низким значением отношения шансов (ОШ = 0,09; 95 % ДИ 0,02 – 0,32). Это различие может свидетельствовать о более выраженной опухолевой активности на стадии pT2 и указывать на возможное

использование β -ХГЧ как прогностического маркера для более агрессивных форм заболевания (Таблица 3.9).

В отличие от β -ХГЧ, уровень АФП и ЛДГ не продемонстрировали статистически значимых различий между стадиями pT1 и pT2. Показатели отношения шансов для этих маркеров близки к единице, что подтверждается результатами анализа (ОШ = 1,10; 95 % ДИ: 0,32 – 3,76 для АФП и ОШ = 1,12; 95 % ДИ: 0,44 – 2,85 для ЛДГ). Полученные результаты статистического анализа свидетельствуют о том, что повышение уровня этих маркеров не является специфичным для различения стадий заболевания в данной выборке пациентов.

Таким образом, частота предоперационного повышения специфических опухолевых маркеров демонстрирует, что β -ХГЧ может служить важным индикатором для различия стадий семиномы, в то время как АФП и ЛДГ не показали значимых различий между pT1- и pT2-стадиями, что ограничивает их роль в качестве дифференциальных маркеров на ранних и более поздних стадиях заболевания.

Таблица 3.9 – Сравнительный анализ частоты предоперационного повышения специфических опухолевых маркеров у пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

Гормоны	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Iб (pT2N0M0) (n = 42)	χ^2	p-value	Отношение шансов (ОШ) [95 % ДИ]
АФП	7 (13,0 %)	5 (11,9 %)	0,02	0,877	1,10 [0,32 – 3,76]
β -ХГЧ	3 (5,6 %)	17 (40,5 %)	17,47	<0,001*	0,09 [0,02 – 0,32]
ЛДГ	14 (25,9 %)	10 (23,8 %)	0,06	0,813	1,12 [0,44 – 2,85]

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

3.10. Гистологическое исследование неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий

Терапевтическая тактика, применяемая при семиноме, должна базироваться на этиологических особенностях и гистологической принадлежности опухоли.

При гистологическом исследовании образцов яичка пациентов I группы (n = 96) во всех случаях выявлена классическая семинома дольчатого строения с тотальной герминативной катаплазией – появлением слабодифференцированных или недифференцированных клеток, сходных с эмбриональными. Опухолевые комплексы сформированы крупными полигональными клетками с обильной светлой (оптически пустой) цитоплазмой и четко очерченными границами; ядра преимущественно многоугольной формы, с рыхлой хроматиновой структурой и одним или несколькими крупными ядрышками. Стромальный компонент представлен волокнистой соединительной тканью, формирующей тонкие фиброзные перегородки. В опухоли и перитуморальной зоне отмечена умеренная воспалительная инфильтрация, представленная скоплениями лимфоцитов, плазмочитов и других иммунокомпетентных клеток. Дополнительно наблюдались интерстициальный отек, микрокистозные изменения и очаги коагуляционного некроза, особенно выраженные в области белочной оболочки, где также регистрировалась воспалительная инфильтрация (Рисунок 3.22).

Морфологическая картина семиномы pT1 характеризуется ограничением опухолевого узла паренхимой яичка и сетью яичка без признаков сосудистой или лимфатической инвазии. Опухолевые клетки крупные, полигональные, с широкой светлой цитоплазмой; ядра округлые или слегка угловатые, с выраженным ядрышком. Архитектоника дольчатая: гнезда и тяжи опухолевых клеток разделены тонкими фиброзными перегородками, в которых определяется лимфоцитарная инфильтрация. Местами фиксировались мелкие очаги коагуляционного некроза и микрокисты; интерстициальный отек умеренный. В ряде наблюдений отмечалась фокальная инвазия в белочную оболочку (n = 29; 53,7 %) без распространения во

влагалищную оболочку. В перитуморальной паренхиме сохраняются признаки тотальной герминальной аплазии.

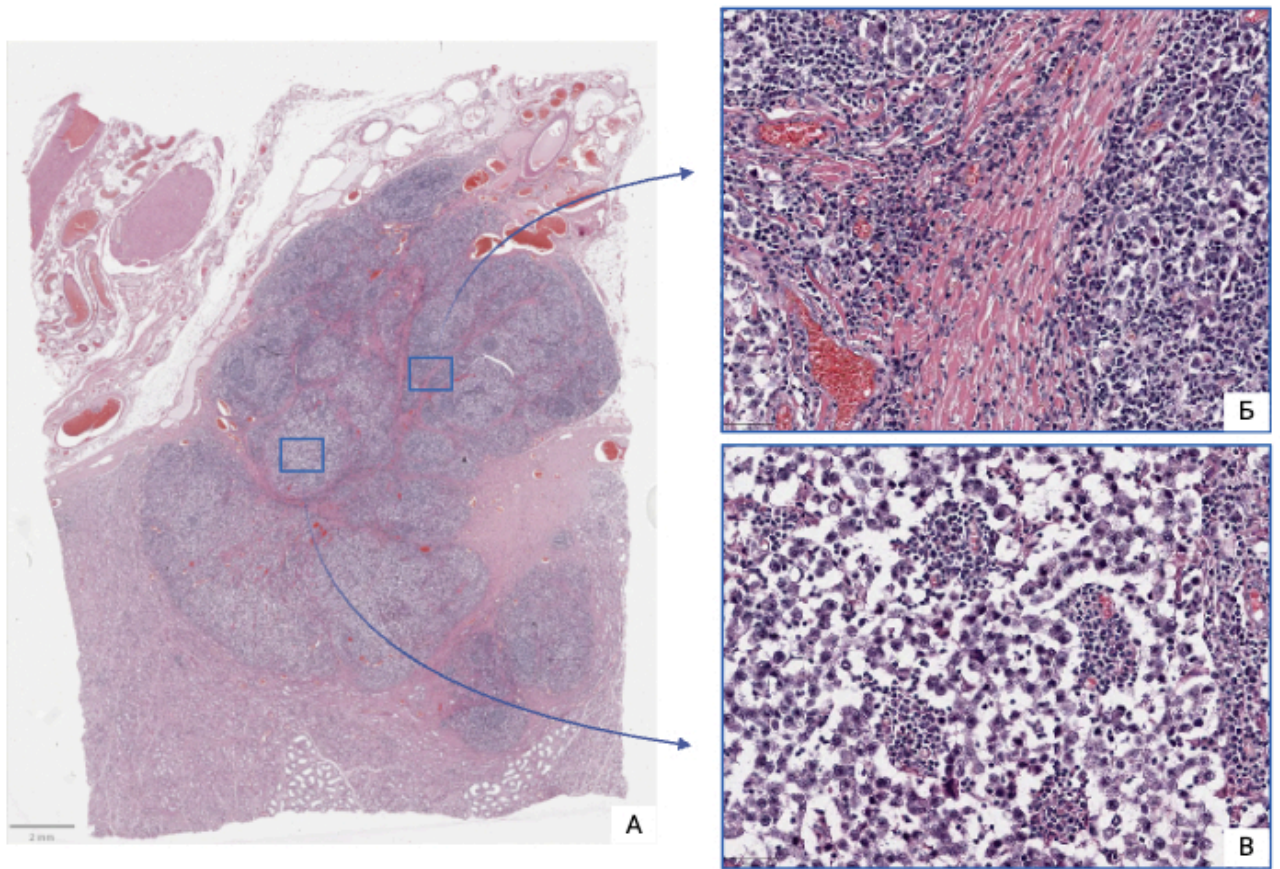


Рисунок 3.22 – Пациент С., 23 года. Семинома pT1-стадия. А – гистоскан; Б – строма; В – опухоль. Окрашивание: гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$

Для семиномы pT2 характерны сосудистая и/или лимфатическая инвазия с прорастанием в белочную и во влагалищную оболочку. Цитологический облик клеток типичен для сеином (крупные клетки со светлой цитоплазмой и выраженными ядрышками), однако их организация становится более узловатой, с очагами повышенной клеточной плотности. В строме чаще выявляются более обширные зоны коагуляционного некроза, выраженный интерстициальный отек и выраженная лимфоцитарная инфильтрация, нередко с периваскулярной организацией. В отдельных полях зрения обнаруживаются тромбы и эмболы опухолевых клеток в просветах сосудов малого и среднего калибра. Инвазия оболочек и наличие лимфо-/гемоваскулярной инвазии свидетельствуют о более агрессивном локальном росте по сравнению с pT1 (Рисунок 3.23).

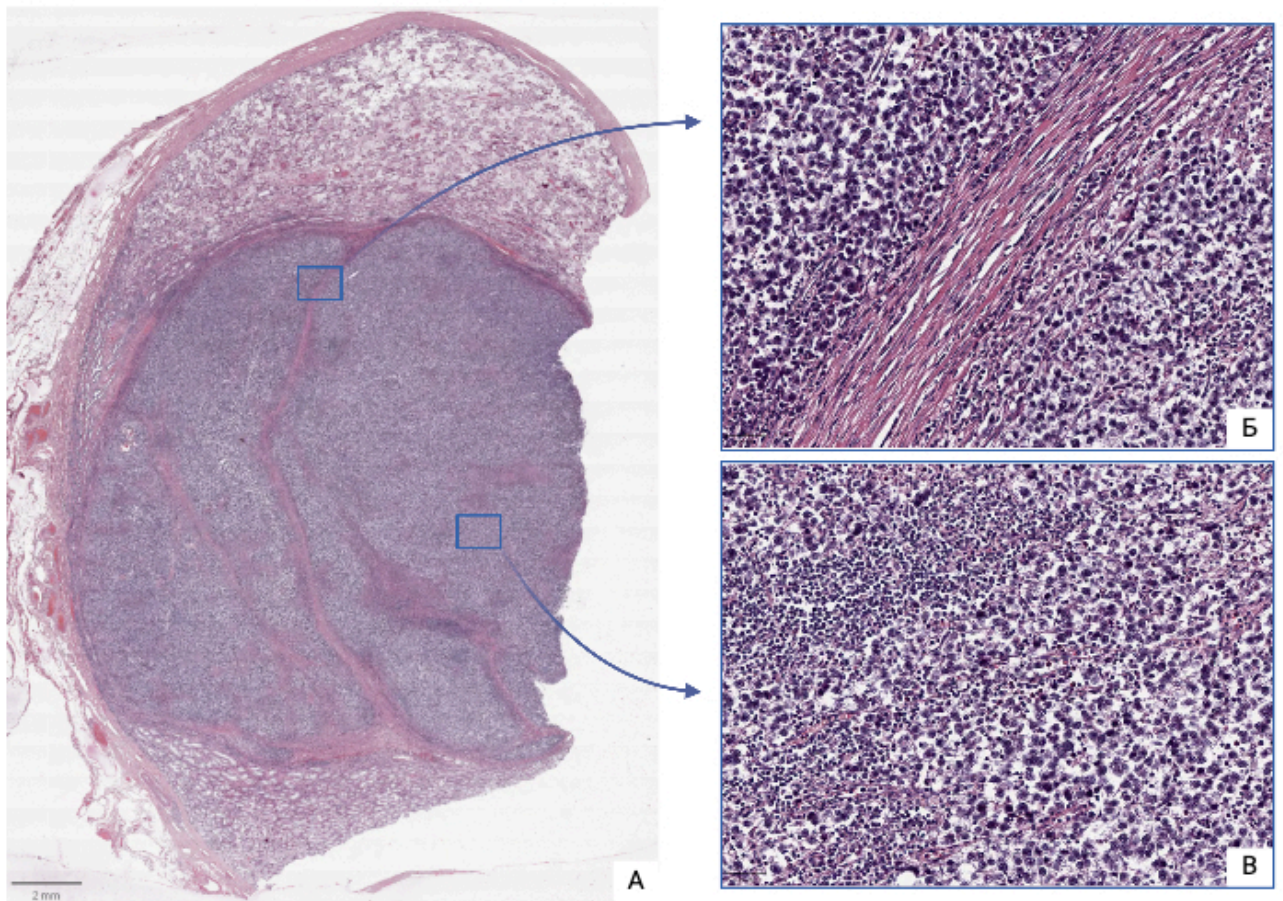


Рисунок 3.23 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. А – гистоскан; Б – строма; В – опухоль. Окрашивание: гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$

Всем пациентам ($n = 96$; 100 %) после комплексного обследования в качестве радикального хирургического лечения была выполнена орхифуникулэктомия, при этом 20 (21 %) пациентов изъявили желание установить силиконовые имплантаты.

При иммуногистохимической верификации во всех образцах ($n = 96$, 100 %) была подтверждена гистогенетическая принадлежность опухолей к классической семиноме с наличием PLAP- и OCT3/4-позитивных атипичных клеток. Феномен утраты органоспецифических и приобретение эмбриональных антигенов атипичными клетками может обеспечивать их «неуязвимость» перед иммунной системой, поскольку данные антигены не индуцируют выработку антител. Морфологическая картина соответствовала pT1-стадии ($n = 54$; 56,3 %) и pT2-стадии ($n = 42$; 43,8 %) семиномы (Рисунок 3.24, Рисунок 3.25).

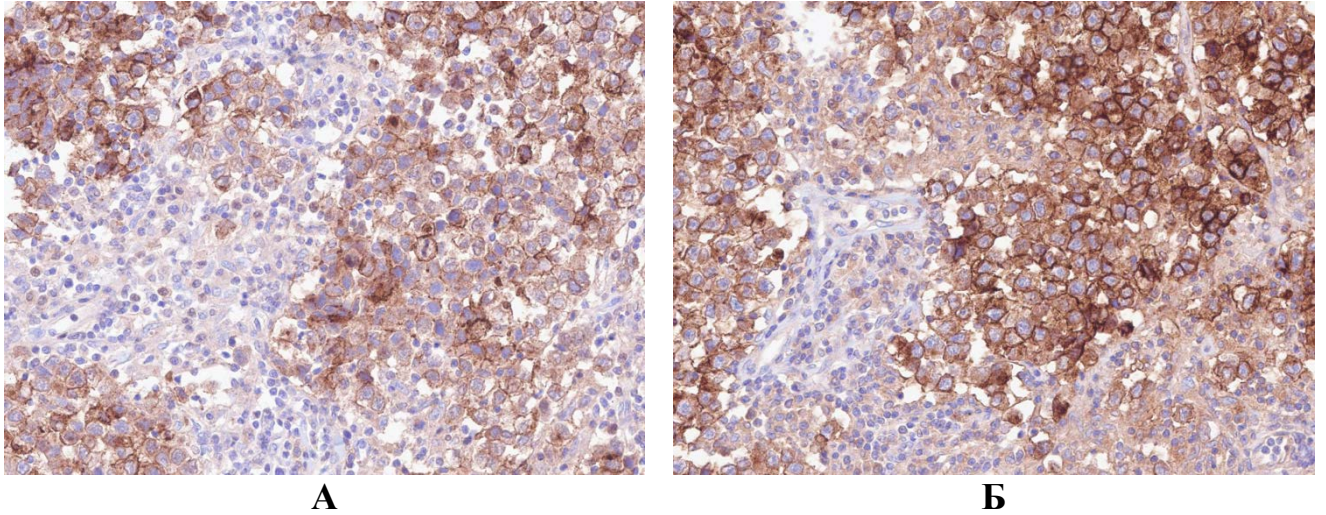


Рисунок 3.24 А – Пациент С., 23 года. Семинома pT1-стадия. Б – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. Иммуногистохимическая реакция с антителами к PLAP; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

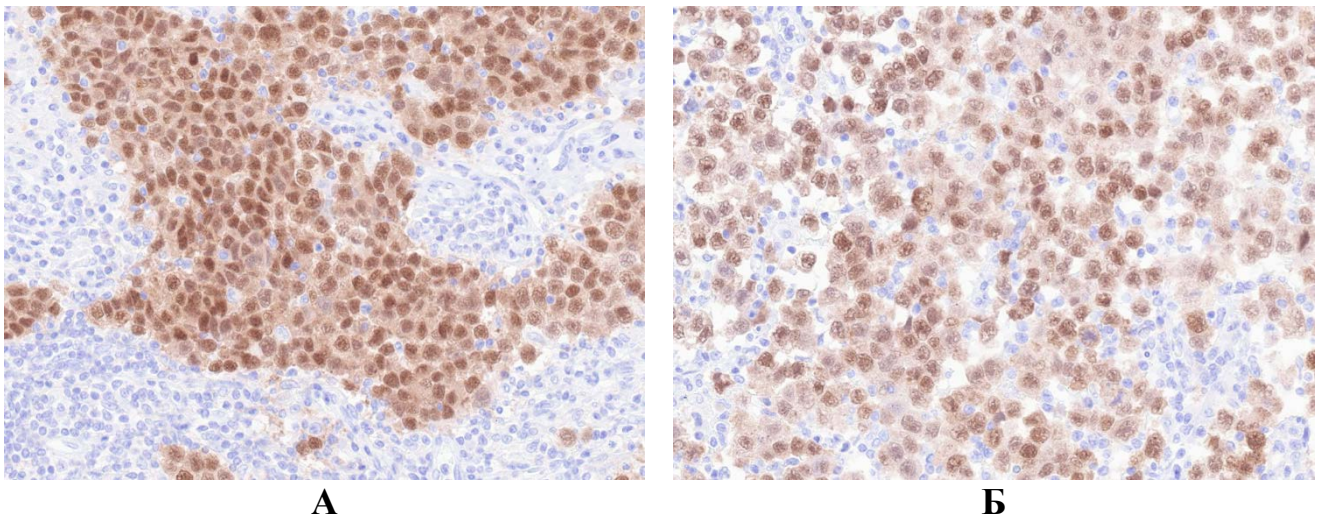


Рисунок 3.25 А – Пациент С., 23 года. Семинома pT1-стадия. Б – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. Иммуногистохимическая реакция с антителами к OCT3/4; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

Сравнительный морфометрический и микроскопический анализ семиномы в стадиях pT1 и pT2 выявил статистически значимые различия по ряду ключевых морфологических параметров, что свидетельствует о различиях в характеристиках опухоли на разных стадиях заболевания (Таблица 3.10).

Так, медианный размер опухоли на стадии pT2 оказался в 1,8 раза больше, чем на стадии pT1 ($p < 0,001$), что может свидетельствовать о более выраженном росте опухолевого процесса на поздних стадиях. Медианный объем опухоли также

был значительно больше в группе pT2 – в 4,3 раза, что подтверждает более обширное распространение новообразования в более поздней стадии ($p < 0,001$).

Рассмотрение категориального параметра «размер опухоли более 5 см» показал, что опухоли, превышающие этот размер, встречались в группе pT2 в 2,0 раза чаще, чем в группе pT1 ($p = 0,004$). Это подтверждается снижением вероятности ранней стадии заболевания при крупных размерах опухоли (ОШ = 0,29; 95 % ДИ: 0,12 – 0,68), что делает размер опухоли важным прогностическим фактором.

Таблица 3.10 – Сравнительный анализ морфометрических и микроскопических параметров у пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

Количественные параметры	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	p-value		
Размер опухоли, см			<0,001*		
Среднее ± SD	3,9 ± 2,3	4,9 ± 2,2			
Медиана [Q1 – Q3]	3,2 [2,1 – 6,0]	5,7 [3,2 – 6,2]			
Объем опухоли, см ³			<0,001*		
Среднее ± SD	28,4 ± 40,4	49,3 ± 47,4			
Медиана [Q1 – Q3]	8,8 [4,4 – 43,5]	37,9 [10,6 – 63,3]			
Категориальные параметры	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	χ^2	p-value	Отношение шансов (ОШ) [95 % ДИ]
Размер опухоли > 5 см					
	15 (27,8 %)	24 (57,1 %)	8,45	0,004*	0,29 [0,12 – 0,68]
Инвазия в белочную оболочку					
	29 (53,7 %)	31 (73,8 %)	4,08	0,044*	0,41 [0,17 – 0,98]
Инвазия в сеть яичка					
	17 (31,5 %)	22 (52,4 %)	4,28	0,039*	0,43 [0,18 – 0,96]
Некроз опухоли					
	13 (24,1 %)	12 (28,6 %)	0,25	0,619	0,79 [0,32 – 1,98]
Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).					

Также была зафиксирована статистически значимая разница в частоте инвазии опухоли в белочную оболочку: на стадии pT2 инвазия встречалась в 1,4 раза чаще, чем на стадии pT1 ($p = 0,04$; ОШ = 0,41; 95 % ДИ: 0,17 – 0,98), что указывает на более агрессивное поведение опухоли на более поздних стадиях. Подобная картина наблюдается и при сравнении частоты инвазии опухоли в сеть яичка: на стадии pT2 инвазия была зафиксирована в 1,7 раза чаще, чем на pT1 ($p = 0,04$; ОШ = 0,43; 95 % ДИ: 0,18 – 0,96), что еще раз подтверждает тенденцию к более выраженной инвазии при более распространенной стадии заболевания.

Единственный патоморфологический параметр, который не продемонстрировал статистически значимой разницы, – это некроз опухоли. Он встречался с сопоставимой частотой как при pT2 (28,6 %), так и при pT1 (24,1 %) стадиях ($p = 0,62$; ОШ = 0,79; 95 % ДИ: 0,32 – 1,98), что может свидетельствовать о том, что некроз не является специфическим маркером прогрессии опухоли на данных стадиях (Таблица 3.10).

3.11. Ассоциация клиничко-морфологических параметров и групп риска рецидива

После проведения гистологического исследования все пациенты были стратифицированы на группы риска рецидива на основе сочетания ряда морфологических критериев, таких как размер опухоли более 5 см, наличие инвазии в сеть яичка и лимфоваскулярной инвазии. В результате ранжирования для пациентов с pT1-стадией были выделены следующие группы: низкий риск – 35 (64,8 %), промежуточный риск – 11 (20,4 %) и высокий риск – 8 (14,8 %). Для стадии pT2 распределение пациентов по группам риска было следующим: низкий риск – 9 (21,4 %), промежуточный риск – 15 (35,7 %) и высокий риск – 18 (42,9 %) (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Группы риска рецидива при семиномах герминогенных опухолях

Группа риска при семиноме I стадии	5-летний риск рецидива	Адьювантная терапия
Низкий Опухоль ≤5 см, нет LVI, нет RTI Опухоль ≤2 см есть LVI или RTI	8 %	Не показана
Промежуточный Опухоль ≤2 см, есть LVI и RTI Опухоль ≤5 см есть LVI или RTI Опухоль >5 см, нет LVI, нет RTI	20 %	Обсуждается
Высокий Опухоль >5 см, есть LVI и RTI	44 %	Рекомендуется
Примечание: LVI – лимфоваскулярная инвазия, RTI – инвазия в сеть яичка.		

Анализ категориальных клиничко-морфологических параметров в контексте групп риска рецидива выявил статистически значимые различия по нескольким ключевым показателям. В частности, пациенты молодого возраста чаще попадали как в группу низкого риска, так и в группу высокого риска, по сравнению с промежуточной группой (79,5 % и 84,6 % против 46,2 % соответственно; $\chi^2 = 11,88$; $p = 0,003$). Этот результат подчеркивает важность возраста как прогностического параметра для предсказания риска рецидива.

Что касается распространенности курения, то в различных группах риска не было выявлено значимых различий: в группе низкого риска курили 20,5 % пациентов, в промежуточной – 34,6 %, в группе высокого – 42,3 % ($\chi^2 = 4,03$; $p = 0,134$). Это свидетельствует о том, что курение не является фактором, дифференцирующим группы риска рецидива.

Морфологические характеристики опухолей также продемонстрировали значительную ассоциацию с уровнем риска рецидива. Так, инвазию в белочную оболочку яичка наблюдали у 36,4 % пациентов низкого риска, у 73,0 % – в промежуточной группе и у 92,3 % – в группе высокого риска ($\chi^2 = 23,63$; $p < 0,001$). Это подтверждает, что инвазия в белочную оболочку является важным прогностическим маркером для более высоких рисков рецидива.

Некроз опухоли также оказался более характерен для пациентов с высоким риском рецидива (46,2 %), в то время как в группах низкого и промежуточного риска он встречался с частотой 20,5 % и 19,2 % соответственно ($\chi^2 = 6,58$; $p = 0,038$), что подчеркивает его связь с более агрессивными формами опухоли.

Что касается опухолевых маркеров, то альфа-фетопротеин (АФП) не показал статистически значимых различий между группами риска (низкий – 15,9 %, промежуточный – 7,7 %, высокий – 11,5 %; $\chi^2 = 1,04$; $p = 0,595$), что указывает на его ограниченную роль в стратификации риска. Напротив, уровни бета-хорионического гонадотропина (β -ХГЧ) значительно различались между группами, что указывает на его значимость как прогностического маркера: низкий риск – 4,5 %, промежуточный – 23,1 %, высокий – 46,2 % ($\chi^2 = 17,26$; $p < 0,001$). Это подчеркивает, что β -ХГЧ может служить важным индикатором для оценки уровня риска рецидива.

Наконец, при оценке уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) не было выявлено статистически значимых различий между группами (18,2 %, 23,1 % и 34,6 % соответственно; $\chi^2 = 2,44$; $p = 0,296$), что указывает на его низкую прогностическую значимость для стратификации риска рецидива (Таблица 3.5).

Примерно треть пациентов в каждой из групп страдала от вредных привычек (курение): 20,5 % в группе низкого риска, 34,6 % в промежуточной группе и 42,3 % в группе высокого риска ($p = 0,134$), что не оказывало значимого влияния на исход заболевания.

Таким образом, статистически значимыми критериями, ассоциированными с риском рецидива заболевания, оказались инвазия в белочную оболочку, некроз опухоли и уровень β -ХГЧ. Напротив, курение и повышение уровня АФП и ЛДГ не продемонстрировали значимой ассоциации с риском рецидива, что свидетельствует о их низкой прогностической значимости для стратификации риска в данной выборке пациентов (Таблица 3.12), (Рисунок 3.26).

Таблица 3.12 – Ассоциация клинико-морфологических параметров и групп риска рецидива у пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

Категориальные параметры	Низкий (n = 44)	Промежуточный (n = 26)	Высокий (n = 26)	χ^2	p-value
Молодой возраст	35 (79,5 %)	12 (46,2 %)	22 (84,6 %)	11,88	0,003*
Курение	9 (20,5 %)	9 (34,6 %)	11 (42,3 %)	4,03	0,134
Инвазия в белочную оболочку	16 (36,4 %)	19 (73,0 %)	24 (92,3 %)	23,63	<0,001*
Некроз опухоли	9 (20,5 %)	5 (19,2 %)	12 (46,2 %)	6,58	0,038*
Повышение опухолевых маркеров					
АФП	7 (15,9 %)	2 (7,7 %)	3 (11,5 %)	1,04	0,595
β -ХГЧ	2 (4,5 %)	6 (23,1 %)	12 (46,2 %)	17,26	<0,001*
ЛДГ	8 (18,2 %)	6 (23,1 %)	9 (34,6 %)	2,44	0,296

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

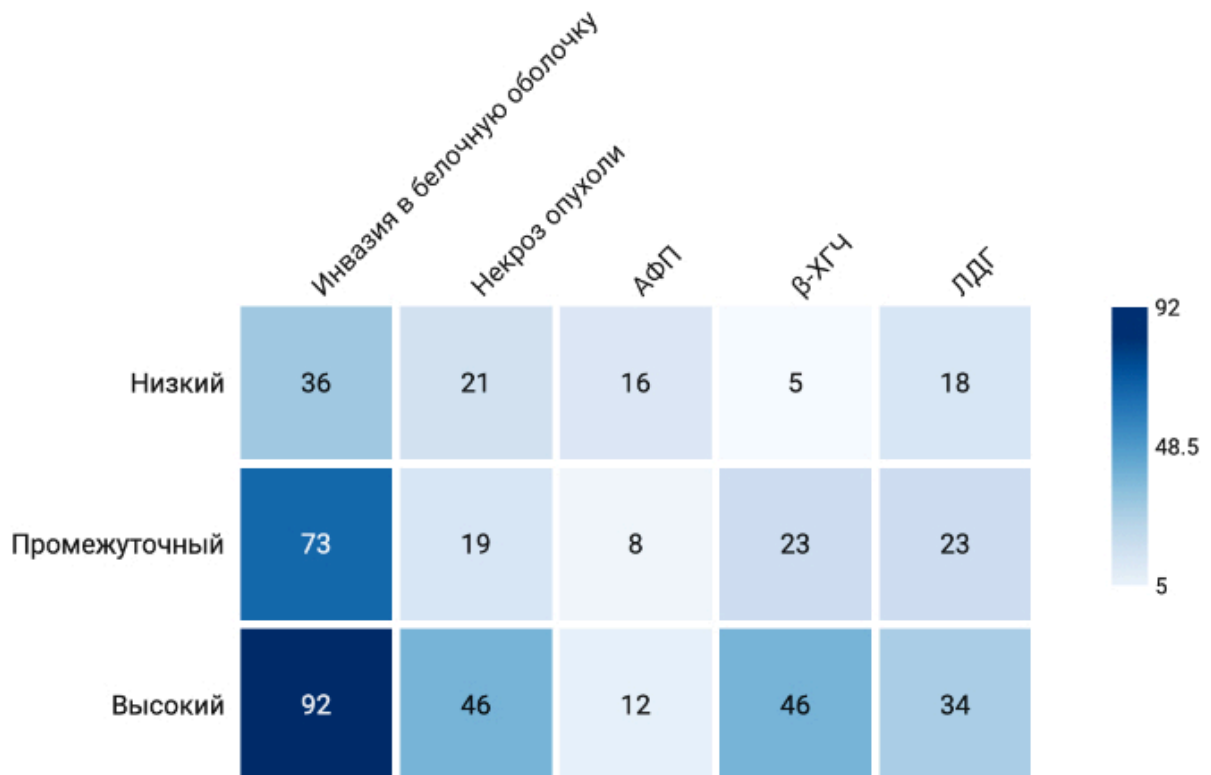


Рисунок 3.26 – Тепловая карта статистически значимых ассоциаций морфологических и лабораторных параметров с группами риска рецидива у пациентов с неметастатической семиномой pT1- и pT2-стадий

3.12. α -SMA+ и CD34+ клетки в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий

При иммуногистохимическом исследовании семиномы наблюдали CD34-позитивную экспрессию (интенсивное мембранное окрашивание) в эндотелии тонкостенных кровеносных сосудов, формирующих разветвленную, «деликатную» капиллярную сеть в толще волокнистых септ и между скоплениями или кластерами опухолевых клеток.

Окрашивание на актиновые миофиламенты – α -SMA дополняло иммуногистохимическую картину CD34-позитивной сосудистой сети. α -SMA-позитивные клетки определялись в стенке кровеносных сосудов, а также в периваскулярных и стромальных миофибробластах, расположенных в волокнистых перегородках между опухолевыми кластерами.

Совместная оценка CD34 и α -SMA позволила визуализировать капиллярно-волокнистый каркас семиномы: CD34 маркировал эндотелий богатой сосудистой сети, тогда как α -SMA – ее сократительный и волокнисто-мышечный компонент, обеспечивающий структурную поддержку и компартментализацию опухолевых узлов (Рисунок 3.27).

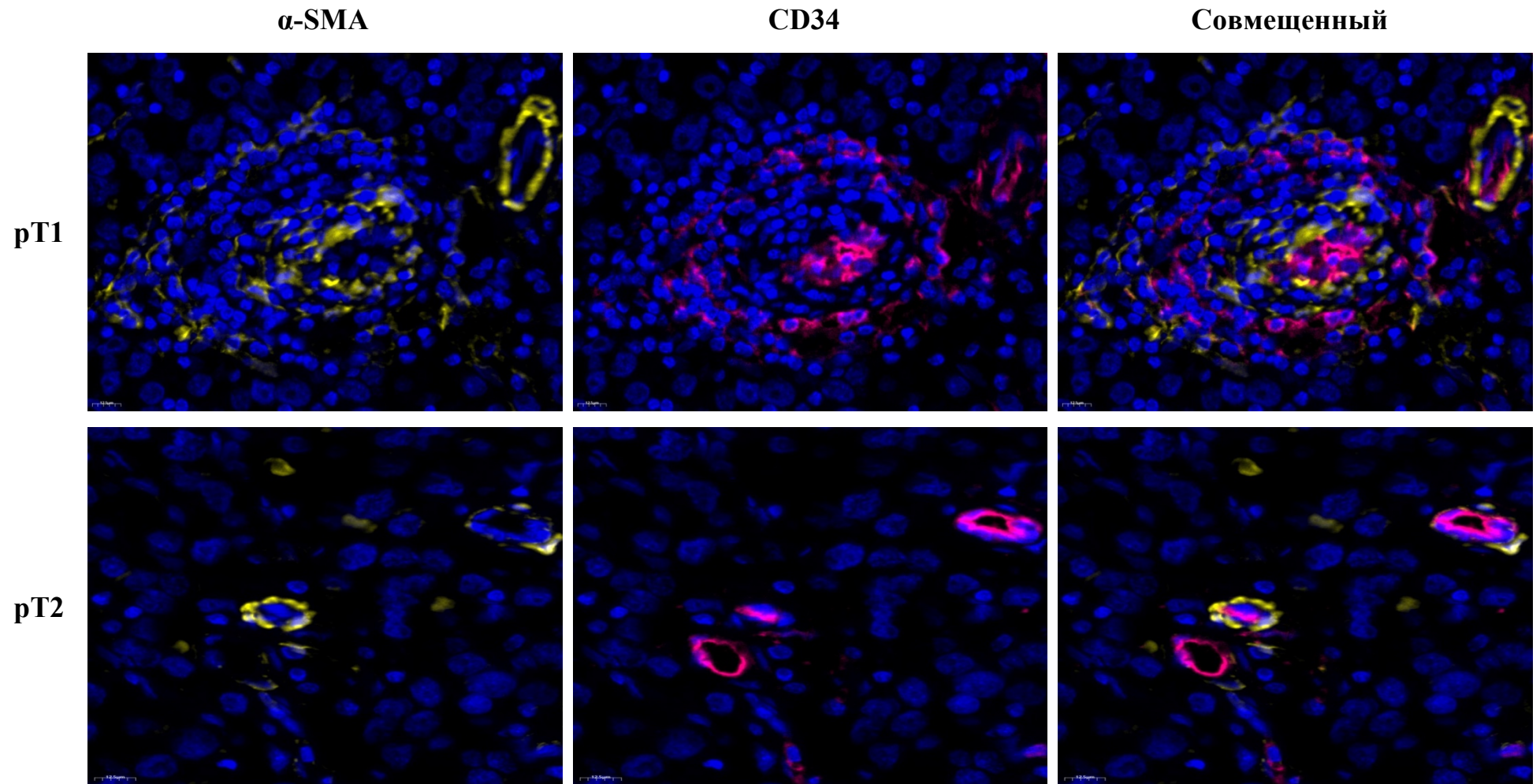


Рисунок 3.27 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к α -SMA (желтое свечение), CD34 (розовое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения α -SMA+CD34. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

3.13. Оценка пролиферации и гибели опухолевых клеток неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий

При оценке пролиферативной активности опухолевых клеток семиномы с использованием маркера Ki-67 установлено, что в подгруппе pT1 медианное значение составило 26,3 [18,38 – 38,77]. В подгруппе pT2 медиана Ki-67 была несколько выше – 30,9 [21,11 – 45,26]. Однако различия между группами не достигли статистической значимости ($p = 0,504$).

Анализ показателя TUNEL-опосредованной гибели также продемонстрировал сходные показатели в обеих подгруппах. В pT1 медиана составила 2,4 [1,23 – 2,19], тогда как в pT2 – 2,5 [1,92 – 3,68]. Статистически значимых различий между группами не выявлено ($p = 0,175$).

Таким образом, пролиферация и гибель опухолевых клеток семиномы в подгруппах pT1 и pT2 остаются сопоставимыми, без статистически значимых различий (Таблица 3.13), (Рисунок 3.28).

Таблица 3.13 – Доля пролиферации и гибели опухолевых клеток в семиноме, %

Маркер	Семинома		p-value
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	
Ki-67	26,22 [18,38 – 38,77]	30,90 [21,11 – 45,26]	0,504*
TUNEL	2,35 [1,23 – 2,19]	2,52 [1,92 – 3,68]	0,175*

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2.

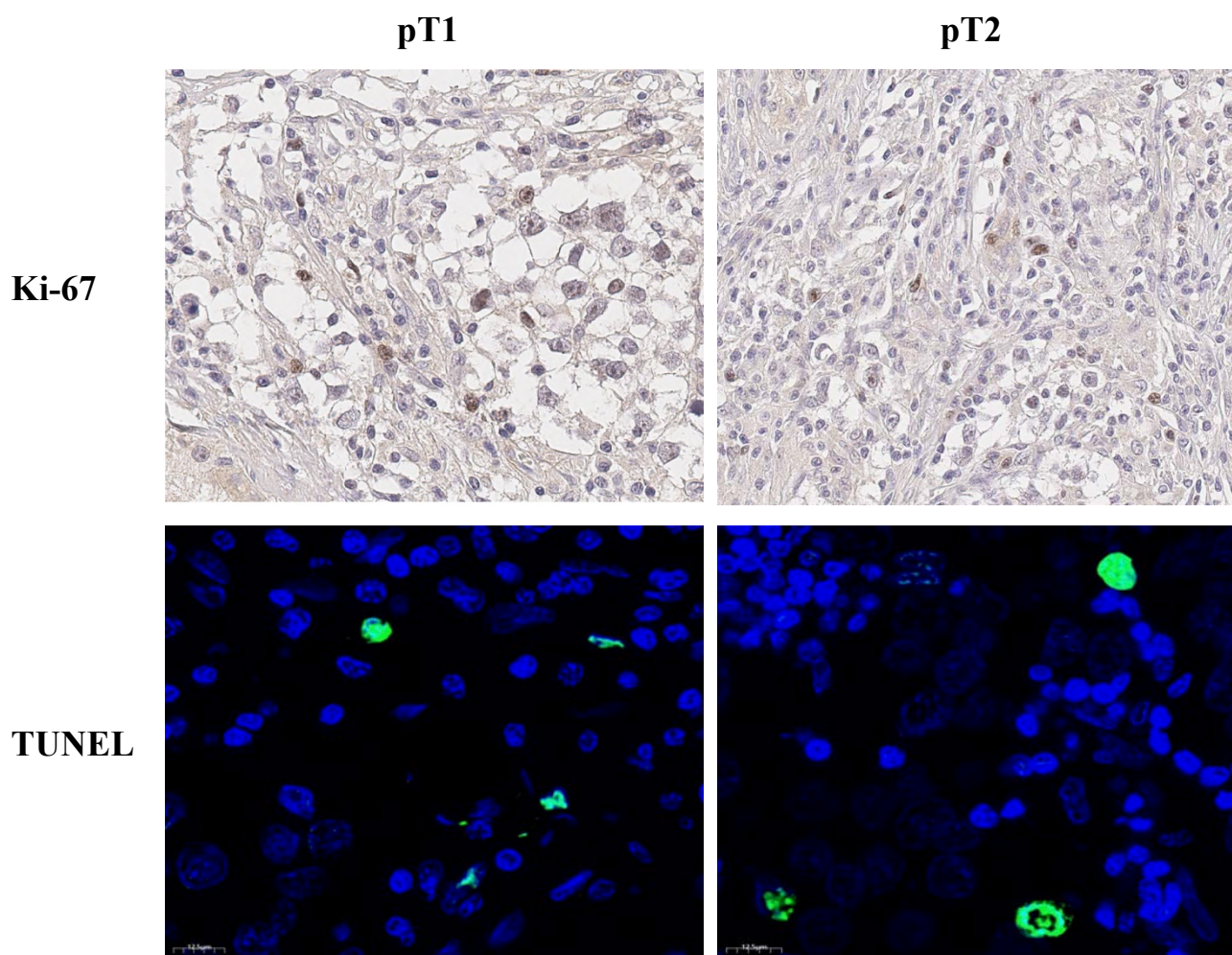


Рисунок 3.28 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Перитуморальная зона, (семинома pT1 и pT2) стадии и нормальное яичко. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67 и TUNEL, увеличение $\times 400$. Ki-67 – ядерная реакция (коричневая метка), докрасивание ядер – гематоксилином; TUNEL – зеленое свечение, DAPI – ядра, синее свечение. Световая и флуоресцентная микроскопия

3.14. Оценка фактора NF- κ B в неметастатической сеиноме pT1- и pT2-стадий

Иммуногистохимический анализ экспрессии NF- κ B в сеиноме продемонстрировал полное отсутствие иммунопозитивных опухолевых клеток во всех анализируемых случаях. Ни цитоплазматическую, ни ядерную локализацию маркера в опухолевых клетках не обнаружили.

NF-κB-позитивную реакцию наблюдали исключительно в микроокружении опухоли, данные клетки были представлены преимущественно лимфоцитами и макрофагами с цитоплазматической локализацией сигнала.

Количественный анализ включал подсчет NF-κB-позитивных клеток только в мононуклеарном инфильтрате. В подгруппе pT1 медиана составила 643,89 [503,17 – 810,88] клеток/мм² (среднее 663,81 ± 223,88). В подгруппе pT2 медианное значение было 753,26 [522,89 – 834,72] клеток/мм² (среднее 737,07 ± 265,06). Различия между pT1 и pT2 не достигли статистической значимости (p = 0,224) (Таблица 3.14), (Рисунок 3.29).

Таблица 3.14 – Количественная характеристика NF-κB-позитивных клеток в семиноме на 1мм²

Маркер	Семинома		p-value
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	
NF-κB	643,89 [503,17 – 810,88]	753,26 [522,89 – 834,72]	0,224*
Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3] * – по сравнению pT1 с pT2.			

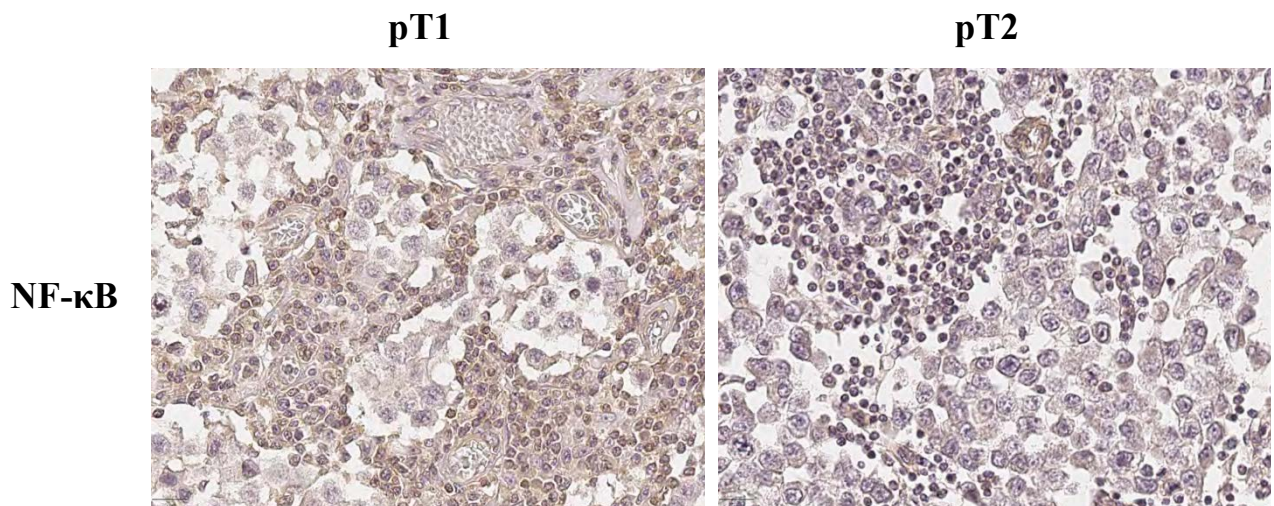


Рисунок 3.29 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NF-κB; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение ×400

3.15. Оценка CD31-позитивных кровеносных сосудов в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий

При сравнительном иммуногистохимическом анализе семиномы pT1- и pT2-стадий отмечено увеличение CD31-позитивных эндотелиоцитов кровеносных сосудов по мере прогрессирования заболевания. В группе pT1 плотность кровеносных сосудов составляла 193,90 сосуд/мм² [124,20 – 248,53], тогда как при pT2 она увеличивалась до 226,75 сосуд/мм² [172,77 – 329,71] (p=0,152) (Таблица 3.15), (Рисунок 3.30).

Таблица 3.15 – Микрососудистая плотность в семиноме на 1мм²

Маркер	Семинома		p-value
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	
CD31	193,90 [124,20 – 248,53]	226,75 [172,77 – 329,71]	0,152*

Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2.

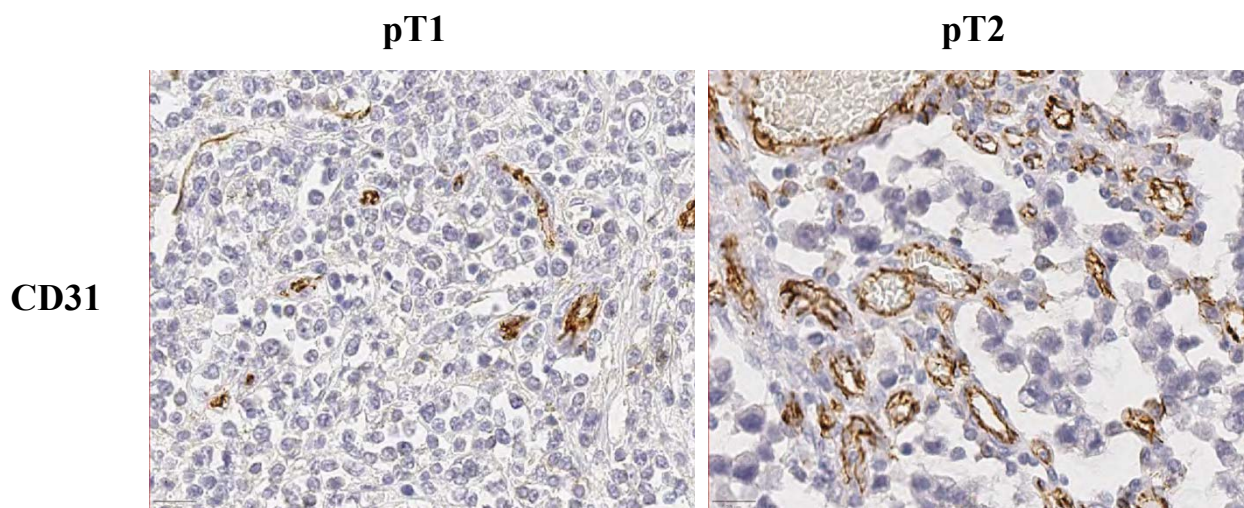


Рисунок 3.30 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD31; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение ×400

3.16. Анализ лимфоцитарного инфильтрата неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий

При иммуномечении с антителами к CD3 в семиноме отмечается обильная инфильтрация Т-лимфоцитами с интенсивным мембранно-цитоплазматическим окрашиванием. Иммунопозитивные клетки локализовались преимущественно в строме и между опухолевыми клетками.

При иммуногистохимическом анализе CD4 Т-лимфоцитов были выявлены характерные особенности их расположения в опухолевой ткани. Т-хелперы располагались преимущественно диффузно, группируясь в умеренные скопления лишь в строме опухоли. Больше всего их было в интерстициальной ткани между кластерами опухолевых клеток и периваскулярно, вокруг мелких сосудов. В периферических отделах опухолевого узла CD4-клетки формировали редкие мелкие кластеры, тогда как в центральных зонах опухоли их доля была выше.

Экспрессия CD8 Т-лимфоцитов также имела диффузный характер распределения, без тенденции к кластеризации. В периферических зонах опухоли многие CD8 лимфоциты располагались на ее границе и стромы, а также образовывали кольцеобразные скопления вокруг кровеносных сосудов. В центральных отделах опухолевой ткани CD8 лимфоциты встречались значительно реже.

Иммунопозитивные CD19 В-лимфоциты являются наименее многочисленными клетками лимфоидного инфильтрата и имели отличный очаговый характер распределения. В опухолевой ткани встречаются лишь единичные В-лимфоциты. Несмотря на малое количество, CD19 В-лимфоциты в семиномах демонстрируют склонность к формированию третичных лимфоидных структур, которые представляют собой организованные агрегаты лимфоидных клеток, напоминающие фолликулы вторичных лимфоидных органов.

Иммуногистохимический анализ степени лимфоидной инфильтрации демонстрирует выраженную межиндивидуальную вариабельность, а также пространственную вариабельность внутри одной опухоли. Тем не менее описанные

выше паттерны (периферическое скопление CD8, диффузное рассеяние CD4, редкие В-клетки) были воспроизводимо выявлены во всех случаях.

Для объективизации количественной оценки лимфоцитарного инфильтрата был проведен морфометрический анализ CD3, CD4, CD8 и CD19 клеток, который выполнялся в пересчете на 1 мм² опухолевой ткани. Суммарная плотность Т-лимфоцитов оказалась высокой на обеих стадиях: медиана CD3 клеток составила 1502,11 [1208,49 – 2105,93] клеток/мм² при pT1 и 1599,24 [1319,16 – 2435,72] клеток/мм² при pT2; медиана CD4 клеток – 651,33 [460,65 – 950,08] клеток/мм² при pT1 и 722,51 [476,07 – 1027,29] клеток/мм² при pT2; медиана CD8 клеток – 666,28 [422,37 – 815,15] клеток/мм² при pT1 и 685,25 [548,03 – 1063,37] клеток/мм² при pT2. Для CD19 В-лимфоцитов плотность была значительно ниже: 87,91 [59,36 – 149,29] клеток/мм² при pT1 и 92,92 [47,06 – 133,09] клеток/мм² при pT2. Медианное количество Т-лимфоцитов примерно в 7–8 раз превышало количество В-лимфоцитов в опухолевом микроокружении, что указывает на преобладание Т-клеточного звена в иммунном инфильтрате семиномы.

Статистический сравнительный анализ не выявил значимых различий между стадиями pT1 и pT2 ни для одной из исследуемых субпопуляций лимфоцитов. Разница в плотности инфильтрации CD3-лимфоцитами между pT1 и pT2 оказалась статистически незначимой ($p = 0,137$), аналогично для CD4 клеток ($p = 0,504$), для CD8 клеток ($p = 0,175$) и для CD19 клеток ($p = 0,575$).

Таким образом, на ранних стадиях семиномы (pT1 и pT2) количественное и пространственное распределение элементов лимфоцитарного инфильтрата остается относительно стабильным, без тенденции к снижению или увеличению их плотности при прогрессировании опухоли (Таблица 3.16), (Рисунок 3.31, Рисунок 3.32).

Таблица 3.16 – Количественная характеристика CD3, CD4, CD8 и CD19 лимфоцитов в семиноме на 1мм²

Маркер	Семинома		p-value
	Подгруппа Ia (pT1N0M0) (n = 54)	Подгруппа Ib (pT2N0M0) (n = 42)	
CD3	1502,11 [1208,49 – 2105,93]	1599,24 [1319,16 – 2435,72]	0,137*
CD4	651,33 [460,65 – 950,08]	722,51 [476,08 – 1027,29]	0,504*
CD8	666,28 [422,37 – 815,15]	685,25 [548,03 – 1063,37]	0,175*
CD19	87,91 [59,36 – 149,29]	92,92 [47,06 – 133,09]	0,575*

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2.

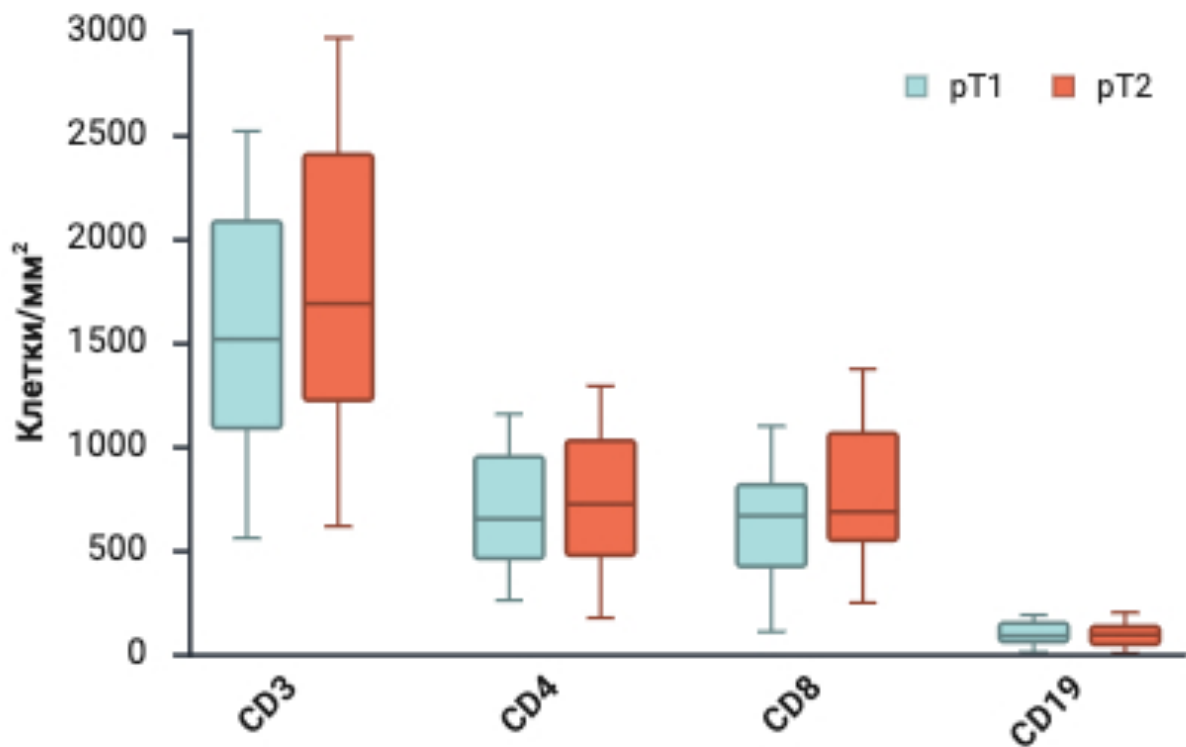


Рисунок 3.31 – Диаграмма «ящик с усами». Количественное сравнение CD4, CD8 и CD19 лимфоцитов в семиноме на 1мм² в стадиях pT1 и pT2

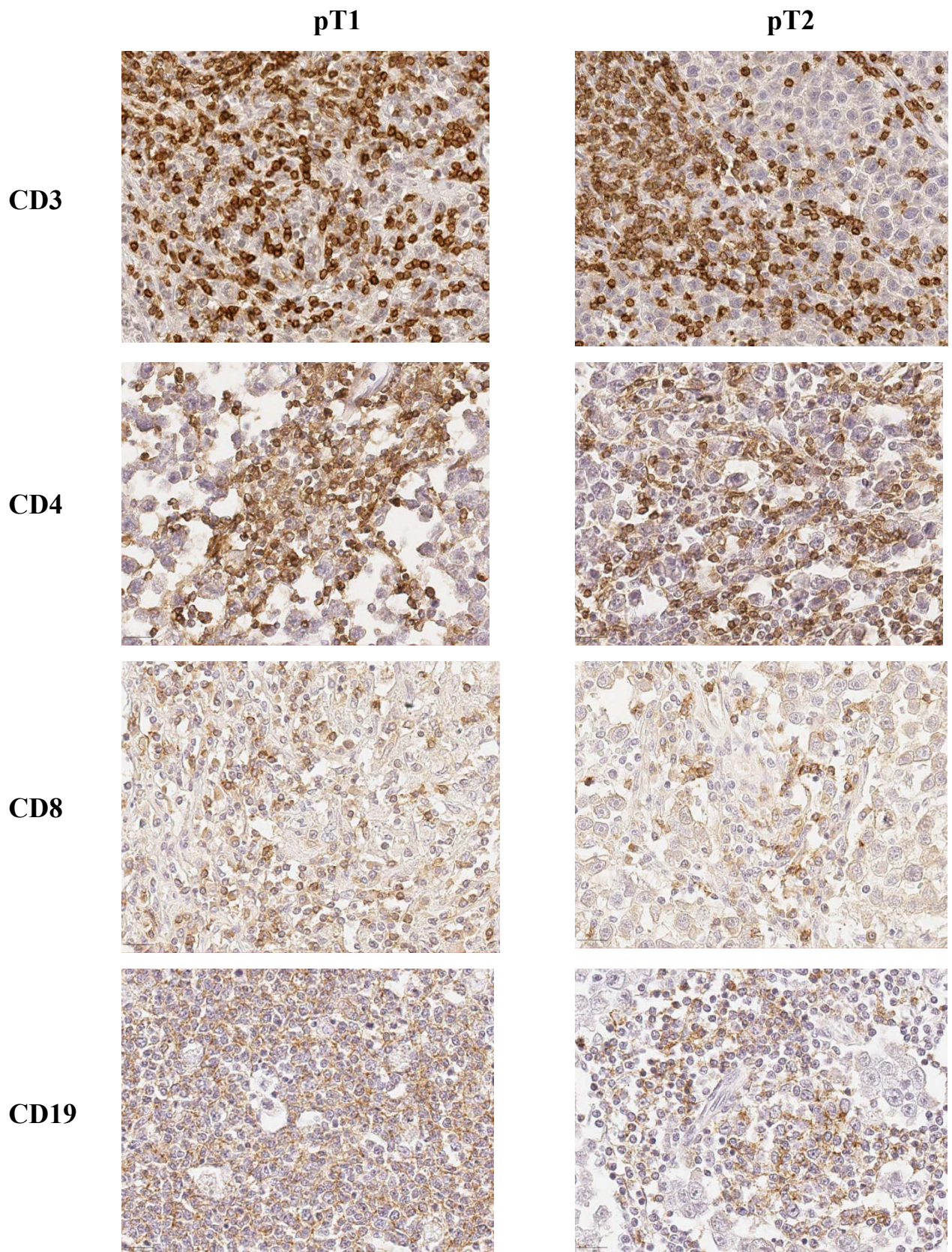


Рисунок 3.32 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3, CD4, CD8 и CD19; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 200$

3.16.1. Комбинация маркеров CD4+CD8+FOXP3 (триплексное иммуномечение)

FOXP3 рассматривается как ключевой транскрипционный фактор, определяющий дифференцировку и функциональную стабильность CD4 регуляторных Т-клеток (Treg), поддерживающий их супрессорный фенотип и экспрессию генов, обеспечивающих периферическую иммунную толерантность. В условиях опухолевого роста FOXP3+ Treg вносят существенный вклад в формирование иммуносупрессивного микроокружения, в том числе за счет активации оси TGF- β /IL-10 и подавления эффекторного противоопухолевого иммунного ответа.

Особый интерес представляет оценка уровня экспрессии FOXP3 в семиноме pT1- и pT2-стадий как интегрального показателя соотношения регуляторных и эффекторных иммунных влияний, а также возможных механизмов иммунного уклонения опухолевых клеток.

При мультиплексном иммуногистохимическом анализе ядерная экспрессия FOXP3 в моноклеарных и других клетках семиномы обнаружили исключительно в CD4+ Т-лимфоцитах; ко-экспрессия FOXP3. Напротив, с CD8+ Т-клетками и другими элементами клеточного инфильтрата не определялась. Доля CD4⁺FOXP3+ Т-клеток в структуре опухолевого инфильтрата оставалась низкой и в обеих стадиях не превышала 3 %, при этом статистически значимых различий между pT1 и pT2 не получено ($p = 0,807$) (Таблица 3.17), (Рисунок 3.33, Рисунок 3.34).

Таблица 3.17 – Доля FOXP3-позитивных клеток в семиноме, %

Маркер	Стадия	Семинома
FOXP3	pT1	2,4 ± 0,6
	pT2	2,3 ± 0,2
	<i>p</i> -value	0,807

Примечание: количественные данные представлены в виде M ± SD

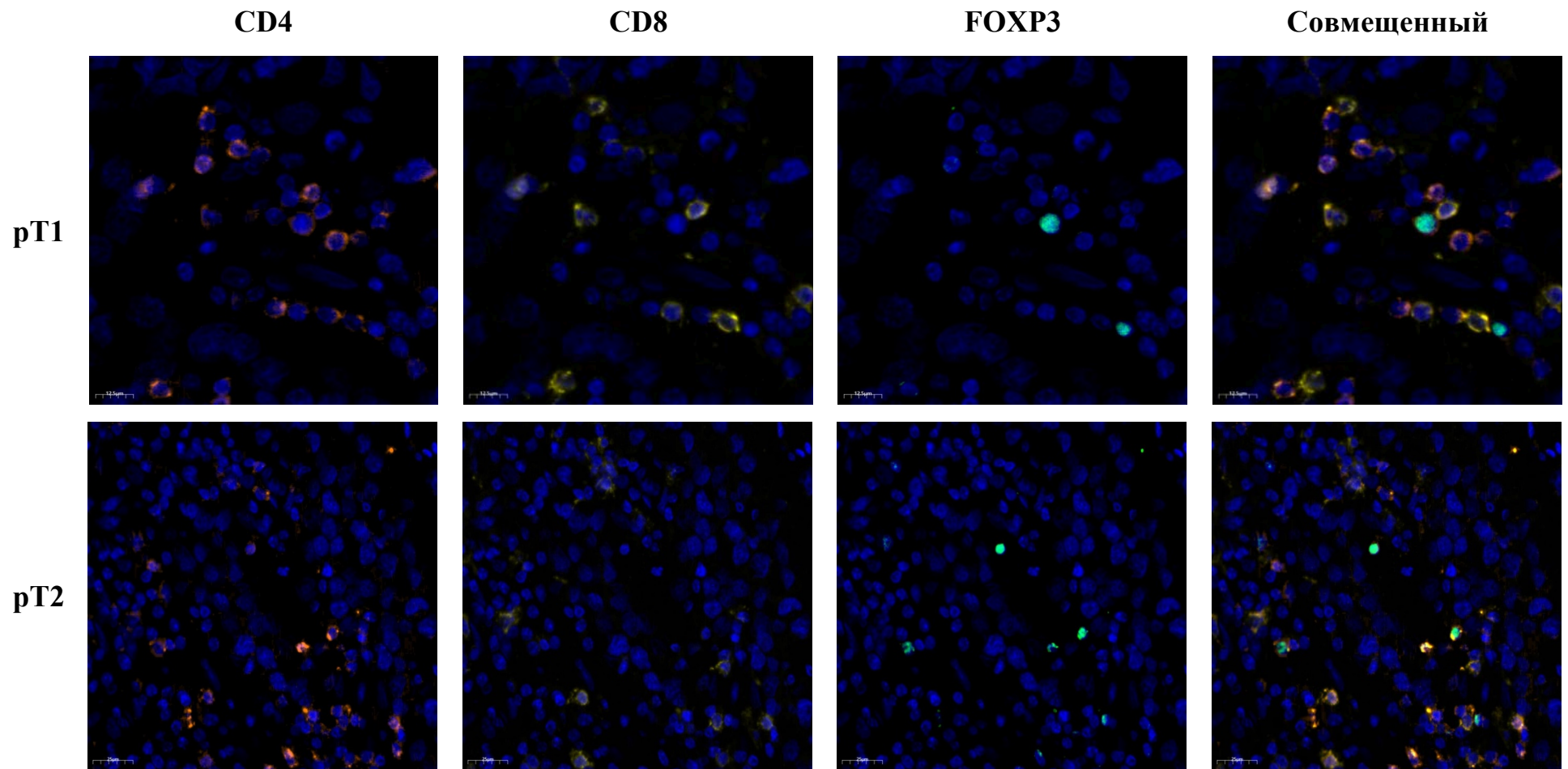
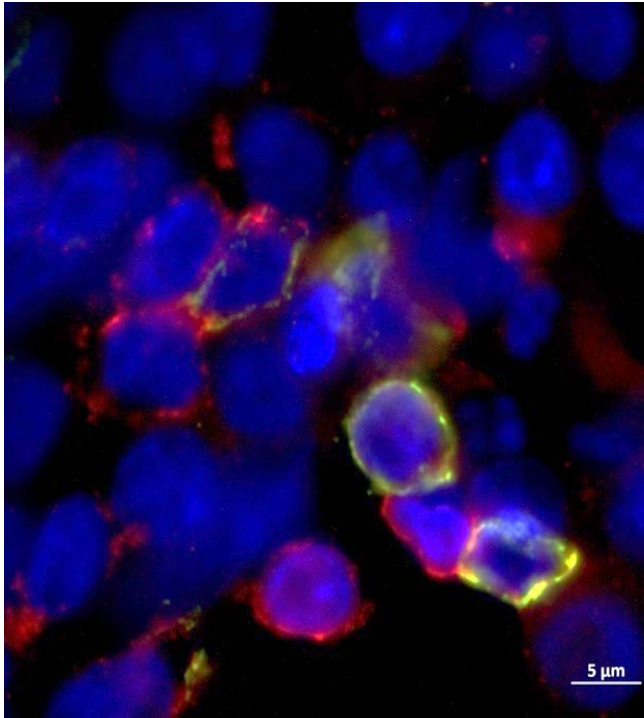
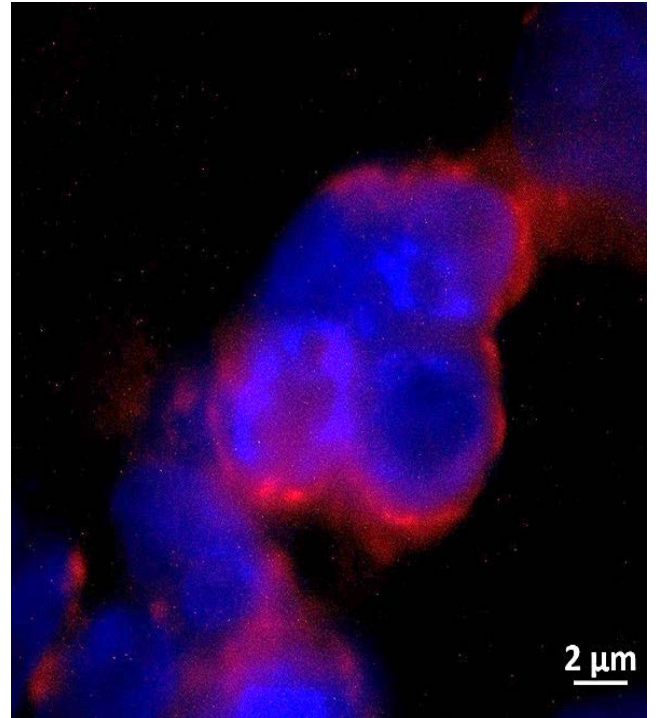


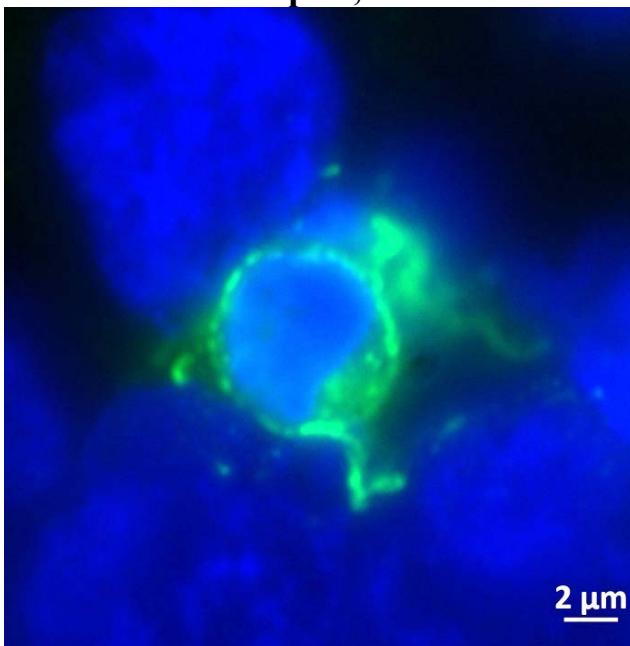
Рисунок 3.33 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD4 (оранжевое свечение), CD8 (желтое свечение) и FOXP3 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD4+CD8+FOXP3. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия



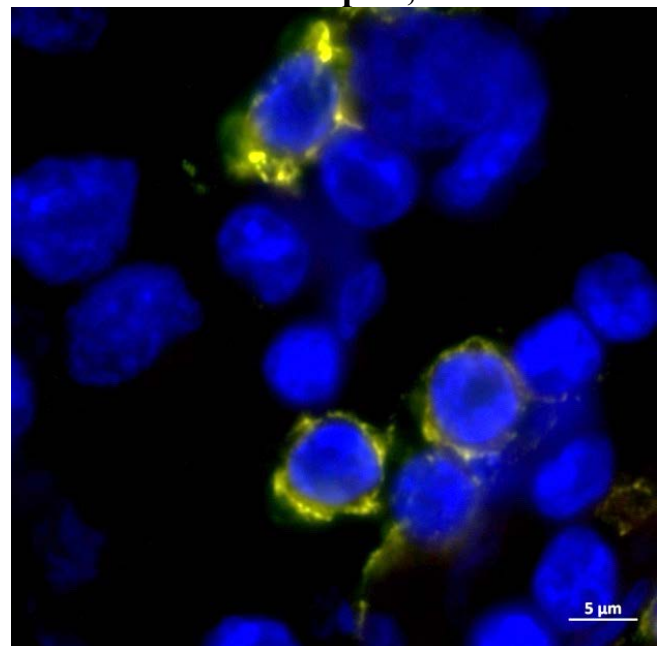
Семинома pT1, CD3+CD8



Семинома pT1, CD3



Семинома pT2, CD4



Семинома pT2, CD8

Рисунок 3.34 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание лимфоцитов в опухоли: CD3 – красное свечение; CD4 – зеленое свечение; CD8 – желтое свечение; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

3.17. Фенотипическая и пространственная характеристика опухолеассоциированных макрофагов в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий

Поиск дополнительных критериев стратификации риска, основанных на морфофункциональных количественных и качественных изменений – побуждает к поиску маркеров, свойственных биологии опухоли, влияющих на опухолевую прогрессию с акцентом на ее распространенность в зависимости от ее стадии. Это повысит диагностику на раннем этапе и последующую эффективность лечения.

Цитологически CD68 OAM обладают четко выраженными клеточными границами и различной формой – от округлой до полигональной. В свою очередь, CD163 OAM относительно более крупные клетки с овальными либо неправильной формы ядрами и обладают обильной цитоплазмой с выраженными цитоплазматическими иммунопозитивными гранулами (Рисунок 3.41).

Иммуногистохимический анализ CD68 макрофагов выявил выраженную гетерогенность в инфильтрате макрофагов как между различными образцами, так и в пределах одного случая, что демонстрирует большой межквартильный интервал (Q1-Q3) и графически отображается на скрипичном графике (Рисунок 3.35).

Большинство CD68 OAM находились в периферических зонах опухолевой ткани, формируя плотные перистромальные скопления. Были выделены три основных паттерна распределения макрофагов: диффузное (Рисунок 3.36 Б, Рисунок 3.38 Б), очаговая инфильтрация (Рисунок 3.36 Г, Рисунок 3.38 Г) и единичные клетки (Рисунок 3.36 В, Рисунок 3.38 В). Тем не менее сравнительный количественный анализ CD68 OAM не показал статистически значимых различий между стадиями pT1 и pT2 ($p = 0,423$) (Таблица 3.18).

CD163 OAM также продемонстрировали значительную межиндивидуальную и региональную вариабельность. Повышенную плотность CD163 OAM наблюдали преимущественно в центральных зонах опухоли, где они образовывали диффузные скопления клеток (Рисунок 3.37 Б, Рисунок 3.39 Б), часто ассоциированную с

мелкими кровеносными сосудами или участками фиброзного ремоделирования стромы. Единичные CD163 макрофаги также были выявлены в перистромальных зонах и вокруг кровеносных сосудов (Рисунок 3.37 Г, Рисунок 3.39 Г). Примечательно, что в периферических областях опухоли CD163 ОАМ отсутствовали в большинстве полей зрения (Рисунок 3.37 В, Рисунок 3.39 В).

При сравнении количественной выраженности фенотипов макрофагов в семиноме было отмечено преобладание CD68 макрофагов примерно в 120 раз над CD163 макрофагами.

Сравнительный количественный анализ не показал статистически значимой разницы в количестве CD68 ОАМ между pT1 и pT2 ($p = 0,423$).

В то же время инфильтрация CD163 ОАМ на стадии pT2 в 3,4 раза выше, чем на стадии pT1 ($p < 0,001$). Помимо увеличения количества CD163 ОАМ на стадии pT2, для них была характерна тенденция к более плотному сосредоточению в центральной зоне опухоли, что отчетливо демонстрирует карта плотности (Таблица 3.18, Рисунок 3.40).

Таким образом, фенотипические и пространственные характеристики опухоль-ассоциированных макрофагов существенно изменяются по мере прогрессирования семиномы.

Таблица 3.18 – Количественная характеристика CD68 и CD163 макрофагов в семиноме на 1мм^2

Маркер	Семинома		
	Стадия	Опухоль	Строма
CD68	pT1	237,67 [166,65 – 345,46]	32,19 [20,42 – 55,34]
	pT2	247,58 [177,84 – 304,87]	87,95 [19,30 – 112,12]
	<i>p</i> -value	0,423 *	0,001 *
CD163	pT1	8,72 [1,84 – 21,13]	16,18 [9,98 – 25,67]
	pT2	29,33 [9,68 – 45,54]	19,62 [9,97 – 45,90]
	<i>p</i> -value	0,001 *	0,082 *

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1 – Q3]. * – по сравнению pT1 с pT2.

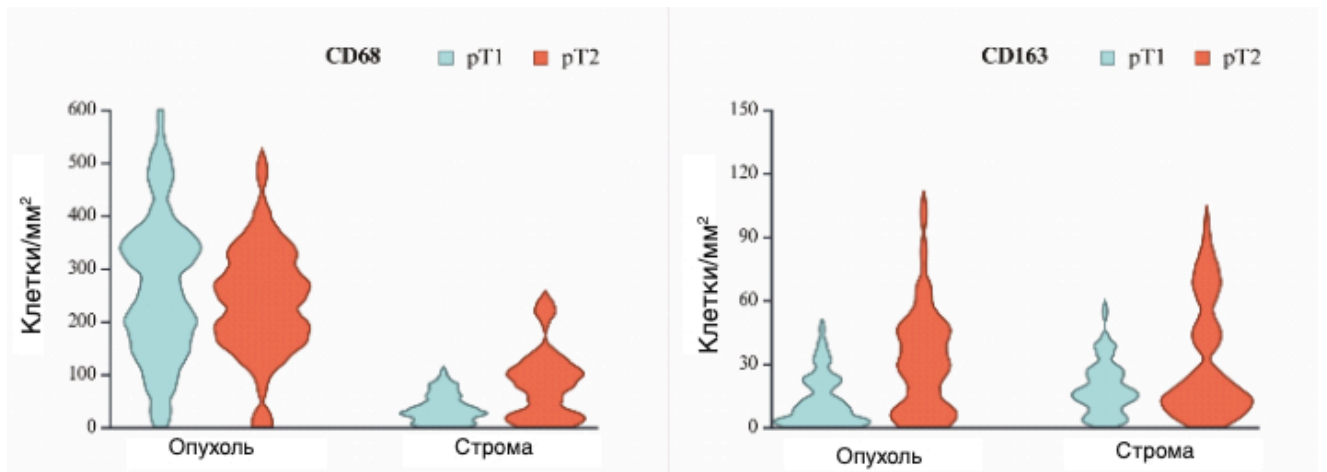


Рисунок 3.35 – Скрипичный график. Количественное сравнение CD68 и CD163 макрофагов в опухолевом и стромальном компоненте семиномы на 1мм^2 в стадиях pT1 и pT2

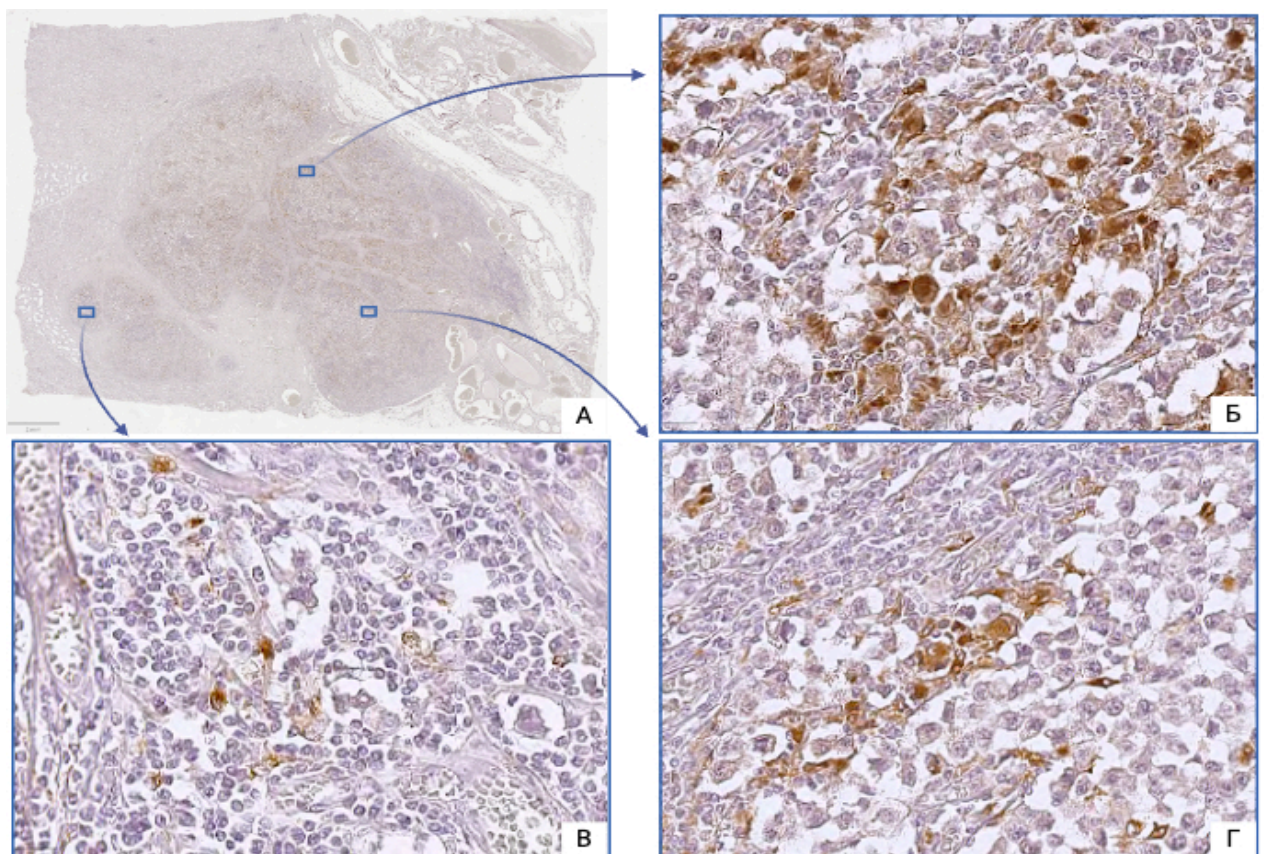


Рисунок 3.36 – Пациент С., 23 года. Семинома pT1-стадия. А – гистоскан; Б – выраженная диффузная макрофагальная инфильтрация; В – единичные макрофаги; Г – очаговая макрофагальная инфильтрация. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

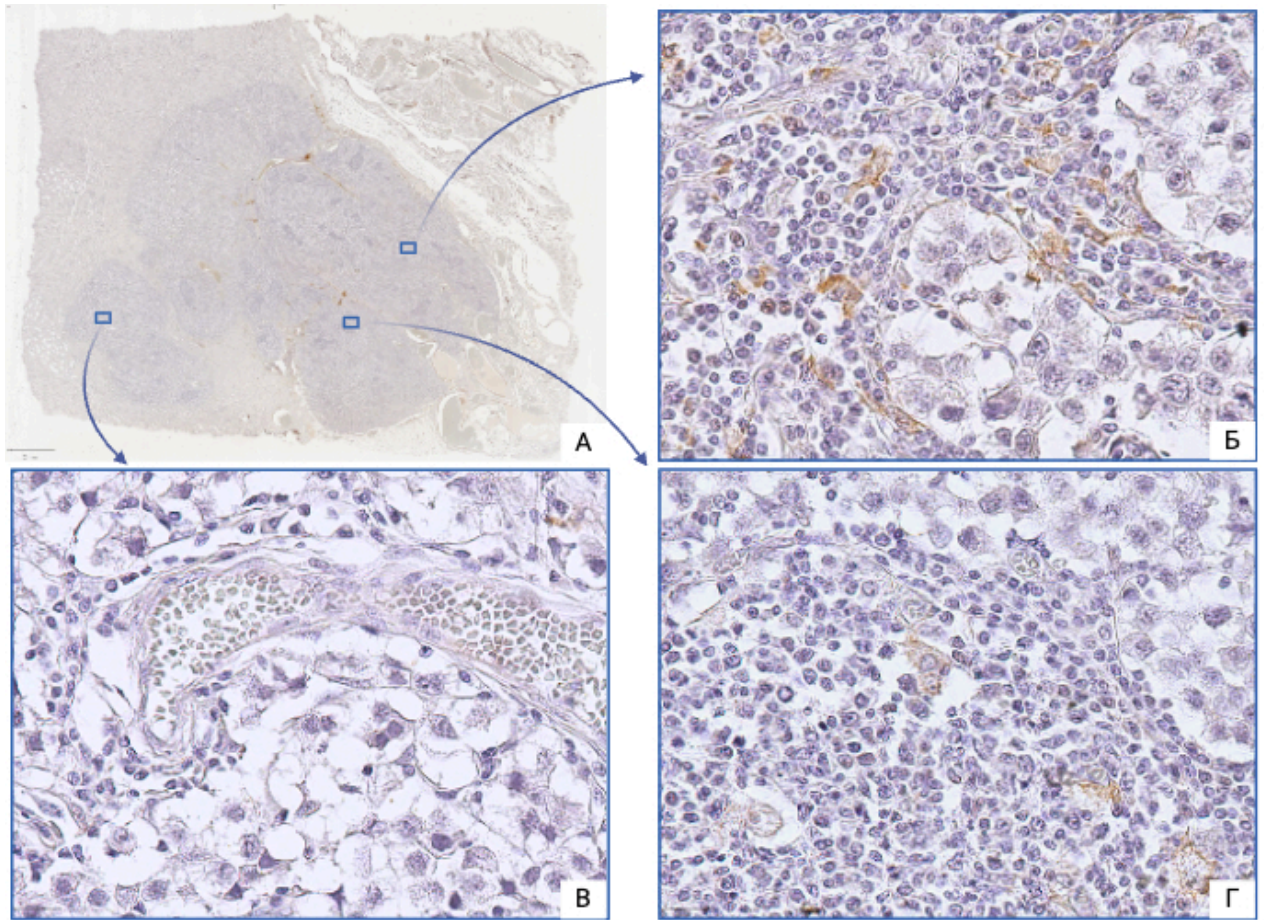


Рисунок 3.37 – Пациент С., 23 года. Семинома рТ1-стадия. А – гистоскан; Б – выраженная диффузная макрофагальная инфильтрация; В – отсутствие иммунопозитивных клеток; Г – очаговая макрофагальная инфильтрация. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD163; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

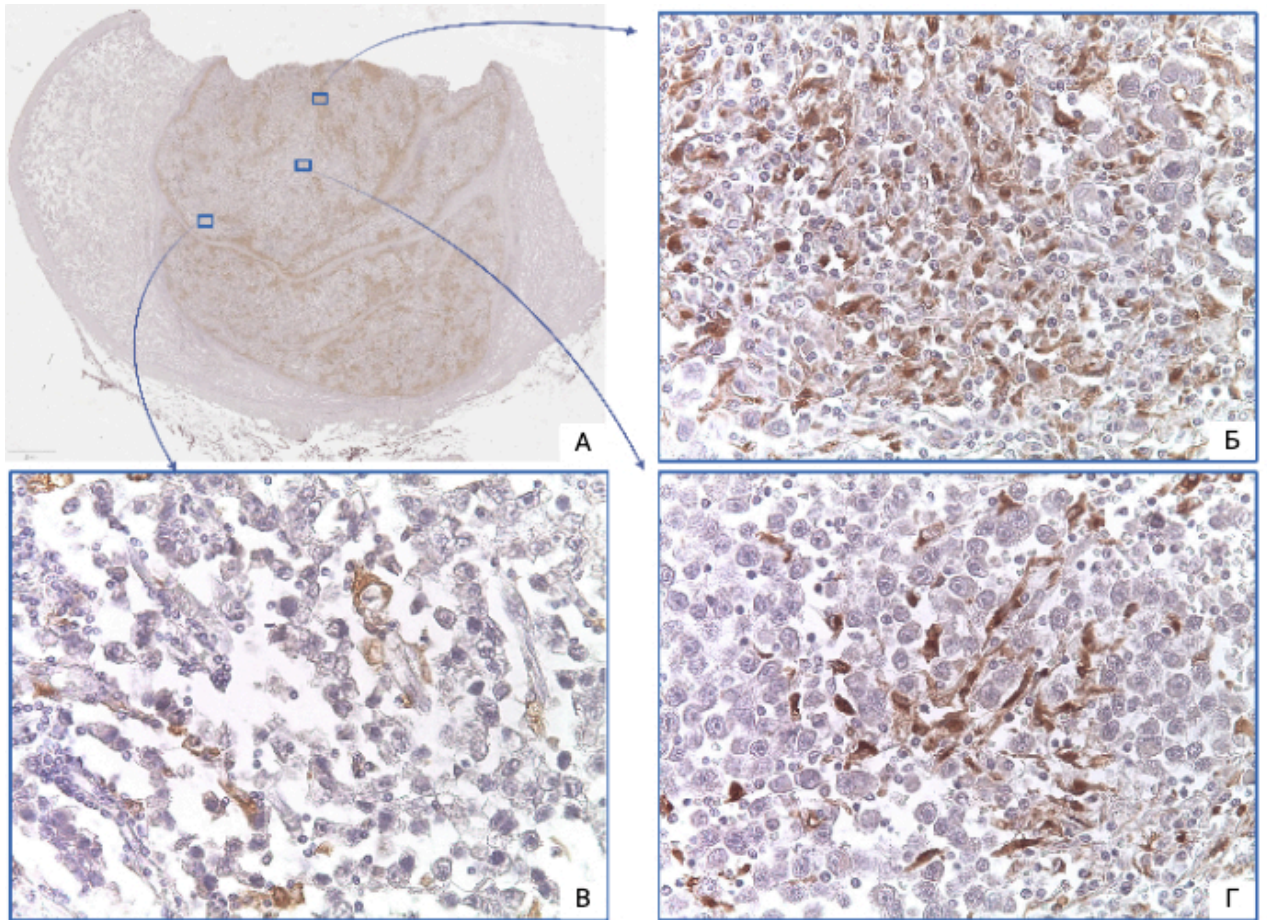


Рисунок 3.38 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. А – гистоскан; Б – выраженная диффузная макрофагальная инфильтрация; В – единичные макрофаги; Г – очаговая макрофагальная инфильтрация. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

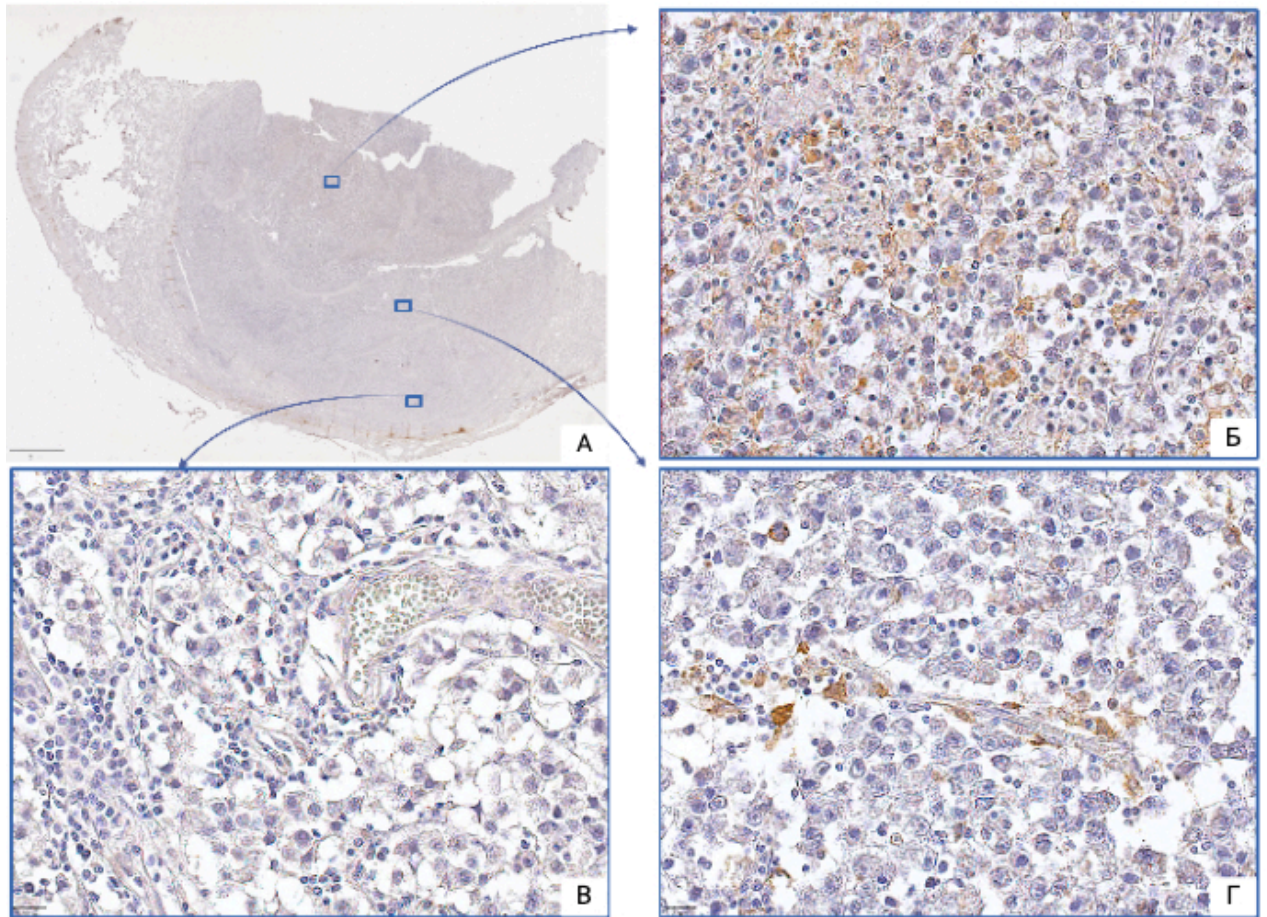


Рисунок 3.39 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. А – гистоскан; Б – выраженная диффузная макрофагальная инфильтрация; В – отсутствие иммунопозитивных клеток; Г – очаговая макрофагальная инфильтрация. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD163; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

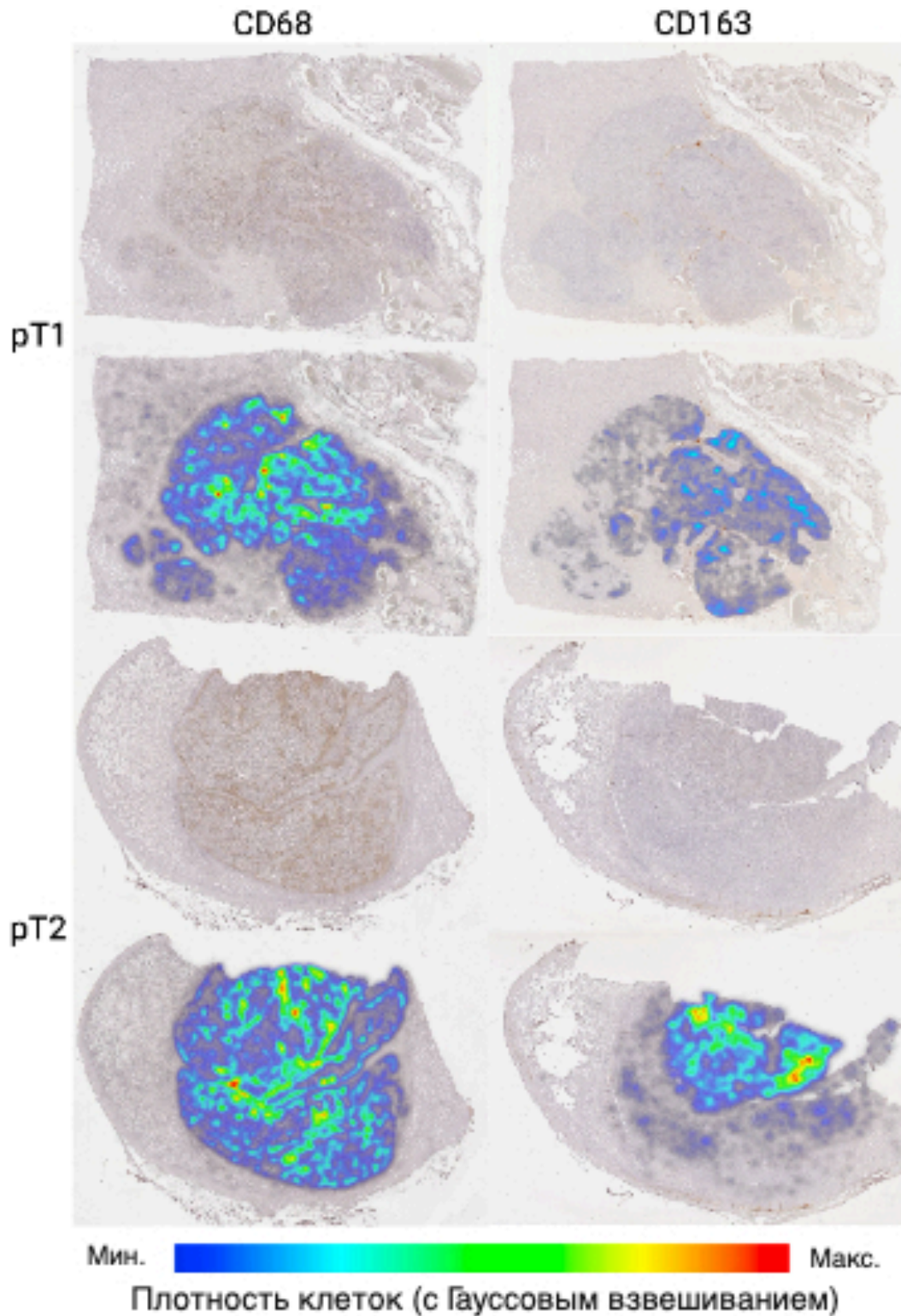


Рисунок 3.40 – Карта плотности. Пространственное распределение CD68 и CD163 макрофагов в семиноме в стадиях pT1 и pT2. В верхних рядах представлены репрезентативные гистосканы, в нижних – соответствующие тепловые карты плотности с наложением. Цветовая шкала отражает плотность макрофагов (клетки/мм²), нормированную методом Гауссового взвешивания (синий = минимум; красный = максимум)

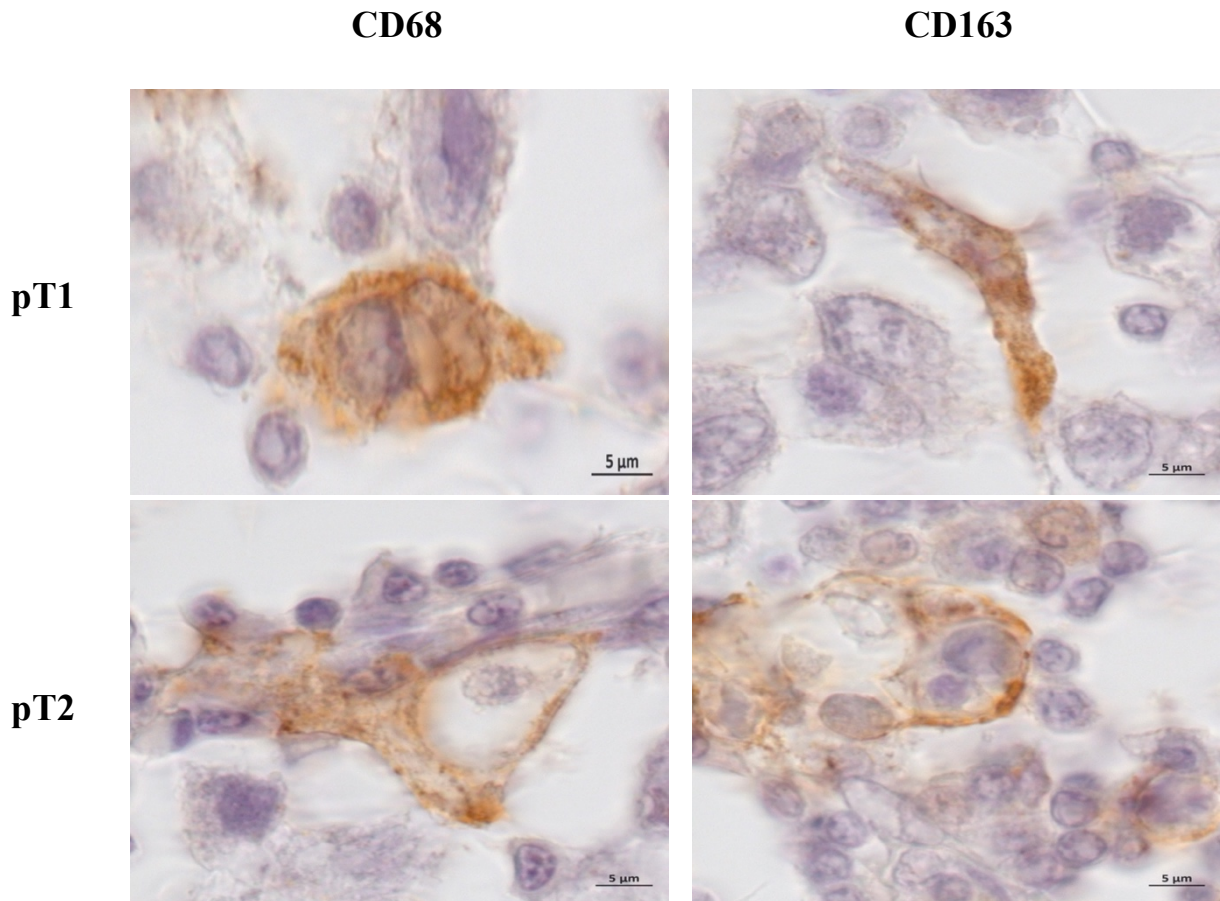


Рисунок 3.41 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 и CD163; докрасивание ядер – гематоксилином

3.18. Оценка роли опухоль-ассоциированных макрофагов в формировании иммуносупрессивного микроокружения неметастатической семиномы pT1- и pT2-стадий

Для анализа взаимодействий атипичных клеток, экспрессирующих медиаторы, преимущественно противовоспалительного характера в семиноме с элементами иммунного микроокружения, на которые влияют эти медиаторы использован метод мультиплексной иммуногистохимии, позволяющий одновременно визуализировать продукцию медиаторов атипичными клетками и ко-экспрессию этих же медиаторов на ОАМ.

3.18.1. Комбинация маркеров CD68+CD163+CD117 (триплексное иммуномечение)

Известно, что CD117 является трансмембранным рецептором тирозинкиназы, физиологически необходимым для развития и выживания примордиальных половых клеток. Его экспрессия позволяет дифференцировать примордиальные от зрелых половых клеток яичка, а также он служит одним из ключевых иммуногистохимических маркеров, позволяющих верифицировать семиному при сравнении с несеминомыми герминогенными опухолями, для которых экспрессия CD117, как правило, нехарактерна.

Совместная визуализация CD68+ и CD163+ опухоль-ассоциированных макрофагов с CD117+ опухолевыми клетками позволяет оценить их пространственное взаимодействие и анализировать вклад различных фенотипов ОАМ в формирование иммунного микроокружения сеиномы.

При мультиплексном иммуногистохимическом анализе сеиномы pT1-стадии отмечена выраженная диффузная мембранная экспрессия CD117 опухолевыми клетками, формирующими солидные гнезда и тяжи. Атипичные клетки обильно инфильтрированы CD68+ ОАМ, которые располагаются с ними в непосредственном, многостороннем контакте, формируя перичеселлюлярные «манжеты» и мостики между опухолевыми клетками. Подобный паттерн свидетельствует о тесном клеточно-клеточном взаимодействии и потенциальной ключевой роли макрофагов в организации микросреды опухоли уже на ранней стадии. При этом часть ОАМ ко-экспрессировала CD68 и CD163, что можно трактовать как морфологическое проявление инициации иммуносупрессивной перестройки иммунного микроокружения (Рисунок 3.42, Рисунок 3.45, Рисунок 3.46).

В сеиноме pT2-стадии отмечали выраженное увеличение доли макрофагов ко-экспрессирующих CD68⁺CD163 с тенденцией к формированию более плотных скоплений в центральных зонах опухоли. Преимущественно большая часть

CD68⁺CD163⁺ ОАМ располагалась также в непосредственном контакте с CD117-позитивными опухолевыми клетками (Рисунок 3.42, Рисунок 3.45, Рисунок 3.47).

3.18.2. Комбинация CD163+CD31 (диплексное иммуномечение)

Комбинированное иммуномечение CD163⁺ ОАМ и CD31-позитивных эндотелиоцитов кровеносных сосудов в семиноме позволяет визуализировать пространственную взаимосвязь элементов микроокружения и оценить степень функционального влияния ОАМ.

При сравнительном анализе сеиномы на pT1- и pT2-стадиях выявили прямо-пропорциональное увеличение доли CD163⁺ ОАМ, расположенных в радиусе 50 мкм от кровеносных сосудов в 1,5 раза ($p = 0,001$), что косвенно подтверждает проангиогенное влияние CD163⁺ ОАМ на прогрессирование заболевания (Таблица 3.20, Рисунок 3.43).

3.18.3. Комбинация маркеров CD68+CD163+IL-10 (триплексное иммуномечение)

IL-10 является плейотропным противовоспалительным цитокином, продуцируемым: регуляторными Т-клетками (Treg, Tr1), опухоль-ассоциированными макрофагами, дендритными клетками, В-клетками и опухолевыми клетками. Их функциональная роль в канцерогенезе в основном проопухолева, заключающаяся в подавлении созревания и функции дендритных клеток и ухудшении презентации опухолевых антигенов; снижение активности Th1-ответа и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток; подавление цитотоксической функции NK-клеток.

При мультиплексном анализе сеиномы обнаружены ОАМ, продуцирующие IL-10 с возможностью детализации их фенотипов.

В сеиноме pT2-стадии отмечено достоверное увеличение доли CD68⁺ опухоль-ассоциированных макрофагов, ко-экспрессирующих IL-10, по сравнению

с pT1: с $89,3 \pm 7,9$ % до $93,0 \pm 6,5$ % ($p = 0,012$) (Таблица 3.20, Рисунок 3.48, Рисунок 3.49, Рисунок 3.50).

Аналогичная тенденция выявлена для CD68⁺CD163⁺ макрофагов: доля ко-экспрессирующих IL-10, возростала с $86,3 \pm 9,8$ % на pT1 до $91,7 \pm 8,5$ % на pT2, различия также были статистически значимыми ($p = 0,005$). Таким образом, большинство CD68⁺ и CD68⁺CD163⁺ ОАМ в семиноме демонстрируют ко-экспрессию IL-10 с тенденцией к прямо-пропорциональному увеличению по мере прогрессирования семиномы (Таблица 3.20, Рисунок 3.48, Рисунок 3.49, Рисунок 3.50).

При пространственном анализе взаимодействий ОАМ с опухолевыми клетками, продуцирующими IL-10 отмечено, что для общей популяции CD68⁺ ОАМ частота нахождения хотя бы одного IL-10-позитивного объекта в радиусе 25 мкм возростала с $47,6 \pm 13,9$ % до $58,3 \pm 12,6$ % на стадии pT2 ($p = 0,001$) (Таблица 3.20, Рисунок 3.48, Рисунок 3.49, Рисунок 3.50).

При анализе пространственного соседства CD68⁺CD163⁺ ОАМ отмечено, что практически все их них имеют в радиусе 25 мкм IL-10-позитивные атипичные клетки: на обеих pT-стадиях этот показатель достигал практически 100 %, без статистически значимый различий между стадиями ($p = 0,164$). Это объясняет механизм уклонения опухоли от иммунного надзора с формированием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, что может способствовать модулированию ангиогенеза и ремоделированию стромы.

3.18.4. Комбинация TGF- β +MMP-3 (диплексное иммуномечение)

Известно, что TGF- β является цитокином с мощным регуляторным влиянием на пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, иммунный ответ и ремоделирование матрикса. MMP-3 – матриксная металлопротеиназа, расщепляющая широкий спектр компонентов внеклеточного матрикса (коллагены, протеогликаны, ламинин и др.).

При оценке семиномы pT1-стадии отмечали фокальную экспрессию TGF- β на элементах иммунного микроокружения – у некоторых клеток или в составе малых кластеров, в большей степени в макрофагах с частой юстапозицией к зонам интенсивной MMP-3-позитивности. Кроме того, единичные атипичные клетки были TGF- β -позитивными. MMP-3-позитивное мембранное окрашивание отмечали в большинстве опухолевых клеток и межклеточных пространствах. Кроме того, во многих участках отмечали желто-зеленые домены частичной ко-экспрессии MMP-3 с TGF- β на многих иммунных и немногочисленных атипичных клетках.

В семиноме pT2-стадии доля TGF- β + клеток, имеющих как минимум одну MMP-3-позитивные клетки, достоверно увеличивалась по сравнению с pT1: с $79,2 \pm 12,2$ % до $89,0 \pm 11,5$ % (увеличение на 9,8 процентного пункта, то есть в 1,1 раза, $p = 0,002$), что свидетельствует об усилении пространственной ассоциации TGF- β + и MMP-3+ компонентов опухолевой микросреды при прогрессии сеиномы (Таблица 3.19, Таблица 3.20, Рисунок 3.44).

Таблица 3.19 – Количественная характеристика TGF- β , MMP-3 и IL-10 клеток в сеиноме на 1мм^2

Маркер	Стадия	Сеинома
TGF- β	pT1	154,30 [120,46 – 178,91]
	pT2	202,47 [165,69 – 238,12]
	<i>p-value</i>	0,028
MMP-3	pT1	1682,68 [1230,25 – 2015,99]
	pT2	1569,31 [1121,03 – 1998,77]
	<i>p-value</i>	0,742
IL-10	pT1	2527,04 [2001,37 – 2949,55]
	pT2	2483,12 [2065,91 – 3082,32]
	<i>p-value</i>	0,319
Примечание: количественные данные представлены в виде Me [Q1 – Q3]		

Таблица 3.20 – Оценка количественной характеристики и частоты ко-экспрессии CD68 и CD163 макрофагов и IL-10 в семиноме

Показатель	Стадия	Семинома
Доля CD68 OAM, экспрессирующих IL-10	pT1	89,3 ± 7,9
	pT2	93,0 ± 6,5
	<i>p</i> -value	0,012
Доля CD68 ⁺ CD163 OAM, экспрессирующих IL-10	pT1	86,3 ± 9,8
	pT2	91,7 ± 8,5
	<i>p</i> -value	0,005
CD68 с ≥1 IL-10 в 25 мкм, %	pT1	47,6 ± 13,9
	pT2	58,3 ± 12,6
	<i>p</i> -value	0,001
CD68 ⁺ CD163 с ≥1 IL-10 в 25 мкм, %	pT1	96,8 ± 5,2
	pT2	98,2 ± 3,7
	<i>p</i> -value	0,164
TGF-β с ≥1 MMP-3 в 25 мкм, %	pT1	79,2 ± 12,2
	pT2	89,0 ± 11,5
	<i>p</i> -value	0,002
CD163 с ≥1 CD31 в 25 мкм, %	pT1	45,3 ± 16,4
	pT2	69,9 ± 15,0
	<i>p</i> -value	0,001
Примечание: количественные данные представлены в виде M ± SD		

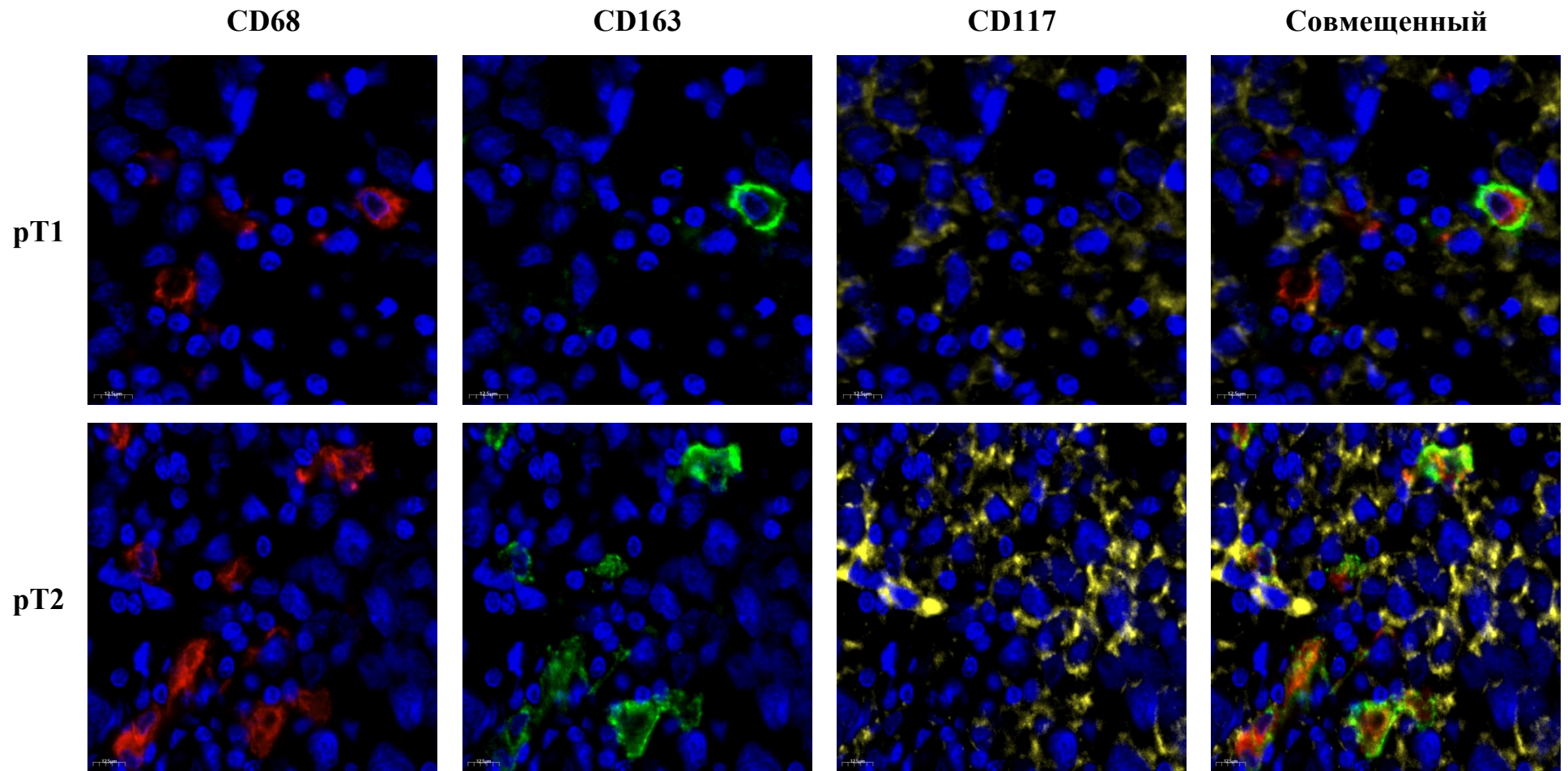


Рисунок 3.42 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 (красное свечение), CD163 (зеленое свечение), CD117 (желтое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD68+CD163+CD117. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

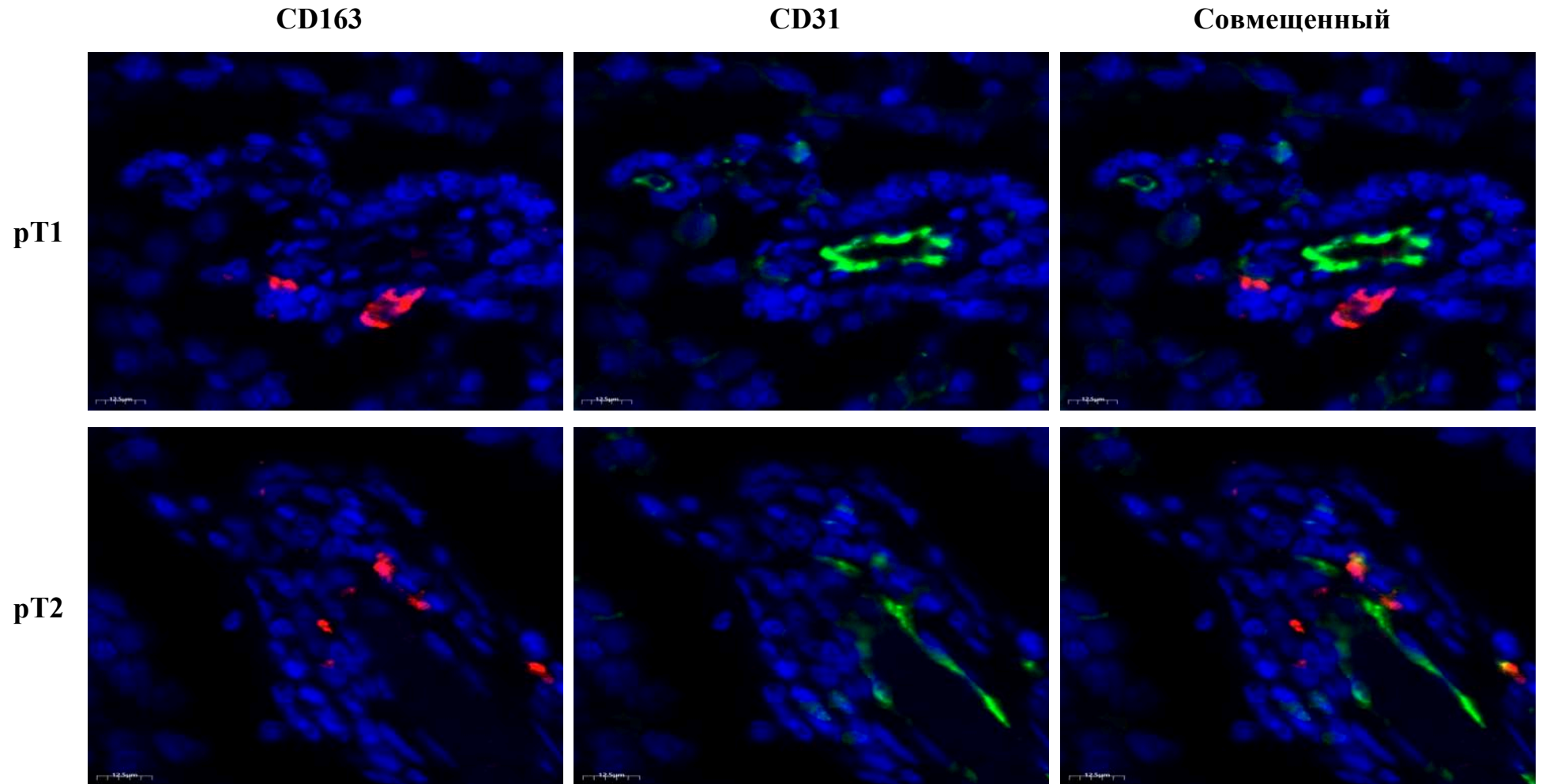


Рисунок 3.43 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD163 (красное свечение), CD31 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD163+CD31. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

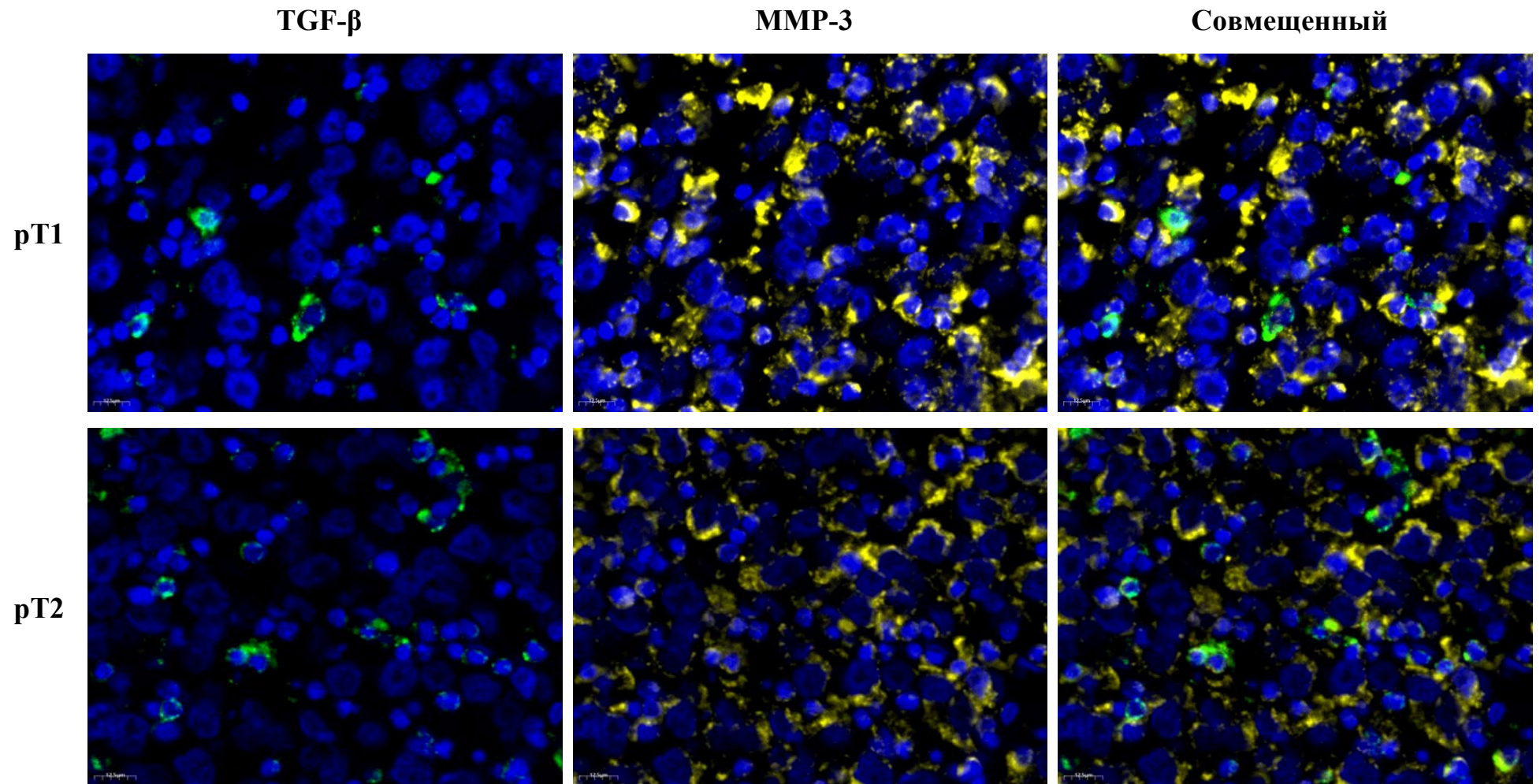
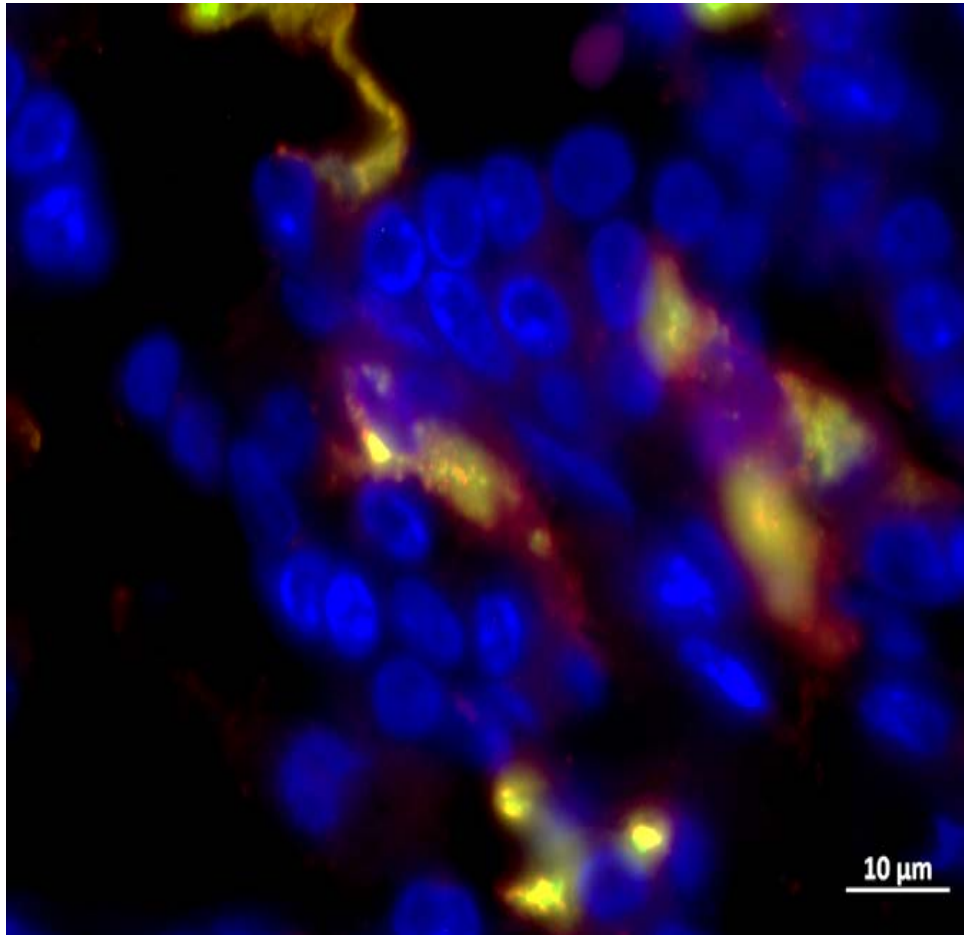
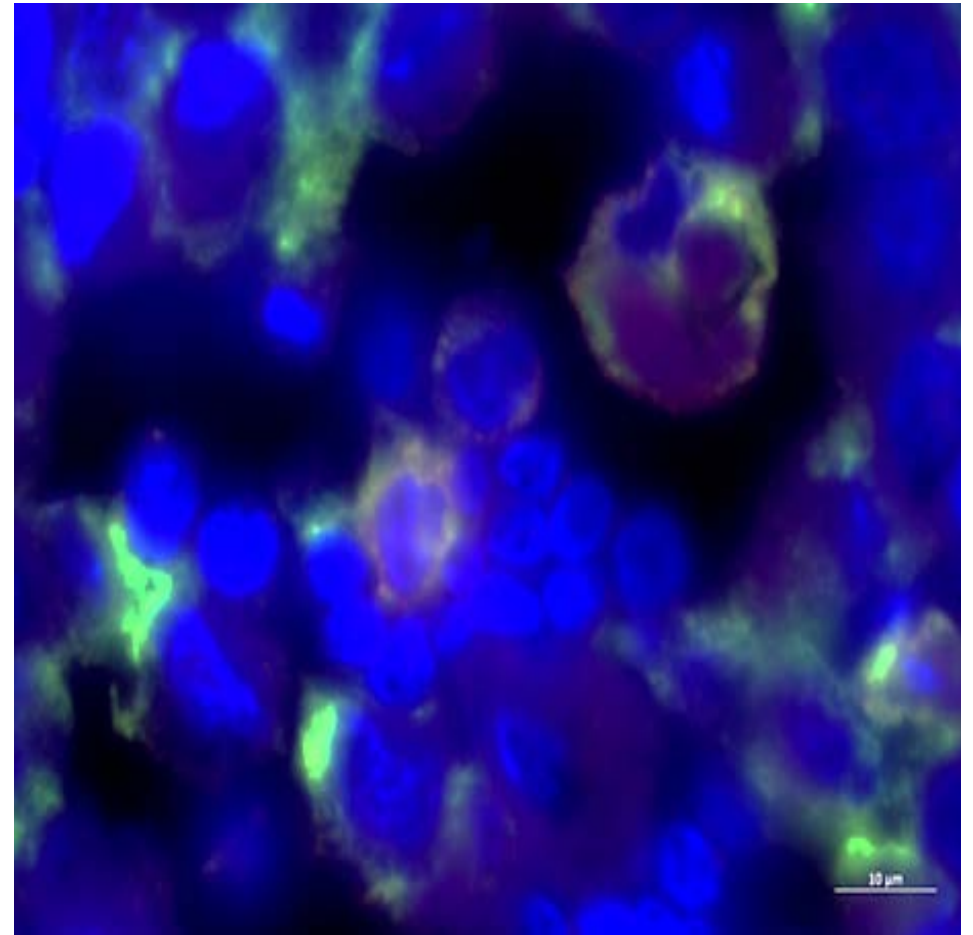


Рисунок 3.44 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TGF- β (зеленое свечение) и MMP-3 (желтое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения TGF- β +MMP-3. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия



Семинома, pT1. CD68+CD163



Семинома, pT2. CD68+CD163

Рисунок 3.45 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание опухоль-ассоциированных макрофагов: CD68 – красное свечение; CD163 – зеленое свечение; DAPI – синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскоп

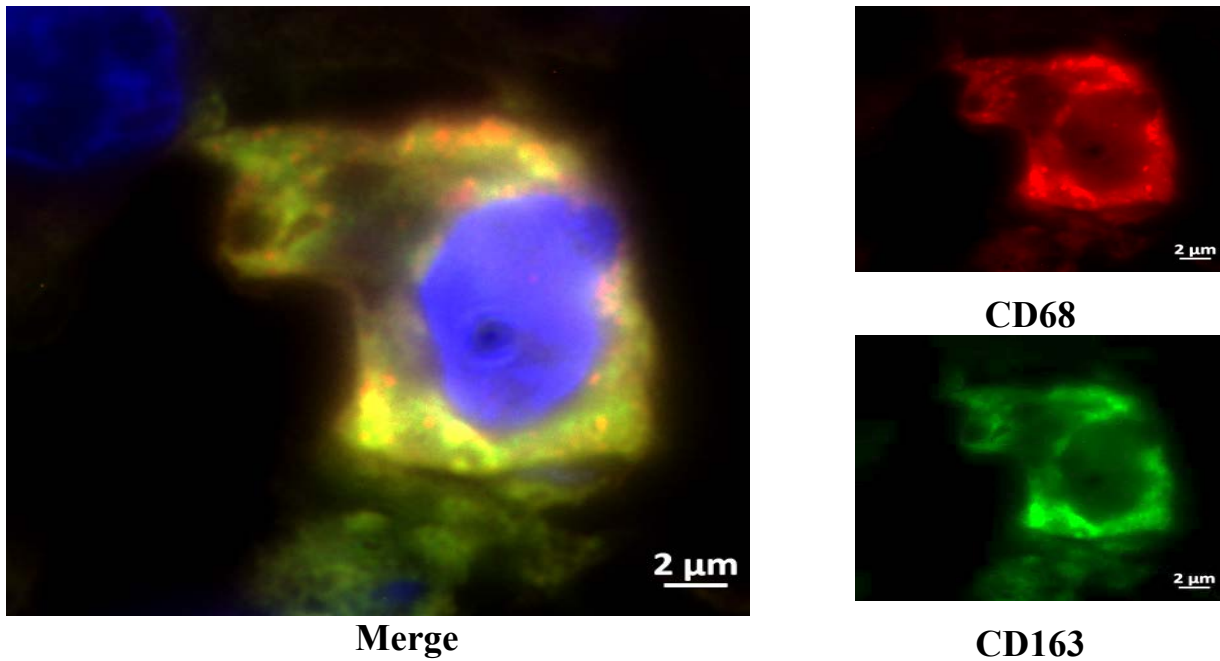


Рисунок 3.46 – Семинома, pT1-стадия. Иммуногистохимическое окрашивание опухоль-ассоциированных макрофагов: CD68 – красное свечение; CD163 – зеленое свечение; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

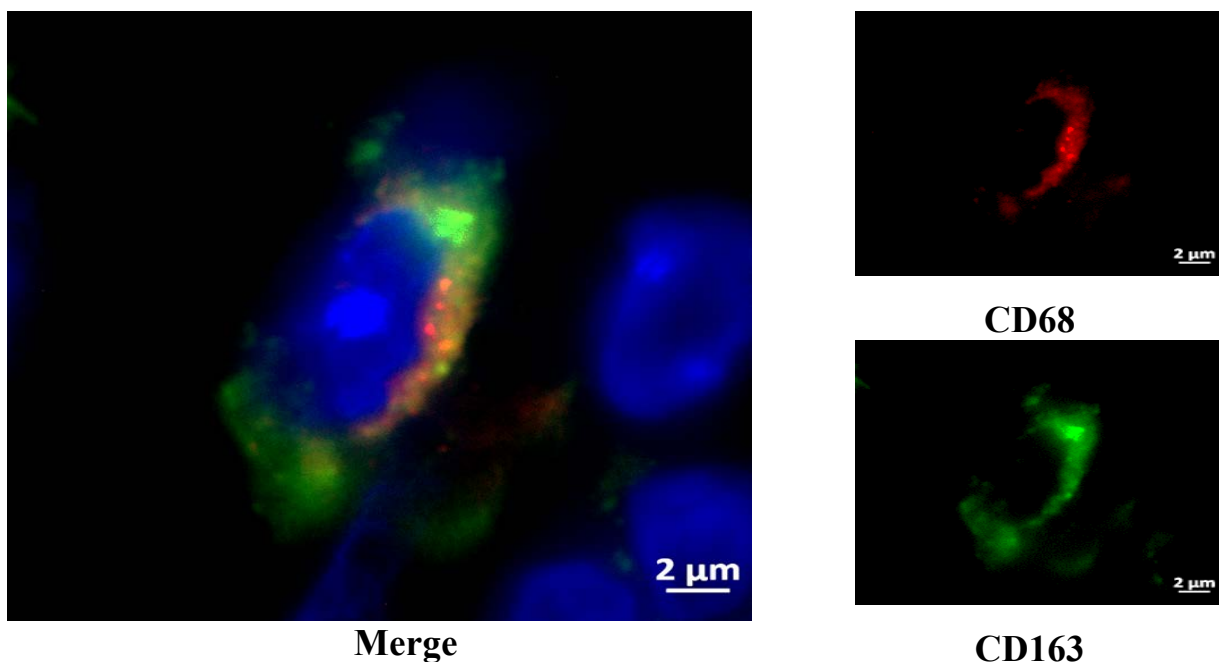


Рисунок 3.47 – Семинома, pT2-стадия. Иммуногистохимическое окрашивание опухоль-ассоциированных макрофагов: CD68 – красное свечение; CD163 – зеленое свечение; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

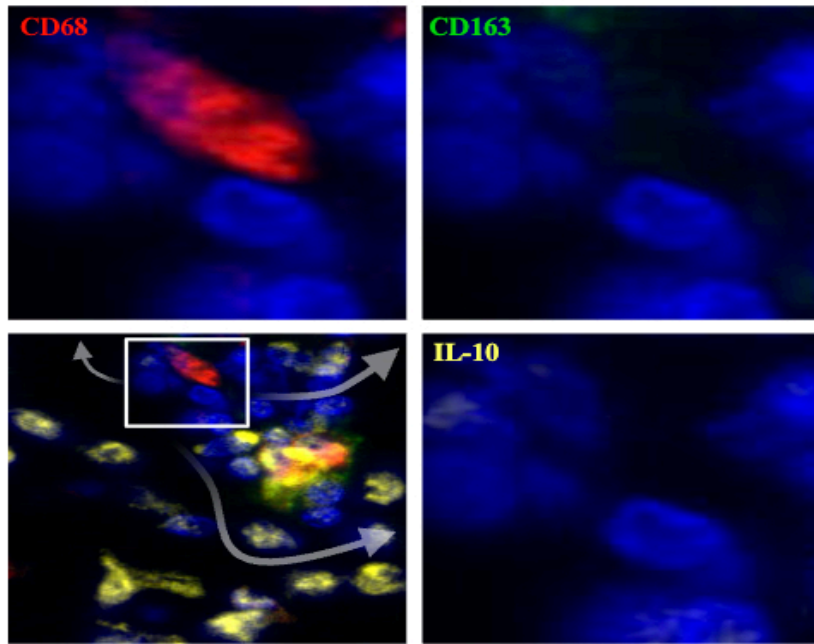


Рисунок 3.48 – Семинома, pT1-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 (красное свечение), CD163 (красное свечение) и IL-10 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD68+CD163+IL-10. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

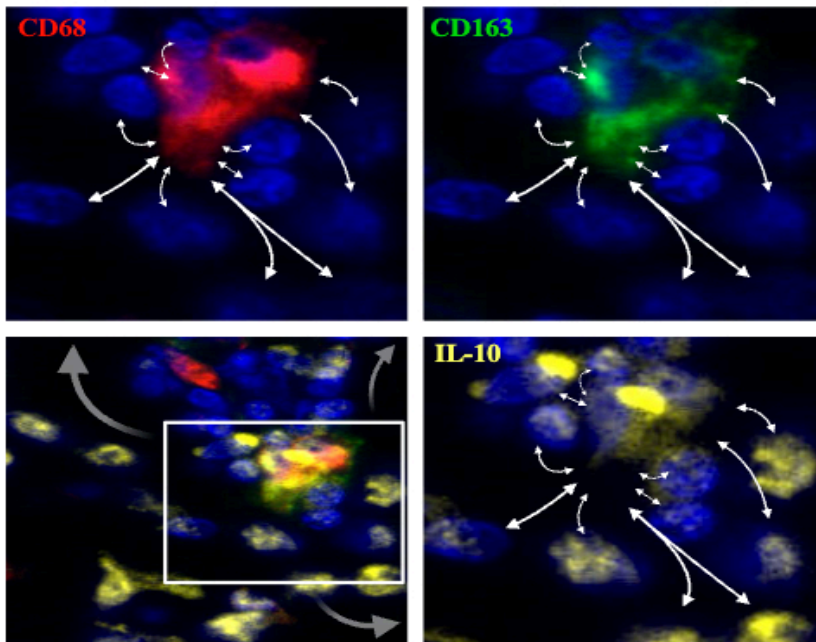


Рисунок 3.49 – Семинома, pT1-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 (красное свечение), CD163 (красное свечение) и IL-10 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD68+CD163+IL-10. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

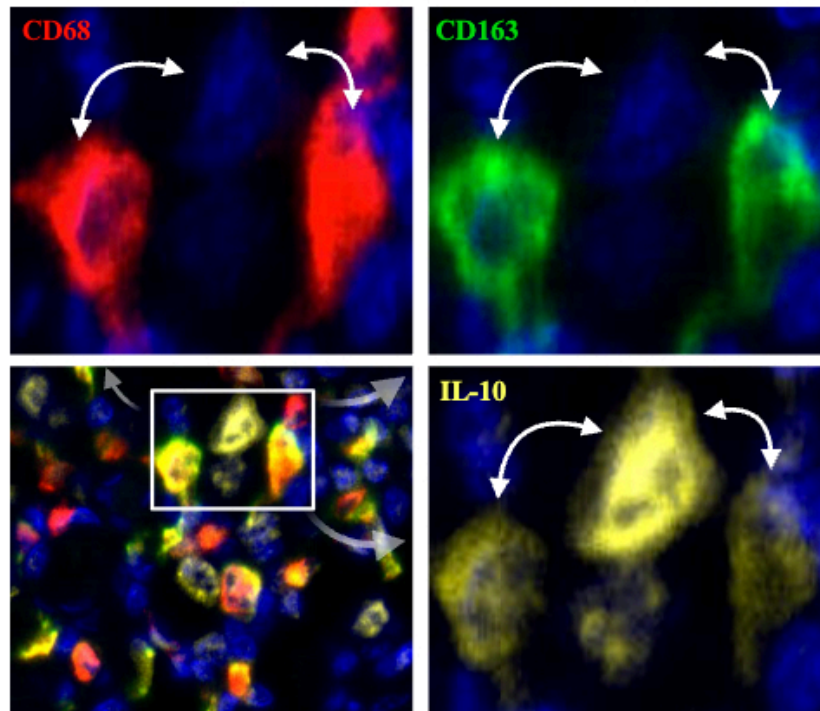


Рисунок 3.50 – Семинома, pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD68 (красное свечение), CD163 (красное свечение) и IL-10 (зеленое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения CD68+CD163+IL-10. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

Резюме

Таким образом, совокупность описанных морфологических изменений указывает на то, что увеличение доли CD163 макрофагов, в синергическом действии с FOXP3 Treg, осью IL-10/TGF- β и секретомом тучных клеток, является ключевым признаком прогрессирующего иммуно-стромального ремоделирования при сеиноме pT1- и pT2-стадии. Количественная нагрузка CD163 ОАМ коррелирует с частотой рецидива, что подтверждает прогностическую значимость данного маркера и обосновывает его использование для стратификации риска в сочетании с показателями иммуносупрессии, ремоделирования матрикса и ангиогенеза.

3.19. Оценка прогностической значимости CD163 макрофагов

Для оценки прогностической ценности количества CD163 ОАМ макрофагов в отношении вероятности возникновения рецидива семиномы был применен метод ROC-анализа. По результатам которого площадь под кривой (AUC) составила 0,64 (95 % ДИ: 0,44 – 0,84), что соответствует умеренной прогностической ценности показателя в отношении риска рецидива семиномы. Это значение AUC подтверждает, что модель имеет ограниченную способность к точному предсказанию рецидивов, однако она все-таки позволяет частично выделить пациентов с повышенным риском. Кривая демонстрирует рост истинного положительного отклика с увеличением ложных положительных откликов, что говорит о возможности улучшения прогностической точности с учетом дополнительных маркеров или факторов. Несмотря на умеренную диагностическую ценность, полученные данные подчеркивают необходимость дальнейшего исследования и уточнения прогностических моделей для более точного предсказания рецидивов на основе макрофагов CD163 и других потенциальных маркеров элементов опухолевого микроокружения (Рисунок 3.51).

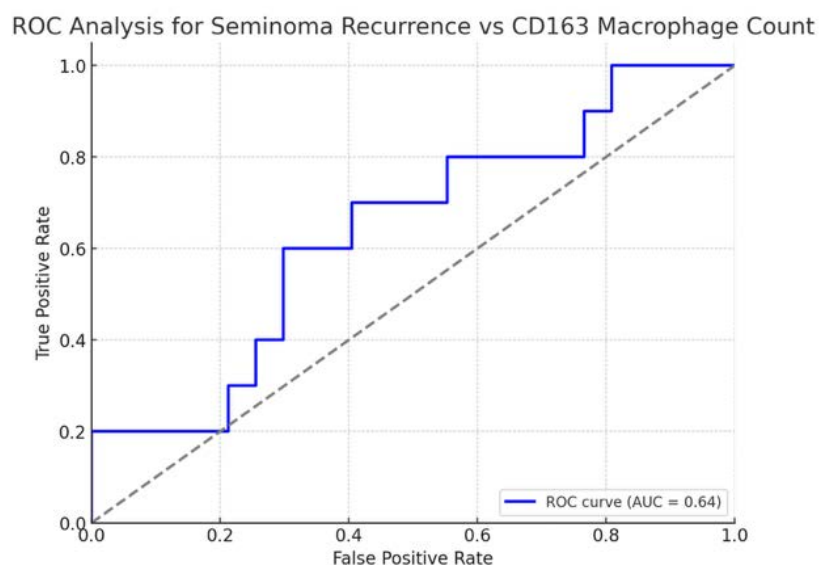


Рисунок 3.51 – ROC-кривая. Взаимосвязь и количества CD163 макрофагов (клетки/мм²). AUC = 0,64

Показатель ROC-AUC = 0,64 для CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов свидетельствует об их умеренной прогностической ценности в отношении риска рецидива семиномы и, соответственно, о необходимости дальнейшего изучения данного маркера. Данные мультиплексной иммуногистохимии согласуются с биологическим обоснованием: герминальные перестройки мужской зародышевой линии и связанная с ними «герминоподобная» программа опухолевых клеток формируют иммуносупрессивную, пластичную стромально-васкулярную нишу, которая способствует рекрутированию CD163 макрофагов, запуску TGF- β -зависимой регуляторной оси и MMP-3-опосредованному ремоделированию матрикса. Именно эта ось, а не изолированный количественный показатель, определяет склонность к инвазии и рецидиву. Следовательно, в герминально детерминированной нише ключевыми драйверами неблагоприятного течения выступают выявленная клеточная пластичность и характерные инвазивные паттерны.

3.20. Иммунофенотипический профиль тучных клеток и их проангиогенная роль в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий

Тучные клетки – крупные, овально-округлой или вытянутой формы, с бледно базофильной цитоплазмой, насыщенной многочисленными темно-базофильными гранулами, содержащими биологически активные вещества – гистамин, гепарин, серотонин, хондроитинсульфаты и гиалуроновую кислоту. Ядро клеток компактное, с грубыми хроматиновыми глыбками. Для детекции тучных клеток были использованы как гистохимические методы, так и иммуногистохимические реакции с использованием антител к специфическим компонентам гранул. В частности, гистохимическое окрашивание толуидиновым синим позволяет выявить тучные клетки по характерной темно-фиолетовой метахромазии их гранул, а иммуногистохимическое исследование с антителами к ферментам гранул (триптазе, химазе,

карбоксипептидазе АЗ (СРАЗ)) используется для количественной оценки и идентификации фенотипов тучных клеток (серозные и мукозные) (Рисунок 3.52).

При гистохимическом окрашивании толуидиновым синим в опухолевых образцах семиномы рТ1-стадии выявлено малое количество тучных клеток с выраженной темно-фиолетовой метахромазией, без признаков дегрануляции. На рТ2-стадии количество тучных клеток было минимальным, а их медианное значение демонстрировало снижение в 8,0 раз ($p = 0,001$) по сравнению с рТ1. Это свидетельствует о резком уменьшении количества тучных клеток при опухолевой прогрессии (Таблица 3.21).

Таблица 3.21 – Количественная характеристика маркеров тучных клеток в семиноме и интактном яичке на 1мм^2

Маркер	Семинома			p-value
	Стадия	Опухоль	Строма	
Толуидиновый синий	рТ1	0,47 [0,33 – 0,77]	0,34 [0,00 – 2,92]	0,001
	рТ2	0,06 [0,03 – 0,14]*	0,69 [0,00 – 0,42]	

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1 – Q3]
* – по сравнению рТ1 с рТ2.

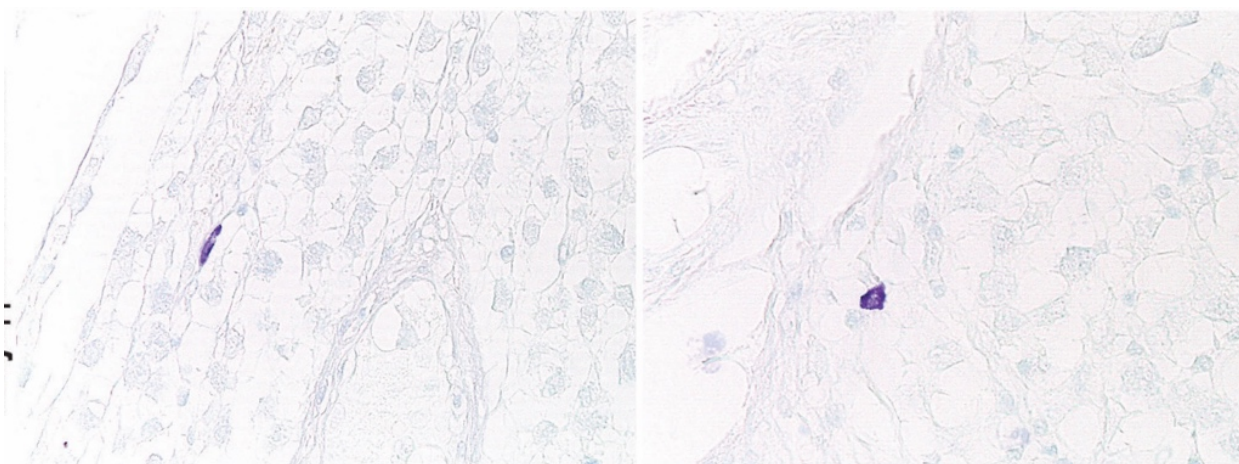


Рисунок 3.52 – Семинома: слева – рТ1-стадия; справа – рТ2-стадия. Окрашивание: толуидиновым синим, увеличение $\times 400$

При иммуногистохимическом окрашивании с антителами к сериновым протеазам гранул тучных клеток – Tryptase и Chymase выявлены существенные различия экспрессии этих ферментов в зависимости от pTNM-стадии. Tryptase и Chymase обладают трипсиноподобной и химотрипсиноподобной активностью. В зависимости от содержания этих ферментов тучные клетки подразделяются на серозный тип (триптаза+ / химаза+) и мукозный тип (триптаза+ / химаза-) (Рисунок 3.55).

Иммунофенотипический количественный анализ Tryptase- и Chymase-позитивных тучных клеток демонстрирует значительное снижение медианных значений на стадии pT2 в 7,3 раза ($p = 0,002$) и 10,4 раза ($p = 0,001$), чем на стадии pT1 (Таблица 3.22, Рисунок 3.53).

При количественном анализе CРАЗ-положительных тучных клеток отмечено снижение уровня экспрессии карбоксипептидазы А3 на стадии pT2. Медианное количество CРАЗ-позитивных тучных клеток на стадии pT2 оказалось в 4,3 раза меньше, чем на стадии pT1 ($p = 0,010$) (Рисунок 3.53).

Таким образом, проведенный иммунофенотипический анализ тучных клеток в тканях семиномы pT1- и pT2-стадий демонстрирует значительное уменьшение как числа тучных клеток, так и уровня экспрессии их ключевых ферментов гранул (метахромазия толуидиновым синим, триптаза, химаза, CРАЗ) на более поздней стадии заболевания (Таблица 3.22, Рисунок 3.53, Рисунок 3.54).

Таблица 3.22 – Количественная характеристика маркеров тучных клеток в семиноме и интактном яичке на 1мм²

Маркер	Семинома			p-value
	Стадия	Опухоль	Строма	
Тryptase	pT1	0,412 [0,24 – 0,70]	0,78 [0,00 – 2,33]	0,002
	pT2	0,056 [0,02 – 0,15]*	0,00 [0,00 – 0,00]	
Chymase	pT1	0,24 [0,16 – 0,55]	0,78 [0,05 – 2,75]	0,001
	pT2	0,02 [0,00 – 0,06]*	0,00 [0,00 – 0,52]	
CPA3	pT1	0,13 [0,06 – 0,33]	0,42 [0,00 – 1,54]	0,010
	pT2	0,03 [0,13 – 0,57]*	0,00 [0,00 – 0,50]	

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1 – Q3]
* – по сравнению pT1 с pT2.

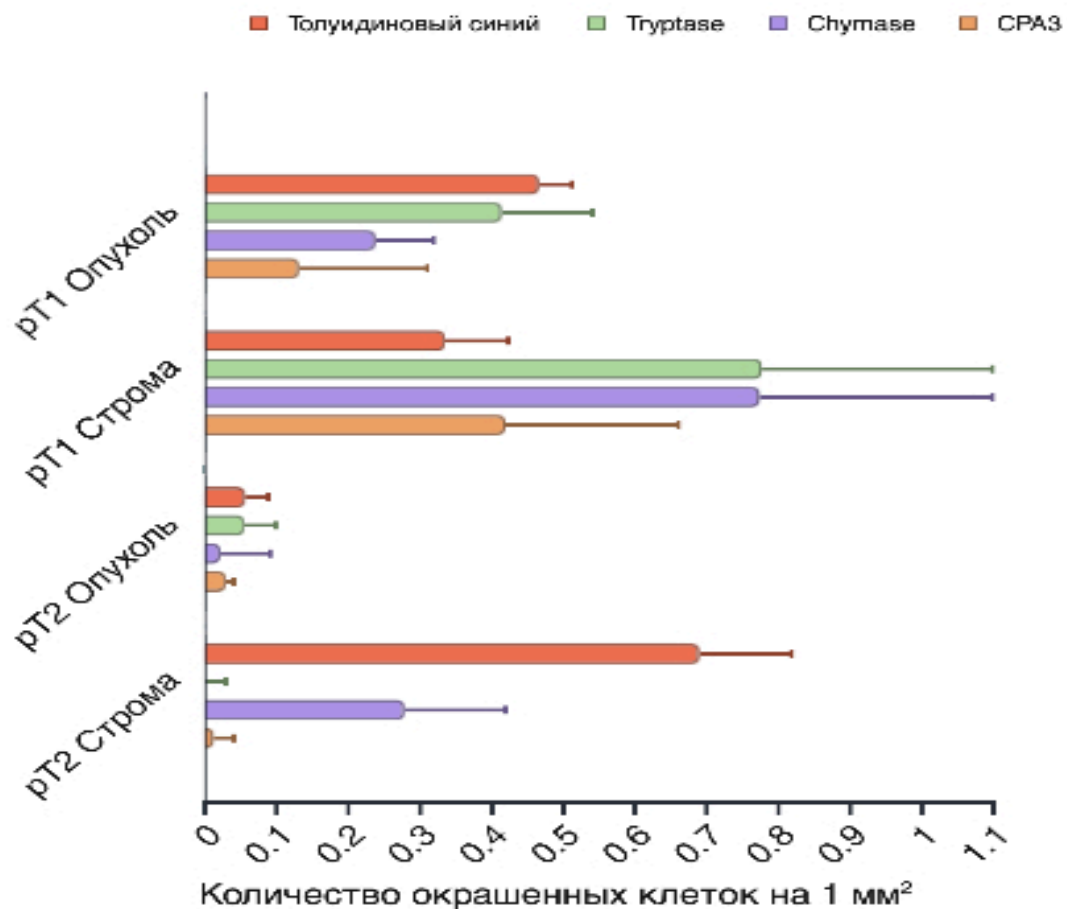


Рисунок 3.53 – Столбчатая диаграмма. Количественное сравнение Толуидин-, Тryptase-, Chymase- и CPA3-позитивных тучных клеток в опухолевом и стромальном компоненте сеиномы на 1мм² в стадиях pT1 и pT2

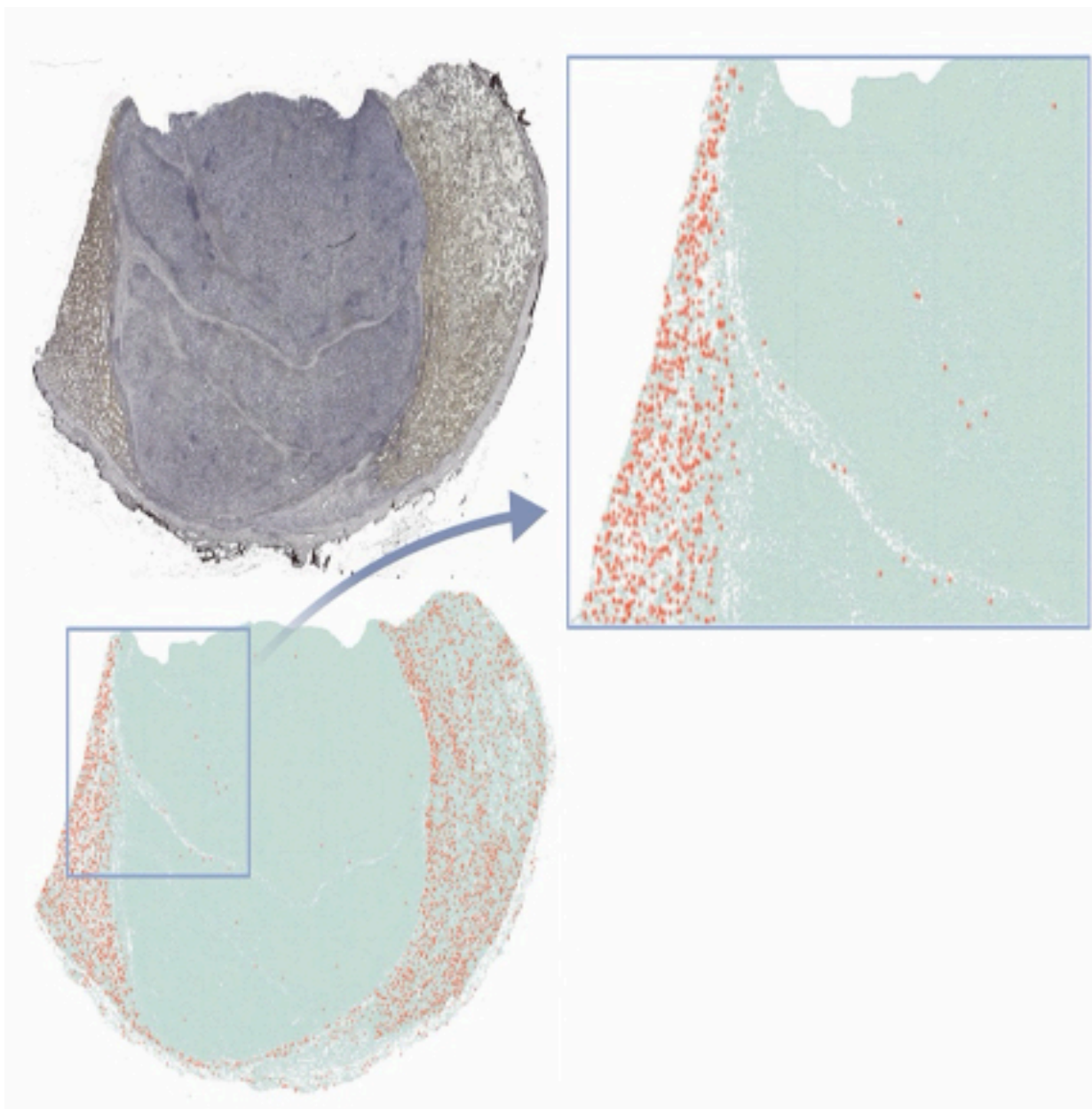


Рисунок 3.54 – Пациент П., 27 лет. Семинома pT2-стадия. Картирование семиномы. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Tryptase. Сверху – гистоскан. Снизу – точечная диаграмма, отображающая распределение триптаза-положительных тучных клеток в микропрепарате. (оранжевые точки – триптаза-положительные клетки, зеленые – триптаза-негативные клетки)

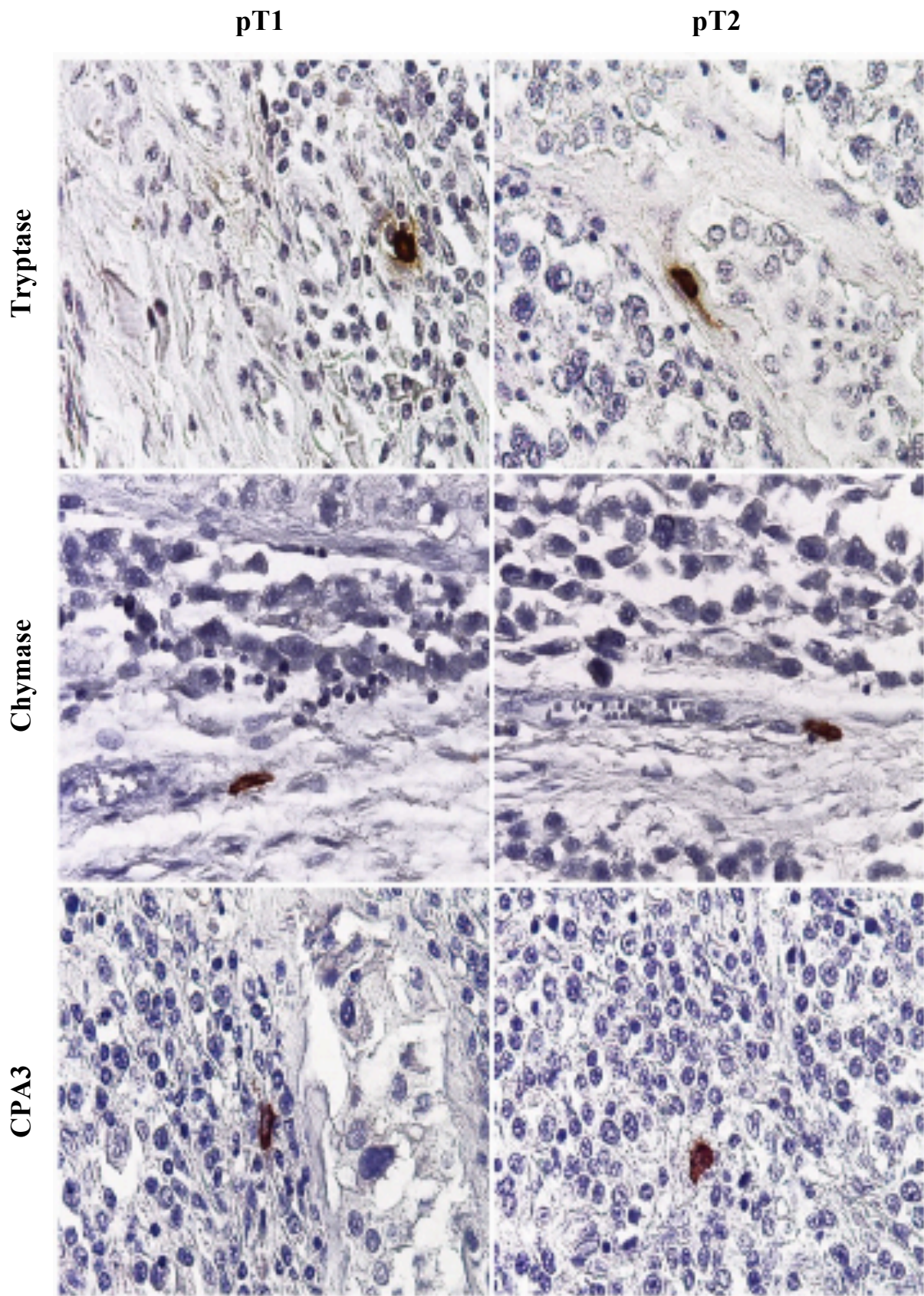


Рисунок 3.55 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание на медиаторы тучных клеток – антителами к Tryptase, Chymase, CPA3; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 400$

3.20.1. Комбинация маркеров Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP (мультиплексное иммуномечение)

При анализе ко-экспрессии Tryptase⁺Chymase⁺CPA3⁺PLAP в семиноме отмечено преобладание Tg⁺ тучных клеток. При оценке пространственной топологии ТК наблюдали в стромальном компоненте и среди иммунного инфильтрата, взаимодействия с PLAP-позитивными опухолевыми клетками отмечено не было (Таблица 3.22, Рисунок 3.56).

3.20.2. Комбинация маркеров Tryptase+CD31 (диплексное иммуномечение)

При пространственном анализе Tg⁺ тучных клеток в отношении CD31-позитивных эндотелиоцитов кровеносных сосудов в семиноме было отмечено, что практически все ТК располагались в радиусе 50 мкм от кровеносных сосудов. При сравнительном анализе pT1- и pT2-стадий статистически значимых различий по этому показателю не обнаружили ($p = 0,810$) (Таблица 3.23, Рисунок 3.57, Рисунок 3.58).

Таблица 3.23 – Оценка доли Tryptase-позитивных тучных клеток, расположенных в радиусе 50 мкм от CD31-позитивных кровеносных сосудов в перитуморальной зоне сеиномы и нормальном яичке

Показатель	Стадия	Сеинома
Tryptase с ≥ 1 CD31 в 50 μm , %	pT1	98,7 \pm 5,1
	pT2	98,4 \pm 6,3
	<i>p</i> -value	0,810*
Примечание: количественные данные представлены в виде $M \pm SD$ * – по сравнению pT1 с pT2.		

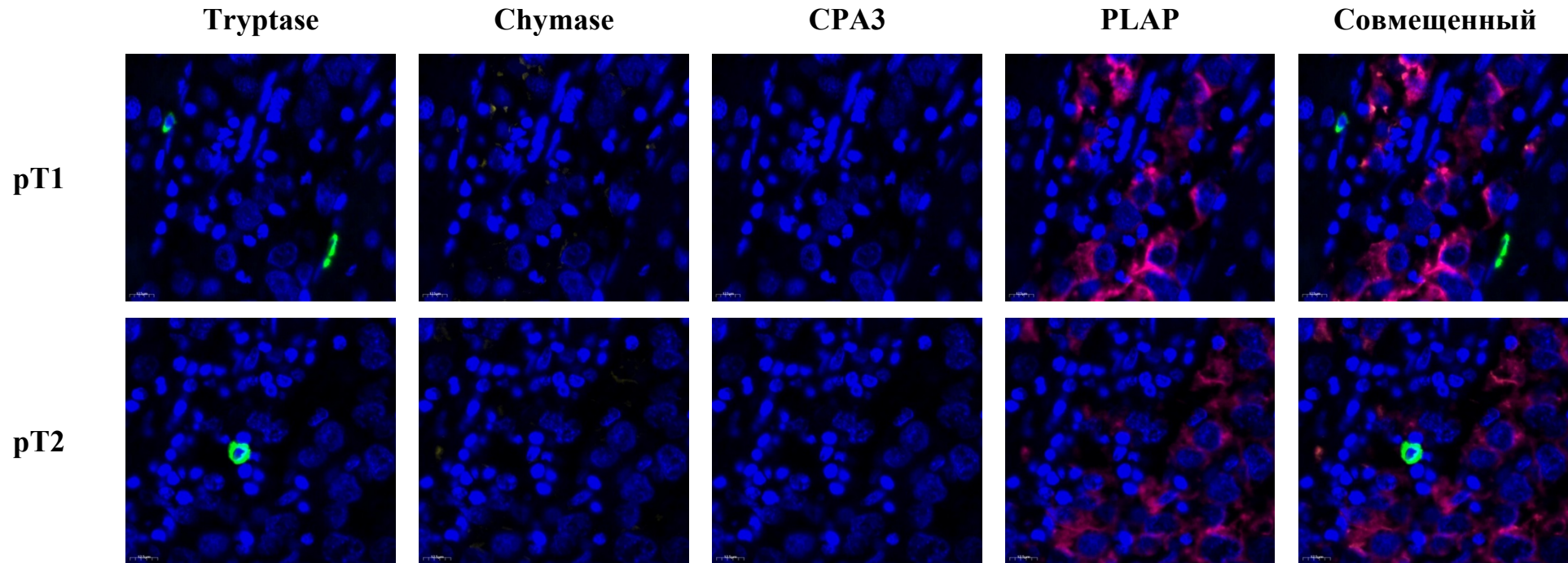


Рисунок 3.56 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), Chymase (желтое свечение), CPA3 (оранжевое свечение) и PLAP (розовое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+Chymase+CPA3+PLAP. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

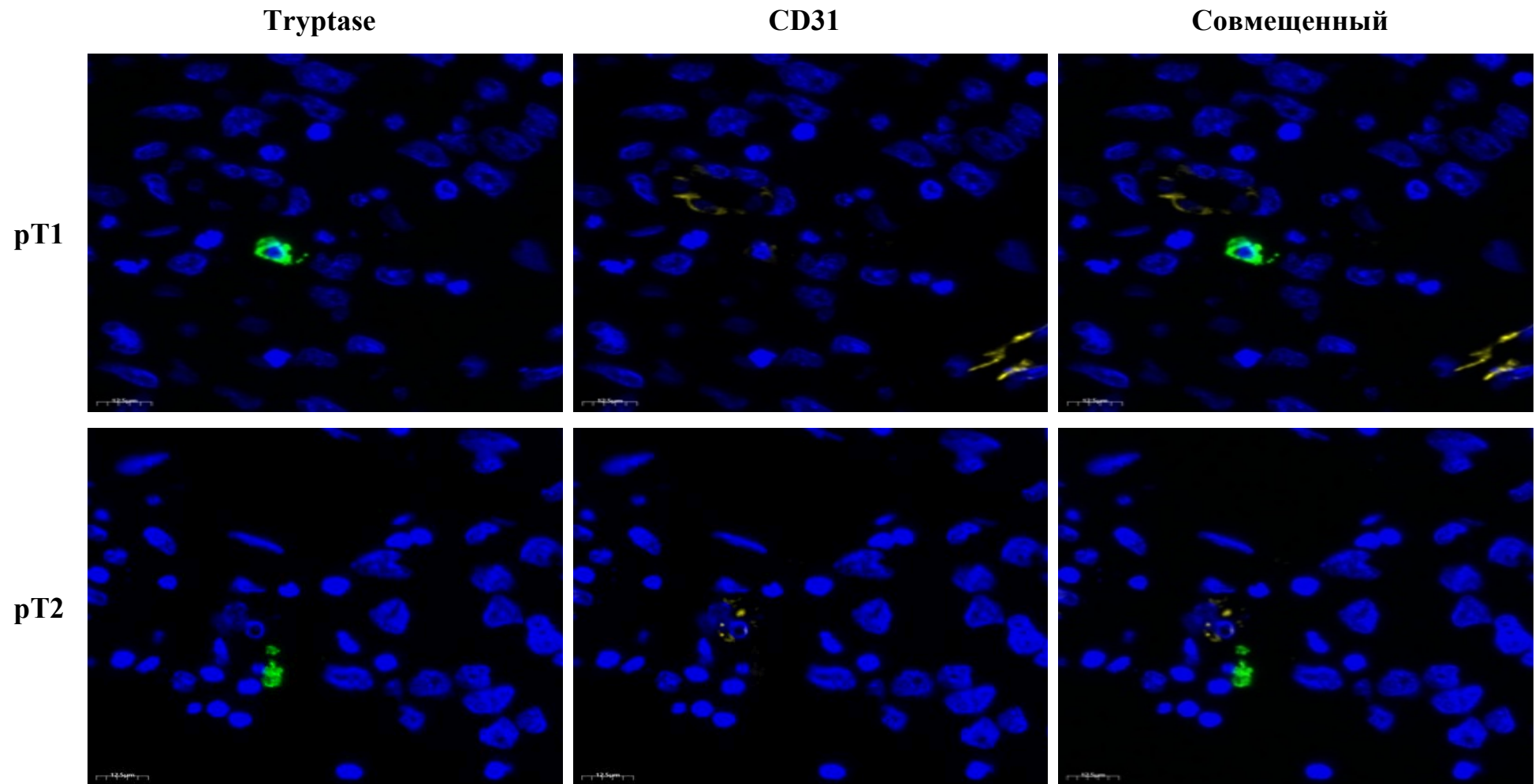
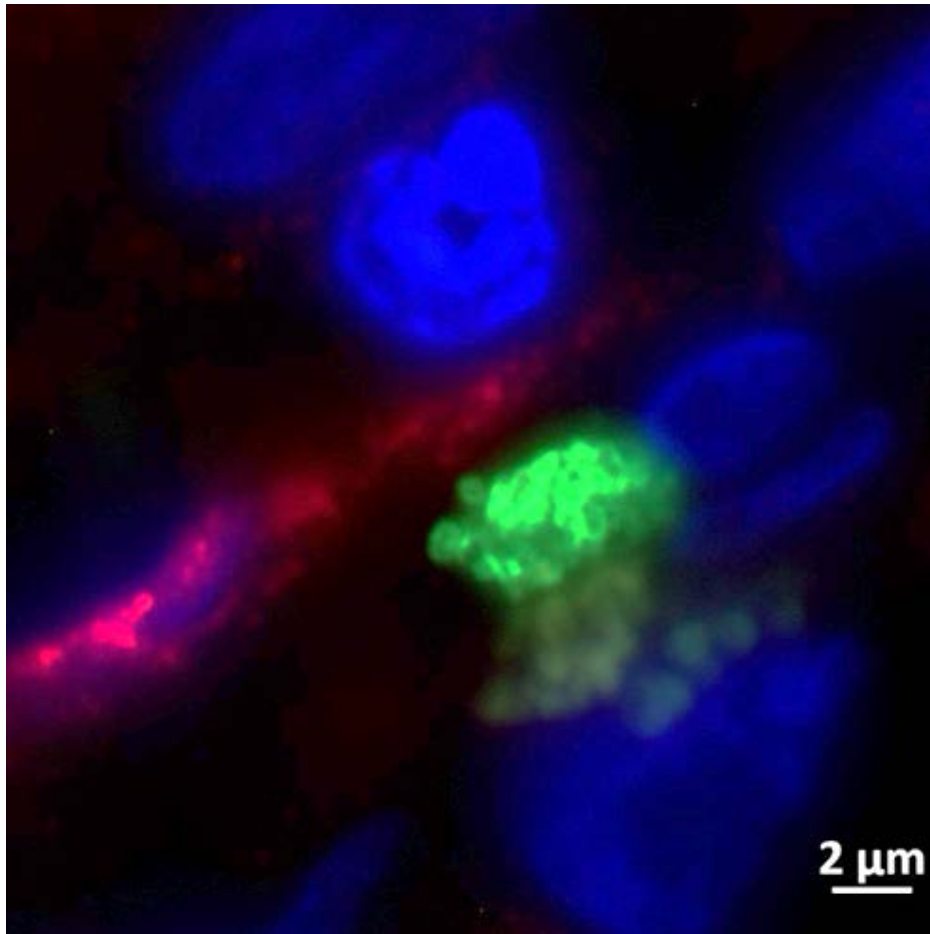
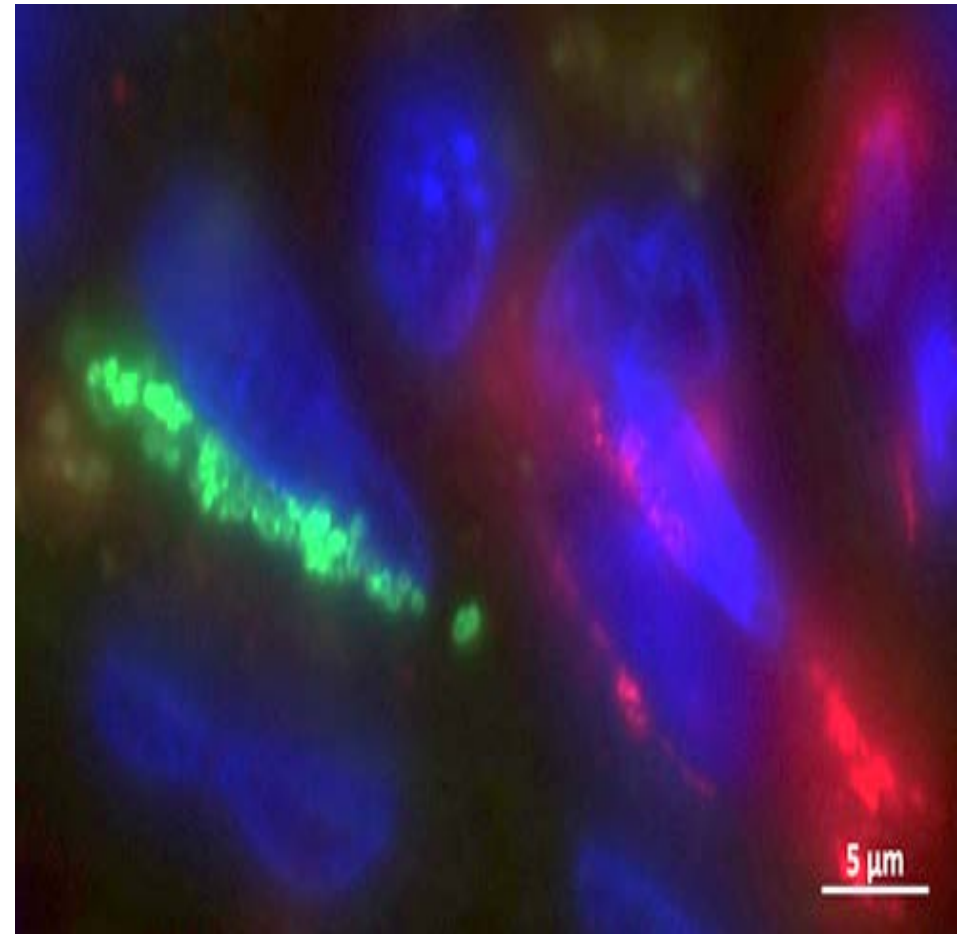


Рисунок 3.57 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Tryptase (зеленое свечение), CD31 (желтое свечение), а также совмещенные изображения иммуномечения Tryptase+CD31. DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия



Семинома, pT1. Tryptase + CD31



Семинома, pT2. Tryptase + CD31

Рисунок 3.58 – Семинома, pT1- и pT2-стадии. Взаимодействие Tryptase+ тучных клеток и эндотелия (CD31) кровеносных сосудов. Иммуногистохимическое окрашивание – комбинация Tryptase+CD31. Tryptase – зеленое свечение; CD31 – красное свечение; DAPI – ядра, синее свечение. Мультиплексный анализ, флуоресцентная микроскопия

Резюме (изложение основных результатов диссертационного исследования)

Начиная с индифферентной стадии развития гонады в эмбриогенезе – образование половых валиков, куда из внезародышевой энтодермы желточного мешка мигрируют гонобласты, из половых шнуров формируется эпителиосперматогенный слой, а из мезенхимы – строма, далее, с последующей особенно в подростковый период – манифестации сперматогенеза, яичко рассматривается как иммунопривилегированный орган, с особым локальным гомеостазом. Нарушения дифференцировки сперматогенных клеток создают предпосылки, в том числе к герминогенной неоплазии *in situ*, которая является предшественником семиномы. На данном этапе происходят определенные морфологические изменения в иммунном ландшафте семиномы: взаимодействие Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток с атипичными и другими соматическими клетками, возможно, придают особую уникальность данной опухоли, а их количество находится в корреляционной зависимости от стадии.

При комплексном анализе элементов опухолевого микроокружения в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий выявлен ряд закономерностей, подчеркивающих особый иммунный статус яичка. При иммуногистохимическом исследовании субпопуляций Т- и В-лимфоцитов наблюдали резкое увеличение их количества при сравнении с перитуморальной зоной и особенно с нормальным яичком. При фенотипическом и пространственном анализе выявили, что ОАМ обладают клеточной пластичностью, проявляющейся увеличением численности CD163 ОАМ в семиноме pT2-стадии по сравнению с pT1. При этом количество CD68 ОАМ оставалось неизменным при сравнении стадий заболевания. В свою очередь, иммунофенотипический анализ ТК демонстрировал обратно-пропорциональное снижение количества Tryptase-, Chymase-, CPA3-позитивных и окрашенных Толуидиновым синим клеток.

Кроме того, при использовании ROC-анализа была выявлена средняя прогностическая ценность CD163 ОАМ на частоту возникновения рецидива заболевания.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании произведен комплексный анализ взаимодействия элементов иммунного микроокружения со сперматогенным эпителием в норме и с атипичными клетками в неметастатической семиноме pT1- и pT2-стадий, развивающейся на фоне нарушений сперматогенеза во внутриутробном развитии – задержки созревания первичных половых клеток, приводящей к герминальной неоплазии.

Особое внимание в данной работе уделено перитуморальной зоне – не только пограничной области между опухолью и интактной паренхимой, но и переходному звену развивающегося яичка от нормального строения к патологическому состоянию. С помощью мультиплексной иммуногистохимии и морфометрии мы реконструировали пространственные связи опухолевых клеток с элементами иммунного ландшафта и сосудисто-стромальной нишей семиномы. В исследовании сделан акцент на раскрытие реактивных и адаптационных механизмов со стороны элементов локального звена иммунитета.

Таким образом, был выполнен сравнительный анализ клинических и морфологических данных (pT1- и pT2-стадий) и уровней онкомаркеров. Такой комплексный подход позволил выявить ключевые изменения в иммунном микромире семиномы и оценить их возможное прогностическое значение.

4.1. Эмбриональный фактор в развитии герминальной неоплазии

Как известно, в яичке постоянно поддерживается особый иммунопривилегированный статус, задающий темп последующих событий. Ключевая роль в его обеспечении принадлежит, прежде всего, гемато-тестикулярному барьеру, образованному плотными контактами sustentоцитов: он изолирует антигенные сперматогенные клетки и формирует биохимически защищённую среду. Однако интратестикулярная компартиментализация не является единственным ограничивающим фактором, поскольку в паренхиме действуют

согласованные иммунорегуляторные механизмы локального гомеостаза. Так, интерстициальные макрофаги, которые находясь в покое (толерантном) фенотипе, тем не менее продуцируют IL-10 и TGF- β и тем самым нивелируют избыточную реактивность продуцентов иммунной системы; суспендоциты и интерстициальные эндокриноциты вместе с единичными Treg усиливают этот эффект, продуцируя активин А, TGF- β , IL-10 и другие медиаторы [114]. В том же направлении реализуют свои функции и скудно представленные дендритные клетки, обеспечивающие, в частности, толерантность к антигенам сперматогенеза, тогда как тучные клетки, пребывая в более или менее покоем состоянии, поддерживают иммунный гомеостаз [115].

Бесспорно, события, происходящие в мужской гонаде еще в эмбриогенезе, а затем в яичке у новорожденного мальчика, следует рассматривать не только как проявление физиологического сперматогенеза, но и как предпосылки к его нарушению – вплоть до опухолевой трансформации первичных половых и / или сперматогенных клеток.

Гаметогенез как начальный этап онтогенеза у мужчин представлен сперматогенезом, а у женщин – овогенезом; именно эти процессы формируют высокоспециализированные половые клетки, способные к оплодотворению и формированию нового организма.

Исторически, интерес эмбриологов и репродуктологов к взаимоотношениям половых и соматических клеток объясним: как только завершается морфологическая детерминация и дифференцировка пола гонады, в ней начинается размножение и дальнейшая дифференцировка половых клеток. У мужчин это становление сперматогониального пула и последующий сперматогенез, имеющий свою специфику по сравнению с овогенезом, что связано с особенностями биологии размножения [12].

И здесь логично перейти от общего контура к конкретике – закладке гонады и ее заселению примордиальными половыми клетками.

Уже в раннем эмбриогенезе, в примордиальных половых клетках, мигрирующих к половому гребню, первичных половых клетках, а также в

латентной популяции недифференцированных сперматогенных клеток обнаруживается экспрессия фетальных белков – PLAP, OCT3/4, KIT (CD117) [80]. Перечисленные клетки и являются в последствии морфологическим субстратом для развития герминогенной неоплазии *in situ* в постнатальном периоде онтогенеза, а протеины – специфическими онкомаркерами, имеющими важнейшее диагностическое значение.

Большинство предшественников сперматогенных клеток либо дифференцируются еще в неонатальном периоде, либо элиминируются апоптозом; если же этого не происходит, то в подростковом возрасте в яичках появляются «покоящиеся предопухолевые узлы», которые при активации элементов гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси могут запустить неопластический процесс. Еще Н. Э. Скаккебек писал, что «атипичные половые клетки» находятся в яичке задолго до появления самой опухоли; это стало первым упоминанием происхождения семиномы из эмбриональных пре-сперматогенных клеток [117]. К факторам риска, укладывающимся в эту же канву, относятся крипторхизм, тестикулярная дисгенезия, воздействие эндокринных раздражителей, поскольку все они так или иначе нарушают тонкую дифференцировку первичных половых клеток в критические периоды развития гонады [128].

Хорошо известно, что в подростковом возрасте манифестирует сперматогенез, включающий в себя 4 – 5 циклов с продолжительностью каждого в среднем 75 дней, и параллельный запуск органоспецифичных репарационных механизмов для нивелирования возможных пренатальных нарушений развития яичка и герминальной дифференцировки. Строгая стадийность, кооперация герминативных и соматических элементов, адекватная трофика и фагоцитоз (со стороны sustentоцитов) образуют сложную иерархическую систему, напрямую зависящую от функционирования барьерных и защитных (иммунных) факторов. Митотические деления сперматогоний, мейоз сперматоцитов и финальная стадия – спермиогенез – происходят в изолированных извитых семенных канальцах, где сперматогенные клетки отделены от иммунных клеток плотными контактами;

поэтому, поддержание иммунопривилегии здесь не факультативно, а крайне необходимо [12, 115].

Морфофункциональная микроархитектура яичка представлена мужскими половыми клетками, развивающимися клонально и образующими синцитий, а также компонентами регулирующими сперматогенез: с одной стороны – «няньками» (суспендоцитами), а с другой – гормонпродуцирующими интерстициальными эндокриноцитами, с третьей – иммунными механизмами. Такую морфофункциональную организацию можно сравнить с «высокотехнологичным конвейером». В то же время роль иммунных клеток в нормальном яичке – и тем более при срыве сперматогенеза – остается мало изученной, что лишь подчеркивает центральное значение различных барьеров и локальной толерантности как условий для бесперебойной работы этого «конвейера» [11, 117, 118].

Способна ли семинома развиваться одновременно с манифестацией сперматогенеза в пубертатном периоде или все-таки ее возникновение связано с нарушением биологии развития яичка в эмбриогенезе? Этот вопрос остается дискуссионным до сих пор. Также по-прежнему открыта тема развития бесплодия у мужчин даже при односторонней семиноме. Наконец, большинство морфологов и онкологов озадачены особым онкологическим статусом сеиномы и закономерностями её биологии, что, как правило, проявляется специфичностью клинической картины и более благоприятным прогнозом по сравнению с другими злокачественными новообразованиями.

Собственно опухолевый узел при классической сеиноме сохраняет характерный морфологический рисунок: дольковую архитектуру с тонкими волокнистыми септами и очагами лимфоидной инфильтрации, а также крупные атипичные клетки со «светлой» цитоплазмой; и именно на этом фоне выявляется устойчивая иммуногистохимическая экспрессия PLAP и OCT3/4, что подтверждает связь с эмбриональным фактором в патогенезе герминальной неоплазии. Однако, можно отметить избирательный дуализм дальнейших событий развития мужской гонады – когда первичные половые клетки, утратившие органоспецифические дифференциальные антигены тем не менее сохраняют онкофетальный фенотип,

«маскируясь» под «собственные» ткани и тем самым снижая степень распознавания со стороны элементов эффекторного иммунитета. Дальнейшие события клеточной пластичности и запуск механизмов интрагонадной индукции позволяют атипичным клеткам перейти в стволовое состояние. При этом меняется ориентация межклеточных контактов и пути сигналинга: происходит эпителиально-мезенхимально-подобная перестройка в поляризации кадгеринов (модуляция E- и N-кадгерина), активируются сложные механизмы сохранения опухолевых клеток, при участии ядерного фактора NF-κB, усиливается экспрессия транспортеров множественной устойчивости [43].

В семиноме ключевыми маркерами выступают OCT3/4 и SOX17 при сохранении экспрессии NANOG, тогда как в эмбриональном раке доминирует ко-экспрессия OCT3/4+SOX2. Иммунофенотипическую картину дополняют сигналы от белков семейства TGF-β (BMP/Activin), которые способны удерживать баланс большинства регуляторных факторов в сперматогенных клетках. Это еще одна возможность, позволяющая опухоли «маскироваться» в эмбриогенезе от иммунного надзора: пластичность поддерживает ее за счет модуляции белков адгезии, с параллельной активацией FAS/FAS-L на эффекторных клетках, оказывающей на них губительное действие [15, 58, 127].

Таким образом, если при развитии гонады происходит «сбой» и сперматогенные клетки сохраняют эмбриональный фенотип, то возрастает риск герминальной неоплазии. Зыбкость локальной иммунопривилегированности и межклеточных коммуникаций также приводит к нарушению сперматогенеза с трансформацией в опухолевые клетки [80, 114, 115].

При крипторхизме наблюдаются нарушения сперматогенеза и гибель сустентоцитов, сопровождающиеся снижением продукции факторов роста и создающие предпосылки для малигнизации: риск герминогенных опухолей возрастает в 3 – 14 раза [128]. В нашей когорте соматические заболевания яичек в анамнезе (крипторхизм, микролитиаз и др.), наблюдались примерно у пятой части пациентов без различий у pT1- и pT2-стадий. Очевидно, что факторы риска определяют факт возникновения герминальной неоплазии и семиномы, но не

влияет на стадийность. Последнее, по-видимому, определяется взаимодействием атипичных клеток с элементами опухолевого микроокружения – то есть местными факторами прогрессии, обсуждаемыми далее.

Согласно полученным результатам, представляется важным провести параллели: обсудить биологию развития сперматогенеза в антенатальном и постнатальном периодах онтогенеза, сопоставить морфологическую картину в нормальном яичке и при семиноме; особый интерес при этом представляет перитуморальная зона.

При анализе перитуморальной зоны в дистрофически измененном сперматогенном эпителии были обнаружены фокусы с признаками герминальной неоплазии, клетки которой окрашивались на OCT3/4 и PLAP. Это указывает на отклонение от эталонной перинатальной дифференцировки первичных половых клеток [80]. Как правило, в норме такие клетки либо дифференцируются в неонатальном периоде, либо утилизируются апоптозом; если же этот переход не завершен, то при индукции гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси (в подростковом периоде) этот «сбой» может стать триггером для неопластической экспансии. Более вероятно, что это и есть те самые «эмбриональные остатки», свидетельствующие о сдвиге герминальной ниши – отсутствие полноценного сперматогенеза в перитуморальной зоне сочетается с сохранением фетальных факторов (онкофетальных маркеров), подтверждая концепцию незавершенной дифференцировки герминативной линии как основы развития сеиномы.

В этой логике развитие герминальной неоплазии можно рассматривать как патологическое отклонение от траектории физиологического сперматогенеза или развития мужской гонады, возникающее либо при недостаточной поддержке со стороны соматических клеток (например, при дисгенезии sustentоцитов), либо под влиянием экзогенных факторов в критические периоды эмбриогенеза. Молекулярно-биологические параллели здесь очень показательны: атипичные клетки сеиномы и примордиальные половые клетки демонстрируют тождественный транскрипционный профиль (OCT3/4, NANOG, SOX17 и др.), что

свидетельствует о незавершенной дифференцировке и прочной связи текущего иммунофенотипа опухолевых клеток с эмбриональным происхождением [80].

Резюмируя вышесказанное, мужские половые клетки, начиная с их закладки в эпибласте и миграции из внезародышевой энтодермы к гонадам, дифференцируются и взаимодействуют с микроокружением. Эти процессы поддерживают пул сперматогенного эпителия и формируют морфологические предпосылки к патологии, включая неоплазию. Герминогенные опухоли (ГО), в том числе семинома, характеризуются высокой специфичностью, и их изучение требует сопоставления с гистологическим и молекулярно-биологическим состоянием нормальной ткани яичка.

4.2. Пролиферативная активность: норма, перитуморальная зона и семинома

В нормальном яичке ядерная экспрессия Ki-67 отражает физиологическую пролиферацию сперматогенного эпителия. Митотическая активность выявлялась преимущественно в сперматогониях и части сперматоцитов, тогда как соматические клетки интерстициальной ткани в большинстве случаев оставались Ki-67-негативными [89]. Экспериментальная модель органотипических культур нормального яичка и тканей с CIS/семиномой показала, что Ki-67 надежно маркирует пролиферирующие сперматогенные клетки как *in situ*, так и в краткосрочной культуре, что указывает на сохранение их пролиферативной активности в условиях сохраненной гистоархитектоники [50].

В доступной научной литературе отсутствуют исследования Ki-67 в перитуморальной зоне сеиномы; в большинстве работ по герминогенным опухолям яичка интерес морфологов сосредоточен на анализе индекса Ki-67 только в пределах опухолевой ткани [66]. В других солидных опухолях Ki-67 также преимущественно рассматривается как внутриопухолевый показатель. Однако известно, что «переходные» зоны между опухолью и сохранившимся нормальным яичком могут иметь собственный профиль пролиферации. Он отражает механизмы клеточно-тканевой пластичности, реактивную пролиферацию сперматогенного

эпителия и иммунных клеток. В то же время в нашем исследовании выявлено снижение пролиферативной активности сперматогенного эпителия в перитуморальной зоне в связи с очаговыми поражениями в виде дистрофии и герминальной аплазии, а также тубулярной атрофии. Данное наблюдение частично согласуется с высокой частотой снижения фертильности у пациентов с семиномой.

В одном из недавних исследований Lourenco, посвященном сравнительной пролиферативной активности всех типов ГО с применением цифровой морфометрии, было отмечено повышение индекса Ki-67 в несеминомах по сравнению с семиномами, что отражает их более агрессивный биологический профиль. Несмотря на тенденцию в онкоморфологической практике к применению Ki-67 для стратификации риска и прогноза при различных солидных опухолях, полученные нами данные о пролиферативной активности атипичных клеток семиномы в абсолютных значениях были малы [44, 112]. В сочетании с данными других исследователей об отсутствии корреляции уровня Ki-67 со стадией заболевания, категорией риска и исходом лечения это не позволяет рассматривать Ki-67 как самостоятельный прогностический фактор для семином [66].

Таким образом, для семиномы и ее перитуморальной зоны Ki-67 является надежным индикатором пролиферативной активности опухолевых клеток и удобным количественным параметром для описания биологического поведения опухоли.

4.3. Двухцепочечные разрывы ДНК: норма, перитуморальная зона и семинома

При исследовании нормального яичка нами была выявлена TUNEL-положительная реакция примерно в 1/5 сперматогенных клеток. Согласно обзорным работам по регуляции апоптоза в яичке, это отражает «физиологический» путь элиминации избыточных клеток и является одним из ключевых механизмов поддержания качественного состава герминативного пула [31].

Для перитуморальной зоны семиномы были характерны повышенные показатели TUNEL-опосредованной гибели сперматогенных клеток. Доля клеток с выявленной фрагментацией ДНК возрастала прямо пропорционально pT-стадии. Это может объясняться как минимум двумя механизмами. Во-первых, гибелью клеток вследствие критических дистрофических и апластических изменений. Во-вторых, действием цитотоксических лимфоцитов, абсолютное количество которых повышается по сравнению с нормальным яичком. Подобная тенденция описана и при раке молочной железы: у части пациенток отмечали высокую долю TUNEL-позитивных клеток (до 76 – 100 %) в перитуморальной зоне, при этом показатель различался между подтипами (luminal A vs luminal B) [17].

По результатам нашего исследования доля TUNEL-позитивных опухолевых клеток в семиноме была крайне низкой. Это согласуется с результатами сравнительного анализа доли TUNEL-позитивных клеток в различных типах ГО, где было показано, что уровень фрагментации ДНК опухолевых клеток в семиномах ниже, чем в эмбриональной карциноме. Вместе с тем исследование данного маркера в различных опухолях представляет интерес главным образом не для оценки гибели атипичных клеток, а как индикатор эффективности CTL, вызывающих TUNEL-опосредованную гибель. Так, в одном из исследований с применением TUNEL/CD3-двойного окрашивания было показано, что почти половина TUNEL-позитивных опухолевых клеток семиномы находилась в непосредственном контакте с CD3⁺ лимфоцитами. Кроме того, число granzyme B⁺ CTL достоверно коррелировало с TUNEL-индексом. Эти данные интерпретируют как признак функционально активного цитотоксического ответа, способного инициировать апоптоз опухолевых клеток через гранзим-опосредованный путь [17].

В более глубокой интерпретации TUNEL использовали и для косвенной оценки чувствительности герминогенных опухолей к химиотерапии. Показано, что после воздействия цисплатина в герминогенных опухолях наблюдается выраженный «пик» TUNEL-опосредованной гибели. Его рассматривают как

морфологический коррелят высокой хемочувствительности герминогенных опухолей по сравнению с большинством других солидных опухолей [17].

Таким образом, полученные данные уточняют представления о низкой доле TUNEL-позитивных клеток в семиноме и об отсутствии динамики при сравнении pT-стадий. Одновременно увеличение числа TUNEL+ сперматогенных клеток в перитуморальной зоне дополняет ее гистологическую картину.

4.4. Фактор NF-κB: норма, перитуморальная зона и семинома

В регуляции сперматогенеза участвует, в частности, транскрипционный фактор NF-κB. В сустентоцитах он модулирует экспрессию андрогенного рецептора и вовлечен в сигнальные пути FSH. Тем самым NF-κB непосредственно влияет на функцию сустентоцитов и опосредованно – на созревание сперматогенных клеток. NF-κB-зависимые триггерные механизмы в сустентоцитах запускают противовоспалительные ответы при угрозе клеточной гибели и одновременно помогают поддерживать баланс иммунных клеток. В интерстициальных эндокриноцитах NF-κB может подавлять стероидогенез в ответ на провоспалительные стимулы (напр., TNF-α). Этот защитный механизм при избыточной активации сопровождается снижением выработки тестостерона [115, 136].

Отсутствие экспрессии NF-κB в опухолевых клетках семиномы указывает на неактивированный статус данного пути. Это характерно для сеиноме, поскольку им обычно не свойственна NF-κB-зависимая регуляция пролиферации и инвазии [68]. В отличие от ряда эпителиальных опухолей, где NF-κB участвует в формировании агрессивного фенотипа, семинома демонстрирует преимущественно «иммунный», а не «опухолевый» профиль экспрессии данного маркера [129].

Выявление NF-κB-позитивных клеток исключительно среди лимфоцитов и макрофагов свидетельствует об активации воспалительного компонента опухолевого микроокружения. Поскольку для сеиноме характерен выраженный

иммунный инфильтрат, полученные данные подтверждают: NF-κB-активация в данном случае отражает реакцию местного иммунитета, а не активность опухолевых клеток [79]. Увеличение численности NF-κB-позитивных клеток в перитуморальной зоне на pT2-стадии по сравнению с pT1 формирует градиент воспалительной активации, что может свидетельствовать об усилении локального иммунного ответа по мере увеличения опухолевой массы.

Минимальный уровень NF-κB-позитивных клеток в нормальном яичке дополнительно подчеркивает, что выявленная экспрессия связана именно с воспалительным инфильтратом вокруг опухоли. Таким образом, NF-κB при семиноме отражает активность иммунного микроокружения, а не опухолевых клеток, что согласуется с известными биологическими особенностями герминогенных опухолей.

4.5. Васкуляризация: норма, перитуморальная зона и семинома

Кровеносные сосуды в нормальном яичке хорошо изучены. Вместе с тем особый интерес представляет определение элементов иммунного микроокружения, прилежащих к ним, и характеристика их взаимодействия с сосудистым руслом – как для установления физиологического референса, так и для дальнейшего сравнения с перитуморальной зоной. Так, в интерстициальной ткани CD31-позитивные кровеносные сосуды определяются в межканальцевых пространствах, где расположены все присутствующие в яичке иммунные клетки, обеспечивая стабильное кровоснабжение и обмен сигнальными молекулами [23].

Выявленное незначительное увеличение плотности CD31+ кровеносных сосудов в перитуморальной зоне, вероятнее всего, связано с увеличением площади самого интерстициального межканальцевого пространства.

Исследований, в которых перитуморальную зону специально выделяли в отдельный объект анализа, немного. Так, например, при раке гортани плотность CD31+ оценивали как в самой опухоли, так и в перитуморальной зоне. Однако количественные различия между этими областями и их клиническая значимость

тракуются неоднозначно, а единый стандарт интерпретации до сих пор не разработан [59].

В семиноме прямо-пропорциональное стадии увеличение количества кровеносных сосудов было незначительным, а литературные данные ограничиваются выводами о том, что пациенты с высокой плотностью CD31 при исходно локализованной семиноме чаще имели скрытые метастазы [33]. Это подтверждает, что богатая сосудистая сеть не только улучшает снабжение опухоли кислородом и питательными веществами, но и создает потенциальные пути для миграции опухолевых клеток, облегчая их выход в лимфатические и кровеносные сосуды.

При этом в других солидных опухолях (рак предстательной железы, желудка, печени, слюнных желез) показано, что высокая плотность CD31 ассоциируется с более агрессивным течением, инвазией и повышенным риском метастазирования [38, 74, 110]. Таким образом, CD31-позитивная сосудистая сеть может рассматриваться как морфологический маркер ангиогенной активности, связанной с повышенным риском прогрессии.

Особый фундаментальный интерес вызывает изучение взаимодействия элементов иммунного микроокружения, в первую очередь степени их влияния на кровеносные сосуды, с целью определения их проангиогенного потенциала. По литературным данным проангиогенным эффектом обладают тучные клетки и ОАМ, способные также выделять проангиогенные факторы. Нами было также показано, что макрофаги и тучные клетки обладают проангиогенными свойствами, и это коррелирует с неблагоприятным прогнозом.

В целом плотность кровеносного русла, оцененная по маркеру CD31, отражает степень ангиогенеза и сосудистого ремоделирования в нормальном и опухолевом яичке. Высокая плотность CD31 во многих солидных опухолях ассоциируется с неблагоприятным прогнозом, и имеющиеся фрагментарные данные позволяют предположить аналогичную тенденцию для семиномы и других герминогенных опухолей.

4.6. Стромально-сосудистый компонент и элементы гемато-тестикулярного барьера: норма, перитуморальная зона и семинома

В нормальном яичке полученный нами иммуногистохимический паттерн CD34 и α -SMA подчеркивает сложную организацию перитубулярного и сосудистого компартментов. CD34-позитивное окрашивание выявлялось в эндотелии мелких сосудов интерстициальной ткани, а также в большинстве перитубулярных клеток, формирующих стенку извитых семенных канальцев. α -SMA образовывал сплошной слой вокруг канальцев и ярко маркировал гладкомышечный компонент стенки кровеносных сосудов, соответствуя перитубулярным миоидным клеткам. Мультиплексное CD34/ α -SMA-окрашивание показало, что часть перитубулярных клеток ко-экспрессирует оба маркера, тогда как другие остаются CD34+/ α -SMA- или CD34-/ α -SMA+, что согласуется с данными о гетерогенном «двухслойном» перитубулярном компартменте, включающем сократительные миоидные клетки и CD34+ стромальные элементы/теллоциты [90, 106, 128]. Такая конфигурация отражает сохраненный перитубулярный барьер и структурную поддержку ниши сперматогенного эпителия.

В семиномах CD34-позитивная экспрессия также демонстрировала капиллярную сеть: интенсивное мембранное окрашивание эндотелия кровеносных сосудов определялось в толще фиброзных септ и между кластерами опухолевых клеток. α -SMA дополнял эту картину, маркируя гладкие миоциты стенки кровеносных сосудов и периваскулярные/стромальные миофибробласты в волокнистых перегородках. Таким образом, сочетанное CD34/ α -SMA-иммуномечение демонстрирует капиллярно-волокнистый каркас сеиномы, в котором CD34 отражает развитую сосудистую сеть, а α -SMA – ее волокнисто-мышечный каркас, поддерживающий опухолевые кластеры. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными о нарастании CD34-определяемой микрососудистой плотностью по мере прогрессии сеиномы и роли богатой сосудистой сети в опухолевом росте [108].

В более широком контексте наши результаты укладываются в концепцию стромального ремоделирования: в нормальном яичке CD34+ перитубулярные клетки и α -SMA+ миоидные клетки сосуществуют и обеспечивают гомеостаз, тогда как в опухоли CD34-сигнал смещается преимущественно к эндотелию, а α -SMA подчеркивает реактивный фибромиоидный компонент стромы. Аналогичный сдвиг – потеря CD34+ стромальных клеток и преобладание α -SMA+ миофибробластов – описан в инвазивной строме колоректального рака и других карцином [30]. Для семинома это позволяет рассматривать CD34 и α -SMA не только как рутинные сосудистый и стромальный маркеры, но и как индикаторы степени ангиогенной и миофибробластной перестройки микроокружения в зависимости от стадии.

4.7. Лимфоциты: норма, перитуморальная зона и семинома

В нормальном яичке локальный иммунный гомеостаз выступает драйвером регуляции количественного и качественного состава иммунных элементов. При иммуногистохимическом исследовании определяются редкие CD3, CD4 и CD8 Т-лимфоциты, располагающиеся преимущественно в интерстициальной ткани, данная особенность пространственного распределения объясняется наличием гемато-тестикулярного барьера, поэтому Т-лимфоциты не контактируют с половыми клетками, а также с sustentоцитами и интерстициальными эндокриноцитами. Особый иммунный статус яичка поддерживается в основном Т-лимфоцитами – на уровне ~ 10 – 20 % от всех иммунных клеток. При этом мы отмечаем пятикратное преобладание CD8 над CD4 лимфоцитами, что согласуется с данными других авторов [56]. Функциональная роль Т-лимфоцитов в нормальном яичке заключается в готовности к активации и возможности при необходимости продуцировать TNF- α , IFN- γ и FasL. Отсюда и интерес к их регуляторному потенциалу: аналогичная толерогенная среда, которая при физиологическом сперматогенезе ослабляет активность Т-клеток (высокие уровни TGF- β , IL-10 и др.)

и биологически необходима, в опухоли она способна вызывать сходную иммуносупрессию, однако с неблагоприятным прогнозом для пациента [114].

В эту иммуногистохимическую картину органично вписываются регуляторные Т-лимфоциты (FOXP3 Treg), присутствующие по результатам нашего исследования в нормальном яичке у ~ 2 % лимфоцитов. Их мизерное количество и функциональная роль подтверждена в одном из экспериментальных исследований на крысах: Treg лимфоциты продуцируют иммуносупрессивные цитокины (например, TGF- β) и подавляют пролиферацию обычных Т-лимфоцитов, особенно аутоагрессивных к антигенам сперматогенных клеток. Таким образом, Treg лимфоциты способны поддерживать локальную иммунную толерантность: распознавая антигены созревающих сперматозоидов, выходящих из канальцев, Treg инициируют формирование системной толерантности в дренирующих лимфоузлах [54, 114]. Именно этот механизм иммунопривилегии предотвращает выработку антиспермальных антител и иммунное повреждение половых клеток, а понимание функциональной роли Treg лимфоцитов в нормальном яичке может быть ключом к пониманию их роли в перитуморальной зоне и, собственно, в семиноме.

Еще одна характерная черта иммунного ландшафта нормального яичка – практически полное отсутствие CD19 В-лимфоцитов. По данным исследований, даже при воспалении их рекрутирование в ткань яичка остается минимальным, что снижает вероятность продукции антител и ограничивает аутоагрессию [26].

При иммуногистохимическом анализе отмечено прямо пропорциональное увеличение количества CD4 и CD8 лимфоцитов в перитуморальной зоне семиномы. Это отражает функцию адаптационно-эффекторного звена иммунитета: по мере прогрессирования заболевания обе субпопуляции Т-лимфоцитов увеличиваются количественно, стремясь элиминировать или «сдержать» опухоль. Данная концепция подтверждается данными исследований при злокачественных опухолях эпителиального происхождения: при колоректальном раке выраженная лимфоидная инфильтрация на границе инвазии (так называемая «кροноподобная» реакция) ассоциирована с более благоприятным прогнозом и реже встречается при

агрессивных формах [31, 84]. Аналогично, при раке поджелудочной железы высокая плотность CD3/CD8 лимфоцитов в перитуморальной зоне коррелировала с увеличением общей выживаемости пациентов [45].

При иммуногистохимическом исследовании мы обнаружили высокую плотность CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в семиноме, то есть полная иммунная толерантность отсутствует, что частично согласуется с литературными данными [108]. В дополнение наши результаты показывают отсутствие динамики количественных изменений лимфоцитов на pT1- и pT2-стадиях: инфильтрация CD4 и CD8 Т-лимфоцитами остается стабильно высокой по мере прогрессии на ранних стадиях. Эта устойчивость сочетается с выраженной иммуногенностью атипичных клеток. В экспериментальном сравнительном исследовании F. Gayer и соавт. с использованием ко-культуры *in vitro* линии TCam-2 с лимфоцитами отмечена активация CD8 Т-лимфоцитов и секреция IL-2, IL-6, TNF- α , в несеменной опухоли (линия NTERA-2) [134]. Тем самым доказана особая способность сеиномы индуцировать миграцию и активировать Т-лимфоциты. Вероятно, такой эффект частично компенсирует известный механизм иммунного уклонения через ось FAS/FAS-L: снижение экспрессии FAS на опухолевых клетках, что уменьшает их уязвимость к FAS-опосредованной гибели, тогда как экспрессия/высвобождение FAS-L позволяет индуцировать апоптоз CD8 Т-лимфоцитов и NK-клеток [16].

Сохранность противоопухолевого потенциала Т-клеток на ранних этапах согласуется с данными анализа количества иммунных клеток при различных ГО, проведенного R. Islam и соавт.: на pT1 стадии сеиномы отмечается выраженная Т-лимфоцитарная инфильтрация, тогда как при метастатической сеиноме нарастает доля дисфункциональных фенотипов, что сопровождается снижением пула общей Т-клеточной популяции [114, 130]. Таким образом, на начальных стадиях неметастатической сеиномы преобладают эффекторные Т-клетки, которые впоследствии убывают ввиду иммунного истощения.

Важно, что качественный состав мононуклеарного инфильтрата более показателен, чем значение абсолютной плотности. По результатам нашего исследования мы не обнаружили изменений доли FOXP3 Treg между стадиями

семиномы, тогда как в литературе, описывают преобладание FOXP3 Treg в инфильтрате [108]. На этом фоне примечателен и В-клеточный компонент: мы выявили повышение уровня CD19 В-лимфоцитов с формированием третичных лимфоидных структур и признаками антиген-специфического гуморального ответа с клональной экспансией В-клеток [114]. Эти наблюдения усиливают тезис о том, что решающими являются функциональная архитектура и локализация инфильтрата, а не только его количественные характеристики.

Такой подход, в основном, согласуется с результатами транскриптомного типирования сеиномы: а) «холодное» микроокружение (наивные/Treg), б) «горячий» иммунопрофиль (высокий иммунный индекс, эффекторные Т-клетки, признаки иммунного «старения») [104]. Вероятно, ключевые изменения иммунного ландшафта происходят либо до клинических проявлений, либо уже при метастатическом процессе, когда отмечается дисбаланс между эффекторными и супрессивными клетками.

4.8. Макрофаги: норма, перитуморальная зона и сеинома

Макрофаги – это ключевые клетки иммунной системы, выполняющие три основные функции. Во-первых, они являются классическими фагоцитами, то есть поглощают и уничтожают чужеродные частицы, бактерии, вирусы, а также собственные поврежденные или отмершие клетки. Во-вторых, они играют ключевую роль в презентации антигенов, запуская и регулируя адаптивный иммунный ответ. В-третьих, макрофаги выделяют широкий спектр биологически активных веществ (цитокины, факторы роста и др.), которые регулируют воспаление, процессы восстановления тканей и иммунные реакции в организме [28].

При иммуногистохимическом анализе выявлено доминирование CD68 макрофагов на фоне единичных Т-лимфоцитов, что соответствует литературным данным: их рассматривают как ключевую популяцию иммунных клеток нормального яичка и визуализируют практически в каждом поле зрения [56, 60].

Локализация макрофагов также определяется элементами гемато-тестикулярного барьера: они располагаются в интерстициальной ткани, тесно контактируя с интерстициальными эндокриноцитами и кровеносными сосудами. При этом активированные CD163 макрофаги в нормальном яичке практически не выявляются.

Помимо количественных преобразований субпопуляций лимфоцитов в перитуморальной зоне мы также наблюдали изменения со стороны макрофагов. Так, снижение CD68 макрофагов обратно пропорционально стадии заболевания: на pT1-стадии семиномы их численность близка к уровню нормального яичка, и этого достаточно для реализации ими антиген-презентирующих и фагоцитирующих свойств и, следовательно, участия в «сдерживании» опухолевого роста. По мере прогрессирования семиномы, опухолевое микроокружение перитуморальной зоны подавляет активность CD68 макрофагов или рекрутирует их в опухоль, вероятно за счет измененной секреции хемоаттрактантов. Следует предположить, что это могут быть ранние признаки иммуносупрессивной перестройки микроокружения перитуморальной зоны семиномы. Схожий феномен описан и для других солидных опухолей: при прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы отмечали снижение числа противовоспалительных клеток Купфера вокруг опухоли при одновременном увеличении иммуносупрессивных моноцитов в кровотоке [90].

Вместе с тем CD68 макрофаги обеспечивают не только онкоиммунологическую, но и физиологическую функцию в перитуморальной зоне. Они взаимодействуют с интерстициальными эндокриноцитами и тем самым участвуют в регуляции стероидогенеза, синтезируя 25-гидроксихолестерин – стероид, служащий субстратом для выработки тестостерона. В ряде экспериментальных исследований, удаление или уменьшение числа макрофагов нарушало продукцию тестостерона и созревание интерстициальных эндокриноцитов. Кроме того, макрофаги взаимодействуют с перитубулярными миоидными клетками и поддерживают микросреду, оптимальную для сперматогенеза [56, 60].

Важно, что признаков преобладания иммуносупрессивной среды за счет усиленной поляризации CD163 макрофагами в нашем исследовании не наблюдалось. Данный результат логичнее трактовать как «перемещение» регуляторного ресурса, а не как его фенотипическую трансформацию. При семиноме это следует рассматривать как благоприятный признак, поскольку по результатам исследований других солидных опухолей высокое количество CD163 макрофагов в перитуморальной зоне способствует инвазии, выделяя протеазы и факторы ангиогенеза, а увеличение M2-макрофагов на границе опухоли коррелирует с более агрессивным ростом и худшим прогнозом [65].

Так, несеминомы часто характеризуются повышенным содержанием иммуносупрессивных миелоидных клеток – нейтрофилов и M2-макрофагов, – и это связывают с худшим прогнозом [114]. Работа I. Novak и соавт. с мультиплексным окрашиванием показала, что несеминомные ГО склонны формировать иммуносупрессивное микроокружение: у пациентов с продвинутыми стадиями выявлялись повышенные генные фокусы, связанные с нейтрофилами и M2-ориентированными макрофагами, наряду с уменьшением активности T/NK-клеток [85]. Семиномы же, напротив, демонстрировали более выраженный провоспалительный инфильтрат и активацию T-клеток [114, 134].

В опухоли количество CD68 макрофагов не различалось по стадиям, однако их фенотипический профиль смещается: возрастает доля CD163, которые концентрируются в основном в центральных участках опухоли, периваскулярно и в очагах экстрацеллюлярного ремоделирования, формируя «островки» M2-поляризации [88]. Подобную гетерогенность ОАМ в семиноме наблюдали и другие авторы: CD163 макрофаги при pT2 имеют тенденцию к увеличению в опухоли по сравнению с pT1 [141]. Функционально эти кластеры сочетаются с экспрессией TGF- β и MMP-3, что указывает на локальную иммуносупрессию и активное ремоделирование матрикса – как одно из условий, благоприятных для инвазии и выживания атипичных клеток. В некоторых опухолях высокая инфильтрация CD163 ОАМ связана с сокращением безрецидивной и/или общей выживаемости [99]. Для семином эти данные пока ограничены, однако в нашей когорте

увеличенная клеточная плотность CD163 ассоциировалась с тенденцией к рецидиву у пациентов с семиномой. Следовательно, M2-сдвиг следует учитывать, как важный компонент интегральной оценки риска наряду с отношением CD8/Treg и балансом M1/M2-подтипов.

Особый интерес в контексте иммуносупрессивного статуса микроокружения семиномы представляет увеличение численности IL-10-продуцирующих ОАМ. В литературе описана ко-экспрессия CD163 и IL-10 (CD163⁺IL-10⁺); при этом сообщается, что доля таких клеток может быть значительной среди общей популяции ОАМ [108]. Вместе с тем выполненный нами анализ пространственных взаимодействий показал, что CD163⁺ клетки существенно чаще вступают в контакт с IL-10⁺ опухолевыми клетками, чем CD68⁺ ОАМ. Полученные данные дополнительно указывают на функциональную значимость CD163⁺ опухоль-ассоциированных макрофагов как ключевого компонента IL-10-опосредованной иммуносупрессивной оси в микроокружении сеиномы (Рисунок 4.1).

4.9. Иммуносупрессивные медиаторы: норма, перитуморальная зона и семинома

По мере окончательного формирования гонады изменяется и цитокиновый профиль: нарастает TGF- β и другие медиаторы, что, с одной стороны, стабилизирует нишу сперматогенеза, а с другой – формирует гормонально-паракринный фон, на котором латентные неопластические клетки получают некий «стимул» для последующей пролиферации [114]. Эта двоякость – регулирование нормального развития гонады и потенциальное «разрешение» онкологической трансформации – подчеркивает значимость реализации защитных механизмов уже в эмбриональном периоде и в то же время указывает на уязвимость этой системы.

Морфофункциональную стабильность гемато-тестикулярного барьера поддерживают различные цитокины TNF- α , TGF- β 3 и др. Через NF- κ B они участвуют в перестройке Сертоли-Сертоливых контактов, влияя на проницаемость

и обновление барьера, а также адгезию в комплексе «Сустентоцит-сперматогенез» [67, 115].

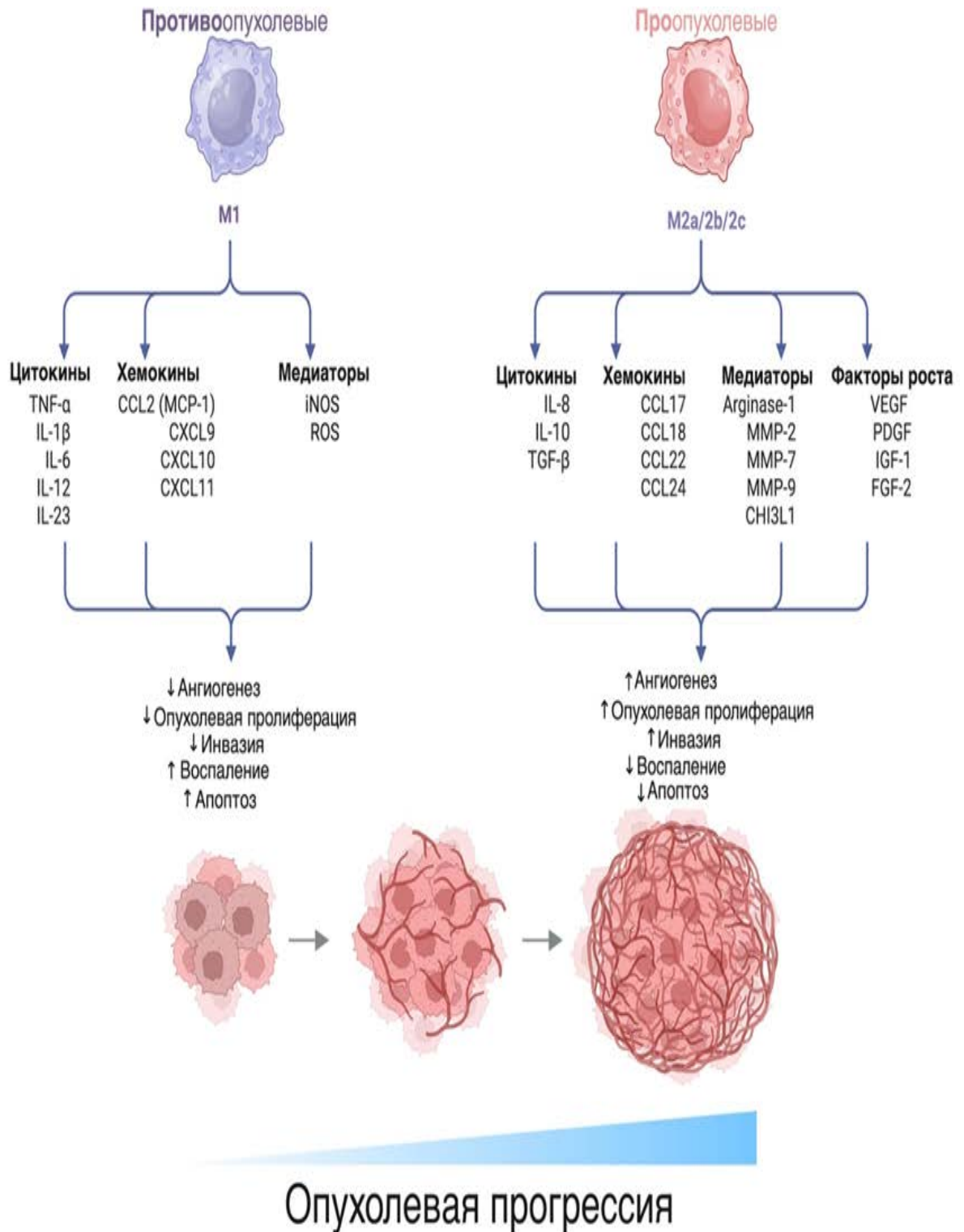


Рисунок 4.1 – Функциональная поляризация макрофагов и её влияние на прогрессирувание опухоли. На диаграмме представлены два противоположных фенотипа макрофагов – M1 и M2 (подтипы M2a/2b/2c), которые выполняют различные биологические функции в микроокружении опухоли

4.10. Тучные клетки: норма, перитуморальная зона и семинома

Тучные клетки дополняют интратестикулярный иммунный гомеостаз своей тонкой регуляцией. По данным иммунофенотипического анализа их немного, однако их локализация в интерстициальной ткани, чаще у кровеносных сосудов, соответствует данным других авторов. Триптаза, химаза и карбоксипептидаза А3 (СРА3) в гранулах секретома ТК отражают их многопрофильные эффекторные и регуляторные функции в поддержании гомеостаза, иммунных и тканевых реакций. В частности, ТК могут напрямую взаимодействовать с аутореактивными Т-лимфоцитами, что запускает дегрануляцию и выброс иммуномодуляторов [10, 56].

В норме ТК участвуют в регуляции стероидогенеза сперматогенных клеток в интестициальных эндокриноцитах, а также в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса. Показано, что их повышенная активность сопровождается снижением стероидогенеза, тогда как стабилизация улучшает некоторые параметры фертильности в моделях воспаления яичка [27]. Если же численность ТК возрастает, усиливается риск фиброзирования: триптаза стимулирует пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, что при хроническом воспалении приводит к фиброзу и склерозу канальцев [56]. В то же время те же протеазы активируют матриксные металлопротеиназы (ММП) и их ингибиторы, поддерживая равновесие ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса. В физиологических условиях этот баланс обеспечивает гистоархитектонику; при патологических состояниях, особенно в перитуморальной зоне сеиномы, регуляторный потенциал тучных клеток приобретает особую значимость (раскроем детали ниже) [103].

Отдельного внимания заслуживает роль ТК в перитуморальной зоне, где наблюдается двухфазная динамика с отчетливой функциональной органной специфичностью. На pT1-стадии все иммунофенотипические субпопуляции ТК количественно увеличиваются с тенденцией к расположению на границе с опухолью. Учитывая известную роль триптазы и химазы, можно предположить их участие в формировании волокнистой капсулы и в ангиогенезе – вероятно, с целью

ограничения роста опухоли [139]. Далее, по мере прогрессирования семиномы, отмечается снижение численности тучных клеток; вместе с этим ослабевает потенциальный «сдерживающий» эффект, ограничивающий рост и микрососудистое ремоделирование. Это наблюдение сопоставимо с данными экспериментальных работ: блокирование тучных клеток и их протеаз ослабляет противоопухолевую резистентность и способствует метастазированию меланомы у мышей [124].

Таким образом, на ранней стадии семиномы ТК могут выполнять защитную функцию, ограничивая инвазию за счет секреции противоопухолевых медиаторов и привлечения цитотоксических лимфоцитов. Вместе с тем их гранулы содержат факторы, потенциально поддерживающие опухолевый рост (например, VEGF и факторы роста фибробластов), что подчеркивает амбивалентность влияния ТК.

К стадии pT2 эта реакция подавляется опухолью: количество ТК становится заметно меньше, что может облегчить дальнейшую опухолевую инвазию. Снижение ТК означает и меньшую продукцию хемоаттрактантов для Т- и НК-клеток, а значит – ослабление иммунного надзора. В результате семинома на стадии pT2 приобретает более агрессивный фенотип, сопряженный с изменениями ТК-зависимого звена в перитуморальной зоне [8, 10, 56].

О провоспалительной роли ТК косвенно свидетельствуют их количественные изменения при различных воспалительных состояниях, когда численность ТК в яичке резко возрастает. Так, при экспериментальном аутоиммунном орхите или варикоцеле у животных ТК – инфильтрация в десятки раз превышает их значение в нормальной яичке. У мужчин с нарушенным сперматогенезом (например, при бесплодии) также отмечено увеличение доли триптаза-позитивных ТК в стенке извитых семенных канальцев; это сопровождается повреждением ткани (в частности – фиброзом) и, вероятно, связано с постоянным высвобождением секрета тучных клеток [56].

В семиноме ТК встречаются крайне редко на pT1-стадии и практически полностью исчезают на pT2-стадии [4]. Потеря ТК может сопровождаться изменениями со стороны эндотелия и факторов ангиогенеза, облегчая инвазию и

микрососудистую перестройку. Эти наблюдения согласуются с экспериментальными данными: дефицит триптазы, химазы и СРАЗ у животных усиливает метастазирование меланомы в легкое, что указывает на защитную роль этих протеаз [125]. В отдельных солидных опухолях, напротив, повышенная ТК – инфильтрация ассоциируется с противоопухолевыми эффектами [33]. В семиноме исчезновение тучных клеток можно трактовать как утрату одного из факторов противодействия прогрессии: там, где миелоидная ось переходит к ремоделированию стромы, контроль со стороны ТК ослабевает, а адаптивный иммунитет, функционирующий преимущественно по периферии, уже не способен адекватно реализовать иммунную привилегированность.

Комплексный мета-анализ 28 исследований (4224 пациента) показал, что выраженная инфильтрация триптаза-положительными ТК ассоциирована с более неблагоприятным прогнозом при солидных опухолях. Высокая плотность триптазы в ТК коррелировала со снижением общей и безрецидивной выживаемости. В стратифицированном анализе у больных с гепатоцеллюлярной карциномой обилие ТК было связано с более короткой выживаемостью, а при колоректальном раке – с меньшей 5-летней выживаемостью. Кроме того, в опухолях, содержащих большое количество ТК, чаще наблюдались метастазы в лимфатические узлы. Эти данные в целом указывают, что увеличение ТК связано с неблагоприятным прогнозом во многих агрессивных опухолях. Например, при метастазах колоректального рака в печень высокое внутритуморальное содержание Tryptase-позитивных ТК прогнозирует более высокий риск рецидива после резекции. Аналогично, при аденокарциноме поджелудочной или предстательной железы обилие Chymase/Tryptase тучных клеток сопровождается усиленным ангиогенезом и инвазивностью [33, 98].

4.11. Итог выполненной работы

Настоящее исследование было задумано как ответ на продолжающуюся дискуссию о морфологических изменениях и ключевых этапах биологии развития

человека – прежде всего гаметогенеза 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 клинической неоплазией позволяет наблюдать опухолевый рост в динамике прогрессии и увидеть, где именно нормальная траектория развития отклоняется в сторону герминальной неоплазии.

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

Ключевыми инструментами послужили гистологические, гистохимические и иммуногистохимические методы, которые при комплексном подходе позволяют, с одной стороны, отслеживать формирование и целостность межклеточных взаимодействий, а с другой – выявлять 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 опухолевых 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 сеиномы), 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.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Локальная иммунная микросреда нормального яичка представляет собой скоординированную работу пусть даже и единичных Т-клеток (преимущественно CD8) с доминирующими CD68 макрофагами, стабильной популяцией ТК и, наконец, со сперматогенными клетками, находящимися в центре внимания. Совместно эти клетки поддерживают особый иммунный статус и локальный гомеостаз, а понимание механизмов их действия и функциональной роли важно для интерпретации событий в семиноме и перитуморальной зоне.

По результатам нашего исследования перитуморальную зону сеиномы следует рассматривать как «переходную» нишу – особый морфологический и функциональный компартмент, в котором помимо выявления участков герминальной неоплазии *in situ* четко прослеживается перестройка иммунного ландшафта. Именно здесь прослеживается утрата монолитности исходной иммунопривилегии, а демаркация вокруг опухолевого узла подготавливается к сдерживанию распространения атипичных клеток. Эти изменения возникают либо вследствие нарушения дифференцировки первичных половых клеток ещё в антенатальном развитии с инициацией герминальной неоплазии на фоне гормонального всплеска в подростковом возрасте, либо, возможно, связаны с опухолевым влиянием на перитуморальную зону.

Перитуморальная зона сеиномы была рассмотрена как «переходная» часть, где еще сохраняются элементы иммунопривилегии, но уже разворачиваются эффекторные реакции: возрастает плотность CD4/CD8 лимфоцитов, модифицируется пул CD68 макрофагов без поляризации в CD163 фенотип и формируется двухфазный ответ тучных клеток. На ранних стадиях эти механизмы совместно ограничивают опухоль, однако по мере прогрессии их ресурс истощается, что сопровождается утратой контроля над ростом и инвазией.

Сопоставление перитуморальной зоны сеиномы со структурами нормального яичка позволило выявить ряд ключевых изменений, отражающих картину иммунного перитуморального ремоделирования: эффекторные Т-клетки

наращивают «наступательный порыв» и сдерживают распространение опухоли, тогда как иммунные регуляторы – макрофаги и тучные клетки – истощаются по мере прогрессирования заболевания, утрачивая способность поддерживать тканевые барьеры и механизмы локального контроля, что способствует дальнейшей прогрессии. В результате формируются условия, при которых перитуморальная зона перестает быть только сдерживающим контуром и становится «плацдармом» для опухолевой инвазии; именно поэтому ее качественный, а не количественный профиль следует рассматривать как ключ к пониманию дальнейшей траектории опухолевого процесса, а в клиническом значении данная зона может быть полезна для прогнозирования.

При сопоставлении результатов морфологического исследования с клиническими данными, вырисовывается следующая картина: распространение опухолевой инвазии (LVI и/или поражением сети яичка) сочетается с нарастанием численности CD163 макрофагов и снижением количества тучных клеток. Параллельно в группе более высокого риска чаще обнаруживается повышение β -ХГЧ – косвенный признак присутствия синцитиотрофобластических элементов и возможной иммуносупрессии со стороны этого гормона, способной смещать локальный иммунный баланс (индукция IL-10, TGF- β , рост доли Treg).

Таким образом, поддержание иммунопривилегии и целостности межклеточных коммуникаций является ключом к норме (биологии развития яичка), тогда как их срыв – ключом к опухолевому росту, то есть семиноме (патобиологии развития яичка).

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, а в сперматогенных клетках перитуморальной зоны соотношение Ki-67/TUNEL снижалось обратно-пропорционально pT-стадии. 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. 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.

4. Статистически значимых различий количества Т- и В-лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19 в зависимости от pT-стадии неметастатической семиномы не выявлено. В то время как в перитуморальной зоне зарегистрировано увеличение количества Т-лимфоцитов прямо-пропорционально pT-стадии, при полном отсутствии В-лимфоцитов. Иммуносупрессивный маркер FOXP3 не продемонстрировал статистически значимых различий в семиноме pT1- и pT2-стадий.

5. На pT2-стадии нематастатической семиномы наблюдается выраженное повышение количества CD163 макрофагов, по сравнению с pT1-стадией; количество CD68 макрофагов при этом не изменяется. В перитуморальной зоне на pT1- и pT2-стадиях и в нормальном яичке CD163 макрофаги практически отсутствуют. Количество CD68 макрофагов снижается на pT2-стадии по сравнению с pT1-стадией, 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⁺ и CD68⁺CD163⁺IL-10⁺; доля CD68⁺CD163⁺ опухоль-ассоциированных макрофагов, имеющих одну и более IL-10⁺ опухолевую клетку в радиусе пространственного соседства (25 мкм), достигает 98 % в обеих pT-стадиях. В то время как данный показатель для CD68⁺ ОАМ регистрируется в диапазоне от 47 % до 58 %. Доля пространственного взаимодействия (25 мкм) иммунных и атипичных клеток, экспрессирующих TGF- β и MMP-3 возрастает прямо-пропорционально pT-стадии, оказывая тем самым иммуносупрессивно-ремоделирующее влияние на опухолевый рост.

7. При иммуногистохимическом исследовании отмечена тенденция к увеличению плотности CD31-позитивных кровеносных сосудов в семиноме. 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 pT-стадиях; доля CD163 опухоль-ассоциированных макрофагов, расположенных в пределах 50 мкм от кровеносных сосудов, на pT2-стадии увеличивалась, достигая 70 %.

8. В нематастатической семиноме количество Tryptase-, Chymase- и CPA3-позитивных тучных клеток снижается обратно пропорционально pT-стадии. В перитуморальной зоне pT1 наблюдается их увеличение по данным экспрессии указанных маркеров в сравнении с pT2-стадией. 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

1. При патоморфологическом исследовании микропрепаратов семиномы, особенно у пациентов группы промежуточного риска рецидива, целесообразно дополнительно применять панель иммуногистохимических антител к CD68, CD163, Tryptase, Chymase и СРАЗ 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.

2. 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 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)

CPA3 – карбоксипептидаза A3 (англ. carboxypeptidase A3)

CTL – цитотоксические Т-лимфоциты (англ. cytotoxic T lymphocytes)

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (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- κ B – ядерный фактор κ B (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)

TUNEL – метод выявления фрагментации ДНК (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

α -SMA – альфа-гладкомышечный актин (англ. alpha-smooth muscle actin)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голиченков, В. А. Эмбриология: учебник для студентов университетов / В. А. Голиченков, Е. А. Иванов, Е. Н. Никерясова. — Москва: Издательский Дом «Академия», 2004. — 224 с.
2. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального β -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2023. – 266 с.
3. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / Ассоциация онкологов России. Официальный сайт. URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2022/11/zlokachestvennye-novoobrazovaniya-v-rossii-v-2021-g_zabolevaemost-i-smertnost.pdf (дата обращения: 01.12.2025)
4. Иммунофенотипическая характеристика тучных клеток в неметастатической семиноме / В. И. Щекин, А. А. Крашенинников, Д. В. Белкопытов [и др.] // Архив патологии. – 2025. – Т. 87 – № 5. – С. 46–53. – DOI: 10.17116/patol20258705146.
5. Количественная характеристика тучных клеток в семиноме / В. И. Щекин // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2024. – Т. 14 – № 2. – С. 52-57. – DOI: 10.29039/2224-6444-2024-14-2-52-57.
6. Морфологические и лабораторные факторы, ассоциированные с риском рецидива при неметастатической семиноме pT1–pT2 стадий: ретроспективный анализ / В. И. Щекин, И. Н. Заборский, К. Н. Сафиуллин [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2025. – Т. 12 – № 3. – С. 8-20. – DOI: 10.17709/2410-1893-2025-12-3-1.
7. Патент № 2851418 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ установления pT стадии неметастатической семиномы: заявл. 14.04.2025;

опубл. 24.11.2025 / Г. А. Демяшкин, И. Э. Ингель, В. И. Щекин [и др.] // Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр радиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

8. Практические рекомендации RUSSCO «Герминогенные опухоли у мужчин», часть 1.2 // Злокачественные опухоли. Офиц. сайт. URL: https://www.rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/2024/2024-1_2-11.pdf (дата обращения: 01.12.2025)

9. Предоперационный уровень половых гормонов как предиктор морфологической характеристики злокачественных новообразований яичка / Р. Ф. Холбобозода, А. А. Костин, Н. В. Воробьев [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2024. – Т. 23 – № 1. – С. 63–74. – DOI: 10.21294/1814-4861-2024-23-1-63-74.

10. Роль тучных клеток при физиологической и осложненной беременности / М. В. Шамаракова, Н. В. Низяева, И. М. Богданова [и др.] // Архив патологии. – 2023. – Т. 85 – № 3. – С. 75-81. – DOI: 10.17116/patol20238503175.

11. Сохранение фертильности у мальчиков с онкологическими заболеваниями препубертатного и пубертатного возраста / А. П. Карицкий, О. Е. Лавринович, Ю. А. Татищева [и др.] // Вопросы онкологии. – 2025. – Т. 71 – № 4. – С. 863-873.

12. Функциональные взаимодействия VAF и LEM-белков в процессах формирования половых клеток / И. О. Боголюбова, Д. С. Боголюбов // Цитология. – 2023. – Т. 65 – № 5. – С. 407-419.

13. A Coculture Model Mimicking the Tumor Microenvironment Unveils Mutual Interactions between Immune Cell Subtypes and the Human Seminoma Cell Line TCam-2 / F. A. Gayer, A. Fichtner, T. Legler [et al.] // Cells. — 2022. — Vol. 11 — № 5. — P. 885. — DOI: 10.3390/cells11050885.

14. A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast

carcinoma / M. Tavares, C. Sampaio, G. Lima [et al.] // *BMC Cancer*. — 2021. — Vol. 21 — № 1. — P. 901. — DOI: 10.1186/s12885-021-08636-4.

15. A mechanism linking Id2-TGF β crosstalk to reversible adaptive plasticity in neuroblastoma / L. Chakrabarti, B. Wang, N. Lee [et al.] // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8 — № 12. — P. e83521. — DOI: 10.1371/journal.pone.0083521.

16. ACSS2/AATF Drives Soluble FasL-Mediated CD8⁺ T Cell Apoptosis in Pancreatic Neuroendocrine Tumors / Q. Dang, T. Wang, Y. Wang [et al.] // *Advanced Science*. — 2025. — Vol. 12 — № 40. — P. e06883. — DOI: 10.1002/advs.202506883.

17. Activated status of tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis in testicular seminoma / E. Yakirevich, O. Lefel, Y. Sova [et al.] // *Journal of Pathology*. — 2002. — Vol. 196 — № 1. — P. 67–75. — DOI: 10.1002/path.996.

18. An initial study on the predictive value using multiple MRI characteristics for Ki-67 labeling index in glioma / N. Du, W. Shu, K. Li [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. — 2023. — Vol. 21 — № 1. — P. 119. — DOI: 10.1186/s12967-023-03950-w.

19. An introduction to the WHO 5th edition 2022 classification of testicular tumours / D. M. Berney, I. Cree, V. Rao [et al.] // *Histopathology*. — 2022. — Vol. 81 — № 4. — P. 459–466. — DOI: 10.1111/his.14675.

20. Analysis of the immunoexpression of opioid receptors and their correlation with markers of angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in breast cancer / A. de Sousa, T. Dantas, P. de Barros Silva [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. — 2021. — Vol. 22 — № 2. — P. 633–640. — DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.2.633.

21. Analysis of the mast cell expressed carboxypeptidase A3 and its structural and evolutionary relationship to other vertebrate carboxypeptidases / S. Akula, L. Hellman, F. Aviles [et al.] // *Developmental and Comparative Immunology*. — 2022. — Vol. 127. — P. 104273. — DOI: 10.1016/j.dci.2021.104273.

22. Angiogenesis Still Plays a Crucial Role in Human Melanoma Progression / G. Cazzato, G. Ingravallo, D. Ribatti // *Cancers*. — 2024. — Vol. 16 — № 10. — P. 1794. — DOI: 10.3390/cancers16101794.

23. Application of single-cell RNA sequencing on human testicular samples: a comprehensive review / F. Dong, P. Ping, Y. Ma [et al.] // *Int J Biol Sci.* — 2023. — Vol. 19 — № 7. — P. 2167–2197. — DOI: 10.7150/ijbs.82191.
24. Are Mast Cells MASTers in Cancer? / G. Varricchi, M. Galdiero, S. Loffredo [et al.] // *Frontiers in Immunology.* — 2017. — Vol. 8. — P. 424. — DOI: 10.3389/fimmu.2017.00424.
25. Aspirin triggers ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells through restricting NF-kappaB p65-activated SLC7A11 transcription / Y. Wang, J. Feng, L. Zhao [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* — 2023. — Vol. 44 — № 8. — P. 1712–1724. — DOI: 10.1038/s41401-023-01062-1.
26. B cells in the tumor microenvironment: Multi-faceted organizers, regulators, and effectors of anti-tumor immunity / C. Laumont, B. Nelson // *Cancer Cell.* — 2023. — Vol. 41 — № 3. — P. 466–489. — DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.017.
27. Bisphenol A-induced testicular immune dysfunction leads to suppressed steroidogenesis and excessive histamine production / Y. Park, S. Hwang, W. Pang [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* — 2025. — Vol. 303. — P. 118790. — DOI: 10.1016/j.ecoenv.2025.118790.
28. Breast Cancer Survival Outcomes and Tumor-Associated Macrophage Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. Allison, S. Edirimanne, J. Matthews [et al.] // *Oncology and Therapy.* — 2023. — Vol. 11 — № 1. — P. 27–48. — DOI: 10.1007/s40487-022-00214-3.
29. Carboxypeptidase A3—A Key Component of the Protease Phenotype of Mast Cells / D. Atiakshin, A. Kostin, I. Trotsenko [et al.] // *Cells.* — 2022. — Vol. 11 — № 3. — P. 570. — DOI: 10.3390/cells11030570.
30. CD34+ Stromal Cells/Telocytes as a Source of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast / L. Diaz-Flores, R. Gutierrez, M. Gonzalez-Gomez [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2021. — Vol. 22 — № 7. — P. 3686. — DOI: 10.3390/ijms22073686.
31. Cellular Modifications in Spermatogenesis during Seasonal Testicular Regression: An Update Review in Mammals / E. Beltran-Frutos, L. Freire-Brito, J.

Martinez-Hernandez [et al.] // *Animals*. — 2022. — Vol. 12 — № 13. — P. 1605. — DOI: 10.3390/ani12131605.

32. Chemokine Profile Is Different in Normal Testis Compared to Seminoma - Especially in Tumor Infiltrating Lymphocytes / J. Handelin, H. Teppo, K. Haapasaari [et al.] // *Anticancer Research*. — 2024. — Vol. 44 — № 11. — P. 4961–4972. — DOI: 10.21873/anticanres.17321.

33. Chymase-positive mast cells correlate with tumor angiogenesis: first report in pancreatic cancer patients / C. Laface, M. Laforgia, A. Zito [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. — 2021. — Vol. 25 — № 22. — P. 6862–6873. — DOI: 10.26355/eurrev_202111_27234.

34. Comparative analysis of tertiary lymphoid structures for predicting survival of colorectal cancer: a whole-slide images-based study / M. He, H. Ye, L. Liu [et al.] // *Precision Clinical Medicine*. — 2024. — Vol. 7 — № 4. — P. pbae030. — DOI: 10.1093/pmedi/pbae030.

35. Current and Evolving Biomarkers in the Diagnosis and Management of Testicular Germ Cell Tumors / J. Sykes, A. Kaldany, T. Jang // *Journal of Clinical Medicine*. — 2024. — Vol. 13 — № 23. — P. 7448. — DOI: 10.3390/jcm13237448.

36. Customer online shopping anxiety within the Unified Theory of Acceptance and Use Technology (UTAUT) framework / H. Celik // *Asia Pacific Journal of Marketing and Logistics*. — 2016. — Vol. 28 — № 2. — P. 278–307. — DOI: 10.1108/APJML-05-2015-0077.

37. Cyto- and Histopographic Assessment of CPA3-Positive Testicular Mast Cells in Obstructive and Non-Obstructive Azoospermia / D. Atiakshin, N. Kulchenko, A. Kostin [et al.] // *Cells*. — 2024. — Vol. 13 — № 10. — P. 833. — DOI: 10.3390/cells13100833.

38. Different predictive values of microvessel density for biochemical recurrence among different PCa populations: A systematic review and meta-analysis / J. Jiang, J. Li, X. Xiong [et al.] // *Cancer Medicine*. — 2023. — Vol. 12. — P. 2166–2178. — DOI: 10.1002/cam4.5093.

39. Dynamic polarization of tumor-associated macrophages and their interaction with intratumoral T cells in an inflamed tumor microenvironment: from mechanistic insights to therapeutic opportunities / J. Han, L. Dong, M. Wu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1160340. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1160340.
40. EAU Guidelines on Testicular Cancer (Limited Update April 2024) [Электронный ресурс] // European Association of Urology. Официальный сайт. — URL: <https://d56bochluxqnz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-Guidelines-on-Testicular-Cancer-2024.pdf> (дата обращения: 27.11.2025).
41. Effects of Leydig cell elimination on testicular interstitial cell populations: characterization by scRNA-seq and immunocytochemical techniques / F. Huang, J. Wang, H. Wang [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. — 2024. — Vol. 15. — P. 1423801. — DOI: 10.3389/fendo.2024.1423801.
42. Epigenetic reprogramming in mouse and human primordial germ cells / S. Lee, M. Surani // *Experimental & Molecular Medicine*. — 2024. — Vol. 12. — P. 2578–2587. — DOI: 10.1038/s12276-024-01359-z.
43. Epithelial-mesenchymal plasticity and cisplatin resistance in germ cell tumors: Mechanisms and emerging therapeutic strategies (Review) / E. de Brito Gomes, T. de Souza, A. Oliveira [et al.] // *International Journal of Oncology*. — 2025. — Vol. 67 — № 6. — P. 105. — DOI: 10.3892/ijo.2025.5811.
44. European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2023 guidance paper for gastroduodenal neuroendocrine tumours (NETs) G1-G3 / F. Panzuto, J. Ramage, D. Pritchard [et al.] // *Journal of Neuroendocrinology*. — 2023. — Vol. 35 — № 8. — P. e13306. — DOI: 10.1111/jne.13306.
45. Evaluation of prognostic significance of histopathological characteristics and tumor-infiltrating lymphocytes for pancreatic cancer survival / K. Corbac, M. Gurleyik, A. Gonultas [et al.] // *Sci Rep*. — 2024. — Vol. 14. — P. 27392. — DOI: 10.1038/s41598-024-79342-x.
46. Genomic landscape of adult testicular germ cell tumours in the 100,000 Genomes Project / M. Leathlobhair, A. Frangou, B. Kinnersley [et al.] // *Nature*

Communications. — 2024. — Vol. 15. — P. 9247. — DOI: 10.1038/s41467-024-53193-6.

47. Germ Cell Maintenance and Sustained Testosterone and Precursor Hormone Production in Human Prepubertal Testis Organ Culture with Tissues from Boys 7 Years+ under Conditions from Adult Testicular Tissue / N. Aden, M. Kurek, A. Reda [et al.] // *Cells*. — 2023. — Vol. 12 — № 3. — P. 415. — DOI: 10.3390/cells12030415.

48. Germ cell neoplasms of the testis: Update for 2022 / K. Iczkowski // *Seminars in Diagnostic Pathology*. — 2023. — Vol. 40 — № 1. — P. 2–21. — DOI: 10.1053/j.semmp.2022.07.001.

49. Germline stem cells in human / H. Cheng, D. Shang, R. Zhou // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2022. — Vol. 7 — № 1. — P. 345. — DOI: 10.1038/s41392-022-01197-3.

50. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche / A. Jorgensen, R. Mitchell, K. Winther [et al.] // *British Journal of Cancer*. — 2014. — Vol. 111 — № 4. — P. 598–608. — DOI: 10.1038/bjc.2014.160.

51. Human chorionic gonadotropin-positive seminoma patients: A registry compiled by the global germ cell tumor collaborative group (G3) / C. Seidel, G. Daugaard, T. Nestler [et al.] // *Eur J Cancer*. — 2020. — Vol. 132 — № 2. — P. 127–135. — DOI: 10.1016/j.ejca.2020.03.022.

52. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF- β receptor activation / S. Berndt, S. Blacher, C. Munaut [et al.] // *The FASEB Journal*. — 2013. — Vol. 27 — P. 1309–1321. — DOI: 10.1096/fj.12-213686.

53. Identification and clinical impact of potentially actionable somatic oncogenic mutations in solid tumor samples / S. Toomey, A. Carr, M. Mezynski [et al.] // *J Transl Med*. — 2020. — Vol. 18. — № 1. — P. 99. — DOI: 10.1186/s12967-020-02273-4.

54. Identification of testicular cancer immune infiltrates and novel immune cell subtypes / Z. Zhu, X. Xuan, X. Wang [et al.] // *FEBS Open Bio*. — 2023. — Vol. 13 — № 10. — P. 1967–1985. — DOI: 10.1002/2211-5463.13688.

55. IL-6/IL-10 mRNA expression ratio in tumor tissues predicts prognosis in gastric cancer patients without distant metastasis / L. Zhou, C. Tang, X. Li [et al.] // *Scientific Reports*. — 2022. — Vol. 12 — № 1. — P. 19427. — DOI: 10.1038/s41598-022-24189-3.
56. Immune Cell Subtypes and Their Function in the Testis / S. Bhushan, M. Theas, V. Guazzone [et al.] // *Front Immunol*. — 2020. — Vol. 11. — P. 583304. — DOI: 10.3389/fimmu.2020.583304.
57. Immune checkpoint inhibitors and Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cell therapy: Potential treatment options against Testicular Germ Cell Tumors / G. Schepisi, C. Gianni, M. Cursano [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1118610. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1118610.
58. Immune-related mechanisms and immunotherapy in extragonadal germ cell tumors / W. Xiu, J. Pang, Y. Hu [et al.] // *Front Immunol*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1145788. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1145788.
59. Immunohistochemical Assessment of Microvessel Density in OSCC: Spatial Heterogeneity of Angiogenesis and Its Impact on Survival / A. Mamilos, A. Lein, L. Winter [et al.] // *Biomedicines*. — 2023. — Vol. 11 — № 10. — P. 2724. — DOI: 10.3390/biomedicines11102724.
60. Immunoregulation in the testis and its implication in fertility and infections / K. Khambata, D. Modi, S. Gupta // *Explor Immunol*. — 2021. — Vol. 1. — P. 309–324. — DOI: 10.37349/ei.2021.00021.
61. Immunoscore Combining CD8, FoxP3, and CD68-Positive Cells Density and Distribution Predicts the Prognosis of Head and Neck Cancer Patients / S. Furgiuele, G. Descamps, J. Lechien [et al.] // *Cells*. — 2022. — Vol. 11 — № 13. — P. 2050. — DOI: 10.3390/cells11132050.
62. Immunosuppressive tumor-associated macrophages expressing interleukin-10 conferred poor prognosis and therapeutic vulnerability in patients with muscle-invasive bladder cancer / Y. Xu, H. Zeng, K. Jin [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2022. — Vol. 10 — № 3. — P. e003416. — DOI: 10.1136/jitc-2021-003416.

63. Integrating Tumor Intraepithelial CD8⁺ and Stromal FOXP3⁺ T-Cell Densities as an Enhanced Immune Prognostic Index in Colorectal Cancer / A. Tuomisto, P. Sirnio, H. Elomaa [et al.] // *Laboratory Investigation*. — 2025. — Vol. 105 — № 11. — P. 104213. — DOI: 10.1016/j.labinv.2025.104213.

64. Interleukin-17A derived from mast cells contributes to fibrosis in gastric cancer with peritoneal dissemination / K. Gunjigake, J. Kinoshita, T. Yamaguchi [et al.] // *Gastric Cancer*. — 2021. — Vol. 24 — № 1. — P. 31–44. — DOI: 10.1007/s10120-020-01092-2.

65. Invasive margin tissue-resident macrophages of high CD163 expression impede responses to T cell-based immunotherapy / M. van Elsas, C. Labrie, A. Etzerodt [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2023. — Vol. 11 — № 3. — P. e006433. — DOI: 10.1136/jitc-2022-006433.

66. Ki67 and LSD1 Expression in Testicular Germ Cell Tumors Is Not Associated with Patient Outcome: Investigation Using a Digital Pathology Algorithm / B. C. Lourenco, C. Guimaraes-Teixeira, B. C. T. Flores [et al.] // *Life*. — 2022. — Vol. 12 — № 2. — P. 264. — DOI: 10.3390/life12020264.

67. Long-Term Maintenance of Viable Adult Rat Sertoli Cells Able to Establish Testis Barrier Components and Function in Response to Androgens / H. Kabbesh, M. Riaz, A. Jensen [et al.] // *Cells*. — 2021. — Vol. 10 — № 9. — P. 2405. — DOI: 10.3390/cells10092405.

68. Loss of miR-514a-3p regulation of PEG3 activates the NF-kappa B pathway in human testicular germ cell tumors / D. Ozata, X. Li, L. Lee [et al.] // *Cell Death & Disease*. — 2017. — Vol. 8. — P. e2759. — DOI: 10.1038/cddis.2016.464.

69. Lung Mast Cells Have a High Constitutive Expression of Carboxypeptidase A3 mRNA That Is Independent from Granule-Stored CPA3 / P. Siddhuraj, C. Clausson, C. Sanden [et al.] // *Cells*. — 2021. — Vol. 10 — № 2. — P. 309. — DOI: 10.3390/cells10020309.

70. Mast cell chymase regulates extracellular matrix remodeling-related events in primary human small airway epithelial cells / X. Zhao, C. Sommerhoff, A. Paivandy

[et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. — 2022. — Vol. 150 — № 6. — P. 1534–1544. — DOI: 10.1016/j.jaci.2022.05.028.

71. Mast Cells as a Component of Spermatogonial Stem Cells' Microenvironment / A. Sadek, Y. Khrantsova, B. Yushkov // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — Vol. 25 — № 23. — P. 13177. — DOI: 10.3390/ijms252313177.

72. Mast Cells as a Target – A Comprehensive Review of Recent Therapeutic Approaches / J. Baran, A. Sobiepanek, A. Mazurkiewicz-Pisarek [et al.] // *Cells*. — 2023. — Vol. 12 — № 8. — P. 1187. — DOI: 10.3390/cells12081187.

73. Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets / F. Siebenhaar, F. A. Redegeld, S. C. Bischoff [et al.] // *Trends in Immunology*. — 2018. — Vol. 39 — № 2. — P. 151–162. — DOI: 10.1016/j.it.2017.10.005.

74. Mast cells in colorectal cancer tumour progression, angiogenesis, and lymphangiogenesis / X. Liu, X. Li, H. Wei [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1209056. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1209056.

75. Mast cells: key players in digestive system tumors and their interactions with immune cells / F. Shu, J. Yu, Y. Liu [et al.] // *Cell Death Discovery*. — 2025. — Vol. 11 — № 1. — P. 8. — DOI: 10.1038/s41420-024-02258-y.

76. Molecular Characterization of Seminoma Utilizing the AACR Project GENIE: A Retrospective Observational Study / S. Geeredy, A. Chang, A. Gallegos [et al.] // *Cancers*. — 2025. — Vol. 17. — № 20. — P. 3363. — DOI: 10.3390/cancers17203363.

77. Molecular Features and Actionable Gene Targets of Testicular Germ Cell Tumors in a Real-World Setting / R. Morales-Grimany, K. Giannikou, C. Delgado [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2025. — Vol. 26. — № 18. — P. 8963. — DOI: 10.3390/ijms26188963

78. mRNA vaccines in the context of cancer treatment: from concept to application / Q. Fu, X. Zhao, J. Hu [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. — 2025. — Vol. 23. — P. 12. — DOI: 10.1186/s12967-024-06033-6.

79. NF- κ B in inflammation and cancer / H. Mao, X. Zhao, S. Sun // *Cellular & Molecular Immunology*. — 2025. — Vol. 22. — P. 811–839. — DOI: 10.1038/s41423-025-01310-w.
80. On the origin of germ cell neoplasia in situ: Dedifferentiation of human adult Sertoli cells in cross talk with seminoma cells in vitro / C. Fink, N. Baal, J. Wilhelm [et al.] // *Neoplasia*. — 2021. — Vol. 23 — № 7. — P. 731–742. — DOI: 10.1016/j.neo.2021.05.008.
81. Pancreatic cancer-associated fibroblasts modulate macrophage differentiation via sialic acid-Siglec interactions / K. Boelaars, E. Rodriguez, Z. Huinen [et al.] // *Communications Biology*. — 2024. — Vol. 7 — № 1. — P. 430. — DOI: 10.1038/s42003-024-06087-8.
82. PAR-2 promotes cell proliferation, migration, and invasion through activating PI3K/AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma / K. L. Tang, H. Y. Tang, Y. Du [et al.] // *Biosci Rep*. — 2019. — Vol. 39 — № 7. — P. BSR20182476. — DOI: 10.1042/BSR20182476. — Retraction in: *Biosci Rep*. — 2024. — Vol. 44 — № 7. — P. BSR-2018-2476_RET. — DOI: 10.1042/BSR-2018-2476_RET.
83. Pathogenesis and pathobiology of testicular germ cell tumours: a view from a developmental biological perspective with guidelines for pathological diagnostics / A. Fichtner, D. Nettersheim, F. Bremmer // *Histopathology*. — 2024. — Vol. 85. — № 5. — P. 701–715. — DOI: 10.1111/his.15249.
84. Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP) expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,381 tumors / V. Reiswich, N. Gorbokon, A. Luebke [et al.] // *The Journal of Pathology: Clinical Research*. — 2021. — Vol. 7 — № 6. — P. 577–589. — DOI: 10.1002/cjp2.237.
85. PD-L1 expression in testicular germ cell tumors undergoing spontaneous regression / I. Novak, M. Tomic, D. Mulabdic [et al.] // *Biomolecules and Biomedicine*. — 2024. — Vol. 24 — № 6. — P. 1751–1760. — DOI: 10.17305/bb.2024.10745.
86. PD-L1(+) tumor-associated macrophages induce CD8(+) T Cell exhaustion in hepatocellular carcinoma / T. Nosaka, M. Ohtani, J. Yamashita [et al.] // *Neoplasia*. — 2025. — Vol. 69. — P. 101234. — DOI: 10.1016/j.neo.2025.101234.

87. Peritumoral tertiary lymphoid structure and tumor stroma percentage predict the prognosis of patients with non-metastatic colorectal cancer / Q. Wang, X. Shen, R. An [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — P. 962056. — DOI: 10.3389/fimmu.2022.962056.
88. Phenotypic and Spatial Characterization of Tumor-Associated Macrophages in Non-Metastatic Seminoma: Association with Local Tumor Progression / G. Demyashkin, V. Shchekin, D. Belokopytov [et al.] // *Med Sci (Basel)*. — 2025. — Vol. 13 — № 3. — P. 129. — DOI: 10.3390/medsci13030129.
89. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67 / N. Andres-Sanchez, D. Fisher, L. Krasinska // *Journal of Cell Science*. — 2022. — Vol. 135 — № 11. — P. jcs258932. — DOI: 10.1242/jcs.258932.
90. Poor Clinical Outcomes and Immuno-evasive Contexture in Intratumoral IL-10-Producing Macrophages Enriched Gastric Cancer Patients / H. Zhang, R. Li, Y. Cao [et al.] // *Annals of Surgery*. — 2022. — Vol. 275 — № 4. — P. e626–e635. — DOI: 10.1097/SLA.0000000000004037.
91. Potential therapeutic targets in the prevention of testicular ischemia-reperfusion injury / R. Ajike, A. Ajayi, O. Oyekunle [et al.] // *Frontiers in Reproductive Health*. — 2025. — Vol. 7. — P. 1706914. — DOI: 10.3389/frph.2025.1706914.
92. Prediction of relapse in stage I testicular germ cell tumor patients on surveillance: investigation of biomarkers / J. Lobo, A. Gillis, A. van den Berg [et al.] // *BMC Cancer*. — 2020. — Vol. 20 — № 1. — P. 728. — DOI: 10.1186/s12885-020-07220-6.
93. Presence/Absence and Specific Location of Resident CD34+ Stromal Cells/Telocytes in Adult and Developing Organs: A Systematic Review / L. Diaz-Flores, R. Gutierrez, M. Garcia [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2020. — Vol. 8. — P. 544845. — DOI: 10.3389/fcell.2020.544845.
94. Prognostic Factors for Relapse in Patients With Clinical Stage I Testicular Seminoma: A Nationwide, Population-Based Cohort Study / T. Wagner, B. G. Toft, J. Lauritsen [et al.] // *J Clin Oncol*. — 2024. — Vol. 42 — № 1. — P. 81–89. — DOI: 10.1200/JCO.23.00959.

95. Prognostic impact of stromal and intratumoral CD3, CD8 and FOXP3 in adjuvantly treated breast cancer: do they add information over stromal tumor-infiltrating lymphocyte density? / T. Koletsa, V. Kotoula, G. Koliou [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. — 2020. — Vol. 69. — P. 1549–1564. — DOI: 10.1007/s00262-020-02557-0.
96. Prognostic Role of CD68+ and CD163+ Tumour-Associated Macrophages and PD-L1 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis / M. H. Chohan, M. Perry, P. Laurance-Young [et al.] // *Br J Biomed Sci*. — 2023. — Vol. 80. — P. 11065. — DOI: 10.3389/bjbs.2023.11065.
97. Prognostic significance of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in operable breast cancer: a meta-analysis / R. Niu, C. Wang, Y. Xie [et al.] // *BMC Cancer*. — 2025. — Vol. 25. — P. 601. — DOI: 10.1186/s12885-025-13912-8.
98. Prognostic significance of mast cells and vascular density in prostatic adenocarcinoma / B. Das, S. Mendonca // *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. — 2022. — Vol. 65 — № 4. — P. 828–831. — DOI: 10.4103/ijpm.ijpm_93_21.
99. Prognostic value of CD163+ macrophages in solid tumor malignancies: A scoping review / H. Mathiesen, K. Juul-Madsen, T. Tramm [et al.] // *Immunology Letters*. — 2025. — Vol. 272. — P. 106970. — DOI: 10.1016/j.imlet.2025.106970.
100. Protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against methotrexate-induced testicular damage / O. Delen, Y. Uz // *Human & Experimental Toxicology*. — 2021. — Vol. 40. — P. S164–S177. — DOI: 10.1177/09603271211035674.
101. RAS/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Testicular Germ Cell Tumors / A. Onorato, E. Guida, A. Colopi [et al.] // *Life (Basel)*. — 2024. — Vol. 14. — № 3. — P. 327. — DOI: 10.3390/life14030327.
102. Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers: IV: Current and Future Utilization of Molecular-Genetic Tests for Testicular Germ Cell Tumors / L. Looijenga, T. van der Kwast, D. Grignon [et al.] // *Am J Surg Pathol*. — 2020. — Vol. 44. — № 7. — P. e66-e79. — DOI: 10.1097/PAS.0000000000001465.

103. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment / D. Komi, F. Redegeld // *Clin Rev Allergy Immunol.* — 2020. — Vol. 58 — № 3. — P. 313–325. — DOI: 10.1007/s12016-019-08753-w.
104. Seminoma subtypes differ in the organization and functional state of the immune microenvironment / A. Savelyeva, K. Medvedev // *3 Biotech.* — 2023. — Vol. 13 — № 3. — P. 110. — DOI: 10.1007/s13205-023-03530-1.
105. Sertoli Cell Immune Regulation: A Double-Edged Sword / R. Washburn, T. Hibler, G. Kaur [et al.] // *Frontiers in Immunology.* — 2022. — Vol. 13. — P. 913502. — DOI: 10.3389/fimmu.2022.913502.
106. Serum tumour markers in germ cell tumours: From diagnosis to cure / P. Pedrazzoli, G. Rosti, E. Soresini [et al.] // *Critical Reviews in Oncology and Hematology.* — 2021. — Vol. 159. — P. 103230. — DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103224.
107. Serum Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours: Frequencies of Elevated Levels and Extents of Marker Elevation Are Significantly Associated with Clinical Parameters and with Response to Treatment / K. Dieckmann, H. Simonsen-Richter, M. Kulejewski [et al.] // *Biomed Res Int.* — 2019. — P. 5030349. — DOI: 10.1155/2019/5030349.
108. Single-cell multi-omics analysis of human testicular germ cell tumor reveals its molecular features and microenvironment / X. Lu, Y. Luo, X. Nie [et al.] // *Nature Communications.* — 2023. — DOI: 10.1038/s41467-023-44305-9.
109. Single-cell transcriptomic atlas of the human testis across the reproductive lifespan / L. Cui, X. Nie, Y. Guo [et al.] // *Nature Aging.* — 2025. — Vol. 5 — № 4. — P. 658–674. — DOI: 10.1038/s43587-025-00824-2.
110. SMOC2 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer involving Wnt/beta-catenin pathway modulation and inducing angiogenesis / C. Li, L. Yin, D. Zhao [et al.] // *Clinical and Experimental Medicine.* — 2025. — Vol. 25 — № 1. — P. 372. — DOI: 10.1007/s10238-025-01914-6.
111. Specific immune cell and cytokine characteristics of human testicular germ cell neoplasia / B. Klein, T. Haggene, D. Fietz [et al.] // *Human Reproduction.* — 2016. — Vol. 31 — № 10. — P. 2192–2202. — DOI: 10.1093/humrep/dew211.

112. St. Gallen/Vienna 2021: A Brief Summary of the Consensus Discussion on Customizing Therapies for Women with Early Breast Cancer / C. Thomssen, M. Balic, N. Harbeck [et al.] // *Breast Care*. — 2021. — Vol. 16 — № 2. — P. 135–143. — DOI: 10.1159/000516114.

113. Stromal cells in normal colon and colon cancers: importance of thyroid hormone signaling / M. Reslinger, M. Plateroti // *Cell Death & Disease*. — 2025. — Vol. 16 — № 1. — P. 699. — DOI: 10.1038/s41419-025-08005-0.

114. T cells in testicular germ cell tumors: new evidence of fundamental contributions by rare subsets / R. Islam, J. Heyer, M. Figura [et al.] // *Br J Cancer*. — 2024. — Vol. 130. — P. 1893–1903. — DOI: 10.1038/s41416-024-02669-9.

115. T Lymphocytes and Testicular Immunity: A New Insight into Immune Regulation in Testes / J. Gong, Q. Zeng, D. Yu [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2020. — Vol. 22 — № 1. — P. 57. — DOI: 10.3390/ijms22010057.

116. Telocytes in Fibrosis Diseases: From Current Findings to Future Clinical Perspectives / X. Wei, T. Chen, X. Yang // *Cell Transplant*. — 2022. — Vol. 24. — P. 741–754. — DOI: 10.1177/09636897221105252.

117. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects / N. Skakkebaek, E. Rajpert-De Meyts, K. Main // *Human Reproduction*. — 2001. — Vol. 16. — № 5. — P. 972–978. — DOI: 10.1093/humrep/16.5.972.

118. Testicular germ cells tumors in adolescents and young adults: Management and outcomes from a single-center experience / C. Spinelli, G. Cito, G. Morelli [et al.] // *Arch Ital Urol Androl*. — 2021. — Vol. 93. — № 3. — P. 301–306. — DOI: 10.4081/aiua.2021.3.301.

119. Tests for Testicular Cancer [Электронный ресурс] // American Cancer Society. Официальный сайт. — URL: <https://www.cancer.org/cancer/types/testicular-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html> (дата обращения: 27.11.2025).

120. TGF-beta Family in Glioblastoma / I. Golan-Cancela, L. Caja // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — Vol. 25 — № 2. — P. 1067. — DOI: 10.3390/ijms25021067.

121. TGF- β as Predictive Marker and Pharmacological Target in Lung Cancer / V. Ramundo, L. Fucci, Y. Aftabi [et al.] // *Cancers (Basel)*. — 2023. — Vol. 15 — № 8. — P. 2295. — DOI: 10.3390/cancers15082295.

122. TGF- β induces cholesterol accumulation to regulate the secretion of tumor-derived extracellular vesicles / D. Rodrigues-Junior, C. Tsirigoti, K. Psatha [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. — 2025. — Vol. 44. — P. 42. — DOI: 10.1186/s13046-025-03291-0.

123. TGF- β signaling pathway: Therapeutic targeting and potential for anti-cancer immunity / S. Ali, M. U. Rehman, A. Yattoo [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. — 2023. — Vol. 947. — P. 175678. — DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175678.

124. TGF- β signaling: critical nexus of fibrogenesis and cancer / A. Giarratana, C. Prendergast, M. Salvatore [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. — 2024. — Vol. 22. — P. 594. — DOI: 10.1186/s12967-024-05411-4.

125. The combined action of mast cell chymase, tryptase and carboxypeptidase A3 protects against melanoma colonization of the lung / M. Grujic, A. Paivandy, A. Gustafson [et al.] // *Oncotarget*. — 2017. — Vol. 8. — № 15. — P. 25066–25079. — DOI: 10.18632/oncotarget.15339.

126. The detection of isochromosome i(12p) in malignant germ cell tumours and tumours with somatic malignant transformation by the use of quantitative real-time polymerase chain reaction / A. Fichtner, J. Richter, A. Hirschmann [et al.] // *Histopathology*. — 2021. — Vol. 79. — № 4. — P. 593–605. — DOI: 10.1111/his.14258.

127. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges / C. Loh, J. Chai, T. Tang [et al.] // *Cells*. — 2019. — Vol. 8 — № 10. — P. 1118. — DOI: 10.3390/cells8101118.

128. The fate of germ cells in cryptorchid testis / J. Thorup, S. Hildorf, A. Hildorf [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. — 2024. — Vol. 14. — P. 1305428. — DOI: 10.3389/fendo.2023.1305428.

129. The heat of the battle: inflammation's role in prostate cancer development and inflammation-targeted therapies / U. Sharma, A. Sahu, H. Shekhar [et al.] // *Discover*

Oncology. — 2025. — Vol. 16 — № 1. — P. 108. — DOI: 10.1007/s12672-025-01829-4.

130. The Immune Landscape and Immunotherapeutic Strategies in Platinum-Refractory Testicular Germ Cell Tumors / K. Evmorfopoulos, K. Marsitopoulos, R. Karachalios [et al.] // *Cancers*. — 2024. — Vol. 16 — № 2. — P. 428. — DOI: 10.3390/cancers16020428.

131. The Molecular Signature of Human Testicular Peritubular Cells Revealed by Single-Cell Analysis / A. Liebich, N. Schmid, C. Koupourtidou [et al.] // *Cells*. — 2022. — Vol. 11 — № 22. — P. 3685. — DOI: 10.3390/cells11223685.

132. The prognostic and predictive role of tumor-infiltrating lymphocytes (FoxP3+ and CD8+) and tumor-associated macrophages in early HER2+ breast cancer / M. Jaaskelainen, S. Tiainen, H. Siiskonen [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. — 2023. — Vol. 201 — № 2. — P. 183–192. — DOI: 10.1007/s10549-023-07017-8.

133. The Prognostic Value of FoxP3+ Tumour-Infiltrating Lymphocytes in Rectal Cancer Depends on Immune Phenotypes Defined by CD8+ Cytotoxic T Cell Density / S. Schnellhardt, J. Hirneth, M. Buttner-Herold [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — P. 781222. — DOI: 10.3389/fimmu.2022.781222.

134. The Subtype Identity of Testicular Cancer Cells Determines Their Immunostimulatory Activity in a Coculture Model / F. Gayer, M. Henkel, J. Luft [et al.] // *Cancers (Basel)*. — 2023. — Vol. 15 — № 9. — P. 2619. — DOI: 10.3390/cancers15092619.

135. The vascular landscape of human cancer / B. Kahn, A. Lucas, R. Alur [et al.] // *J Clin Invest*. — 2021. — Vol. 131 — № 2. — P. e136655. — DOI: 10.1172/JCI136655.

136. Transcription factor *Dmrt1* triggers the SPRY1-NF-kappaB pathway to maintain testicular immune homeostasis and male fertility / M. Zhang, S. Wan, W. Chen [et al.] // *Zoological Research*. — 2023. — Vol. 44 — № 3. — P. 505–521. — DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.440.

137. Transcriptional regulation of FasL expression and participation of sTNF- α in response to Sertoli cell injury / P. Yao, Y. Lin, P. Sawhney [et al.] // *J Biol Chem.* — 2007. — Vol. 282 — № 8. — P. 5420–5431. — DOI: 10.1074/jbc.M609068200.

138. Transcriptome analysis reveals upregulation of immune response pathways at the invasive tumour front of metastatic seminoma germ cell tumours / T. Nestler, P. Dalvi, F. Haidl [et al.] // *British Journal of Cancer.* — 2022. — Vol. 126. — P. 937–947. — DOI: 10.1038/s41416-021-01621-5.

139. Tryptase and tumor angiogenesis / D. Ribatti // *Front Oncol.* — 2024. — Vol. 14. — P. 1500482. — DOI: 10.3389/fonc.2024.1500482.

140. Tumor-associated macrophages and PD-L1 in prostate cancer: a possible key to unlocking immunotherapy efficacy / J. Wang, W. Wu, T. Yuan [et al.] // *Aging (Albany NY).* — 2024. — Vol. 16. — P. 445–465. — DOI: 10.18632/aging.205378.

141. Tumor-Associated Macrophages in Bladder Cancer / M. Leblond // *Cancers (Basel).* — 2021. — Vol. 13 — № 18. — P. 4712. — DOI: 10.3390/cancers13184712.

142. Unveiling the roles of Sertoli cells lineage differentiation in reproductive development and disorders: a review / Y. Gao, Z. Wang, Y. Long [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* — 2024. — Vol. 15. — P. 1357594. — DOI: 10.3389/fendo.2024.1357594.

143. Update on Mast Cell Proteases as Drug Targets / G. Caughey // *Immunology and Allergy Clinics of North America.* — 2023. — Vol. 43 — № 4. — P. 777–787. — DOI: 10.1016/j.iac.2023.04.006

144. Utility of CD34 in Assessing Microvessel Density and Its Correlation With Clinicopathological Parameters in Colorectal Carcinoma Patients / S. Pandey, S. Shukla, S. Vagha // *Cureus.* — 2023. — Vol. 15 — № 11. — P. e49186. — DOI: 10.7759/cureus.49186.

145. VCAM1- α 4 β 1 integrin interaction mediates interstitial tissue reconstruction in 3-D re-aggregate culture of dissociated prepubertal mouse testicular cells / K. Abe, S. Kon, H. Kameyama [et al.] // *Scientific Reports.* — 2021. — Vol. 11 — № 1. — P. 18332. — DOI: 10.1038/s41598-021-97729-y.

146. What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology / J. Luaces, N. Toro-Urrego, M. Otero-Losada [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* — 2023. — Vol. 11. — P. 1114769. — DOI: 10.3389/fcell.2023.1114769.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2851418

СПОСОБ УСТАНОВЛЕНИЯ pT СТАДИИ
НЕМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ СЕМИНОМЫ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр радиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *Демяшкин Григорий Александрович (RU), Ингель Ирина Эдуардовна (RU), Щекин Владимир Иванович (RU), Белокопытов Дмитрий Вячеславович (RU), Шегай Пётр Викторович (RU), Каприн Андрей Дмитриевич (RU)*

Заявка № 2025109273

Приоритет изобретения 14 апреля 2025 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 24 ноября 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 14 апреля 2045 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 00a570e417aad9d531b4b8818e75f29506
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 04.09.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов

