На правах рукописи

Силаков Кирилл Александрович

ЗНАЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ НЕМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

1.5.23. – Биология развития, эмбриология

3.3.2. – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Научные руководители:
Атякшин Дмитрий Андреевич, доктор медицинских наук
Демяшкин Григорий Александрович, доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:
Затолокина Мария Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Катунина Оксана Рахимовна, доктор медицинских наук, доцент, главный научный сотрудник отдела научно-прикладных методов исследования государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы»
Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 2105.001 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиотечном центре и на сайте ФГАОУ ВО «РУДН имени Патриса Лумумбы» (г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; URL: https://www.rudn.ru/science/dissovet).

Автореферат разослан « ___ »_____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 2105.001
кандидат медицинских наук **Люндуп Алексей Валерьевич**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Меланома кожи – одно из наиболее агрессивных злокачественных новообразований человека. Несмотря на то что на долю меланомы приходится лишь порядка 4 – 5% всех злокачественных новообразований кожи, она выступает причиной почти 80% летальных исходов от данной группы патологий [Каприн А.Д. и соавт., 2024]. Заболевание характеризуется вариабельностью эффективности лечения и резким снижением пятилетней выживаемости при прогрессировании процесса – с 95 – 96% на 0 и I стадиях до 70 – 80% на II стадии [Zheng L. et al., 2023]. В контексте биологии развития источник данной патологии восходит к онтогенетическим процессам: в начале на 4–5-й неделе эмбриогенеза происходит миграция клеток нервного гребня в закладку кожи и производные эпидермиса, которые вначале дифференцируются в меланобласты, а затем в меланоциты. Синтез меланина (пигментация) начинается на уже 8–12-й неделе пренатального онтогенеза, однако полная функциональная активность меланоцитов достигается в постнатальном периоде под влиянием ультрафиолетового излучения (УФ-излучения) и других внешних факторов [Guermazi D. et al., 2025]. Последующая злокачественная трансформация меланоцитов (меланомогенез) связана с нарушением регуляции внутриклеточных сигнальных путей в этиологически поврежденных клетках (включая драйверные мутации в генах *BRAF, NRAS, KIT*) под влиянием УФ-излучения и сопутствующей утратой контроля над клеточным циклом [Мазуренко Н.Н. и соавт., 2017; Guermazi D., Saliba E., 2025].

При злокачественной трансформации меланоцитов ключевую роль в опухолевом росте и реализации инвазивного потенциала, а также эффективности иммунного надзора играет клеточный состав тканевого микроокружения. Значение количественных параметров и пространственного распределения опухоль-инфильтрирующих цитотоксических Т-лимфоцитов, опухоль-ассоциированных макрофагов и тучных клеток доказано для ряда солидных новообразований [Alvares-Vilela M. M. et al., 2026; Larionova I. et al., 2020]. Однако при меланоме кожи имеющиеся данные о количественных, фенотипических и пространственных характеристиках данных популяций клеток остаются единичными, фрагментарными и противоречивыми.

Комплексный анализ данных клеточных популяций обусловлен их фундаментальной ролью в поддержании локального гомеостаза: $CD8^+$-Т-лимфоциты выступают в качестве ключевых эффекторов противоопухолевого ответа и служат предиктивными маркерами эффективности современной иммунотерапии. [Komuro H. et al., 2023; Blanc-Durand F. et al., 2023;

Yang A. et al., 2025]; $CD68^+$-макрофаги составляют основу миелоидного инфильтрата и отражают общую интенсивность моноцитарно-макрофагальной реакции тканевого микроокружения [Li M. et al., 2023; Gunassekaran G.R. et al., 2021]; а триптаза-позитивные тучные клетки выступают в качестве полифункциональных регуляторных элементов, способных не только динамически перестраивать стромальный компонент, но и модулировать ангиогенез, а также непосредственно программировать локальный иммуносупрессивный или проопухолевый вектор микроокружения [Атякшин Д.А. и соавт., 2017; Aponte-López A., Muñoz-Cruz S., 2020; Komi D. E. A., Redegeld F. A., 2020].

Отсутствие системных данных о корреляции параметров указанных популяций клеток со стадией неметастатической меланомы кожи, а также об их пространственном взаимодействии в опухолевом микроокружении обусловливает необходимость проведения дальнейших исследований. Такой анализ позволит выявить новые количественные и пространственные особенности микроокружения, отражающие опухолевую прогрессию на ранних стадиях заболевания, и расширить существующие морфологические критерии его прогноза.

Степень разработанности темы исследования

В многочисленных современных исследованиях наличие и пространственное распределение опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток рассматриваются как ключевые факторы, непосредственно определяющие траекторию опухолевого роста и метастатический потенциал меланомы кожи [Ridolfi L. et al., 2003; Falleni M. et al., 2017; Rajabi P. et al., 2017; Benito-Martin A. et al., 2023]. Особый интерес представляет эволюция взглядов на данный клеточный ландшафт: сегодня оценка иммунного инфильтрата перешла от сугубо прогностического описания к его активному использованию в качестве предиктивного маркера для персонализированных терапевтических подходов [Bida M. et al., 2024]. С другой стороны, значительная часть опубликованных работ носит изолированный характер и посвящена изучению лишь отдельных популяций клеток вне их функционального взаимодействия. Кроме того, в литературе по-прежнему сохраняется дефицит комплексных данных, детально сопоставляющих количественные характеристики плотности расположения и топографические особенности распределения лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток непосредственно в интра- и перитуморальном компартментах на начальных этапах опухолевой прогрессии (I и II стадии по AJCC). В этом контексте одновременный многокомпонентный анализ указанных субпопуляций позволяет получить целостное представление о характере локальной иммунной перестройки и выявить новые закономерности, определяющие траекторию раннего метастазирования меланомы кожи. Выбор $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток для анализа взаимодействия с атипичными меланоцитами

обусловлен их ключевой ролью в формировании опухолевого микроокружения. Цитотоксические $CD8^+$-Т-лимфоциты выступают главными эффекторами адаптивного противоопухолевого ответа, тогда как $CD68^+$-макрофаги отражают адаптационную перестройку воспалительного инфильтрата. Оценка тучных клеток по экспрессии триптазы позволяет не только надежно идентифицировать их фенотип, но и охарактеризовать уровень секреции ключевой сериновой протеазы, участвующей в ремоделировании стромы и ангиогенезе. При этом в современной литературе практически отсутствуют данные о пространственном и контактном взаимодействии этих популяций с опухолевыми клетками при меланоме кожи.

Таким образом, накопленный к настоящему времени массив научных данных о биологии опухоль-ассоциированных популяций $CD8^+$-Т-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток при неметастатической меланоме кожи открывает широкие перспективы для дальнейшего уточнения механизмов их межклеточного взаимодействия в патогенезе заболевания. В связи с этим проведение комплексной морфологической оценки клеточного состава микроокружения на ранних стадиях опухолевого процесса представляется своевременным шагом, позволяющим детализировать существующие представления о закономерностях прогрессирования меланомы кожи.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – установить закономерности пространственного распределения и взаимодействия $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в опухолевом микроокружении неметастатической меланомы кожи.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ экспрессии иммуногистохимических маркеров HMB-45, Melan-A/MART-1 и S100 в неметастатической меланоме кожи для характеристики пластичности опухолевого фенотипа в процессе его прогрессии.

2. Оценить распределение цитотоксических $CD8^+$-Т-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов в интра- и перитуморальных зонах неметастатической меланомы кожи в динамике.

3. Провести количественную оценку тучных клеток в интра- и перитуморальной зонах неметастатической меланомы кожи, на основании окрашивания толуидиновым синим и иммуногистохимической детекции триптазы.

4. Провести пространственное фенотипирование клеточного состава микроокружения неметастатической меланомы кожи, охарактеризовать гистотопографию и частоту межклеточных взаимодействий $CD8^+$-Т-лимфоцитов, триптаза-позитивных тучных клеток и Мелан-A^+-клеток как отражение микроэволюции тканевого ландшафта.

5. Раскрыть ключевые патогенетические механизмы взаимодействия $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в развитии неметастатической меланомы кожи с составлением схемы патогенеза.

Научная новизна

На основании проведенного гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследований впервые выявлено, что при неметастической меланоме кожи I и II стадий по классификации Американского объединенного комитета по раку (8-е издание, 2017 г.) особенности клеточного состава и гистотопографии опухолевого микроокружения ($CD8^+$ лимфоцитов, $CD68^+$ макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток) коррелируют со стадией меланомы.

Впервые установлено, что снижение плотности $CD8^+$-лимфоцитов в перитуморальной зоне ассоциировано с нтенсификацией инвазивного роста уже на I и II стадиях меланомы кожи.

Впервые показано, что повышение плотности $CD68^+$-макрофагов в интратуморальной и перитуморальной зонах ассоциировано с усилением инвазивного роста на начальных стадиях меланомы кожи (I и II).

Впервые продемонстрировано, что снижение плотности триптаза-позитивных тучных клеток в интратуморальной зоне, сопровождающееся утратой их прямого контактного взаимодействия с атипичными меланоцитами, ассоциировано с ослаблением врожденного противоопухолевого иммунитета и усилением инвазивного роста уже на I и II стадиях меланомы кожи.

На основании выполненного дизайна мультиплексного иммуногистохимического окрашивания, 3D-визуализации и картирования впервые выявлены топографические особенности архитектоники локального иммунного ландшафта и закономерности формирования клеточных триад «ТК – Melan-A^+ клетка – $CD8^+$-Т-лимфоцит», количество которых достигало максимальных значений на II стадии опухолевого процесса. Усреднённые данные показали обратно пропорциональную зависимость плотности межклеточных контактов от стадии процесса в интратуморальной зоне и сохранение демаркационного потенциала данных структур в перитуморальном компартменте.

Впервые показано, что в микроокружении неметастатической меланомы кожи патогенез опухолевого роста определяется дисбалансом численности и пространственного распределения $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в дополнении существующих представлений о роли $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в опухолевом микроокружении при неметастатической меланоме кожи I и II стадий по AJCC. Выявлены обратно пропорциональная зависимость количества перитуморальных $CD8^+$ лимфоцитов, прямо пропорциональная зависимость – $CD68^+$-макрофагов в интра- и перитуморальной зонах, а также обратно пропорциональная зависимость количества триптаза-позитивных тучных клеток. Проведенное пространственное фенотипирование позволило установить закономерности гистотопографии и межклеточных взаимодействий между тучными клетками, $CD8^+$-лимфоцитами и опухолевыми меланоцитами. Эти результаты расширяют фундаментальные знания об иммунных механизмах регуляции опухолевого роста и подтверждают ключевую роль взаимодействия указанных клеточных популяций в механизмах прогрессии меланомы кожи.

Практическая значимость результатов исследования заключается в возможности применения полученных данных в онкологической и патологоанатомической практике. Выявленные количественные и пространственные характеристики $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в опухолевом микроокружении неметастатической меланомы кожи позволяют рекомендовать включение иммуногистохимической оценки этих маркеров в комплексную морфологическую диагностику для более точной оценки характера опухолевого роста. Полученные данные могут послужить основой для разработки противоангиогенной и противовоспалительной терапии, направленной на модуляцию ключевых компонентов опухолевого микроокружения ($CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток), а также для создания тканевых биомаркеров эффективности иммунотерапии, включая ингибиторы контрольных точек и потенциальную CART-терапию.

Таким образом, в результате проведённого исследования решена актуальная научная задача – выявлены пространственные и фенотипические характеристики $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов, триптаза-позитивных тучных клеток и атипичных меланоцитов при неметастатической меланоме кожи, определяющие баланс между эффективностью противоопухолевого иммунного надзора и формированием локальной иммуносупрессии, индуцирующей опухолевую инвазию.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проводили на операционном и биопсийном материале кожи 73 пациентов с установленным диагнозом «меланома кожи I и II стадий по AJCC» и без

признаков регионарного или отдалённого метастазирования. В исследование включались клинико-анамнестические данные, результаты лабораторных и инструментальных исследований, а также образцы опухолевой ткани, полученные при хирургическом лечении.

Автором проведён анализ медицинской документации пациентов, гистологическая оценка морфологических особенностей опухоли, гистохимическое исследование с окраской толуидиновым синим для выявления тучных клеток, а также иммуногистохимическое исследование с применением меланоцитарных маркеров (S100, HMB-45, MART-1/Melan-A), маркеров иммунных клеток (CD8, CD68), а также тучных клеток (триптаза). Методы исследования: гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, включая мультиплексный дизайн, статистический.

Положения, выносимые на защиту

1. Иммуногистохимическое исследование выявляет постоянную гомогенную экспрессию меланоцитарных маркеров Melan-A/MART-1 и S100 независимо от толщины инвазии и гистологического подтипа неметастатической меланомы кожи (поверхностно-распространяющаяся, узловая формы), в то время как доля HMB-45-позитивных атипичных меланоцитов пропорционально возрастает со стадией AJCC.

2. Комплексная оценка опухолевого микроокружения неметастатической меланомы кожи I и II стадий указывает на взаимосвязь $CD68^+$-макрофагов, триптаза-позитивных тучных клеток и атипичных Melan-A^+ меланоцитов, формирующих особенности иммунного ландшафта, включая пространственные аспекты. Прямая корреляция между увеличением количества $CD68^+$ опухоль-ассоциированных макрофагов и стадией по AJCC отражает скоординированную дисрегуляцию эволюционно-консервативных систем, контролирующих клеточную пластичность микроокружения и локальный иммунный гомеостаз в процессе опухолевого морфогенеза.

3. Прогрессирование неметастатической меланомы кожи I и II стадий сопряжено с характерной реорганизацией иммунного микроокружения: разнонаправленное снижение плотности перитуморальных $CD8^+$-лимфоцитов и триптаза-позитивных тучных клеток на фоне нарастающей инфильтрации $CD68^+$-макрофагами стимулирует инвазивный рост опухоли, при этом пространственная архитектоника указанных межклеточных взаимодействий в интра- и перитуморальной зонах четко коррелирует со стадией процесса по системе AJCC.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация на тему «Значение компонентов микроокружения в опухолевой прогрессии неметастатической меланомы кожи» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология и 3.3.2.

Патологическая анатомия. Направления исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 2, 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; пункту 2, 3 паспорта научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия: пункту 2. Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов; пункту 3. Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярногенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой – пациенты с подтвержденным диагнозом «меланома кожи» I или II стадия по AJCC (n=73).

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну.

Для статистического анализа данных использовались программные пакеты SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Количественные данные предварительно проверяли на нормальность распределения с использованием теста Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Для статистического сравнения двух групп использовался t-критерий Стьюдента. При оценке различий между несколькими группами применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В случае, если распределение данных отклонялось от нормального, применялись непараметрические методы: тест Манна-Уитни для парных сравнений и тест Крускала-Уоллиса

для оценки различий между более чем двумя группами, дополненный post-hoc тестом Данна для уточнения значимых различий. Во всех случаях уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$, что было установлено до начала исследования

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на: Международном молодежном научном форуме «Медицинская весна» (Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, Россия, 2025) и на конференции «Инновационные технологии в образовательном процессе морфологических дисциплин» (Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь, 2025).

Апробация работы состоялась на заседании конференции Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (Молекулярной морфологии) Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил основные этапы диссертационной работы: постановку цели и формулирование задач исследования, разработку дизайна и выбор комплекса морфологических, гистохимических и иммуногистохимических методов, анализ и статистическую обработку полученных данных, обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости, а также формулирование основных положений и выводов. Автор лично проводил сбор и анализ клинико-анамнестических данных пациентов, гистологическое исследование опухолевых образцов с окраской гематоксилином и эозином, гистохимическое исследование с окраской толуидиновым синим для выявления тучных клеток, а также иммуногистохимическое исследование с применением меланоцитарных маркеров (S100, HMB-45, MART-1/Melan-A), маркеров иммунных клеток (CD8, CD68), а также тучных клеток (триптаза). Автором выполнена морфометрическая оценка распределения и плотности клеточных популяций микроокружения и их сопоставление с клинико-морфологическими характеристиками меланомы. Диссертантом в соавторстве подготовлены и опубликованы научные статьи по теме диссертационной работы.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 2 научные статьи в изданиях из базы данных RSCI, 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представляет собой рукопись на русском языке объемом 121 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 18 таблицами и 38 рисунками. Список цитируемой литературы включает 167 источников, из которых 28 отечественных, 139 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖИМОЕ РАБОТЫ

Характеристика материала

Согласно клиническим и морфологическим данным были сформированы следующие группы:

- I (n = 33; возрастом от 51 до 77 лет, средний – 63,5 лет) – операционный материал кожи после широкого иссечения меланомы кожи с установленным клиническим диагнозом С43 меланома кожи I стадии по классификации Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer 8th ed., 2017 г.)»;

- II (n = 40; возрастом от 51 до 81 лет, средний – 62,9 лет) – операционный материал кожи после широкого иссечения меланомы кожи с установленным клиническим диагнозом С43 меланома кожи II стадии по классификации Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer 8th ed., 2017 г.)».

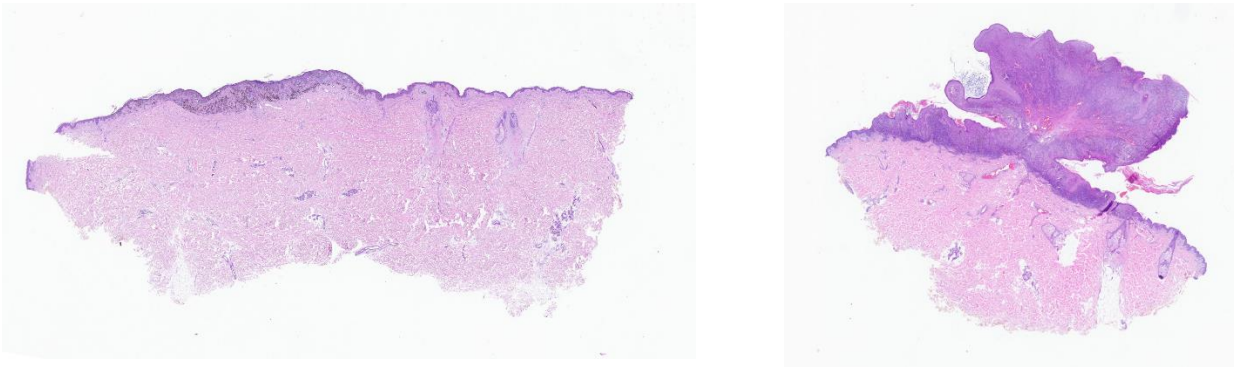
Методы исследования

В диссертационном исследовании на операционном материале кожи 73 пациентов с меланомой I и II стадий по AJCC использовали следующий комплекс методов: а) гистологический – окраска гематоксилином и эозином; б) гистохимический – окраска толуидиновым синим для идентификации и оценки дегрануляции тучных клеток; в) иммуногистохимический, включая мультиплексные дизайны окрашивания (CD8, CD68, Tryptase, S100, Melan-A/MART-1, HMB-45); г) статистический.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-морфологическая характеристика

Клинико-морфологический анализ проведен на операционном материале 73 пациентов (средний возраст – 63 года) с гистологически верифицированной неметастатической меланомой кожи I (n = 33) и II (n = 40) стадий по классификации AJCC (2017 г.). Морфологически выявлены поверхностно-распространяющаяся и узловая формы с широким спектром показателей по Бреслоу (от <1 до >4 мм), категорий pT (pT1a–pT4b) и уровней инвазии по Кларку (Рисунок 1). Глубокая инвазия дермы и подкожно-жировой клетчатки ассоциирована преимущественно с узловым типом заболевания.



А Б

Рисунок 1 – Обзорный вид представленных форм меланомы кожи. А – поверхностно-распространяющаяся меланома кожи; Б – узловая форма меланомы кожи. Окраска: гематоксилин и эозин, гистоскан

Сравнительная характеристика меланоцитарных маркеров

Маркеры S100 и Melan-A/MART-1 демонстрировали стабильное окрашивание независимо от толщины инвазии: доля S100-позитивных клеток варьировала от 89,8% до 89,9%, Melan-A/MART-1 – от 75,3% до 83,3%, без статистически значимых различий между группами с разной категорией pT (pT1–pT4). В отличие от них, экспрессия HMB-45 пропорционально увеличивалась с ростом толщины инвазии: процент HMB-45-позитивных атипичных меланоцитов достоверно возрастал от 41,9% при толщине <1 мм (pT1) до 86,2% при толщине >4 мм (pT4).

Количественная характеристика CD8-положительных лимфоцитов в интра- и перитуморальных зонах при неметастатической меланоме кожи I и II стадий

Плотность интратуморальной инфильтрации $CD8^+$-Т-лимфоцитами оставалась стабильной на всех стадиях (5,1 ± 2,4 – 9,2 ± 2,4 кл./мм²; p > 0,05). В перитуморальной строме

верифицировано прогрессирующее снижение Т-эффекторов по мере нарастания инвазивного потенциала ($p < 0,001$): от 231,6 ± 29,7 кл./мм² на стадии IA (pT1a) до 62,8 ± 8,7 кл./мм² на стадии IIC (pT4b). Предиктором истощения перитуморального «иммунного фронта» является нарастание глубины инвазии и изъязвление опухоли (категории pTb).

Количественная характеристика CD68-положительных макрофагов в интра- и перитуморальных зонах при неметастатической меланоме кожи I и II стадий

Численность $CD68^+$-макрофагов во всех зонах опухоли достоверно превышала контроль ($p < 0,001$) и прямо коррелировала со стадией процесса. В интратуморальной зоне плотность возрастала от 23,8 ± 5,1 (pT1a) до 80,7 ± 12,2 кл./мм² (pT4b), в перитуморальной – от 32,9 ± 6,2 до 71,3 ± 11,6 кл./мм² с максимумом при изъязвлении и на стадии IIC (84,8 ± 7,1 кл./мм²; $p < 0,001$).

Количественная характеристика тучных клеток в интра- и перитуморальных зонах при неметастатической меланоме кожи I и II стадий с использованием гистохимического окрашивания толуидиновым синим и иммуногистохимической детекции триптазы

Гистохимическое (толуидиновый синий) и ИГХ-исследования (детекция триптазы) выявили деплецию тучных клеток при прогрессировании опухоли. На начальных этапах (стадия IA, pT1a) плотность ТК составляла 15,9 ± 2,4 кл./мм² интратуморально и 17,5 ± 2,9 кл./мм² перитуморально. При стадии IIC (pT4b) количество интратуморальных ТК критически падало до 6,1 ± 1,4 кл./мм² ($p < 0,001$), а перитуморально – до 13,5 ± 2,1 кл./мм² ($p < 0,05$). Выявлено 3 типа контакта ТК с опухолью: солокализация без секреции, таргетная дегрануляция к меланоцитам и направленная секреция меланокоров атипичными клетками к ТК с их последующим фагоцитозом (Рисунок 2).

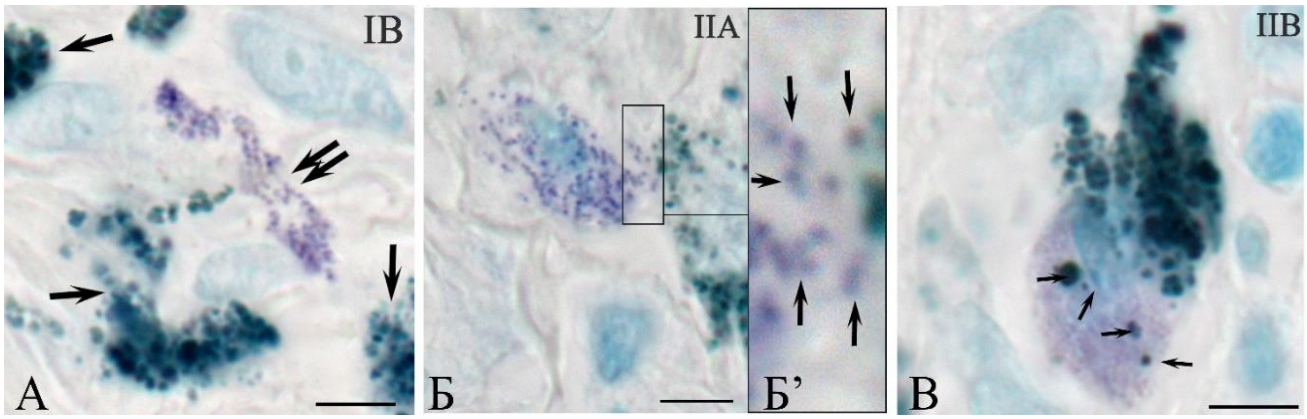


Рисунок 2 – Взаимодействие тучных клеток и атипичных меланоцитов в коже. Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим. А – ТК (двойная стрелка) в месте скопления атипичных меланоцитов (стрелка); Б – признаки активной секреции секреторных гранул к атипичной клетке меланомы (стрелка); В – гранулы меланоцитов различных размеров в цитоплазме ТК (стрелка). Масштабная шкала – 5 мкм

Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и Мелан-А+ клеток меланомы

Мультиплексный анализ показал, что плотность Melan-A$^+$ клеток возрастала при прогрессировании процесса от I до II стадии в интра- и перитуморальной строме. Интенсивность юкстакринной и паракринной солокализации ТК с атипичными меланоцитами достигала максимума на II стадии меланомы: во внутриопухолевом очаге около 40% ТК вступали в непосредственное взаимодействие с Melan-A$^+$ клетками. Напротив, в перитуморальной области максимальная активность паракринного взаимодействия ТК с опухолевыми элементами регистрировалась на I стадии заболевания, значимо снижаясь по мере прогрессии процесса. Гистотопографически в зонах солокализации ТК формировали пограничное расположение по отношению к атипичным меланоцитам, приобретая вытянутую форму с протяженными участками контактов. Характерной морфофункциональной особенностью ТК являлась моно- и мультитаргетная направленная секреция триптаза-позитивных гранул в сторону опухолевых клеток, сопровождавшаяся транслокацией протеазы в ядра мишеней и индукцией их апоптоза (Рисунок 3).

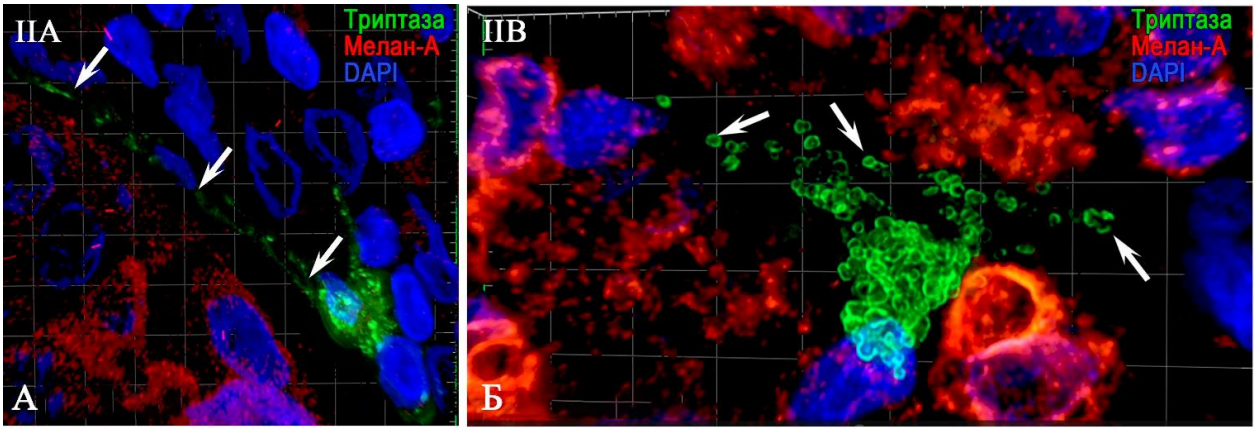


Рисунок 3 – Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и атипичных клеток меланомы кожи. Методика: диплексное иммуногистохимичекое окрашивание триптазы и мелан-А. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А – ТК вытянутой формы (стрелка) окружают скопление атипичных клеток; Б – воздействие триптазы на атипичные клетки меланомы кожи (стрелка). Масштабная сетка – 5 мкм

Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и CD8+ лимфоцитов

Доля CD8$^+$-Т-лимфоцитов во внутриопухолевой области достигала максимума на I стадии (около 20% общего клеточного пула микроокружения) и редуцировалась в 2,5 раза к II стадии. Взаимодействие ТК с CD8$^+$-Т-лимфоцитами регистрировалось на всех стадиях с преобладанием интратуморальных юкстакринных контактов на I стадии. Интратуморальная паракринная солокализация клеток оставалась стабильной при прогрессировании (около 25%), а в перитуморальной зоне отмечалась недостоверная тенденция к нарастанию контактов от I к II стадии. Межклеточные связи реализовывались посредством обширных зон соприкосновения и

через вытянутые цитоплазматические отростки ТК, обеспечивавшие мультитаргетный контакт с несколькими лимфоцитами одновременно. Верифицировано чередующееся упорядоченное расположение клеток с формированием многоклеточных групп синцитиоподобной организации. Выявлен феномен вариабельной CD8-позитивности некоторых тучных клеток в опухоль-ассоциированной популяции (Рисунок 4).

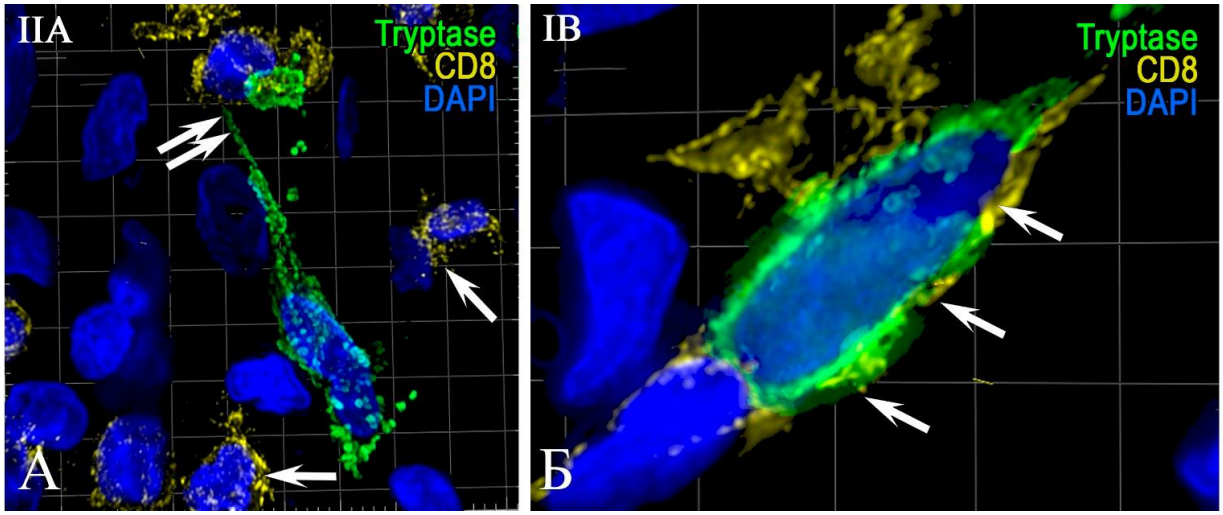


Рисунок 4 – Взаимодействие тучных клеток с цитотоксическими Т-лимфоцитами. Методика: диплексное иммуногистохимическое окрашивание триптазы и CD8+. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А – паракринное (стрелка) и юкстакринное взаимодействие ТК с CD8+Т-лимфоцитом с помощью формирования удлиненного цитоплазматического выроста (двойная стрелка); Б – экспрессия CD8 на поверхности ТК (стрелка). Масштабная сетка – 5 мкм

Взаимодействие CD8$^+$-лимфоцитов с Мелан А$^+$-атипичными меланоцитами

Во внутриопухолевой области сопряженность воздействия Т-киллеров на Melan-A$^+$ клетки была минимальной на I стадии и достоверно возрастала при прогрессировании до II стадии, охватывая около 30% всей популяции CD8$^+$-лимфоцитов. В перитуморальной строме активность прямого воздействия Т-эффекторов на опухолевый субстрат была выражена значительно слабее; при этом нарастание профиля их взаимодействия от I стадии к последующим происходило исключительно за счет паракринных связей на фоне редукции прямых юкстакринных контактов. Цитотопографически верифицировано сочетанное воздействие от одной до трех CD8$^+$-клеток на единичный атипичный меланоцит, инвазия Т-лимфоцитов внутрь опухолевых кластеров и формирование клеточных диад (Рисунок 5). На II стадии реализующие цитотоксический потенциал CD8$^+$-лимфоциты локализовались в микроокружении, характеризующемся высокой плотностью насыщения меланосомами мелких размеров.

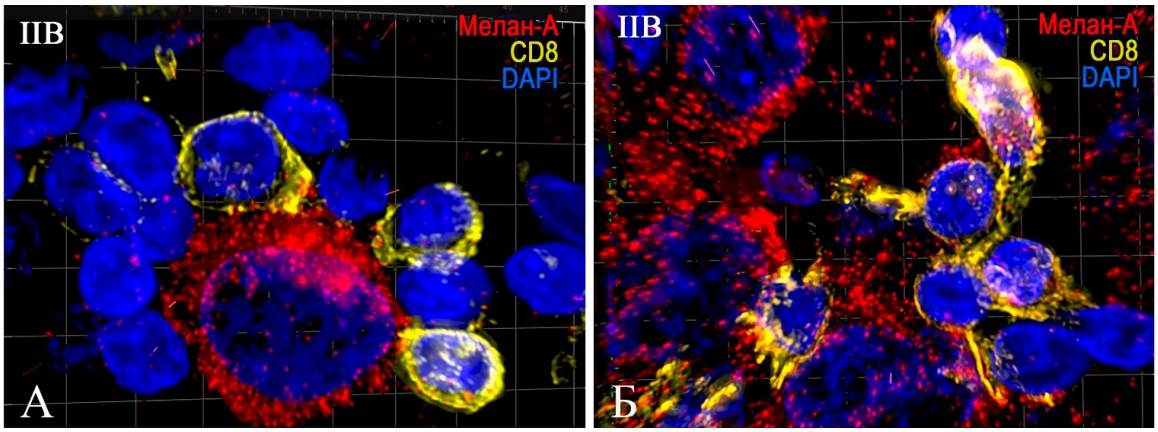


Рисунок 5 – Воздействие цитотоксических Т-лимфоцитов на атипичные клетки меланомы кожи. Методика: диплексное иммуногистохимическое окрашивание CD8 и Мелан-А. Ядра контарстированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А. Юкстакринное цитотоксическое воздействие нескольких $CD8^+$ Т-лимфоцитов на атипичную клетку меланомы; Б. Воздействие группы цитотокисческих Т-лимфоцитов на атипичные Мелан-$А^+$ клетки, активно секретирующих меланокоры. Масштабная сетка – 5 мкм

Образование клеточных триад «ТК - атипичная клетка меланомы - CD8+ Т-лимфоцит»

Мультиплексное окрашивание позволило идентифицировать феномен формирования клеточных триад, представленных взаимодействующими друг с другом ТК, CD8+Т-Л и атипичными меланоцитами. Максимальная частота интеграции клеток в такие пространственные пространственные кластеры регистрировалась во внутриопухолевой зоне на II стадии заболевания. Верифицировано несколько вариантов организации триад: расположение ТК в роли пограничного модулятора с направленной секрецией триптазы к $CD8^+$-эффектору, непосредственно атакующему опухолевую клетку; дистантное паракринное присутствие ТК вблизи цитотоксических диад; промежуточное положение ТК в виде «мостика» с прямой координацией контактов между лимфоцитом и опухолевым субстратом; полное окружение атипичной клетки контактирующими ТК и Т-киллерами (Рисунок 6). В зонах сопряженного межклеточного синтеза выявлялась транслокация триптазы в цитоплазму опухолевых клеток и формирование направленных цитоплазматических выростов $CD8^+$-лимфоцитов к ТК. Синергическая топография триад, наряду с феноменом экспрессии CD8 самими тучными клетками в их составе, свидетельствует о существовании прецизионной локальной регуляции противоопухолевого ответа через прямые кооперативные межклеточные контакты в микроокружении меланомы кожи.

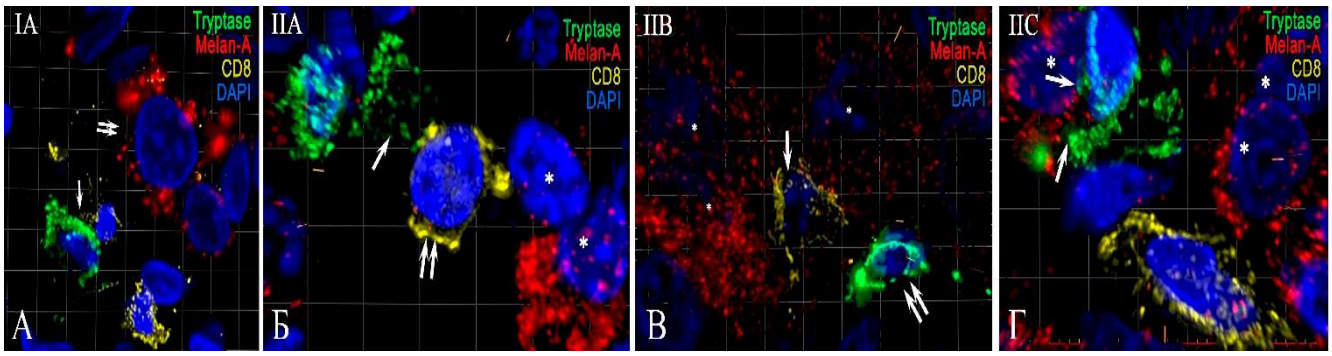


Рисунок 6 – Взаимодействие тучных клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов и атипиных клеток в опухолевом микроокружении меланомы кожи. Методика: Мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание триптазы, CD8 и мелан-А. Флуоресцентная микроскопия, А – Взаимодействующие ТК и $CD8^+$ Т-лимфоцит (стрелка) локализованы на паракринном расстоянии от атипичного меланоцита (двойная стрелка); Б – воздействие $CD8^+$ Т-лимфоцита (двойная стрелка) на атипичную клетку опухоли (звездочка), секреция триптазы ТК к CD8+ Т-лимфоциту (стрелка); В – $CD8^+$ Т-лимфоцит (стрелка) воздействует на две атипичные клетки меланомы кожи (звездочка) ТК расположена на паракринном расстоянии от $CD8^+$ Т-лимфоцита; Г – прямое воздействие тучной клетки (стрелка) и цитотоксического Т-лимфоцита (двойная стрелка) на атипичные клетки меланомы (звездочка). Масштабная шкала – 5 мкм

Патогенетические аспекты прогрессии неметастатической меланомы кожи I и II стадий

В контексте прогрессии неметастатической меланомы кожи I и II стадий можно выделить четыре основных патогенетических механизма, связанных с взаимодействием клеточных компонентов опухолевого микроокружения. Первый, локальный иммуносупрессивный механизм, заключается в снижении плотности $CD8^+$-Т-лимфоцитов в перитуморальной зоне, происходящем обратно пропорционально стадии, что приводит к ослаблению цитотоксического контроля над атипичными Melan-A^+ меланоцитами, а также в накоплении $CD68^+$-макрофагов в интра- и перитуморальных зонах, которое идет прямо пропорционально стадии заболевания и способствует иммуносупрессии, ангиогенезу и ремоделированию матрикса. Второй, локальный противоопухолевый механизм, характеризуется максимальной кооперацией триптаза-позитивных тучных клеток с $CD8^+$-Т-лимфоцитами и Melan-A^+ клетками внутри опухоли на I и II стадиях, включая таргетную секрецию гранул тучных клеток к опухолевым клеткам и цитотоксическое воздействие через триады «тучная клетка – $CD8^+$-лимфоцит – атипичный меланоцит», при этом удлиненный фенотип тучных клеток обеспечивает координацию множества элементов в локусах с низкой плотностью Melan-A^+ клеток. Третий механизм – опухолевая адаптация микроокружения – выражается в способности опухолевой микросреды подавлять популяцию тучных клеток, создавая обратную зависимость их плотности от концентрации Melan-A^+ клеток в интратуморальной зоне, а также в направленной секреции

меланокоров атипичными меланоцитами к тучным клеткам как механизме уклонения от иммунного контроля. Четвертый механизм связан со смещением активности и проявляется в переходе наибольшей интенсивности взаимодействия тучных клеток и $CD8^{+}$-лимфоцитов из интратуморальной зоны на I и II стадиях в перитуморальную зону на более поздних этапах инвазии, а также в индивидуальной вариабельности формирования триад и межклеточных контактов у каждого пациента, определяющей общую динамику иммуногенеза. Таким образом, представленные данные позволяют интерпретировать иммунную модуляцию в микроокружении меланомы не только в рамках классической иммунологии опухолей, но и через призму биологии развития, где опухолевый процесс утилизирует и искажает фундаментальные программы эмбриогенеза и раннего онтогенеза. Это положение подчеркивает важность онтогенетических концепций для понимания механизмов онкогенеза и открывает новые направления для поиска терапевтических мишеней, основанных на блокаде патологически реактивированных эмбриональных путей.

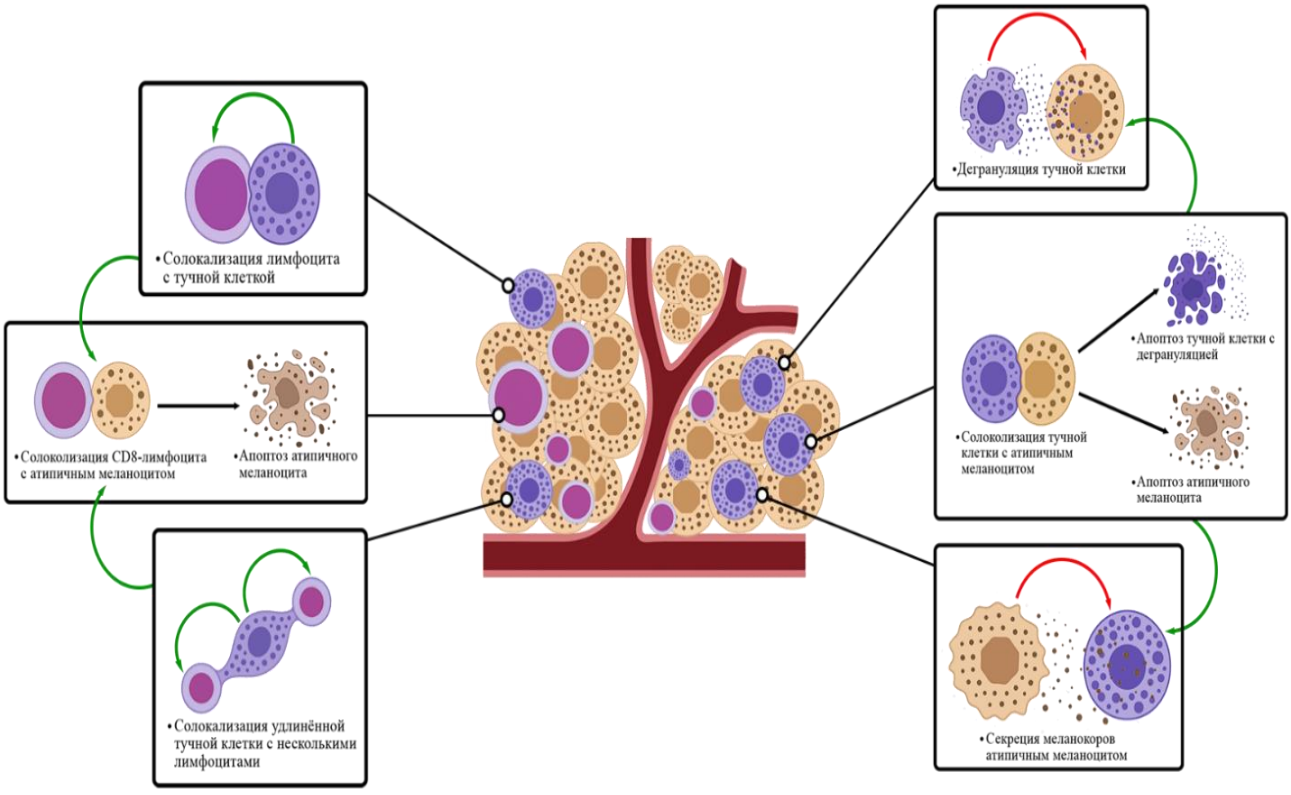


Рисунок 7 – Схема взаимодействия тучных клеток, лимфоцитов и атипичных меланоцитов

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что маркеры S100 и Melan-A/MART-1 демонстрируют стабильную и высокую экспрессию в опухолевых клетках независимо от стадии неметастатической меланомы

кожи. Доля HMB-45-позитивных опухолевых клеток пропорционально возрастает с увеличением стадии.

2. Прогрессирование неметастатической меланомы кожи от I к II стадии по AJCC (с ростом категории pT) сопровождается выраженной реорганизацией клеток интра- и перитуморальной зоны: плотность распределения перитуморальных $CD8^+$-Т-лимфоцитов достоверно снижается более чем в 3,5 раза, отражая истощение пула цитотоксических клеток на фоне увеличения глубины инвазии и изъязвления опухоли ($p < 0,001$); количественная плотность $CD68^+$-макрофагов прямо коррелирует с опухолевым ростом ($p < 0,001$), увеличиваясь более чем в 3,0 раза интратуморально и более чем в 2,5 раза в перитуморальной зоне с достижением максимальных значений при изъязвлении опухоли и стадии IIC.

3. При неметастатической меланоме кожи выявлено, что популяция триптаза-позитивных тучных клеток подвергается прогрессирующей деплеции: уменьшение их количества более чем в 2,5 раза в интратуморальной зоне ($p < 0,001$) при умеренном снижении их численности в перитуморальной зоне ($p < 0,05$).

4. Биология развития взаимодействия опухолевых клеток и элементов иммунного опухолевого микроокружения при неметастатической меланоме кожи можно рассматривать как закономерность, где выявлено увеличение частоты прямых контактов тучных клеток с $CD8^+$-Т-лимфоцитами в интратуморальной зоне преимущественно на I стадии с последующим снижением обратно пропорционально опухолевой прогрессии.

5. Частота образования интратуморальных клеточных триад «тучная клетка – $CD8^+$-Т-лимфоцит – опухолевый меланоцит» достигает максимума на II стадии неметастатической меланомы кожи, отражая компенсаторную активацию локального противоопухолевого иммунного ответа в условиях нарастающей инвазии.

6. Изменение количественных и пространственных характеристик опухоль-ассоциированных популяций $CD8^+$-Т-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в микроокружении меланомы кожи свидетельствует о дисбалансе иммунного ландшафта и персональных особенностях патогенеза заболевания на ранних стадиях развития.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные количественные и пространственные критерии $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и тучных клеток, ассоциированных с опухолью, могут быть эффективно использованы для оценки опухолевого роста меланомы кожи в работе врача-патологоанатома

2. Полученные данные о снижении плотности тучных клеток и $CD8^+$-Т-лимфоцитов в микроокружении меланомы кожи при одновременном увеличении числа $CD68^+$-макрофагов в перитуморальной зоне свидетельствуют о переключении опухолевого микроокружения в

сторону иммуносупрессии, что следует учитывать врачам-онкологам при выборе направлений дальнейших клинических исследований и разработке иммунотерапевтических стратегий, ориентированных на коррекцию секреторной активности атипичных меланоцитов, фенотипа опухоль-ассоциированных макрофагов и потенцирование Т-клеточного ответа.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительный анализ клинико-морфологических и прогностических параметров неметастатической меланомы кожи / **К. А. Силаков**, О. Э. Абрамова, Е. В. Шако, М. А. Бобров, П. А. Молотков, Е. Р. Чичитко, М. А. Митрофанов, К. А. Силантьева, П. В. Шегай, Г. А. Демяшкин // **Research'n Practical Medicine Journal**. – 2025. – № 12(2). – С. 81-89.

2. Диагностическая и прогностическая ценность иммуногистохимических маркеров HMB-45, Melan-A/MART-1 и S100 при различных гистологических подтипах меланомы / **К. А. Силаков**, Е. Ю. Деменкова, В. И. Щекин, М. А. Бобров, Г. А. Демяшкин // **Морфология**. – 2025. – № 163(4). – С. 353–362.

3. Spatial Distribution and Phenotypic Profiling of Cd68+ and Cd163+ Macrophages in Melanoma Progression: Insights into Tumor Microenvironment Dynamics / G. Demyashkin, D. Atiakshin, **K. Silakov**, V. Shchekin, M. Bobrov, M. Vadyukhin, T. Borovaya, E. Blinova, P. Shegay, A. Kaprin // **Biomedicines**. – 2025. – № 13(9). – Art. 2178.

4. Phenotypic and Quantitative Characterization of Mast Cells in Cutaneous Melanoma: Correlation with Staging Metrics / G. Demyashkin, D. Atiakshin, **K. Silakov**, V. Shchekin, M. Bobrov, O. Abramova, M. Vadyukhin, T. Borovaya, E. Blinova, P. Shegay, et al. // **Current Issues in Molecular Biology**. – 2025. – № 47(9). – Art. 752.

5. Interactions Between Tryptase-Positive Mast Cells and Melanin-A+ Cells in the Microenvironment of Cutaneous Melanoma / D. Atiakshin, G. Demyashkin, **K. Silakov**, A. Prikhodko, V. Shchekin, A. Alekhnovich, L. Grivtsova, D. Davydov, I. Klabukov, D. Baranovskii, et al. // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2025. – № 26(23). – Art. 11313.

6. Количественная характеристика Триптазы в I и II стадиях меланомы / **К. А. Силаков**, Е. В. Шако // **II Международный молодежный научный форум «Медицинская весна 2025»**: сб. матер. форума (г. Москва, 2025 г.). – М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2025.

7. Особенности чувствительности меланоцитарных маркеров / К. А. Силаков, М. А. Бобров, Д. Ю. Юферов // **Инновационные технологии в образовательном процессе морфологических дисциплин**: сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф. (г. Минск, 2025 г.). – Минск: БГМУ, 2025.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИГХ – иммуногистохимия

ТК – тучные клетки

AJCC – Американский объединённый комитет по раку (англ. American Joint Committee on Cancer)

CD – кластер дифференцировки (англ. Cluster of Differentiation; CD3, CD8, CD20, CD68 и др.)

pT – патологическая категория первичной опухоли (англ. pathological Tumor category)

Силаков Кирилл Александрович (Российская Федерация)

Значение компонентов микроокружения в опухолевой прогрессии неметастатической меланомы кожи

Диссертационная работа посвящена изучению значения компонентов микроокружения и их пространственному взаимодействию в неметастатической меланоме кожи I и II стадий по классификации AJCC. В работе изучаются феномены влияния динамики инвазивного процесса на пластичность опухолевого фенотипа (экспрессия маркеров HMB-45, Melan-A/MART-1, S100), а также на популяционный состав и гистотопографию иммунного инфильтрата: цитотоксических $CD8^+$-Т-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток в интра- и перитуморальной зонах. В исследовании показана стабильно высокая экспрессия маркеров S100 и Melan-A/MART-1 наряду с достоверным возрастанием доли $HMB\text{-}45^+$ атипичных меланоцитов по мере увеличения категории pT. Также установлено, что прогрессирование меланомы кожи ассоциировано с прямо пропорциональным увеличением плотности $CD68^+$-макрофагов в обоих компартментах опухоли на фоне обратно пропорционального снижения численности перитуморальных $CD8^+$-Т-лимфоцитов и триптаза-позитивных тучных клеток. Кроме того, методами мультиплексного иммунофлуоресцентного профилирования и 3D-картирования впервые выявлена закономерность формирования межклеточных триад «тучная клетка – $Melan\text{-}A^+$ клетка – $CD8^+$-Т-лимфоцит», максимальная частота интеграции которых во внутриопухолевой зоне фиксируется на II стадии процесса, что отражает пространственную перестройку противоопухолевого иммунного ответа и переключение микроокружения в сторону локальной иммуносупрессии.

Silakov Kirill Alexandrovich (Russian Federation)

The role of microenvironment components in the tumor progression of non-metastatic cutaneous melanoma

This dissertation focuses on studying the significance of microenvironment components and their spatial interactions in stage I and II non-metastatic cutaneous melanoma according to the AJCC classification. The study investigates the impact of invasive dynamics on tumor phenotype plasticity (expression of HMB-45, Melan-A/MART-1, and S100 markers), as well as on the population composition and histotopography of the immune infiltrate: cytotoxic $CD8^+$-T lymphocytes, $CD68^+$-macrophages, and tryptase-positive mast cells in intra- and peritumoral zones. The study demonstrated a consistently high expression of S100 and Melan-A/MART-1 markers alongside a significant increase in the proportion of $HMB\text{-}45^+$ atypical melanocytes as the pT category increased. It was also established that cutaneous melanoma progression is associated with a directly proportional increase in $CD68^+$-macrophage density in both tumor compartments against the background of an inversely proportional decrease in peritumoral $CD8^+$-T lymphocytes and tryptase-positive mast cells. Furthermore, using multiplex immunofluorescence profiling and 3D mapping, the study revealed for the first time the pattern of forming "mast cell – $Melan\text{-}A^+$ cell – $CD8^+$-T lymphocyte" intercellular triads, with the maximum integration frequency in the intratumoral zone occurring at stage II of the disease, reflecting the spatial reorganization of the antitumor immune response and a switch in the microenvironment toward local immunosuppression.