ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Атякшин Дмитрий Андреевич
доктор медицинских наук
Демяшкин Григорий Александрович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 18
1.1. Эмбриогенез кожи, происхождение меланоцитов и клеток тканевого микроокружения 18
1.2. Эпидемиология и клиническое значение меланомы кожи 20
1.3. Особенности классификации и стадирования меланомы кожи 22
1.4. Понятие опухолевого микроокружения 27
1.5. Иммунные клетки в опухолевом микроокружении меланомы 32
1.6. Заключение по обзору литературы 36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 37
2.1. Характеристика биоматериала исследования 37
2.2. Методы исследования 38
2.2.1. Гистологическое исследование 38
2.2.2. Гистохимическое исследование 39
2.2.3. Иммуногистохимическое исследование 40
2.2.4. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование 41
2.2.5. Статистические методы 43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 44
3.1. Клиническая характеристика 44
3.2. Морфологическая характеристика меланомы кожи 45
3.3. Сравнительная характеристика меланоцитарных маркеров 48
3.4. Количественная характеристика CD8-положительных лимфоцитов в интра- и перитуморальных зонах при неметастатической меланоме кожи I и II стадий 50
3.5. Количественная характеристика CD68-положительных макрофагов в интра- и перитуморальных зонах при неметастатической меланоме кожи I и II стадий 55

3.6. 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 61
3.8.2. Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и Мелан-А+ клеток меланомы. 75
3.8.3. Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и CD8+ лимфоцитов. 80
3.8.4. Взаимодействие CD8+-лимфоцитов с Мелан А+-атипичными меланоцитами. 84
3.8.5. Образование клеточных триад «ТК - атипичная клетка меланомы - CD8+ Т-лимфоцит». 87
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 91
4.1. Особенности иммунофенотипа атипичных меланоцитов в процессе инвазивного роста меланомы кожи 91
4.2. Роль тучных клеток в прогрессировании неметастатической меланомы кожи 92
4.3. Роль лимфоцитов в развитии неметастатической меланомы кожи 95
4.4. Роль макрофагов в неметастатической меланоме кожи 97
4.5. Итоги выполнения диссертационной работы 99
4.6. Патогенетические аспекты прогрессии неметастатической меланомы кожи I и II стадий 101
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 104
ВЫВОДЫ 106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 110
ПРИЛОЖЕНИЕ А 122

ВВЕДЕНИЕ

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 [16]. Меланома отличается вариабельностью чувствительности к лечению. При локализованных формах (0, I стадии) пятилетняя выживаемость достигает 95 – 96 %, а для II стадии этот показатель снижается до 70 – 80 % [120]

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 [83] 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 [21, 87, 157].

Известно, что в физиологических условиях барьерные и соединительнотканные компартменты кожи содержат строго определенные популяции резидентных иммунных клеток. Если в эпидермисе в норме присутствуют меланоциты и отдельные резидентные Т-лимфоциты, то популяции макрофагов и тучных клеток в физиологических условиях локализуются исключительно в соединительной ткани дермы и гиподерме, где они располагаются преимущественно периваскулярно и периневрально, выполняя важнейшие

функции иммунного надзора и поддержания тканевого гомеостаза [1, 12, 120]. Однако в процессе канцерогенеза эта система тканевого гомеостаза претерпевает существенную перестройку. При злокачественной трансформации меланоцитов клеточные элементы формирующегося опухолевого микроокружения приобретают функциональную пластичность и способны оказывать как противоопухолевое, так и выраженное иммуносупрессивное действие, непосредственно определяя характер прогрессии меланомы кожи.

Значение количественных параметров и пространственного распределения опухоль-инфильтрирующих цитотоксических Т-лимфоцитов, опухоль-ассоциированных макрофагов и тучных клеток доказано для ряда солидных новообразований, включая рак молочной железы и толстой кишки [33, 101]. При меланоме в опухолевом микроокружении формируется инфильтрат, включающий в себя Т-лимфоциты, макрофаги и тучные клетки, однако данные по их количественным и фенотипическим характеристикам остаются единичными и противоречивыми [148, 164]. Изучение данных клеточных популяций продиктовано их ключевым значением в формировании противоопухолевого ответа и структурно-функциональной перестройке опухолевого микроокружения: Т-лимфоциты выступают основными эффекторами клеточного противоопухолевого иммунитета, способными напрямую распознавать и лизировать опухолевые клетки, экспрессирующие меланоцитарные антигены, а их плотность в опухоли является одним из наиболее перспективных тканевых биомаркеров ответа на иммунотерапию; макрофаги представляют собой наиболее многочисленный компонент миелоидного инфильтрата, отражающий общую интенсивность моноцитарно-макрофагальной реакции тканевого микроокружения [101, 147]; 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 [2, 149].

Несмотря на обширный массив научных публикаций, результаты оценки корреляции данных параметров со стадией заболевания характеризуются высокой степенью дискуссионности и вариабельности. Подобная неоднородность выводов во многом обусловлена методологическими различиями в оценке топографических зон инфильтрации и пластичностью клеточных фенотипов, что обусловливает необходимость комплексного пространственного анализа микроокружения, детально реализованного в настоящем исследовании. В связи с этим классическая оценка общей плотности распределения воспалительного инфильтрата в ткани опухоли уже не может в полной мере отражать все нюансы патологического процесса. Возникает обоснованная необходимость не только в более тщательном анализе клеточного ландшафта опухолевого микроокружения, но и в получении точных пространственных характеристик распределения исследуемых клеток. Определение топографических векторов локализации иммунокомпетентных клеток, оценка их взаимного расположения и расстояния между ними позволяют объективизировать скрытые аспекты межклеточного взаимодействия. Именно архитектоника опухолевой стромы и пространственные паттерны взаимоотношений между цитотоксическими Т-лимфоцитами, макрофагами и тучными клетками определяют, будет ли реализован эффективный иммунный ответ или сформируется локальная иммуносупрессия. Таким образом, данные о пространственном взаимодействии клеточного состава опухолевого микроокружения меланомы кожи (лимфоциты, макрофаги и тучные клетки) помогут дополнить морфологические характеристики заболевания и позволяют выявлять ранее недостаточно изученные количественные и фенотипические особенности, отражающие прогрессию процесса на ранних стадиях.

Степень разработанности темы исследования

Современные работы свидетельствуют о растущем интересе к роли клеточного компонента микроокружения. В многочисленных современных исследованиях наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток рассматривается как потенциальный фактор, влияющий на опухолевый рост меланомы кожи [47, 73, 132, 134]. С другой стороны, в этих исследованиях не проводится разделение инфильтрата по типовой пренадлежности клеток, не предоставляются количественные характеристики плотности расположения, их распределения в интра- и перитуморальной зонах, а также отсутствует анализ с учётом стадии заболевания (I или II по AJCC). Особый интерес во взаимодействии с атипичными меланоцитами представляют $CD8^+$-Т-лимфоциты, $CD68^+$-макрофаги и триптаза-позитивные тучные клетки именно из-за их ключевых свойств: цитотоксические $CD8^+$-Т-лимфоциты как основные эффекторы противоопухолевого клеточного иммунитета, $CD68^+$-макрофаги, отражающие макрофагальную реакцию микроокружения; триптаза как главный маркер идентификации и ключевой фактор активности тучных клеток. При этом в современной литературе данные об их пространственном распределении и межклеточных взаимодействиях непосредственно в зоне инвазивного роста неметастатической меланомы кожи на ранних стадиях инвазии носят крайне скудный характер.

Таким образом, сведения о $CD8^+$-Т-лимфоцитах, $CD68^+$-макрофагах и триптаза-позитивных тучных клетках при неметастатической меланоме кожи представляются ограниченными и разрозненными. В связи с этим комплексная морфологическая оценка клеточного состава опухолевого микроокружения на ранних стадиях инвазивного процесса представляет собой актуальное научное направление, способное существенно расширить современные представления о механизмах канцерогенеза 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 в процессе её инвазивного морфогенеза.

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 неметастатической меланоме кожи I и II стадий по классификации Американского объединенного комитета по раку (8-е издание, 2017 г.) особенности клеточного состава опухолевого микроокружения ($CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток) коррелируют со стадией меланомы.

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

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

Впервые продемонстрировано, что снижение плотности расположения 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 расположения 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 противоопухолевых

и иммуносупрессивных функций $CD8^+$ лимфоцитов, $CD68^+$ макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в развитии и расширении научных 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. Выявлено, что увеличение глубины инвазии опухоли находится в обратно пропорциональной зависимости с количеством перитуморальных $CD8^+$-лимфоцитов и триптаза-позитивных тучных клеток, и в прямо пропорциональной зависимости – с численностью интра- и перитуморальных $CD68^+$-макрофагов. Проведенное пространственное фенотипирование позволило установить закономерности топографии и межклеточных взаимодействий между тучными клетками, $CD8^+$-лимфоцитами, $CD68^+$-макрофагами 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), маркерам иммунных клеток (CD8, CD68), а также тучных клеток (триптаза). Методы исследования: гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, включая мультиплексные технологии, 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 расположения 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.

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 25.03.2026 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий 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 и 3.3.2. Патологическая анатомия. Акт о внедрении в учебный процесс б/н от 25.03.2026 г.

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), 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 «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (Молекулярная морфология)» Федерального государственного автономного образовательного учреждения 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 расположения 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эмбриогенез кожи, происхождение меланоцитов и клеток тканевого микроокружения

Развитие кожи у человека начинается с ранних этапов эмбриогенеза. На 4–5-й неделе внутриутробного развития эктодерма формирует зачаток будущего эпидермиса, представленный однослойным зародышевым эпителием [9]. В последующем он многократно пролиферирует, образуя многослойную структуру, которая постепенно дифференцируется в типичные слои эпидермиса – базальный, шиповатый, зернистый и роговой [3]. К концу второго триместра беременности эпидермис по строению приближается к зрелому [4]. Дерма формируется из мезенхимы, происходящей из мезодермы, и представлена соединительнотканными структурами, сосудами, фибробластами и другими элементами [19].

Помимо вышеперечисленных структурных компонентов, в составе дермы с ранних этапов постнатального онтогенеза присутствуют клетки иммунной системы. Лимфоциты происходят из общего лимфоидного предшественника костного мозга, макрофаги формируются из моноцитов миелоидного ряда, а тучные клетки – из $CD34^+$ гемопоэтических предшественников, также имеющих костномозговое происхождение [30]. Все эти клетки мигрируют в дерму, располагаясь периваскулярно и периневрально, и обеспечивают локальный иммунный надзор, регулируют воспалительные реакции и процессы ремоделирования тканей [88].

Особое значение в морфогенезе кожи имеют клетки нервного гребня – транзиторной популяции эмбриональных клеток, обладающих высокой миграционной способностью и мультипотентностью [25]. Нервный гребень формируется на границе нервной трубки в процессе нейруляции, а его клетки, утратившие эпителиальные контакты, приобретают свойства мезенхимальных клеток и начинают активно мигрировать по эмбриону [27]. В зависимости от пути миграции и локальных сигнальных факторов они дифференцируются в широкий

спектр клеточных линий, включая нейроны, глиальные клетки, хромаффинные клетки и меланоциты [7].

Меланоциты, формирующиеся из клеток нервного гребня, заселяют базальный слой эпидермиса, волосяные фолликулы и слизистые оболочки [17]. Они обладают уникальной функцией синтеза меланина, который накапливается в специализированных органеллах – меланосомах [30]. Последние транспортируются в кератиноциты, образуя мелано-эпидермальный комплекс, обеспечивающий фотопротекцию кожи и защиту от ультрафиолетового излучения [42].

Регуляция развития и дифференцировки меланоцитов осуществляется целым рядом сигнальных каскадов. Ключевую роль играет транскрипционный фактор MITF (microphthalmia-associated transcription factor), контролирующий экспрессию генов, ответственных за меланогенез и клеточную выживаемость [55]. Сигнальный путь c-KIT обеспечивает пролиферацию и миграцию меланоцитов, WNT/β-catenin участвует в их дифференцировке, а MAPK/ERK – в регуляции клеточного цикла и ответа на внешние стимулы [14, 18, 20, 69]. Нарушения в работе этих сигнальных систем могут приводить к изменениям функциональной активности клеток и создавать предпосылки для злокачественной трансформации.

Воздействие ультрафиолетового излучения является основным экзогенным канцерогенным фактором для меланоцитов. Оно индуцирует образование ДНК-повреждений, в частности димеров пиримидинов, что приводит к мутациям и геномной нестабильности [93]. Наиболее часто при меланоме выявляются мутации в генах *BRAF, NRAS и KIT*, определяющих рост, дифференцировку и выживаемость клеток [11, 46]. Эти мутации нарушают контроль за клеточным циклом и апоптозом, способствуя накоплению генетических повреждений и развитию опухоли. Особенность эмбрионального происхождения меланоцитов напрямую связана с биологией меланомы. Будучи производными нервного гребня, меланоциты изначально обладают высокой миграционной активностью, необходимой для заселения различных тканей в процессе развития организма. Эта врождённая способность к миграции и адаптации сохраняется и в опухолевых

клетках, определяя выраженный инвазивный и метастатический потенциал меланомы [57].

Таким образом, эмбриональное развитие кожи и меланоцитов, а также присутствие в дерме клеток иммунной системы, таких как лимфоциты, макрофаги и тучные клетки, формируют основу для понимания механизмов опухолевого микроокружения и предрасположенности меланомы кожи к раннему и агрессивному метастазированию.

1.2. Эпидемиология и клиническое значение меланомы кожи

Меланома кожи – это злокачественная опухоль, происходящая из меланоцитов – клеток, продуцирующих пигмент меланин [167]. Заболевание характеризуется агрессивным биологическим поведением, быстрым ростом, ранним лимфогенным и гематогенным метастазированием, а также высокой смертностью даже при относительно небольших размерах первичной опухоли [100]. В отличие от многих других злокачественных новообразований кожи, меланома составляет лишь около 4 % их общего числа, однако именно на неё приходится до 80 % летальных исходов, что подчёркивает её исключительную медико-социальную значимость [36].

По данным Международного агентства по изучению рака ежегодно в мире диагностируется более 320 тысяч новых случаев меланомы кожи, а число смертей достигает 57 тысяч. Наибольшая распространённость отмечается в странах с высоким уровнем инсоляции и преимущественно светлокожим населением: Австралии, Новой Зеландии, странах Северной Европы, США. В Австралии заболеваемость превышает 50 случаев на 100 тыс. населения, что является одним из самых высоких показателей в мире [166].

В Российской Федерации, по данным национальной онкологической статистики, в 2023 году зарегистрировано 13 270 новых случаев меланомы кожи, что составляет около 2 % всех злокачественных новообразований [16]. Смертность от меланомы в России превышает 4 тысячи случаев в год, при этом заболеваемость

продолжает ежегодно расти в среднем на 2–3 %. Особенно тревожной является тенденция к увеличению числа случаев среди лиц молодого и среднего возраста, что существенно влияет на показатели демографии и трудоспособного населения.

К числу основных факторов риска развития меланомы кожи относятся как экзогенные, так и эндогенные предрасполагающие факторы. Наибольшее значение среди внешних воздействий имеет ультрафиолетовое излучение, как естественное солнечное, так и искусственное при использовании соляриев [5]. Интенсивная и длительная инсоляция приводит к повреждению ДНК меланоцитов, формированию мутаций и нарушению процессов репарации, преимущественно в генах *BRAF (V600E), NRAS, NF1* и *KIT*, а также в генах-супрессорах опухолевого роста, таких как *TP53* и *CDKN2A*, что способствует неконтролируемой пролиферации и опухолевой трансформации клеток [81]. Особенно опасными считаются эпизоды солнечных ожогов в детском и подростковом возрасте, так как именно они многократно повышают риск развития меланомы во взрослом состоянии [67].

К внутренним факторам риска относят фототип кожи по классификации Fitzpatrick. Наибольшую предрасположенность к заболеванию имеют лица со светлой кожей, рыжими или светлыми волосами, голубыми глазами, низкой способностью к загару и высокой склонностью к солнечным ожогам [74]. Наличие большого числа невусов, особенно атипичных (диспластических), также рассматривается как фактор риска, а врождённые гигантские невусы в ряде случаев являются предраковыми состояниями [66].

Важную роль играет наследственная предрасположенность. У лиц с семейным анамнезом меланомы вероятность её развития повышается в несколько раз, а в некоторых семьях описаны характерные генетические мутации, среди которых наиболее часто встречаются изменения в гене *CDKN2A*, приводящие к нарушению регуляции клеточного цикла; реже выявляются мутации в гене *CDK4*, вызывающие конститутивную активацию циклин-зависимых киназ, а также герминальные варианты в генах *MITF* и *BAP1*, ассоциированные с предрасположенностью к развитию меланомы и ряда других злокачественных

опухолей [163]. Помимо наследственного фактора, риск повышается у пациентов с иммунодефицитными состояниями, в том числе при ВИЧ-инфекции или приёме иммуносупрессивных препаратов после трансплантации органов [38].

1.3. Особенности классификации и стадирования меланомы кожи

Современная классификация меланоцитарных опухолей кожи, представленная в последнем издании ВОЗ (WHO Classification of Skin Tumours, 2022), основывается не только на морфологических признаках, но и на учёте локализации опухоли и степени воздействия ультрафиолетового излучения. В зависимости от этих факторов выделяют несколько основных групп меланом.

К меланомам, возникающим на коже с интермиттирующим воздействием солнечного излучения, относится поверхностно-распространяющаяся меланома. Этот тип является наиболее распространённым и составляет до 60 – 70 % всех случаев [108]. Для него характерен длительный радиальный рост, выраженная клеточная атипия, нерегулярная пигментация и участки регрессии [65].

К меланомам, формирующимся на коже с хроническим воздействием ультрафиолета, относятся лентиго-меланома и десмопластическая меланома. Лентиго-меланома чаще развивается у лиц пожилого возраста на открытых участках кожи лица и шеи, отличается длительным радиальным ростом и поздней инвазией в дерму [68]. Десмопластическая меланома характеризуется преобладанием веретеновидных клеток, богатой соединительнотканной стромой и низкой степенью пигментации, что нередко затрудняет диагностику [61].

Особую группу составляют Шпитц-опухоли, включающие спектр новообразований от доброкачественных невусов до злокачественных форм. Среди них выделяют Шпитц-меланому, отличающуюся наличием эпителиоидных и веретеновидных клеток и морфологическим сходством со Шпитц-невусом [102].

К акральным меланомам относится акральная лентигинозная меланома, развивающаяся на ладонях, подошвах и в области ногтевого ложа. Её

особенностями являются лентигинозный рост по базальной мембране, поздний переход к вертикальному росту и выраженная клеточная атипия [80].

К меланомам, связанным с врождёнными и голубыми невусами, относят меланому, возникающую в гигантских врождённых невусах, а также меланому, развивающуюся в голубых невусах. Эти формы встречаются реже, но характеризуются агрессивным течением и высоким риском метастазирования [107].

Отдельно выделяют меланомы слизистых оболочек и гениталий, к которым относятся первичные меланомы различной локализации, отличающиеся инвазивным ростом и крайне неблагоприятным прогнозом [126].

К меланоцитарным опухолям глаза и центральной нервной системы относятся конъюнктивальная меланома, увеальная меланома и первичная меланома ЦНС. Эти формы имеют специфические клинико-морфологические характеристики и существенно отличаются от кожных вариантов [26, 150].

Наконец, к группе нодулярных, невоидных и метастатических меланом относят нодульную меланому, которая характеризуется быстрым вертикальным ростом, высокой митотической активностью и ранним метастазированием, невоидную меланому, морфологически схожую с внутридермальными невусами, дермальную меланому, а также метастатическую меланому, проявляющуюся вторичными очагами опухолевого роста в коже и внутренних органах [50, 114].

Таким образом, современная классификация меланомы кожи учитывает как морфологические особенности, так и связь с воздействием ультрафиолетового излучения и локализацию опухоли, что позволяет более точно определять её биологический потенциал и прогнозировать клиническое течение заболевания.

Толщина опухоли по Бреслоу является одним из наиболее значимых морфологических прогностических критериев меланомы кожи. Она определяется как расстояние от зернистого слоя эпидермиса или, при наличии изъязвления, от дна язвы до наиболее глубоко расположенной опухолевой клетки. Метод был предложен A. Breslow в 1970 году и с тех пор используется во всём мире как основной морфометрический параметр при оценке меланомы [56]. В

классификации AJCC (8-е издание, 2017) толщина опухоли рассматривается как ключевой показатель при определении категории pT меланомы кожи. В соответствии с этой системой выделяют несколько градаций глубины инвазии: менее 1,0 мм; 1,01–2,0 мм; 2,01–4,0 мм; более 4,0 мм [79]. Каждое последующее увеличение толщины сопровождается достоверным ухудшением прогноза: если при минимальной инвазии пятилетняя выживаемость превышает 95 %, то при опухолях значительной толщины этот показатель снижается почти вдвое [117]. Особенно неблагоприятным признаком является сочетание выраженной глубины инвазии с изъязвлением поверхности опухоли [64]. Таким образом, толщина по Бреслоу служит фундаментальным критерием для оценки биологического потенциала меланомы, определения стадии и выбора оптимальной тактики лечения.

Классификация TNM, разработанная Американским объединённым комитетом по раку (AJCC) и принятая во всём мире, является универсальной системой стадирования меланомы кожи, позволяющей объективно оценивать прогноз заболевания и определять лечебную тактику. Восьмое издание классификации (2017) основано на результатах крупных клинических исследований и учитывает морфологические, клинические и прогностические параметры [79].

Категория T (tumor) описывает характеристики первичной опухоли и основывается главным образом на толщине по Бреслоу и наличии или отсутствии изъязвления. Толщина опухоли измеряется с точностью до сотых миллиметра и подразделяется на четыре уровня: менее 1,0 мм; от 1,01 до 2,0 мм; от 2,01 до 4,0 мм и более 4,0 мм. Для каждой из этих градаций дополнительно указывается статус изъязвления: опухоли без изъязвления обозначаются индексом «a», а изъязвленные – индексом «b». Таким образом, наличие изъязвления приводит к повышению категории T и рассматривается как независимый неблагоприятный прогностический фактор.

Категория N (nodes) отражает состояние регионарных лимфатических узлов и наличие внутрикожных метастазов. Она учитывает как число поражённых

лимфатических узлов, так и характер метастатического поражения. В классификации AJCC различают микрометастазы, выявляемые только при биопсии сторожевого лимфатического узла или гистологическом исследовании, и макрометастазы, определяемые клинически или инструментальными методами. Дополнительно в категорию N включаются спутниковые (satellite) и транзитные (in-transit) метастазы, возникающие в пределах регионарного лимфатического бассейна, но вне лимфоузлов. Увеличение количества поражённых узлов, а также наличие клинически определяемых макрометастазов и транзитных очагов переводит заболевание в более высокую категорию N и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [155].

Категория M (metastasis) характеризует наличие и локализацию отдалённых метастазов. В системе AJCC выделяют несколько подкатегорий: M1a – метастазы в кожу, подкожную клетчатку или отдалённые лимфатические узлы; M1b – метастазы в лёгкие; M1c – метастазы во внутренние органы, за исключением лёгких; M1d – метастазы в центральную нервную систему. Дополнительным параметром является уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови, отражающий метаболическую активность опухоли и прогностический риск [91]. При отсутствии повышения ЛДГ категория обозначается как (0), при его повышении – как (1), что утяжеляет стадию и свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

На основании комбинации категорий TNM выделяются стадии заболевания от 0 до IV (Таблица 1.1.). Стадия 0 соответствует меланоме in situ без признаков инвазии. Стадии I и II определяются только параметрами первичной опухоли и характеризуют локализованную меланому без поражения лимфатических узлов и отдалённых метастазов; их различие основано на толщине и статусе изъязвления. Стадия III устанавливается при вовлечении регионарных лимфатических узлов или наличии спутниковых и транзитных метастазов. Стадия IV соответствует наличию отдалённых метастазов любой локализации. Таким образом, стадирование по AJCC является ключевым инструментом стратификации риска и выбора тактики лечения,

позволяя прогнозировать течение заболевания и оценивать эффективность терапевтических подходов.

Таблица 1.1 – Классификация стадий меланомы кожи по AJCC (8-е издание, 2017)

Стадия AJCC	**Категории TNM**	**Характеристика**
0	Tis N0 M0	Меланома in situ, без инвазии
IA	T1a N0 M0	Толщина ≤ 1,0 мм, без изъязвления (Ta), узлы не поражены
IB	T1b N0 M0 или T2a N0 M0	Толщина ≤ 1,0 мм с изъязвлением (Tb) или 1,01–2,0 мм без изъязвления
IIA	T2b N0 M0 или T3a N0 M0	Толщина 1,01–2,0 мм с изъязвлением или 2,01–4,0 мм без изъязвления
IIB	T3b N0 M0 или T4a N0 M0	Толщина 2,01–4,0 мм с изъязвлением или > 4,0 мм без изъязвления
IIC	T4b N0 M0	Толщина > 4,0 мм с изъязвлением
IIIA	T1a–T1b N1a–N2a M0 или T2a N1a–N2a M0	Метастазы в регионарные лимфатические узлы и/или наличие спутниковых или транзитных метастазов
IIIB	T0 N1b–N1c M0 или T1a–T2a N1b–N2b M0 или T2b–T3a N1a–N2b M0	
IIIC	T0 N2b–N3c M0 или T1a–T3a N2c–N3c M0 или T3b–T4a N1a–N3c M0 или T4b N1a–N2c M0	
IIID	T4b N3a–N3c M0	
IV	Любой T, любой N, M1a–M1d (0/1)	Отдалённые метастазы (кожа, лимфоузлы, лёгкие, другие органы или ЦНС), с учётом уровня ЛДГ

1.4. Понятие опухолевого микроокружения

Понятие опухолевого микроокружения (tumor microenvironment, TME) играет ключевую роль в современной онкологии и отражает комплексное взаимодействие опухолевых клеток с окружающими их тканями и клеточными элементами. В отличие от традиционного представления, согласно которому рост и прогрессия опухоли определяются только внутренними генетическими изменениями клеток, концепция микроокружения подчёркивает значимость экстрацеллюлярных факторов, клеточных популяций и межклеточных взаимодействий, которые формируют условия для выживания и агрессивного поведения новообразования [8].

К основным компонентам опухолевого микроокружения относят иммунные клетки (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки), клетки сосудистого эндотелия, фибробласты и элементы стромы, а также межклеточный матрикс и сигнальные молекулы – цитокины, хемокины и факторы роста [121]. Совокупность этих элементов образует динамичную экосистему, которая может как способствовать противоопухолевому иммунному ответу, так и создавать условия для иммуносупрессии и прогрессии заболевания.

Лимфоциты занимают центральное место в регуляции противоопухолевого иммунного ответа при меланоме кожи. Среди них наиболее значимыми считаются Т-лимфоциты, которые могут оказывать как защитное, так и проопухолевое действие в зависимости от фенотипа и функционального состояния.

$CD8^+$ Т-лимфоциты распознают опухолевые антигены в комплексе с молекулами МНС класса I и способны индуцировать апоптоз опухолевых клеток посредством секреции гранзимов и перфорина, а также через Fas/FasL-зависимые механизмы [24, 86]. Высокая плотность инфильтрации $CD8^+$ Т-лимфоцитами в опухоли традиционно ассоциируется с более благоприятным прогнозом и сниженным риском метастазирования [6, 75].

$CD4^+$ Т-лимфоциты выполняют регулирующую функцию, обеспечивая активацию и пролиферацию цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов и NK-

клеток [95]. В то же время в микроокружении злокачественных опухолей часто наблюдается значительное количество Treg-клеток (регуляторных $CD4^+CD25^+FoxP3^+$), обладающих выраженным иммуносупрессивным потенциалом. Они подавляют активность эффекторных клеток, стимулируют секрецию противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF-β) и тем самым создают условия для иммунного уклонения опухоли [48, 124].

Особую роль играют также В-лимфоциты, которые могут выполнять двойственную функцию: с одной стороны, они продуцируют антитела против опухолевых антигенов и участвуют в презентации антигенов Т-лимфоцитам, с другой – при хронической активации способны поддерживать иммуносупрессивное микроокружение за счёт продукции регуляторных цитокинов и взаимодействия с Treg-клетками [140].

Наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) считается важным прогностическим и предиктивным фактором при некоторых злокачественных опухолях. Высокая степень лимфоцитарной инфильтрации часто ассоциируется с более благоприятным исходом и лучшей реакцией на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек (anti-PD-1, anti-CTLA-4), в то время как слабая или отсутствующая инфильтрация указывает на «иммунологически холодный» фенотип опухоли [49, 105]. Для оценки лимфоцитарного ответа используется морфологическая классификация TILs (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Морфологическая классификация опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs)

Вариант TILs	**Морфологическая характеристика**	**Прогностическое значение**
Brisk	Диффузная и равномерная инфильтрация лимфоцитов по всей границе опухоли с дермой и/или активное проникновение внутрь опухолевого узла	Ассоциируется с благоприятным прогнозом, снижением риска метастазирования и лучшим ответом на иммунотерапию

Таблица 1.2 – Продолжение

Вариант TILs	**Морфологическая характеристика**	**Прогностическое значение**
Non-brisk	Очаговая или фрагментарная инфильтрация лимфоцитами, ограниченная отдельными участками опухоли	Промежуточное прогностическое значение
Absent	Отсутствие выраженной лимфоцитарной инфильтрации в опухоли или наличие только единичных клеток	Ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и «иммунологически холодным» фенотипом опухоли

Такая система отражает биологический потенциал опухоли и её взаимодействие с иммунной системой: brisk-инфильтрация предсказывает лучший прогноз и меньшую вероятность метастазирования, тогда как отсутствие TILs ассоциируется с агрессивным течением заболевания [122]. Следует отметить, что показатель TILs имеет прогностическое значение не только для меланомы, но и для других злокачественных опухолей, включая рак молочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак лёгкого и рак яичников, где высокая плотность лимфоцитарной инфильтрации также коррелирует с благоприятным прогнозом и повышенной чувствительностью к иммунотерапии [22, 52, 97, 136].

Макрофаги являются одной из ключевых популяций клеток врождённого иммунитета, активно вовлечённых в формирование опухолевого микроокружения. Их функциональное состояние определяется высокой пластичностью и способностью к адаптивной перестройке своего фенотипа, что может приводить к диаметрально противоположным биологическим эффектам в ткани [15].

При активации под влиянием интерферона-γ и липополисахарида макрофаги приобретают выраженные цитотоксические свойства, характеризуются высокой экспрессией провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNF-α, IL-12), активным продуцированием реактивных форм кислорода и азота, а также способностью стимулировать эффекторные Т-лимфоциты [84]. В контексте опухолей они

реализуют свой первичный антитуморальный потенциал, способствуя уничтожению атипичных клеток и усилению локального иммунного ответа [105].

Однако под действием опухолевых факторов, таких как IL-4, IL-10 и TGF-β, макрофаги претерпевают функциональную инверсию и приобретают выраженные иммуносупрессивные свойства [13]. Они начинают секретировать противовоспалительные медиаторы, факторы ангиогенеза (VEGF), протеолитические ферменты, способствующие ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса, а также активно взаимодействуют с Treg-клетками [165]. Накопление таких измененных макрофагов в опухолевом микроокружении коррелирует с усилением неоангиогенеза, латеральной и вертикальной инвазии, метастазирования и неблагоприятным прогнозом [43].

Именно баланс между этими функциональными состояниями определяет итоговый вклад макрофагального инфильтрата в прогрессию заболевания. Сохранение исходной реактивности ассоциируется с эффективным противоопухолевым контролем стромы, тогда как индуцированная опухолью функциональная перестройка клеток отражает проопухолевый характер микроокружения [162]. Современные морфологические и иммуногистохимические исследования подтверждают, что подобная негативная эволюция функционального профиля макрофагов напрямую связана с более агрессивным течением опухолей и снижением выживаемости пациентов [92].

Тучные клетки являются важным компонентом врождённого иммунитета и активно вовлекаются в формирование опухолевого микроокружения. Они локализуются преимущественно в периваскулярных зонах и вблизи границы опухоли, играя двойственную роль в регуляции роста и прогрессии опухолей [30, 71]. Ключевыми медиаторами их физиологической активности являются специфические протеазы – триптаза, химаза и карбоксипептидаза А3, а также гистамин, цитокины и факторы роста, которые оказывают разнонаправленное воздействие на опухолевые клетки и стромальные элементы [37, 71, 90].

С одной стороны, выделение воспалительных цитокинов и протеаз тучными клетками приводит к торможению опухолевого роста, что усиливает

противоопухолевый иммунный ответ [85, 146]. В частности, высокая плотность инфильтрации ткани химаза-позитивными тучными клетками ассоциируется с индукцией локальных противоопухолевых механизмов и служит благоприятным прогностическим фактором при ряде солидных новообразований, включая карциномы различных локализаций [118, 119]. С другой стороны, высокая плотность триптаза-позитивных клеток может способствовать ангиогенезу, ремоделированию стромы и созданию иммуносупрессивной среды, что усиливает инвазивные свойства злокачественных опухолей и повышает риск метастазирования [109].

Противоречивый характер функциональной гетерогенности тучных клеток находит свое подтверждение и при анализе микроокружения многих солидных новообразований. Так, при раке молочной железы высокая плотность триптаза-позитивных тучных клеток ассоциируется с усилением ангиогенеза и неблагоприятным прогнозом, в то время как наличие химаза-позитивных клеток может коррелировать с более благоприятным течением заболевания [133]. В случае колоректального рака накопление тучных клеток в строме опухоли сопровождается активацией ангиогенеза и ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса, что способствует инвазии и метастазированию [85]. При раке поджелудочной железы тучные клетки рассматриваются как важный источник факторов роста и протеаз, формирующих десмопластическую реакцию, которая создаёт благоприятные условия для опухолевой прогрессии [110]. Аналогичные данные получены и при немелкоклеточном раке лёгкого, где количество тучных клеток положительно коррелирует с выраженностью ангиогенеза и агрессивностью опухоли [160].

Таким образом, опухолевое микроокружение представляет собой сложную иерархическую систему, включающую клетки иммунной системы, стромальные элементы и гуморальные факторы. Роль каждого компонента зависит от контекста: одни субпопуляции лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток могут обеспечивать эффективный противоопухолевый иммунный ответ, тогда как другие создают условия для иммуносупрессии, ангиогенеза и метастазирования. Изучение этих механизмов имеет принципиальное значение не только для понимания

канцерогенеза меланомы кожи, но и для разработки новых прогностических маркеров и терапевтических стратегий, направленных на модуляцию микроокружения.

1.5. Иммунные клетки в опухолевом микроокружении меланомы

Иммунная система играет ключевую роль в формировании опухолевого микроокружения, определяя баланс между противоопухолевыми и проопухолевыми механизмами. При меланоме кожи именно клетки иммунного ответа составляют наиболее значимый компонент опухолевого микроокружения, оказывая разнонаправленное влияние на рост, инвазию и метастазирование опухоли [143]. С одной стороны, эффекторные популяции лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток обеспечивают иммунологический надзор, распознавание и элиминацию трансформированных клеток. С другой стороны, те же самые клеточные элементы при изменении фенотипа или хронической активации могут формировать иммуносупрессивную среду, способствующую опухолевой прогрессии [164].

Особое внимание в архитектуре опухолевого микроокружения меланомы кожи уделяется фенотипическому составу опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs), макрофагов и тучных клеток, определяющих локальный ангиогенез и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса [151]. В современной онкоморфологической практике стандартизированная оценка паттернов инфильтрации TILs (brisk, non-brisk, absent) служит важнейшим независимым прогностическим фактором [23]. Однако контролирующая функция TILs ограничена развитием синдрома Т-клеточного истощения (T-cell exhaustion), ассоциированного с хронической антигенной стимуляцией и прогрессирующей ко-экспрессией иммунных чекпоинтов (PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT), что приводит к потере лимфоцитами цитолитической активности и способности к секреции IFN-γ [60]. Понимание этой пространственно-фенотипической гетерогенности TILs легло в основу персонализированного подбора не только стандартной контрольной

терапии (anti-PD-1, anti-CTLA-4), но и инновационных протоколов адаптивной клеточной терапии. В частности, применение препарата лифилейцел основано на ex vivo экспансии и реактивации именно тех жизнеспособных поликлональных TILs, которые были экстрагированы из микроокружения резецированной опухоли, что позволяет обойти локальные механизмы иммуносупрессии при распространенных формах меланомы [10, 99].

Следует подчеркнуть, что комплексный анализ пространственной архитектоники и функционального профиля клеток локального иммунного ландшафта позволил верифицировать систему предиктивных биомаркеров меланомы кожи. Ключевое прогностическое значение имеет не только абсолютная плотность инфильтрации стромы $CD8^+$ цитотоксическими лимфоцитами, но и топографический индекс иммуносупрессии – соотношение эффекторных $CD8^+$ клеток к $FoxP3^+$ регуляторным Т-лимфоцитам, а также градиент распределения функциональных пулов макрофагов и протеазный фенотип тучных клеток [31]. При этом, если стандартизированная морфологическая оценка TILs уже валидирована международными консенсусами, интегрирована в протоколы патогистологического заключения и повсеместно рассматривается как независимый критерий прогноза и ответа на терапию [137], то параметры пространственного распределения макрофагов и профиль специфических протеаз тучных клеток пока остаются предметом активных исследований. Определение топографии данных клеточных популяций может рассматриваться как перспективный инструмент для разработки иммуногистохимических панелей персонализированной прогностической оценки.

Лимфоциты представляют собой центральное звено противоопухолевого иммунного ответа, и их количественный и качественный состав в опухолевом микроокружении (tumor microenvironment, TME) меланомы во многом определяет течение заболевания. Среди них особую роль играют Т-лимфоциты, В-клетки и специализированные субпопуляции регуляторных клеток [159].

Главным эффекторным звеном адаптивного противоопухолевого ответа в локальном микроокружении меланомы кожи выступают $CD8^+$ цитотоксические Т-

лимфоциты (CTLs). Помимо классического механизма индуцированного апоптоза меланомных клеток через MHC-I-опосредованное распознавание антигенов и секрецию цитолитических молекул [153], принципиальное значение имеет субпопуляционная архитектоника данного инфильтрата. Современные данные указывают, что ключевую роль в долгосрочном локальном контроле опухоли играют тканевые резидентные Т-клетки памяти (Trm), характеризующиеся экспрессией интегринов $CD103^+$ и $CD49a^+$ [116]. Именно высокая плотность инфильтрации стромы и эпидермального пласта $CD103^+CD8^+$ Trm-клетками, способными к быстрой локальной пролиферации и продукции ключевых хемокинов, коррелирует с блокированием вертикальной инвазии, снижением гематогенной диссеминации и выраженным предиктивным ответом на чекпоинт-ингибиторы [125, 128].

Функциональная роль $CD4^+$ Т-хелперов в микроокружении меланомы кожи выходит за рамки классической регуляции пролиферации эффекторных популяций и характеризуется высокой степенью фенотипической пластичности. Вместо фиксированной поляризации на Th1-, Th2- и Th17-подтипы, современные исследования рассматривают $CD4^+$ лимфоциты как пластичные координаторы пространственной архитектуры TME [45]. Помимо прямой поддержки цитотоксической функции $CD8^+$ Т-клеток посредством секреции IFN-γ и IL-2, специфические субпопуляции фолликулярных Т-хелперов (Tfh) играют критическую роль в инициации и созревании перитуморальных третичных лимфоидных структур (TLS) [78]. Способность $CD4^+$ Т-клеток модулировать экспрессию хемокинов CXCL13 и CCL19 определяет степень пространственной организации TME, трансформируя диффузную иммунную инфильтрацию в высокоорганизованные фокусы локального иммунного надзора, что ассоциировано со значительным увеличением общей выживаемости пациентов [77].

Регуляторные Т-клетки (Treg, характеризующиеся фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) реализуют супрессивный потенциал в микроокружении меланомы кожи посредством каскада синергичных молекулярных механизмов. Помимо классической секреции ингибиторных цитокинов (IL-10, TGF- β),

критическое значение в формировании зоны локальной анергии эффекторных лимфоцитов имеет метаболическое перепрограммирование TME, осуществляемое Treg-клетками [161]. Экспрессируемые на мембране регуляторных клеток эктонуклеотидазы CD39 и CD73 обеспечивают быструю деградацию внеклеточного АТФ с накоплением аденозина, который через пуринергические рецепторы A2AR напрямую блокирует цитолитическую активность $CD8^+$ CTLs и NK-клеток [158]. Дополнительным фактором уклонения опухоли от иммунного надзора служит конститутивная гиперэкспрессия клетками Treg альфа-цепи рецептора IL-2 (CD25) [103]. Обладая экстремально высоким сродством к интерлейкину-2, Treg-клетки выступают в роли конкурентного «абсорбента» данного цитокина, вызывая метаболическое истощение и последующий апоптоз пролиферирующих эффекторных клонов в перитуморальной зоне [141].

Функциональный дуализм В-лимфоцитов в опухолевом микроокружении меланомы кожи определяется особенностями их пространственной компартментализации и гетерогенностью дифференцировки. Противоопухолевый потенциал В-клеток наиболее полно реализуется при их локализации в составе зрелых перитуморальных третичных лимфоидных структур (TLS), где они формируют герминативные центры [62]. В этой пространственной нише В-лимфоциты функционируют как высокоэффективные антигенпрезентирующие клетки, обеспечивая локальную пролиферацию и клональную экспансию опухолеспецифичных $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, что ассоциировано с выраженным клиническим ответом на ингибиторы иммунных контрольных точек [76]. Напротив, в условиях диффузной инфильтрации стромы опухоли значительная популяция В-клеток подвергается альтернативному перепрограммированию с формированием супрессивного фенотипа (Breg) [63]. Реализуя проопухолевую активность, Breg-клетки посредством координированной секреции IL-10 и трансформирующего ростового фактора-бета TGF-β) не только ингибируют эффекторные звенья иммунитета, но и выступают индукторами конверсии наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов в регуляторные $FoxP3^+$ Treg-клетки, потенцируя локальную иммуносупрессию [34].

1.6. Заключение по обзору литературы

Таким образом, данные литературы показывают, что опухолевая прогрессия во многом основана на аберрантной реактивации консервативных эмбриональных программ. Комплексная оценка архитектоники и плотности расположения инфильтрации ткани неметастатической меланомы кожи I и II стадий $CD8^+$ Т-лимфоцитами, $CD68^+$ макрофагами и триптаза-позитивными тучными клетками позволяет реконструировать механизмы, посредством которых опухоль нейроэктодермального генеза формирует микроокружение, имитирующее эмбриональный гистогенез. В этой патогенетической модели исследуемые клеточные пулы реализуют разграниченные функции: $CD68^+$ макрофаги совмещают про-морфогенетическую активность (структурная перестройка и стимуляция миграции) и иммуносупрессивный статус (подавление цитотоксического ответа), воспроизводя свойства эмбриональных макрофагов; Триптаза-позитивные тучные клетки осуществляют паракринную модуляцию стромы через секрецию протеаз, запускающих ангиогенез и ремоделирование матрикса; $CD8^+$ Т-лимфоциты обеспечивают эволюционно консервативный противоопухолевый надзор для сохранения тканевого гомеостаза. Системный анализ этих популяций на ранних стадиях заболевания позволяет рассматривать опухолевый рост как модель дисрегуляции эмбриональных процессов. Это имеет принципиальное значение для разработки принципиально новых терапевтических стратегий, нацеленных на «эмбриональные» уязвимости опухоли.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование выполнено на базе Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (Молекулярной морфологии) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

2.1. Характеристика биоматериала исследования

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 года, 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.)»;

Операционный материал получали в патологоанатомическом отделении МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России (за представление материала для исследования выражаем признательность заведующему патологоанатомического отделения МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России Гриневичу Вячеславу Николаевичу).

Критерии исключения во всех группах: проведенная ранее противоопухолевая терапия, наличие регионарных и отдаленных метастазов или рецидив заболевания, первично-множественный рак (синхронный или метахронный), инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания.

Проведение настоящего исследования одобрено комитетом по Этике РУДН (выписка из протокола №3 от 10 марта 2026 года).

2.2. Методы исследования

Морфологическое исследование операционного материала кожи проводили на базе Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (Молекулярной морфологии) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Методы исследования:

1) гистологический;

2) гистохимический;

3) иммуногистохимический, включая мультиплексные дизайны окрашивания

4) статистический.

2.2.1. Гистологическое исследование

Для проведения гистологического анализа фрагменты кожи обрабатывались с использованием аппарата для гистологической проводки тканей фирмы «Leica Biosystems» (Германия). Сначала образцы обезвоживались в спиртовых растворах с повышающейся концентрацией (50%, 60%, 70%, 80%, 96% и абсолютный спирт),

затем проводились этапы просветления в ксилоле, и выдерживались при температуре +37℃ в насыщенном парафиновом растворе в ксилоле, после чего помещались в парафин, разогретый до +56℃. Далее материал заливался в смесь парафина и воска, образуя парафиновые блоки. Из этих блоков с помощью автоматического ротационного микротома (Leica RM 2255, Германия) нарезались серийные срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивались гематоксилином Майера и эозином или использовались для гистохимических и иммуногистохимических исследований на специально подготовленных предметных стеклах.

При включении в исследование для достоверности полученных результатов проводили тщательный анализ медицинской документации пациентов с целью исключения проведения противоопухолевой терапии, наличия метастазов, первично-множественного рака, инфекционных и аутоиммунных заболеваний.

У всех пациентов основной группы (n = 73), согласно данным медицинской документации, диагноз: Основное заболевание – меланома кожи I и II стадии по AJCC (8-е издание, 2017), верифицированная гистологически. Сопутствующая соматическая патология учитывалась, но не оказывала влияния на результаты исследования.

2.2.2. Гистохимическое исследование

Для определения тучных клеток использовали гистохимическое окрашивание толуидиновым синим (ErgoProduction LLC, Санкт-Петербург, Россия) согласно протоколу производителя, при этом цитоплазматические гранулы тучных клеток обладали метахромазией и были хорошо заметны на фоне других неокрашенных тканевых компонентов.

2.2.3. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили в ручном режиме, используя первичные антитела (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Антитела, использованные в работе

Антитела	Клон	Номер по каталогу	Разведение
CD8	SP16	ab101500	1:1000
CD68	514H12	ab303565	1:1000
Tryptase	AA1	ab2378	1:4000/1:8000
S100	4C4.9	760-2523	Готовое к применению (Ready-to-Use)
Melan-A/MART-1	A103	790-2990	Готовое к применению (Ready-to-Use)
HMB-45	HMB45	790-4366	Готовое к применению (Ready-to-Use)

Количественная оценка иммунопозитивных клеток проводилась путём подсчёта их числа в «горячих точках» (hotspot areas). На первом этапе при малом увеличении микроскопа (×40 – 100) с использованием программы QuPath v 0.6.0. определяли участки с наибольшей плотностью клеточной инфильтрации. В зависимости от размера очага для подсчёта выбирали от трёх до пяти «горячих точек»: три – в случае небольших поражений и пять – при более обширных опухолевых зонах. Подсчёт клеток проводили как в интратуморально, так и в перитуморальной строме. После чего фиксировали количество иммунопозитивных клеток в каждом выбранном поле на увеличении x400. Итоговый показатель для каждого образца рассчитывали как среднее значение по всем проанализированным «горячим точкам». Для верификации меланоцитарных маркеров (S100, Melan-A/MART-1, HMB-45) использовался полуколичественный метод с подсчетом

процентного соотношения (доли) позитивно окрашенных атипичных меланоцитов ко всему пулу опухолевых клеток в пределах диагностических зон.

2.2.4. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование

Мультиплексное иммунофлуоресцентное окрашивание было выполнено с использованием набора Opal™ 7-color Multiplex IHC Kit (Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA) в соответствии с протоколом производителя. После депарафинизации и регидратации проводили извлечение антигенов в буфере R-UNIVERSAL Epitope Recovery Buffer (Aptum Biologics Ltd., Southampton, UK) при температуре 95 °C в течение 30 минут. Блокирование эндогенных Fc-рецепторов перед инкубацией с первичными антителами не проводилось в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями [58]. При необходимости выполнялось ингибирование эндогенной пероксидазы.

В первом цикле окрашивания срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к триптазе (Mouse monoclonal, Abcam, ab2378, 1:4000), затем обрабатывали полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP в течение 30 минут, после чего проводили инкубацию с флуорофором Opal 488 в течение 10 минут. Связанные первичные и вторичные антитела разрушали повторным кипячением в буфере R-UNIVERSAL при 95 °C для предотвращения перекрёстных реакций в последующих циклах. Во втором цикле окрашивания процедура повторялась с антителами к CD8 (Rabbit monoclonal, Abcam, ab101500, 1:100) с применением Opal Anti-Ms + Rb HRP и последующей инкубацией с Opal 555. В третьем цикле окрашивания срезы инкубировали с антителами к Melan-A (Rabbit monoclonal, Abcam, ab210546, 1:100), с последующим применением Opal 647. После завершения всех циклов ядра окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, 5 μg/mL, 5 мин) и заключали препараты в ProLong™ Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Для контроля специфичности окрашивания использовались срезы без первичных антител и варианты с заменой первичных антител на изотипический контроль (IgG того же вида и концентрации, Dianova, Hamburg, Germany).

Отсутствие окрашивания в контрольных срезах подтверждало специфичность реакции.

Микроскопию и мультиплексную визуализацию проводили на микроскопе ZEISS AxioImager.Z2 (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany), оснащённом объективами Zeiss Plan-Apochromat 100×/1.46 Oil DIC M27 и 150×/1.35 Glyc DIC Corr M27, с использованием цифровых камер Axiocam 712 color и 712 mono. В отдельных случаях использовался конфокальный микроскоп Nikon D-Eclipse C1 Si на базе платформы Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). Для визуализации мультиплексных флуоресцентных срезов применялась система Mantra 2 Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA).

Количественный анализ проводился на всех срезах опухоли. Планиметрический анализ включал подсчёт количества тучных клеток (ТК), $CD8^+$-лимфоцитов, Melan-A^+-клеток и стромальных элементов на единицу площади (мм²), оценку относительного и абсолютного содержания ТК, а также анализ профиля специфических протеаз тучных клеток. Анализ выполнялся в программе QuPath v0.6.0 [41]. После сканирования всего гистологического среза с помощью цифрового флуоресцентного сканера KF-FL-005 (Ningbo, Zhejiang, China), ScanScope CS (Leica Biosystems, IL, USA) и системы Mantra 2 изображения подвергались автоматическому распознаванию ядер с использованием расширения Stardist [138]. Порог интенсивности по каналу DAPI задавался с помощью классификатора пикселей, обученного на экспертной разметке. Классификация клеточных фенотипов осуществлялась с применением нейросетевого алгоритма, обученного на точечных аннотациях, с последующей итеративной верификацией специалистом. Автофлуоресценция минимизировалась с использованием специализированного набора реагентов и оптимизации экспозиции при сканировании.

Ко-локализация клеток определялась по расстоянию между центрами ядер с учётом длин полуосей: менее 10 мкм – юкстакринное взаимодействие (контактирующие клетки), 10 – 20 мкм – паракринная зона, более 20 мкм –

отсутствие взаимодействия. Минимальное расстояние, соответствующее сумме длин полуосей ядер, составляло ≤10 мкм. Результаты каждого этапа анализировались и при необходимости корректировались вручную. Количественные данные экспортировались из QuPath v0.6.0 в SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная) для последующей статистической обработки и визуализации.

2.2.5. Статистические методы

Для статистического анализа данных использовались программные пакеты SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США), 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) с последующим post-hoc тестом Тьюки для выявления значимых межгрупповых различий. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клиническая характеристика

Клинический анализ проведён на 73 пациентах с верифицированной меланомой кожи I и II стадии по классификации Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer 8th ed., 2017 г.). Всем пациентам (n=73) было выполнено широкое иссечение меланомы кожи с реконструктивно-пластическим компонентом в соответствии с клиническими рекомендациями.

Средний возраст пациентов составил около 63 лет. В выборке отмечено преобладание женщин. Наиболее часто меланома локализовалась на коже конечностей и туловища, реже – на коже головы и шеи.

Всем пациентам основной группы было выполнено широкое иссечение меланомы кожи с реконструктивно-пластическим компонентом (Таблица 3.1). Для морфологического исследования использовали операционный материал, представленный кожным лоскутом с опухолевым образованием (Рисунок 3.1.). После фиксации материала проводилась стандартная патологоанатомическая вырезка для последующего гистологического исследования.

Таблица 3.1 – Общая характеристика пациентов с меланомой кожи

Характеристика	**Критерий**	**Количество (n)**
Возраст	46 – 81	
Средний возраст	63,2 ± 5,1	
Пол	Мужчины	29
	Женщины	44
Локализация меланомы кожи	Голова и шея	14
	Туловище	20
	Верхние конечности	19
	Нижние конечности	20

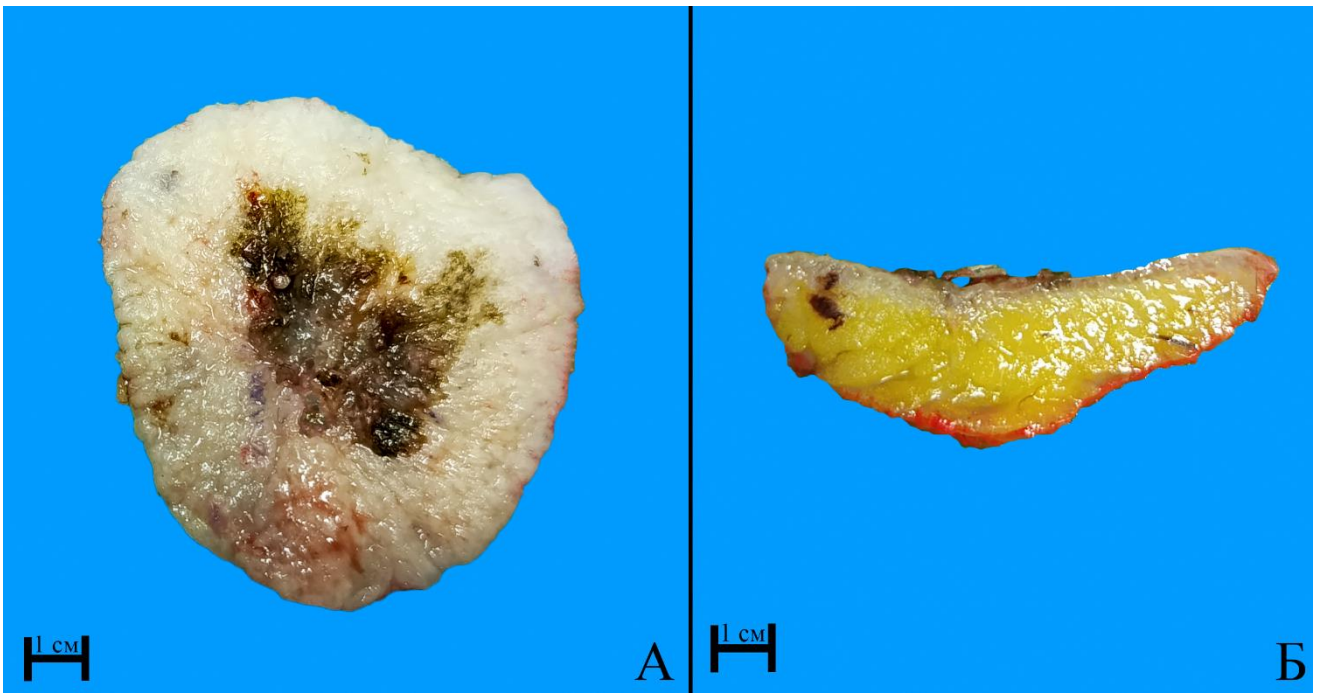


Рисунок 3.1 – Операционный материал, макроскопичсекая характеристика. А – кожный лоскут с меланомой; Б – фрагмент, отобранный для последующего гистологического исследования

3.2. Морфологическая характеристика меланомы кожи

Морфологический анализ показал, что все случаи неметастатической меланомы кожи I и II стадий были представлены поверхностно-распространяющейся и узловой формами меланомы (Таблица 3.2). Поверхностно-распространяющаяся меланома характеризовалась преобладанием радиальной фазы роста, выраженной клеточной атипией, нерегулярной пигментацией и наличием участков регрессии (Рисунок 3.2).

Таблица 3.2 – Морфологическая характеристика меланомы кожи

Характеристика	Кол-во пациентов
Гистологический тип	
Поверхностно-распространяющаяся	31
Узловая	42
Толщина по Бреслоу	
<0,8–1,0 мм	29

Таблица 3.2 – Продолжение

Характеристика	**Кол-во пациентов**
>1,0–2,0 мм	9
>2,0–4,0 мм	12
>4,0 мм	23
Категория pT	
pT1a	21
pT1b	6
pT2a	6
pT2b	5
pT3a	7
pT3b	5
pT4a	9
pT4b	14
Уровень инвазии по Кларку	
I	13
II	22
III	14
IV	20
V	4
Стадия AJCC	
IA	23
IB	10
IIA	12
IIB	14
IIC	14

Узловая меланома отличалась преимущественно вертикальным ростом, быстрым формированием опухолевых узлов, высокой митотической активностью и частыми признаками изъязвления (Рисунок 3.3).

Опухолевые клетки в исследованных случаях демонстрировали широкий спектр морфологических особенностей: от эпителиоидных до веретеновидных форм, с гиперхромными ядрами, крупными ядрышками и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. В узловых формах преобладала анаплазия и значительное количество митозов, включая патологические.

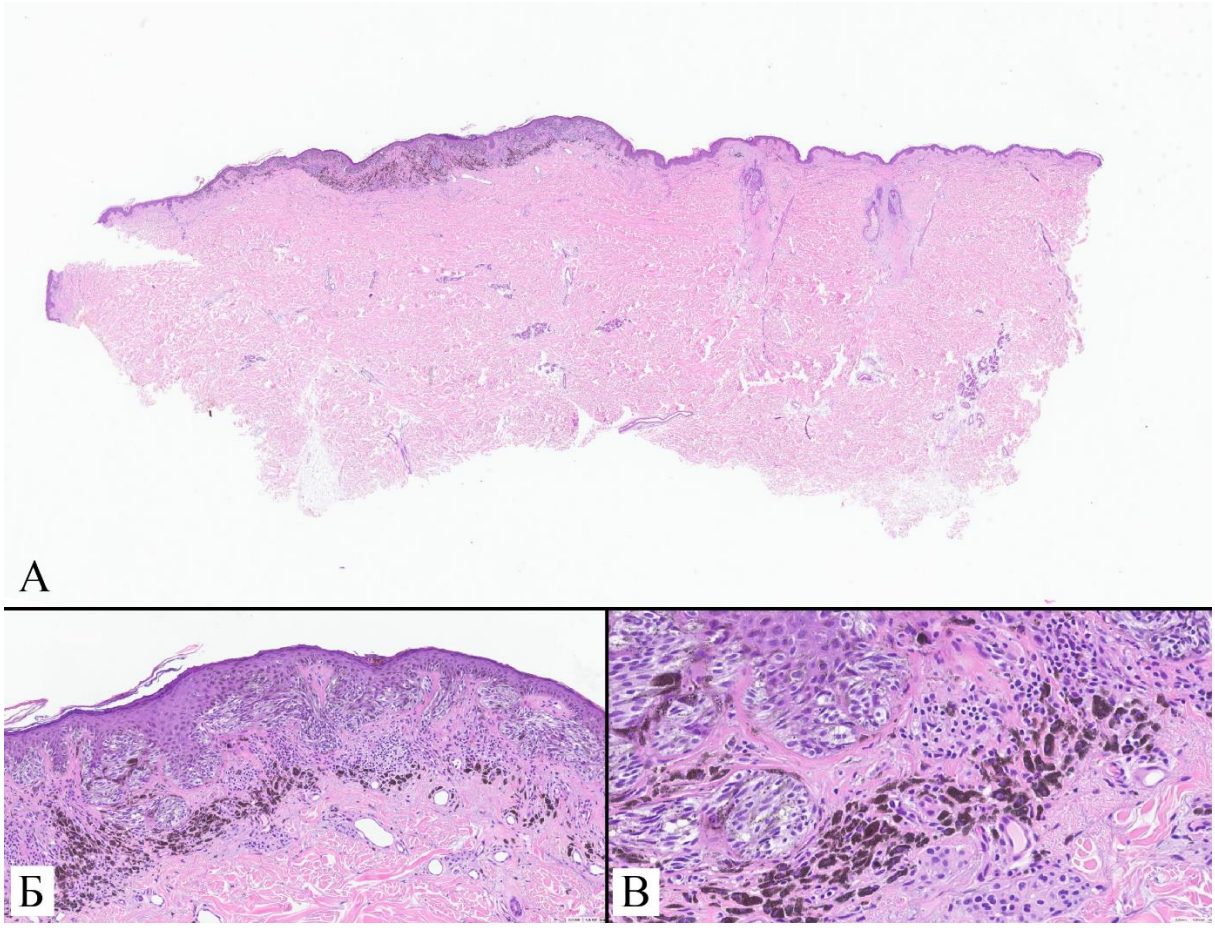


Рисунок 3.2 – Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,7 мм, II уровень инвазии по Кларку, pT1a. Окраска: гематоксилин и эозин. А – гистоскан; Б – ув. ×200; В – ув. ×400

Распределение по толщине опухоли по Бреслоу охватывало все основные градации – от минимальной инвазии менее 1 мм до опухолей более 4 мм. Анализ категории pT показал наличие всех подгрупп от pT1a до pT4b (Таблица 3.2).

При изучении инвазии по Кларку были выявлены все уровни инвазии: от ограниченного поражения в пределах эпидермиса и сосочкового слоя дермы до вовлечения сетчатого слоя дермы и подкожно-жировой клетчатки. Более поверхностные уровни чаще ассоциировались с поверхностно-распространяющимися формами меланомы, тогда как более глубокие уровни чаще встречались при узловом типе (Таблица 3.2).

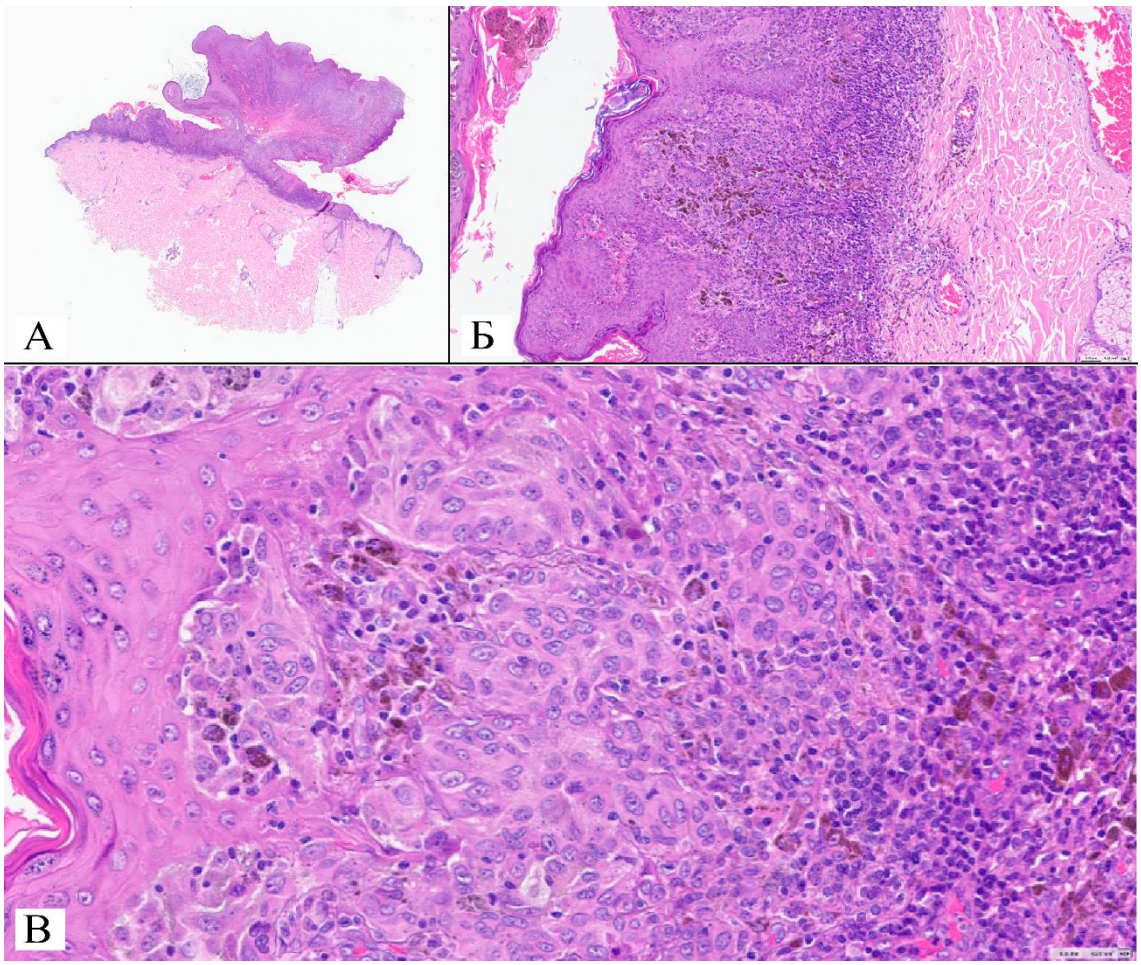


Рисунок 3.3 – Узловая меланома кожи IIA стадии, толщина по Бреслоу 3,5 мм, III уровень инвазии по Кларку, pT3a. Окраска: гематоксилин и эозин. А – гистоскан; Б – ув. ×200; В – ув. ×400

3.3. Сравнительная характеристика меланоцитарных маркеров

В рамках исследования проведена иммуногистохимическая оценка экспрессии маркеров HMB-45, Melan-A/MART-1 и S100 в образцах неметастатической меланомы кожи I и II стадий AJCC.

Маркеры S100 и Melan-A/MART-1 демонстрировали стабильное окрашивание независимо от толщины инвазии: доля S100-позитивных атипичных меланоцитов варьировала в узких пределах (от 89,8% до 89,9%), Melan-A/MART-1 – от 75,3% до 83,3%, без статистически значимых различий между группами с толщиной <1 мм (pT1), 1–2 мм (pT2), 2–4 мм (pT3) и >4 мм (pT4). В отличие от них, экспрессия HMB-45 пропорционально увеличивалась с ростом толщины инвазии:

процент HMB-45-позитивных атипичных меланоцитов возрастал от 41,9% при толщине <1 мм до 86,2% при толщине >4 мм (табл. 3.3, рис. 3.4, 3.5).

Таблица 3.3 – Морфологическая характеристика меланомы кожи

Стадия AJCC	**Толщина по Breslow, мм**	**Категория pT**	**S100, %**	**Melan-A, %**	**HMB-45, %**
I	< 1,0	pT1	89,8	75,3	41,9
	1,1–2,0	pT2	90,1	78,2	68,7
II	2,1–4,0	pT3	89,8	81,6	80,8
	> 4,0	pT4	89,9	83,3	86,2

Примечание – Приведены доли (%) позитивных атипичных меланоцитов по каждому маркеру.

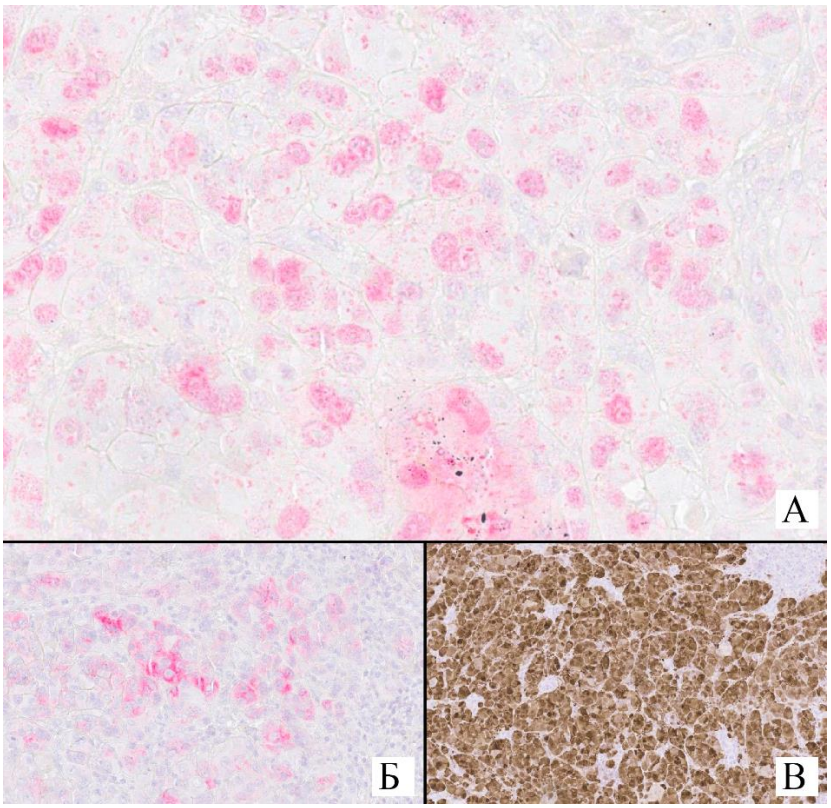


Рисунок 3.4 – Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи IB стадии, толщина по Бреслоу 1,3 мм, III уровень инвазии по Кларку, pT2a. Методика: иммуногистохимическое окрашивание: А – Melan-A, система детекции ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (красное окрашивание), ув. ×400; Б – HMB-45, система детекции ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (красное окрашивание), ув. ×200; В – S100, система детекции ultraView Universal DAB Detection Kit (коричневое окрашивание), ув. ×400

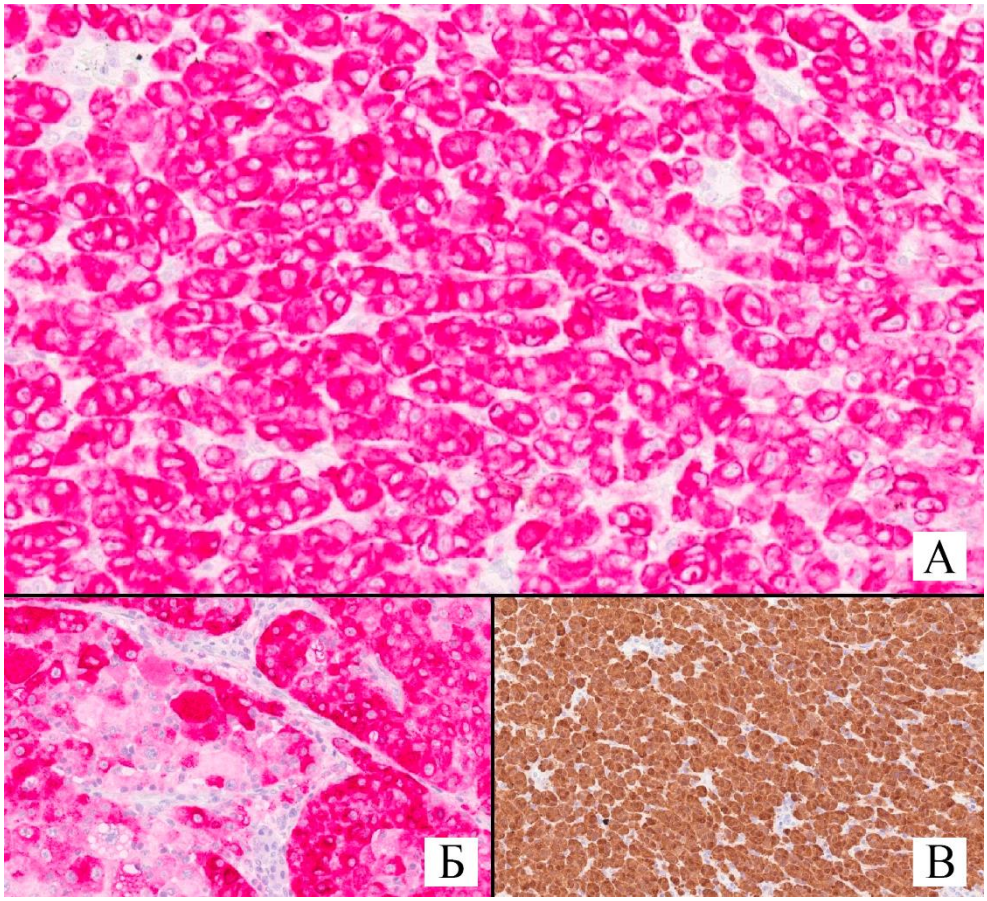


Рисунок 3.5 – Узловая меланома IIA стадии, толщина по Бреслоу 2,4 мм, IV уровень инвазии по Кларку, pT3a. Методика: иммуногистохимическое окрашивание: А – Melan-A, система детекции ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (красное окрашивание), ув. ×200; Б – HMB-45, система детекции ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (красное окрашивание), ув. ×400; В – S100, система детекции ultraView Universal DAB Detection Kit (коричневое окрашивание), ув. ×200

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

Для анализа инфильтрации лимфоцитов в опухолевую ткань и окружающие ее структуры проведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к CD8. CD8-положительные лимфоциты определялись как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах опухоли.

При оценке зависимости их содержания от толщины меланомы по Бреслоу установлено, что для интратуморальных лимфоцитов статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Среднее число $CD8^+$-клеток составило 5,1 при толщине <1,0 мм и 9,2 при толщине >4,0 мм, что превышало значения группы сравнения, однако достоверной динамики не зафиксировано. В перитуморальной зоне закономерности оказались более выраженными. Так, количество $CD8^+$-лимфоцитов было максимальным при толщине <1,0 мм (214,6 клеток) и снижалось до 70,3 клеток при толщине >4,0 мм ($p <0,001$; Таблица 3.4; Рисунок 3.6, 3.7). Таким образом, основным изменением является достоверное уменьшение числа перитуморальных $CD8^+$-клеток, тогда как показатели интратуморальных лимфоцитов остаются относительно стабильными.

Таблица 3.4 – Количество $CD8^+$-лимфоцитов в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу (M ± SD)

Группа / Толщина по Бреслоу	**<0,8–1,0 мм**	**>1,0–2,0 мм**	**>2,0–4,0 мм**	**>4,0 мм**
Интратуморальные $CD8^+$-лимфоциты	5,1 ± 2,4	7,2 ± 3,6	10,2 ± 4,2	9,2 ± 2,4
Перитуморальные $CD8^+$-лимфоциты	214,6 ± 38,3	154,8 ± 36,3	118,2 ± 20,1	70,3 ± 13,1

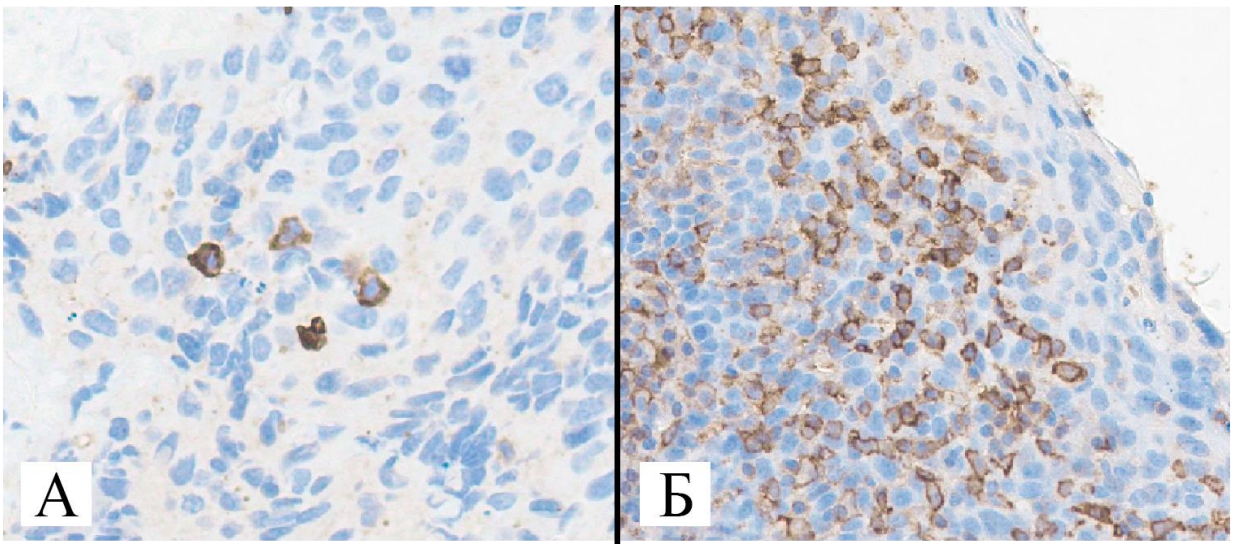


Рисунок 3.6 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,4 мм (pT1b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD8, ядра контрастированы гематоксилином. А – интратуморальная зона, увелич. ×400; Б – перитуморальная зона, увелич. ×200

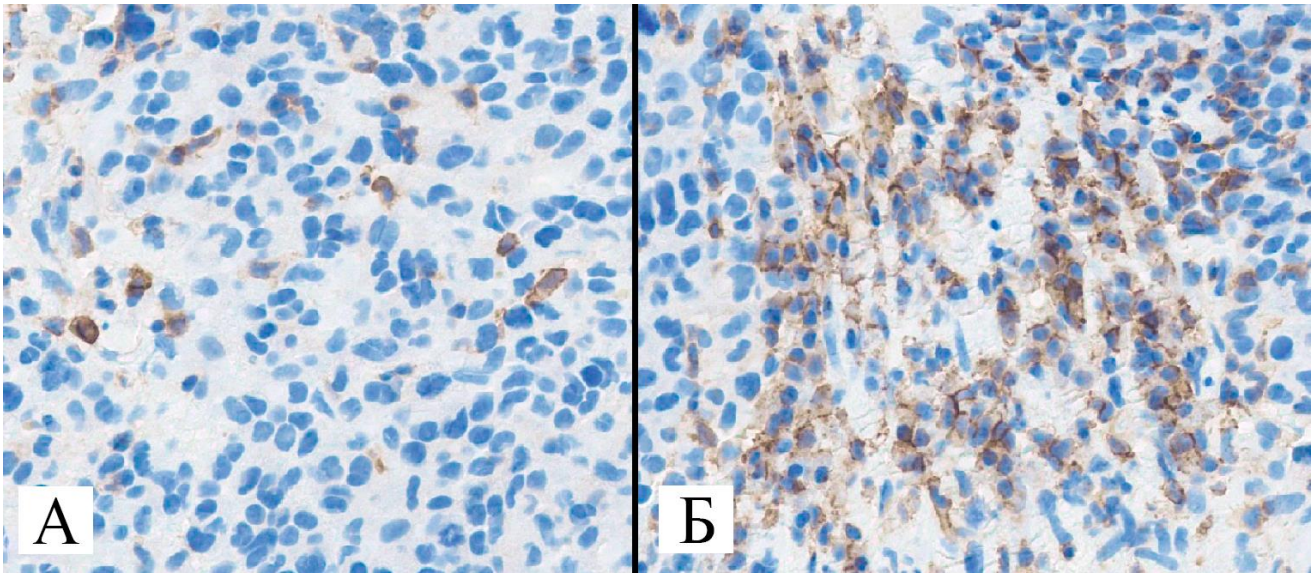


Рисунок 3.7 – Меланома кожи IIB стадии, толщина по Бреслоу 4,3 мм (pT4a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD8, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

Подробный анализ распределения иммунокомпетентных клеток в зависимости от категории Т первичного опухолевого очага (pT) позволил выявить разнонаправленные тенденции в изучаемых гистологических зонах.

Оценка интратуморальной инфильтрации показала, что содержание $CD8^+$-лимфоцитов непосредственно в толще опухолевой ткани не демонстрировало статистически достоверных различий на разных стадиях локального распространения процесса: количественные показатели $CD8^+$-клеток варьировали в узком диапазоне – от 5,3 клеток в поле зрения при категории pT1a до 6,1 клеток при категории pT4b ($p > 0,05$).

Напротив, при исследовании перитуморальной зоны были зафиксированы существенно более выраженные динамические изменения плотности расположения популяции лимфоцитов, которые демонстрировали четкую ассоциацию с деструктивными процессами в эпителиальном покрове, а именно с наличием изъязвления опухоли. В частности, у пациентов с категорией pT1a среднее количество перитуморальных $CD8^+$-лимфоцитов составляло 234,4 клеток, в то время как при прогрессировании процесса до категории pT4b наблюдалось их

высокодостоверное падение до уровня 72,4 клеток ($p < 0,001$; Таблица 3.5; Рисунки 3.8, 3.9).

Обобщая полученные морфометрические данные, можно сделать вывод о том, что именно наличие изъязвления первичной опухоли выступает ключевым патогенетическим фактором, детерминирующим угнетение перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации.

Таблица 3.5 – Количество CD8-лимфоцитов в зависимости от категории pT (M ± SD)

pT категория	**Интратуморальные $CD8^+$-лимфоциты**	**Перитуморальные $CD8^+$-лимфоциты**
pT1a	5,1 ± 2,4	234,4 ± 22,3
pT1b	5,4 ± 2,1	162,8 ± 11,6
pT2a	6,7 ± 2,7	179,2 ± 23,1
pT2b	7,2 ± 3,1	128,7 ± 17,9
pT3a	5,6 ± 2,1	130,1 ± 19,5
pT3b	7,9 ± 2,8	101,8 ± 17,6
pT4a	6,4 ± 2,3	81,7 ± 10,8
pT4b	5,9 ± 1,9	63,1 ± 13,4

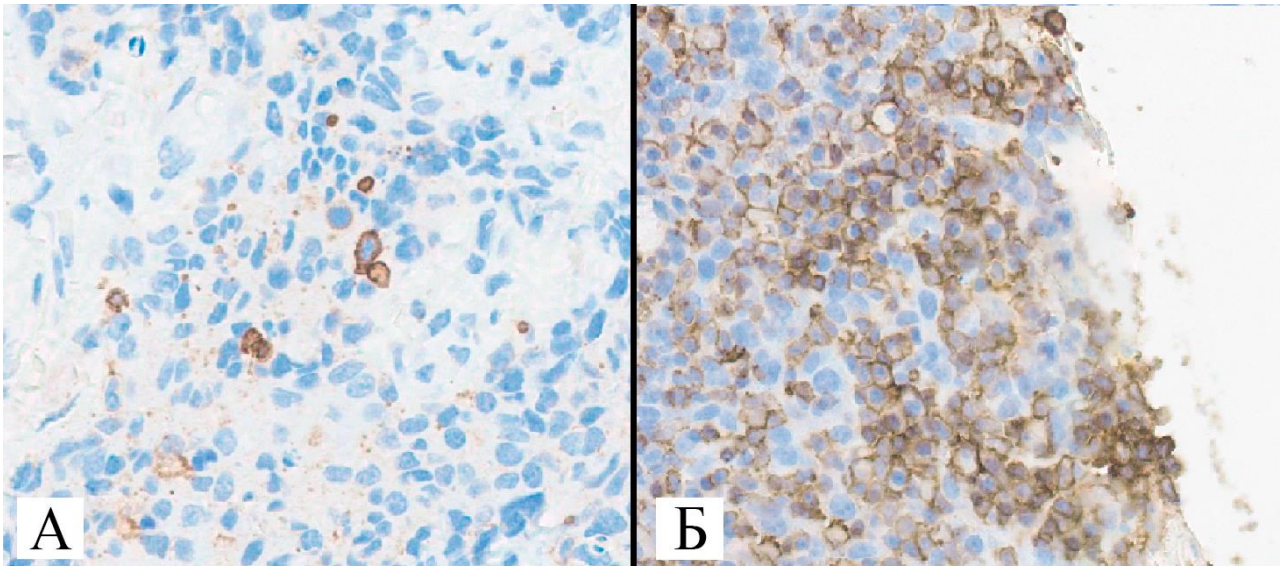


Рисунок 3.8 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,6 мм (pT1a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD8, ядра контрастированы гематоксилином. А – интратуморальная зона, увелич. ×400.; Б – перитуморальная зона, увелич. ×200

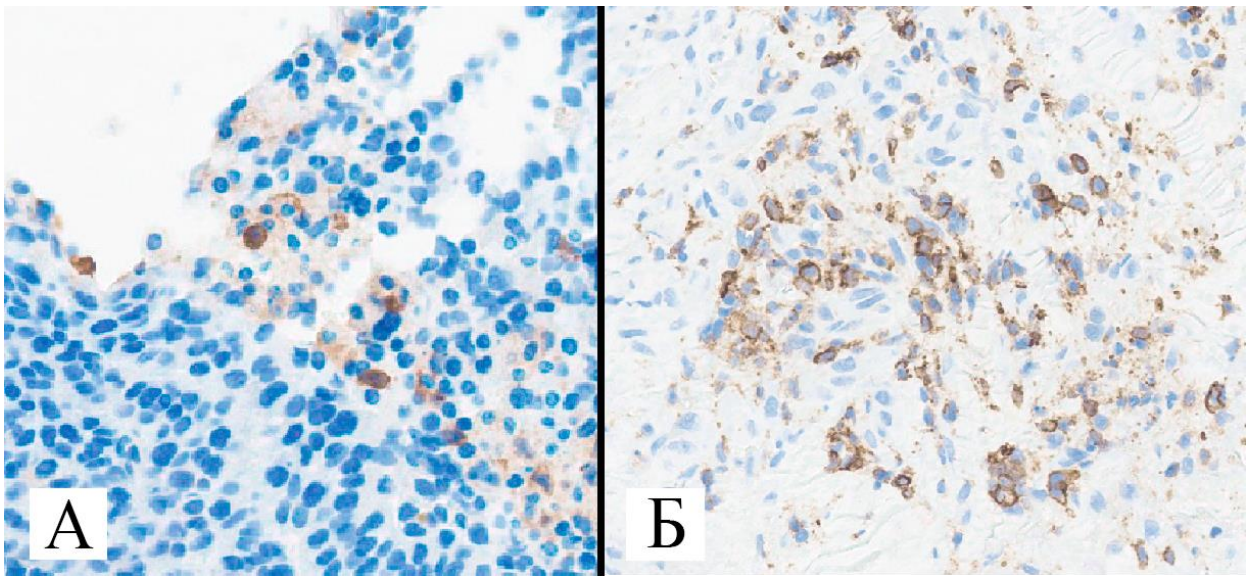


Рисунок 3.9 – Меланома кожи IIC стадии, толщина по Бреслоу 4,1 мм (pT4b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD8, ядра контрастированы гематоксилином. А – интратуморальная зона, увелич. ×400; Б – перитуморальная зона, увелич. ×200

При оценке зависимости от AJCC-стадии выявлено закономерное снижение плотности расположения перитуморальных лимфоцитов по мере прогрессирования опухоли. Количество $CD8^+$-клеток составляло 231,6 ± 29,7 при стадии IA и последовательно снижалось до 62,8 ± 8,7 при IIC ($p < 0,001$). В отношении интратуморальных лимфоцитов выраженной динамики не наблюдалось: количество $CD8^+$-клеток варьировало от 5,2 ± 4,6 до 6,2 ± 4,7, различия между стадиями были статистически недостоверными ($p > 0,05$; Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Количество CD8-позитивных лимфоцитов в зависимости от стадии AJCC (M ± SD)

Стадия AJCC	**Интратуморальные $CD8^+$-лимфоциты**	**Перитуморальные $CD8^+$-лимфоциты**
IA	5,2 ± 2,6	231,6 ± 29,7
IB	5,7 ± 2,2	168,7 ± 18,9
IIA	4,9 ± 1,9	131,3 ± 17,2
IIB	4,6 ± 1,3	95,6 ± 13,9
IIC	6,2 ± 2,1	62,8 ± 8,7

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

Для идентификации макрофагов в образцах меланомы кожи I и II стадии применяли иммуногистохимический метод с использованием антител к CD68, позволяющих охарактеризовать общее количество макрофагов.

В образцах меланомы CD68-позитивные макрофаги выявлялись как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах, при этом их количество достоверно превышало показатели контроля ($p < 0,001$). Так, при толщине опухоли менее 1 мм среднее число $CD68^+$-клеток составляло 27,8 и 34,1 в интратуморальной и перитуморальной зонах соответственно (Рисунок 3.10), что более чем в 10 раз выше значений группы сравнения. При толщине более 4 мм количество $CD68^+$-макрофагов увеличивалось до 64,5 и 71,2 клеток (Рисунок 3.11), демонстрируя выраженную положительную корреляцию с утолщением опухоли (Таблица 3.7. $p <0,001$).

Таблица 3.7 – Количество CD68-позитивных макрофагов в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу (M ± SD)

Группа / Толщина по Бреслоу	**<0,8–1,0 мм**	**>1,0–2,0 мм**	**>2,0–4,0 мм**	**>4,0 мм**
Интратуморальные $CD68^+$-макрофаги	27,8 ± 5,6	43,9 ± 6,2	49,6 ± 7,5	64,5 ± 6,8
Перитуморальные $CD68^+$-макрофаги	34,1 ± 6,8	60,7 ± 7,2	69,3 ± 6,9	71,2 ± 9,1

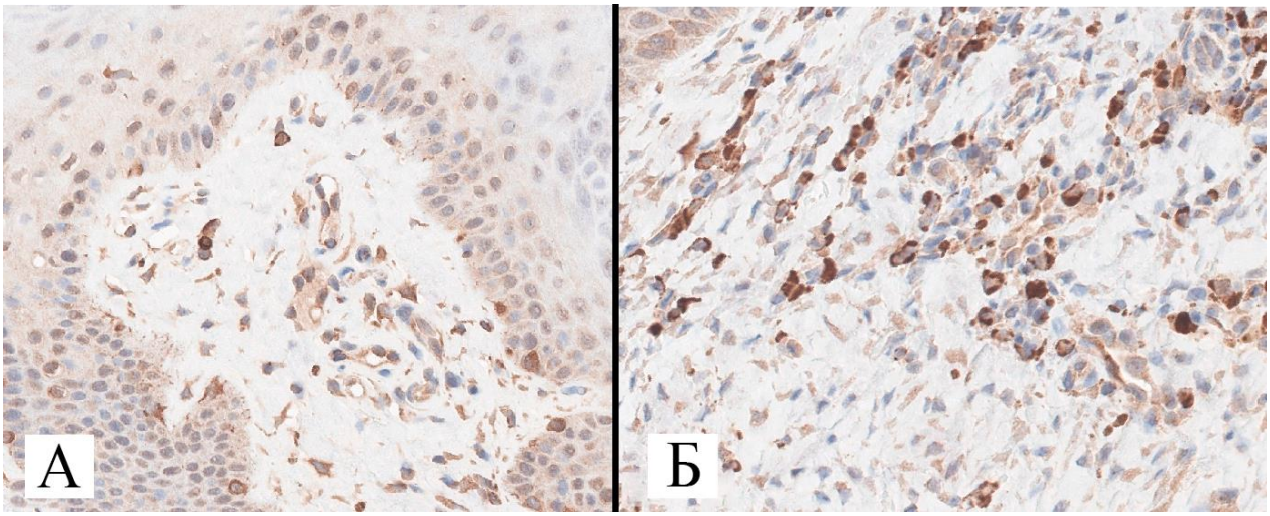


Рисунок 3.10 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,7 мм (pT1b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD68, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

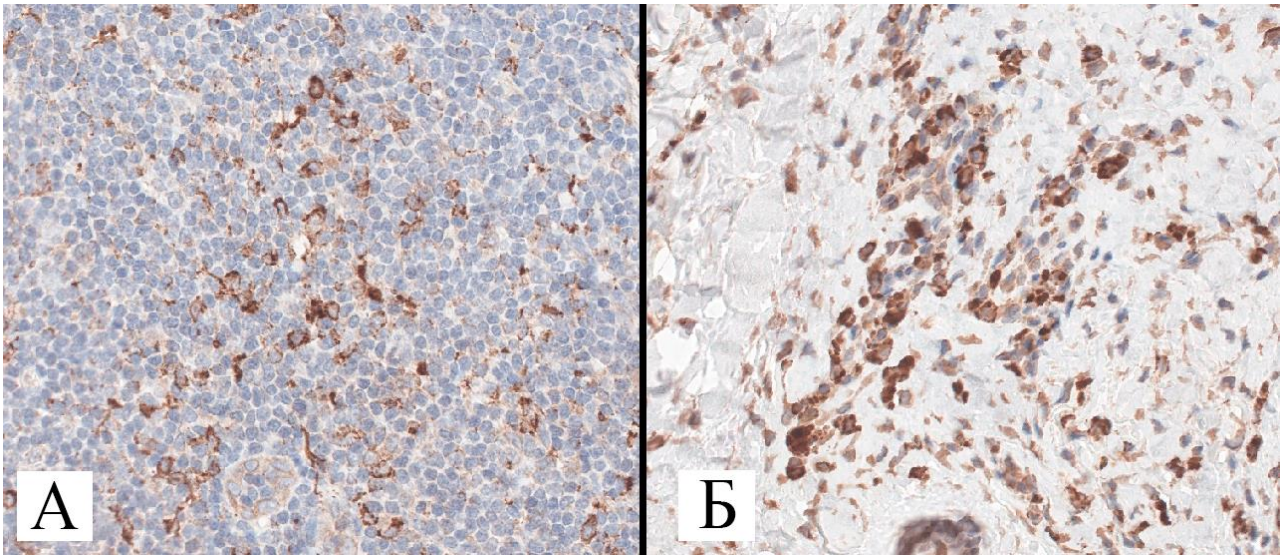


Рисунок 3.11 – Меланома кожи IIB стадии, толщина по Бреслоу 4,6 мм (pT4a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD68, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

При анализе зависимости содержания макрофагов от категории pT выявлен закономерный рост $CD68^+$-клеток по мере увеличения глубины инвазии опухоли. Наибольшее число $CD68^+$-макрофагов отмечалось при pT1a – 22,7 и 28,9 клеток в интратуморальной и перитуморальной зонах соответственно (Рисунок 3.12), что достоверно превышало группу сравнения ($p < 0,01$). При pT4b их количество

достигало 57,2 и 66,1 клеток (Рисунок 3.13), с выраженной ассоциацией с Tb-категориями, то есть с наличием изъязвления опухоли (Таблица 3.8. $p < 0,001$).

Таблица 3.8 – Количество CD68-позитивных макрофагов в зависимости от категории pT (M ± SD)

pT категория	**Интратуморальные CD68⁺-макрофаги**	**Перитуморальные CD68⁺-макрофаги**
pT1a	23,8 ± 5,1	32,9 ± 6,2
pT1b	42,1 ± 7,9	40,5 ± 7,3
pT2a	38,7 ± 7,3	59,4 ± 9,8
pT2b	50,2 ± 8,6	57,1 ± 9,4
pT3a	44,3 ± 8,1	70,1 ± 10,5
pT3b	59,0 ± 9,7	69,2 ± 10,1
pT4a	54,1 ± 9,3	72,4 ± 10,8
pT4b	80,7 ± 12,2	71,3 ± 11,6

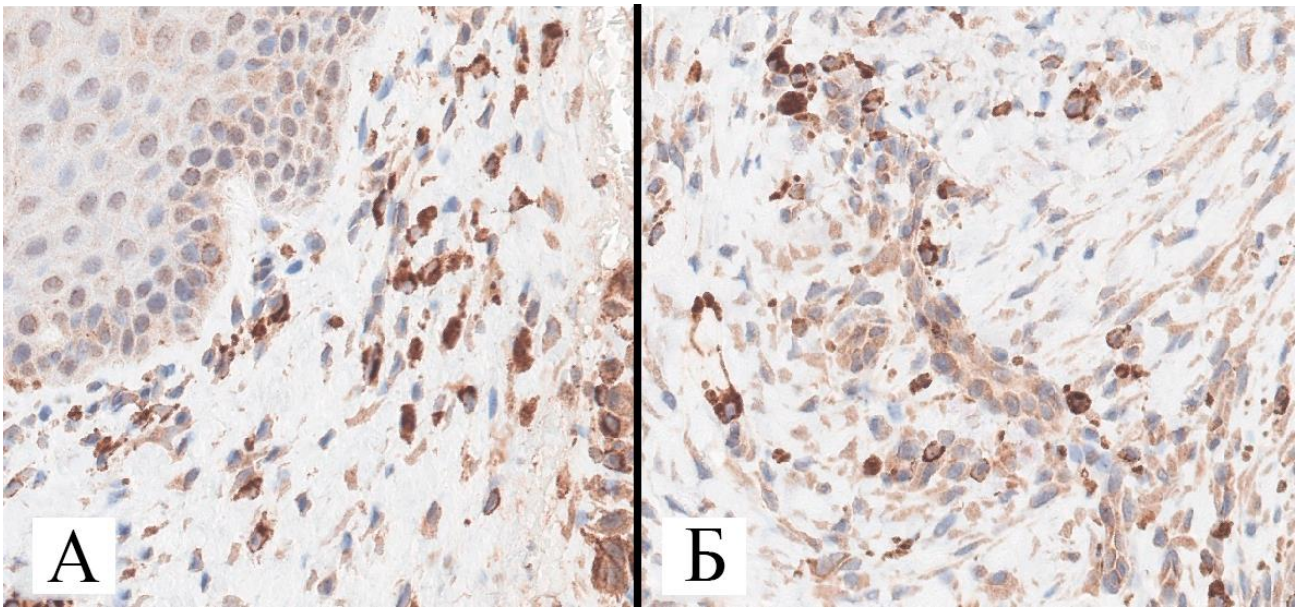


Рисунок 3.12 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,6 мм (pT1a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD68, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

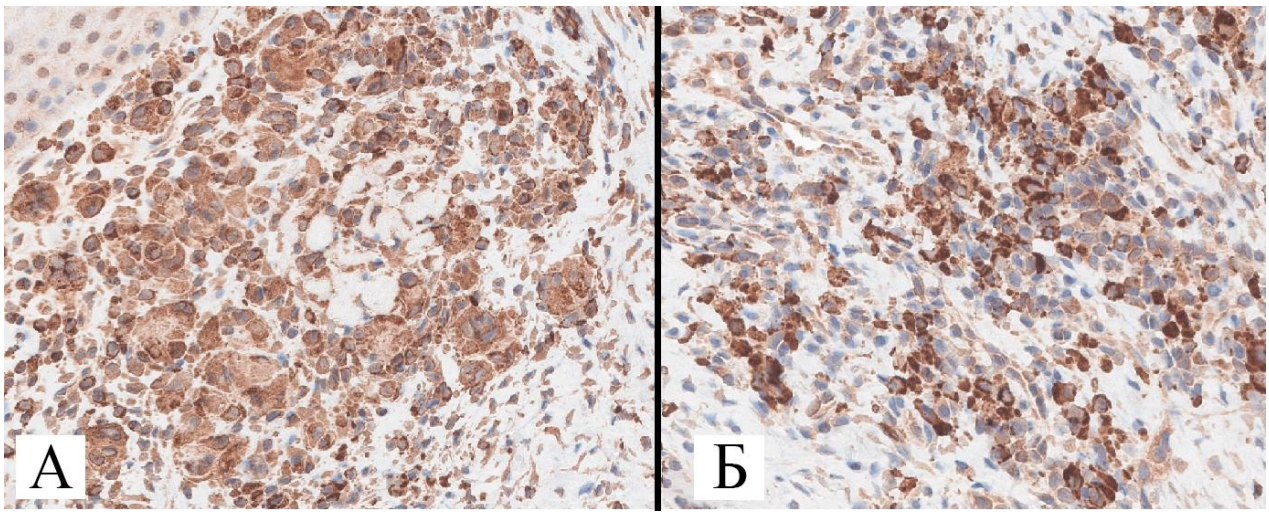


Рисунок 3.13 – Меланома кожи IIC стадии, толщина по Бреслоу 4,3 мм (pT4b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание CD8, ядра контрастированы гематоксилином., увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

При оценке макрофагов в зависимости от стадии по классификации AJCC отмечено, что на ранних стадиях IA и IB инфильтрация была минимальной. Так, количество $CD68^+$-макрофагов в интратуморальной зоне составляло 24,1 при стадии IA и возрастало до 84,2 при стадии IIC, а в перитуморальной зоне – с 32,3 до 72,2 клеток в поле зрения (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Количество CD68-позитивных макрофагов в зависимости от стадии AJCC (M ± SD)

Стадия AJCC	**Интратуморальные $CD68^+$-макрофаги**	**Перитуморальные $CD68^+$ -макрофаги**
IA	24,1 ± 3,2	32,3± 2,9
IB	40,5 ± 4,7	36,1± 3,7
IIA	49,2 ± 5,1	50,2 ± 5,3
IIB	58,3 ± 6,2	63,5 ± 6,1
IIC	84,8 ± 7,1	72,2 ± 5,9

Одновременное фенотипирование триптаза-позитивных тучных клеток, $CD68^+$-макрофагов и атипичных клеток в меланоме кожи показали различные варианты пространственных фенотипов триад в зависимости от юкстракринного и

паракринного взаимодействия иммунных и опухолевых клеток (Рисунок 3.14). Прежде всего, необходимо обратить внимание на индивидуальные значения у каждого пациента частоты солокализации тучных клеток и макрофагов (Рисунок 3.14 А–В). Более того, выявлялись гистотопографические особенности взаимодействия иммунных клеток с атипичными клетками в микроокружении опухоли (Рисунок 3.14 Г–М). В частности, одним из вариантов представлен солокализацией тучной клетки с атипичной, при этом макрофаг прилежит к тучной клетке (рисунок 3.14 Д). Также, возможно прилежание тучной клетки к макрофагу, взаимодействующего с атипичной клеткой (рисунок 3.14 Е, Ж). Наконец, солокализованные друг с другом тучная клетка и макрофаг могут взаимодействовать с клетками опухоли (рисунок 3.14 И). Полученные результаты свидетельствуют о различных вариантах иммуногенеза с участием тучных клеток и макрофагов, которые могут оказывать важные морфогенетические эффекты на эволюцию меланомы кожи.

Резюме

Увеличение числа CD68-позитивных макрофагов, коррелирующее с ухудшением прогноза, может рассматриваться не только как признак воспаления, но и как аналог эмбриональных макрофагальных популяций. В эмбриогенезе макрофаги участвуют в ремоделировании тканей, обеспечении клеточной миграции (в т.ч. клеток нервного гребня), фагоцитозе апоптотических телец и создании пермиссивной микросреды. Патологическая активация этих консервативных, морфогенетических программ макрофагов в опухоли поддерживает инвазивный рост, аналогичный эмбриональному морфогенезу, и может служить одним из драйверов инвазивного роста и локальной иммуносупрессии.

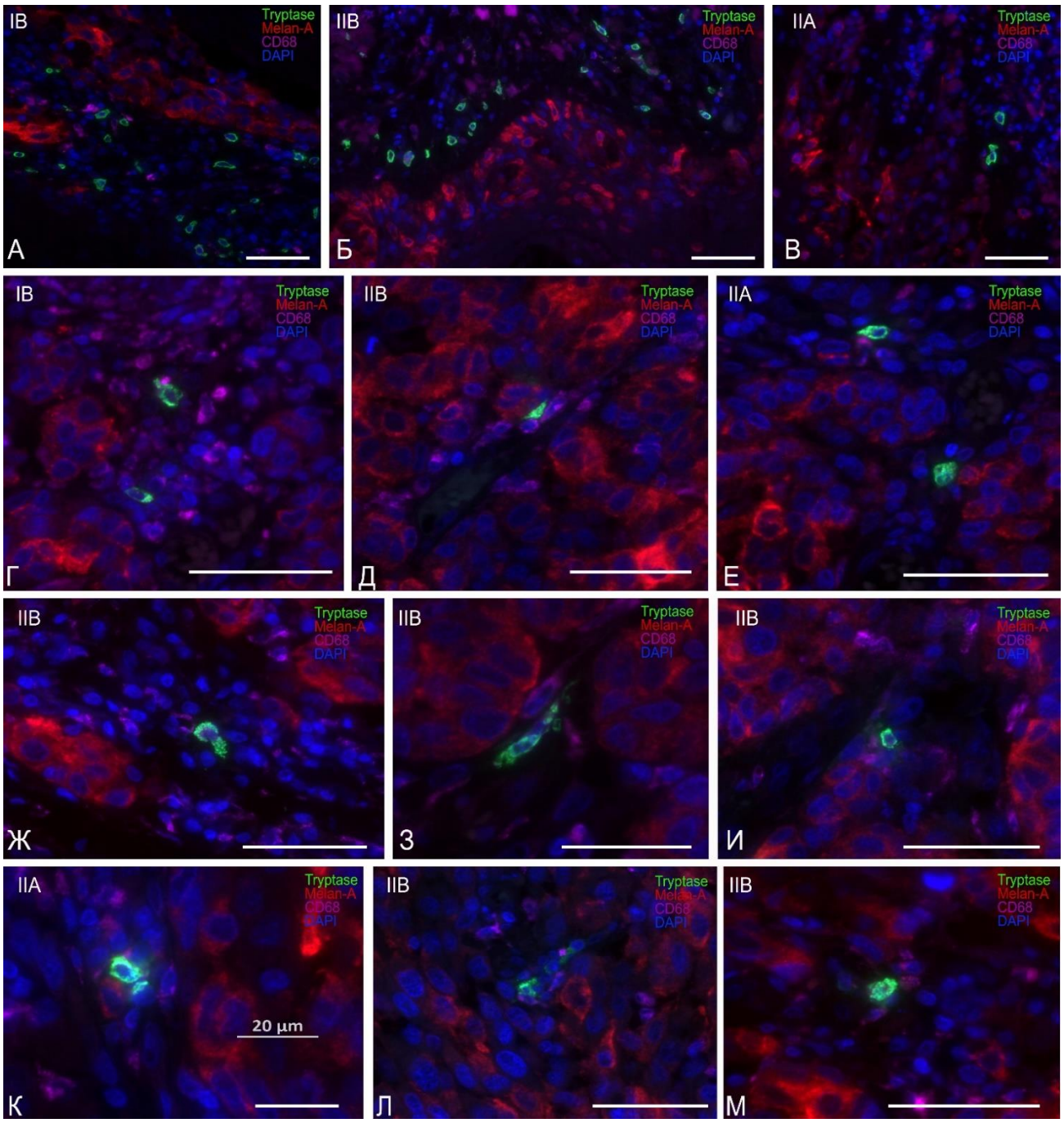


Рисунок 3.14 – Взаимодействие тучных клеток, макрофагов и атипичных клеток в опухолевом микроокружении меланомы кожи. Методика: мультиплексное иммуногистохимическое окрашивание триптазы, CD68 и Мелан-А. Ядра контрастированы DAPI. А–В – различная солокализация тучных клеток, макрофагов и атипичных клеток в миикроокружении меланомы кожи. Г – взаимодействие тучных клеток и макрофагов в опухолевом микроокружении. Д – прилежание макрофагов к тучной клетке, взаимодействующей с атипичной клеткой. Е, Ж – солокализация тучной клетки с макрофагом, взаимодействующим с атипичной клеткой. З – взаимодействие тучной клетки и макрофага в опухолевом микроокружении. И – одновременное взаимодействие тучной клетки с макрофагом и атипичной клеткой. К–М – различные варианты солокализации тучных клеток, макрофагов и атипичных клеток меланомы кожи. Масштабная шкала: К – 20 мкм, остальные – 50 мкм

3.6. 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

Для идентификации тучных клеток (ТК) в образцах меланомы кожи I и II стадий применяли гистохимическое окрашивание толуидиновым синим. При этом гранулы ТК приобретали характерную метахроматическую фиолетовую окраску, что позволяло достоверно выявлять их как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах. Окрашивание толуидиновым синим также позволило определить пространственное распределение ТК относительно меланинсодержащих атипичных клеток как в эпидермисе, так и в дерме кожи. ТК выявлялись в непосредственной близости к меланокорам и атипичным клеткам, что указывает на их участие в формировании клеточных взаимодействий в опухолевом микроокружении (Рис. 3.15А–В).

Отмечалась избирательная локализация ТК и атипичных клеток: их пространственная близость фиксировалась даже в областях дермы с низкой плотностью других клеточных элементов (Рис. 3.15В–Г). В ряде случаев наблюдалось скопление ТК вблизи групп мигрирующих атипичных клеток меланомы (Рис. 3.15Г). Определено три типа взаимодействий ТК с атипичными клетками меланомы:

1. Солокализация без признаков секреторной активности (Рис. 3.15В);
2. Таргетная секреция гранул ТК по направлению к опухолевым клеткам (Рис. 3.15Ё, Л);
3. Секреция меланокоров от атипичных клеток в сторону ТК (Рис. 3.15З, И).

В цитоплазме ТК визуализировались меланокоры различных размеров, соответствующие стадиям поступления пигмента из атипичных клеток (Рис. 3.15З, И). В отдельных случаях взаимодействие сопровождалось морфологическими признаками взаимного апоптоза. Иногда ТК находились в тесной солокализации с

атипичными меланоцитами, что сопровождалось формированием зон прилежания на значительных участках клеточной поверхности (Рис. 3.15Д). В большинстве наблюдений при расположении ТК среди группы атипичных клеток фиксировалась преимущественная солокализация с одной из них (Рис. 3.15Е). В ядрах ТК визуализировались несколько крупных ядрышек, отражающих их высокую биосинтетическую активность. ТК проявляли секреторную активность по отношению к меланинсодержащим клеткам, используя различные механизмы дегрануляции, среди которых наиболее отчётливо визуализировалась цельногранулярная секреция (Рис. 3.15Ё). Секреция имела направленный характер и была ориентирована на атипичные клетки. В ряде наблюдений к поверхности атипичных меланоцитов прилегали группы секреторных гранул, входящих в состав автономных цитоплазматических фрагментов ТК (Рис. 3.15Ж). Во внеклеточном матриксе выявлялись контакты автономных секреторных гранул ТК с меланокорами атипичных клеток. В отдельных случаях крупные меланокоры были полностью окружены секреторными гранулами (Рис. 3.15Й). ТК формировали тонкие цитоплазматические выросты, контактирующие с атипичными клетками меланомы (Рис. 3.15К). Секреторные гранулы ТК локализовались в определённых участках поверхности атипичных клеток независимо от их размеров – как крупных, так и мелких (Рис. 3.15Л). Атипичные клетки демонстрировали направленную секрецию меланокоров различного размера в сторону ТК (Рис. 3.15З, И). Меланокоры контактировали с ТК на ограниченных участках или занимали значительные области клеточной поверхности. При взаимодействии с несколькими атипичными клетками ТК часто ассоциировалась преимущественно с одной из них, формируя цитоплазматические выросты, содержащие меланосомы. В отдельных наблюдениях отмечалась секреция мелких меланокоров, диффундирующих в микроокружение и частично окружающих ТК. Во всех стадиях меланомы в цитоплазме ТК обнаруживались меланинсодержащие структуры различных размеров, что указывает на процесс их фагоцитоза.

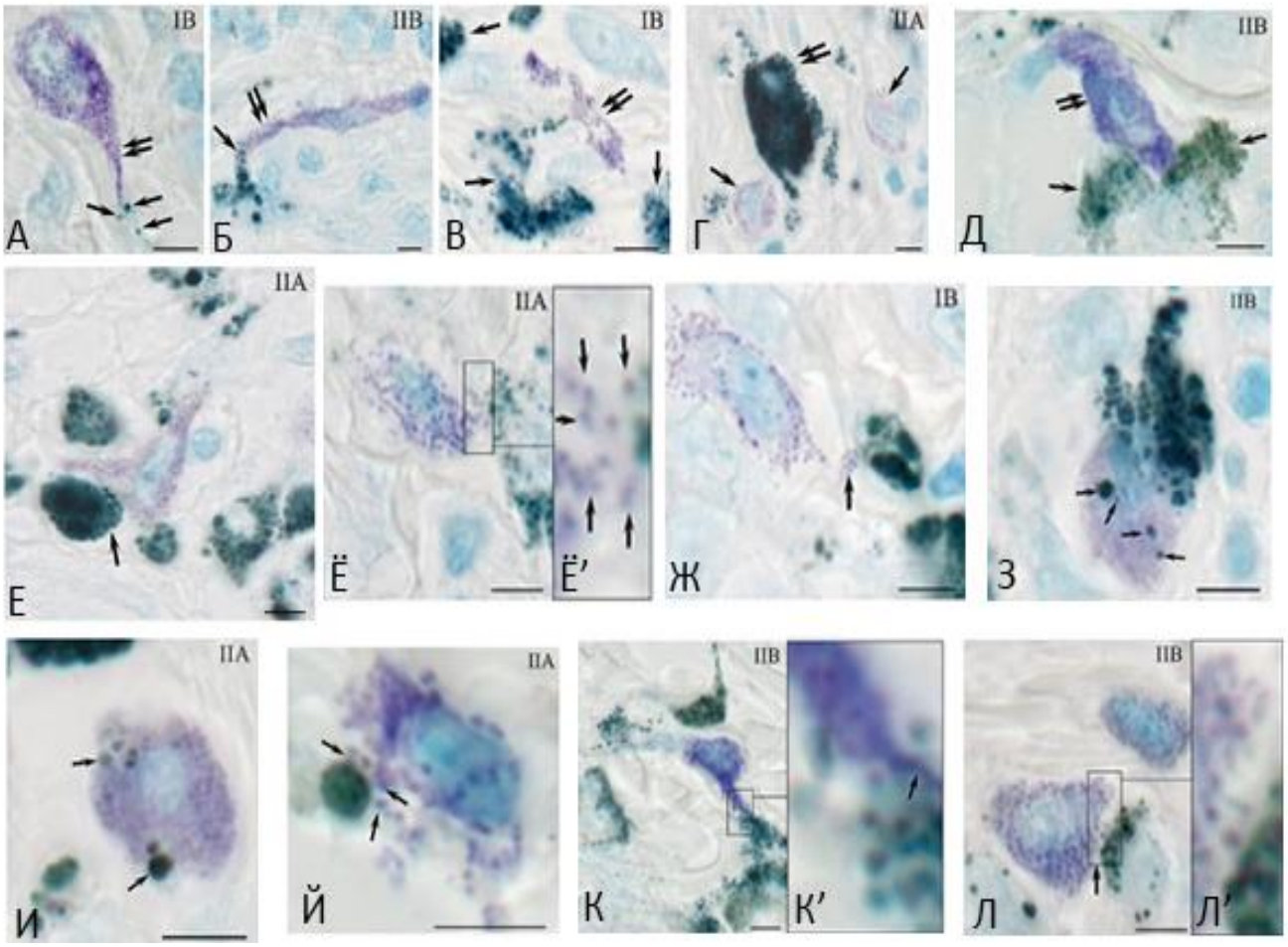


Рисунок 3.15 – Взаимодействие тучных клеток и атипичных меланоцитов в коже. Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим. Шкала: 5 мкм. А – формирование цитоплазматического выроста ТК (двойная стрелка) к гранулам меланина (стрелка); Б – вытянутая форма ТК, один полюс которой (двойная стрелка) контактирует с атипичным меланоцитом (стрелка); В – ТК (двойная стрелка) в месте скопления атипичных меланоцитов (стрелка); Г – мигрирующие атипичные клетки дермы с высокой степенью секреции гранул меланина (двойная стрелка) во внеклеточный матрикс, вокруг которых накапливаются ТК (стрелка); Д – ТК (двойная стрелка) с формированием обширных контактов одновременно с двумя атипичными меланоцитами (стрелка), заполненных меланосомами; Е – ТК в окружении большого количества атипичных клеток меланомы с формированием преимущественного контакта с одной из них (стрелка); Ё – признаки активной секреции секреторных гранул к атипичной клетке меланомы (стрелка); Ё’ – увеличенный фрагмент Ё. Ж – группа секреторных гранул в составе макровезикулы прилегают к атипичной клетке (стрелка); З – проникновение гранул меланоцитов различных размеров в цитоплазму ТК (стрелка); И – гранулы меланоцитов различных размеров в цитоплазме ТК (стрелка); Й – активная секреция гранул ТК к крупному меланокору во внеклеточном матриксе. К – формирование тонкого выроста ТК с секреторными гранулами (стрелка) к атипичному меланоциту; К’ – увеличенный фрагмент К; Л – признаки направленной секреции гранул ТК (стрелка) к атипичному меланоциту; Л’ – увеличенный фрагмент Л

В интратуморальной зоне при толщине опухоли менее 1 мм среднее количество клеток увеличивалось до 14,3 ± 2,1 ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), а в перитуморальной – до 16,2 ± 2,7 клеток ($p < 0,01$; Рисунок 3.16). При увеличении толщины опухоли более 4 мм число тучных клеток достоверно снижалось, достигая 6,1 ± 1,4 в интратуморальной зоне ($p < 0,001$ по сравнению с pT1a) и 13,5 ± 2,1 в перитуморальной зоне (Таблица 3.10; Рисунок 3.17).

Таблица 3.10 – Количество тучных клеток, выявленных окраской толуидиновым синим, в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу (M ± SD)

Группа / Толщина по Бреслоу	**<0,8–1,0 мм**	**>1,0–2,0 мм**	**>2,0–4,0 мм**	**>4,0 мм**
Интратуморальные тучные клетки	14,3 ± 2,1	12,7 ± 2,0	8,4 ± 1,7	6,1 ± 1,4
Перитуморальные тучные клетки	16,2 ± 2,7	17,1 ± 2,5	15,0 ± 2,2	13,5 ± 2,1

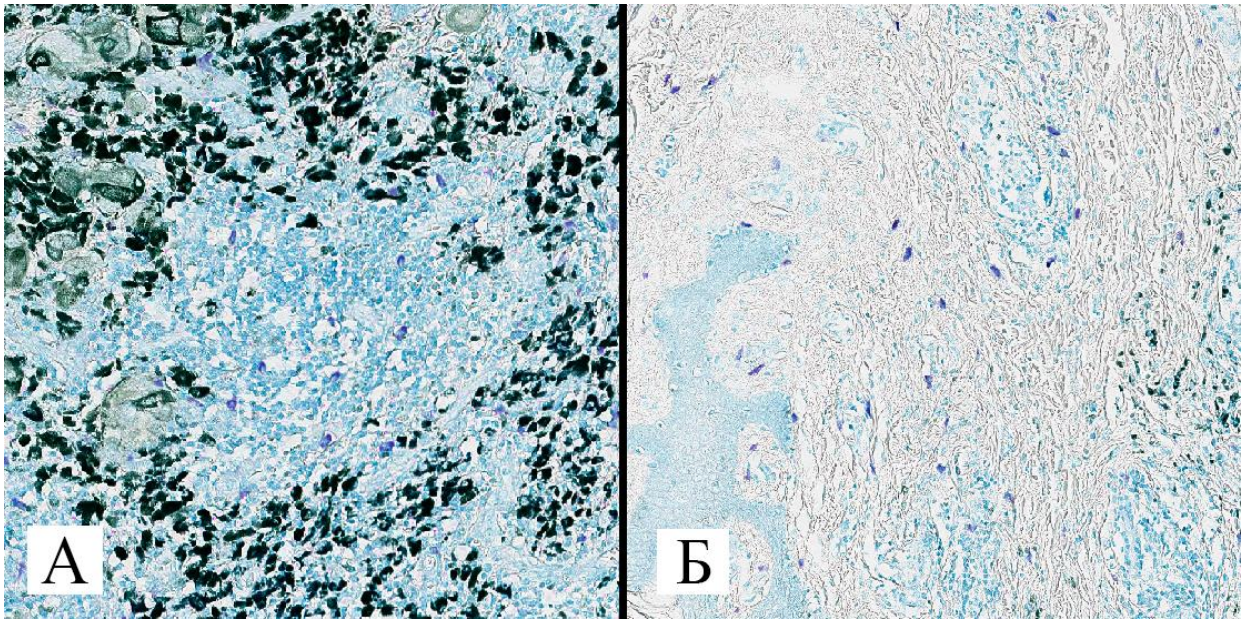


Рисунок 3.16 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,6 мм (pT1b). Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

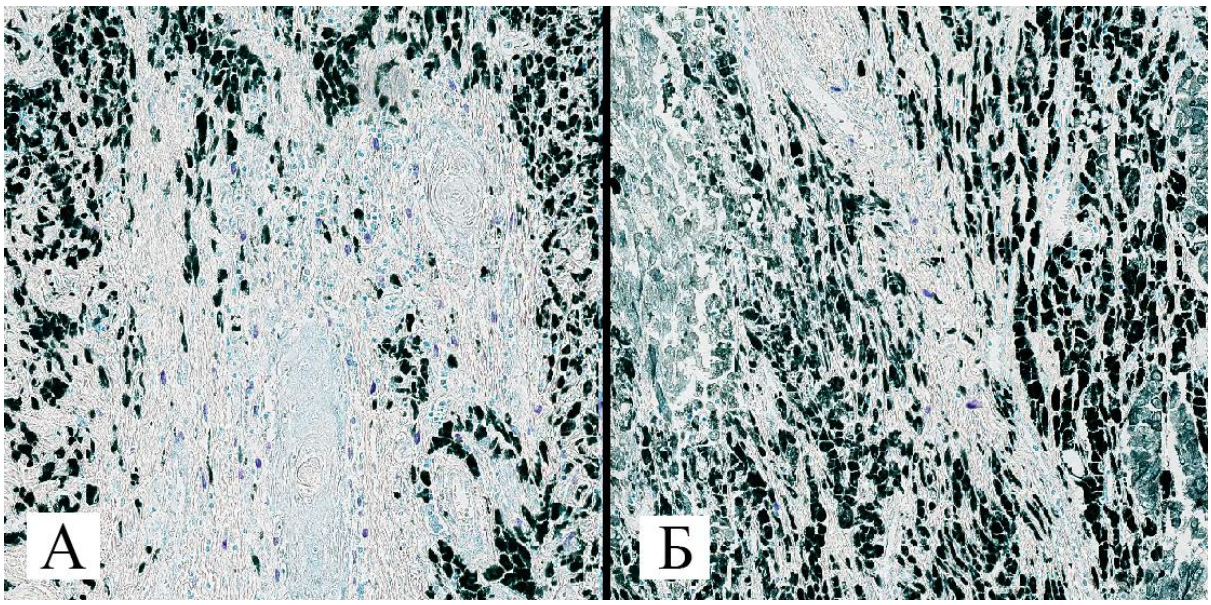


Рисунок 3.17 – Меланома кожи IIB стадии, толщина по Бреслоу 4,3 мм (pT4a). Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

Детальный анализ количественных показателей в зависимости от категории локальной распространенности первичной опухоли (pT) позволил выявить чёткую динамику изменения численности мастоцитарной популяции.

В интратуморальной зоне при категории pT1a средняя плотность инфильтрации тучными клетками составляла 14,6 ± 2,3 в поле зрения, что демонстрировало статистически значимое отклонение от показателей группы сравнения ($p < 0,05$; Рисунок 3.18). При прогрессировании процесса до категории pT4b отмечалось высокодостоверное падение данного параметра до 6,7 ± 1,8 клеток ($p < 0,001$ по сравнению с подгруппой pT1a; Рисунок 3.19).

В свою очередь, при оценке перитуморальной зоны уровень инфильтрации варьировал от 16,8 ± 2,9 клеток при категории pT1a ($p < 0,01$ относительно контрольных значений) до 13,9 ± 2,5 клеток у пациентов с категорией pT4b (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Количество тучных клеток, выявленных окраской толуидиновым синим, в зависимости от категории pT (M ± SD)

pT категория	**Интратуморальные тучные клетки**	**Перитуморальные тучные клетки**
pT1a	14,6 ± 2,3	16,8 ± 2,9
pT1b	14,1 ± 2,1	17,5 ± 2,7
pT2a	13,8 ± 2,0	17,2 ± 2,6
pT2b	12,9 ± 1,9	16,8 ± 2,5
pT3a	9,5 ± 1,7	16,1 ± 2,3
pT3b	7,8 ± 1,5	15,3 ± 2,4
pT4a	7,2 ± 1,6	14,7 ± 2,2
pT4b	6,7 ± 1,8	13,9 ± 2,5

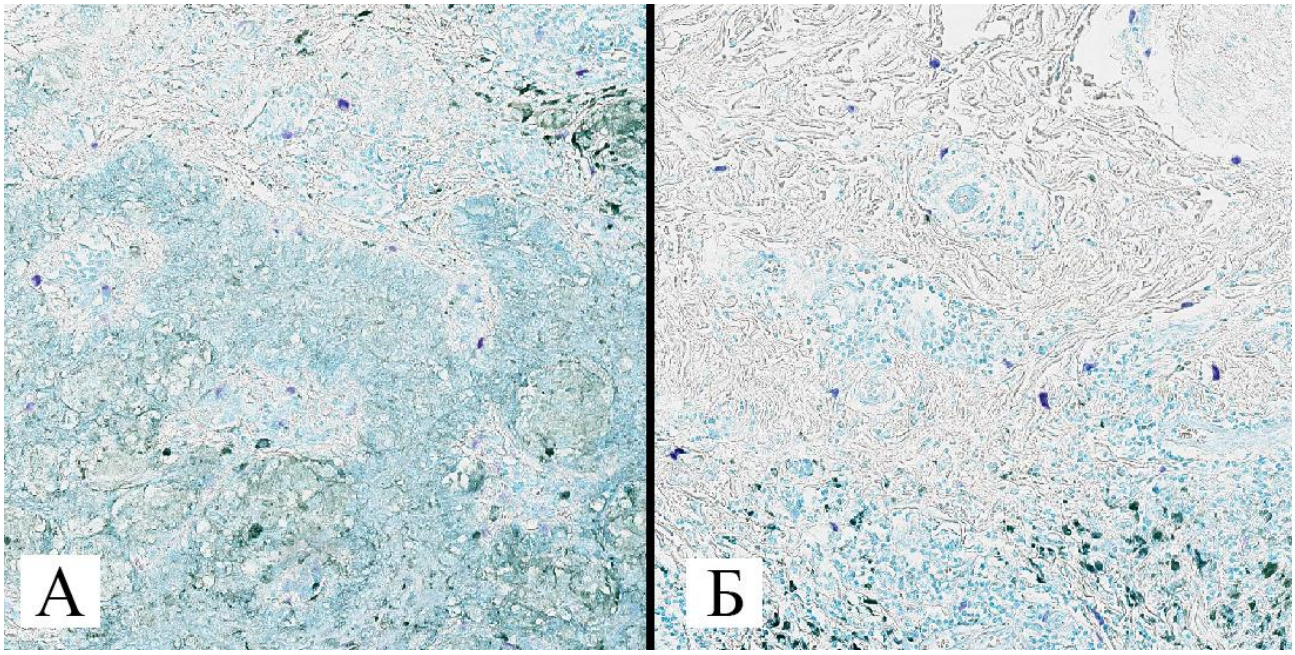


Рисунок 3.18 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,4 мм (pT1a). Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

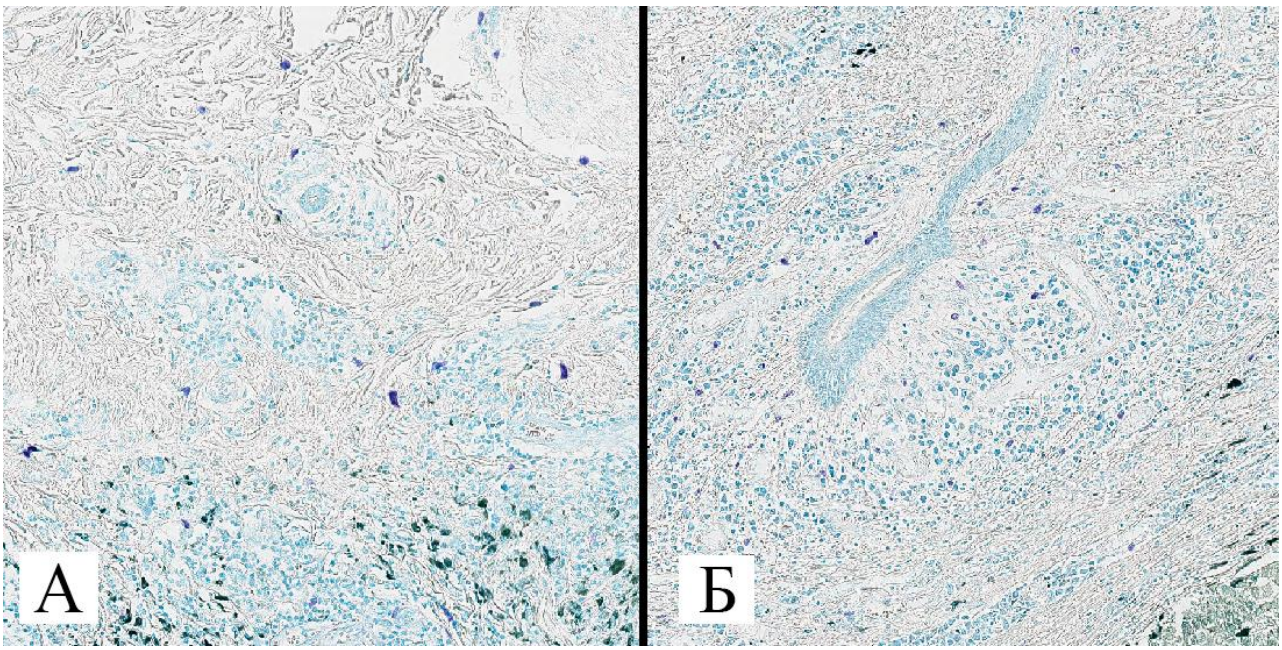


Рисунок 3.19 – Меланома кожи IIC стадии, толщина по Бреслоу 4,6 мм (pT4b). Методика: гистохимическое окрашивание толуидиновым синим, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

Анализ в зависимости от стадии AJCC подтвердил выявленную тенденцию. Так, при стадии IA количество тучных клеток в интратуморальной зоне составляло 15,9 ± 2,4 ($p < 0,05$ к контролю), а в перитуморальной – 17,5 ± 2,9 клеток ($p < 0,01$). При стадии IIC значения снижались до 6,1 ± 1,4 и 14,2 ± 2,2 соответственно ($p < 0,001$ по сравнению с IA; Таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Количество тучных клеток, выявленных окраской толуидиновым синим, в зависимости от стадии AJCC (M ± SD)

Стадия AJCC	**Интратуморальные тучные клетки**	**Перитуморальные тучные клетки**
IA	15,9 ± 2,4	17,5 ± 2,9
IB	14,5 ± 2,1	17,1 ± 2,7
IIA	12,3 ± 2,0	16,5 ± 2,6
IIB	8,3 ± 1,7	14,7 ± 2,3
IIC	6,1 ± 1,4	14,2 ± 2,2

Таким образом, выявлена устойчивая тенденция к уменьшению числа тучных клеток, выявленных окраской толуидиновым синим, по мере увеличения толщины

опухоли и прогрессирования стадии заболевания, при этом их количество как на ранних стадиях, так и в более поздних превышало показатели группы сравнения.

Для объективной верификации популяции тучных клеток в гистологических образцах меланомы кожи I и II стадий дополнительно применялся иммуногистохимический метод с использованием специфических антител к триптазе.

Анализ пространственного распределения триптаза-позитивных тучных клеток как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах выявил отчётливую тенденцию к уменьшению их численности по мере увеличения толщины первичного опухолевого узла. На начальных этапах опухолевой прогрессии (при толщине новообразования менее 1 мм) количественные показатели составляли 14,8 клеток в интратуморальной зоне и 17,4 клеток в перитуморальной зоне, что не имело статистически достоверных различий с значениями группы контроля ($p > 0,05$). Однако при нарастании инвазии до толщины более 4 мм фиксировалось существенное падение числа триптаза-позитивных клеток до 7,5 и 13,8 соответственно, что носило статистически значимый характер ($p < 0,01$ для интратуморального компартмента; $p < 0,05$ для перитуморальной зоны; Таблица 3.13; Рисунки 3.20, 3.21).

Таблица 3.13 – Количество Триптаза-позитивных тучных клеток в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу (M ± SD)

Группа / Толщина по Бреслоу	**<0,8–1,0 мм**	**>1,0–2,0 мм**	**>2,0–4,0 мм**	**>4,0 мм**
Интратуморальные триптаза-позитивные тучные клетки	13,9 ± 1,9	10,8 ± 1,7	7,9 ± 1,6	6,9 ± 1,5
Перитуморальные триптаза-позитивные тучные клетки	16,5 ± 2,3	15,8 ± 2,1	13,7 ± 1,8	12,9 ± 1,7

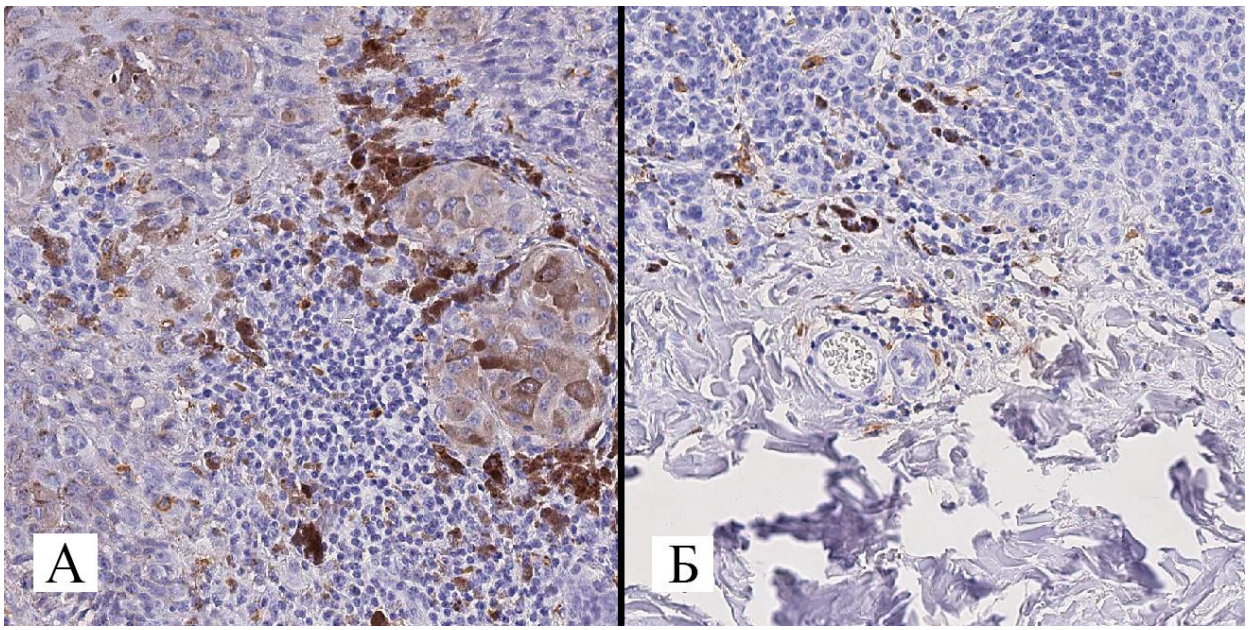


Рисунок 3.20 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,5 мм (pT1b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание триптазы, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

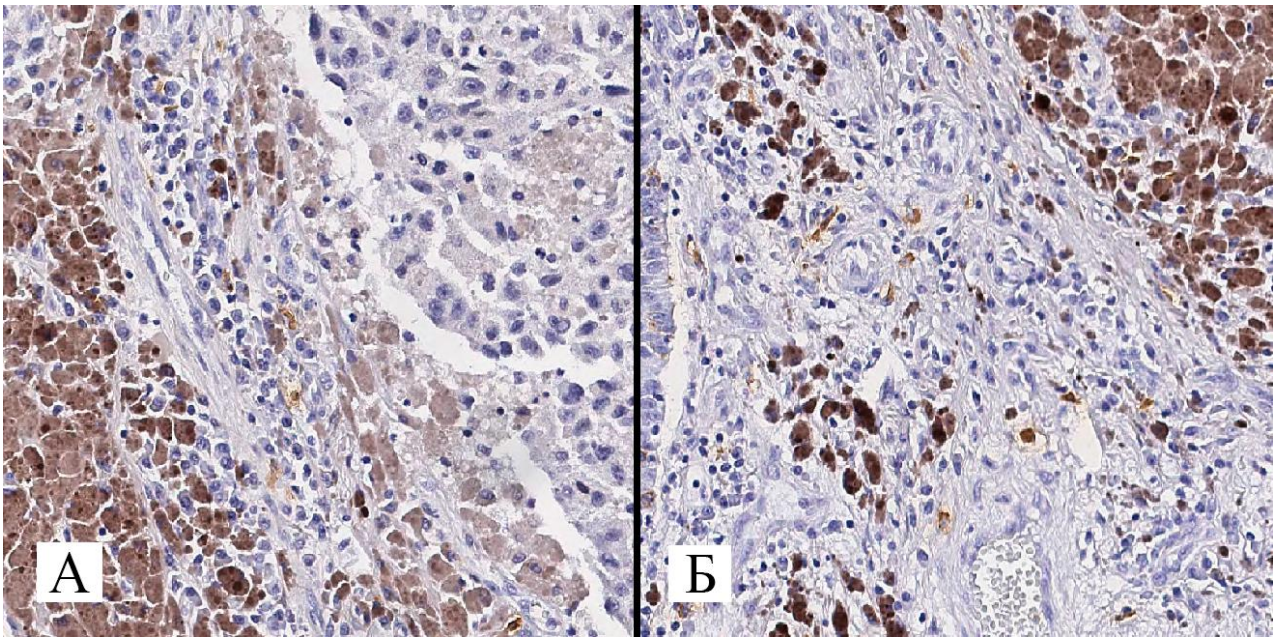


Рисунок 3.21 – Меланома кожи IIB стадии, толщина по Бреслоу 4,2 мм (pT4a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание триптазы, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

При анализе зависимости содержания субпопуляций тучных клеток от категории pT выявлено закономерное уменьшение их количества с увеличением глубины инвазии. Для триптаза-позитивных клеток максимум регистрировался при

pT1a (16,3 и 17,1 в интратуморальной и перитуморальной зонах; различия с контролем статистически недостоверны), тогда как при pT4b их число снижалось до 6,1 и 13,9 клеток ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно; Таблица 3.14; Рисунки 3.22, 3.23).

Таблица 3.14 – Количество триптаза-позитивных тучных клеток в зависимости от категории pT (M ± SD)

pT категория	**Интратуморальные триптаза-позитивные тучные клетки**	**Перитуморальные триптаза-позитивные тучные клетки**
pT1a	16,3 ± 2,1	17,1 ± 2,3
pT1b	14,1 ± 2,1	17,5 ± 2,7
pT2a	13,8 ± 2,0	17,2 ± 2,6
pT2b	12,9 ± 1,9	16,8 ± 2,5
pT3a	9,5 ± 1,7	16,1 ± 2,3
pT3b	7,8 ± 1,5	15,3 ± 2,4
pT4a	7,2 ± 1,6	14,7 ± 2,2
pT4b	6,1 ± 1,3	13,9 ± 2,5

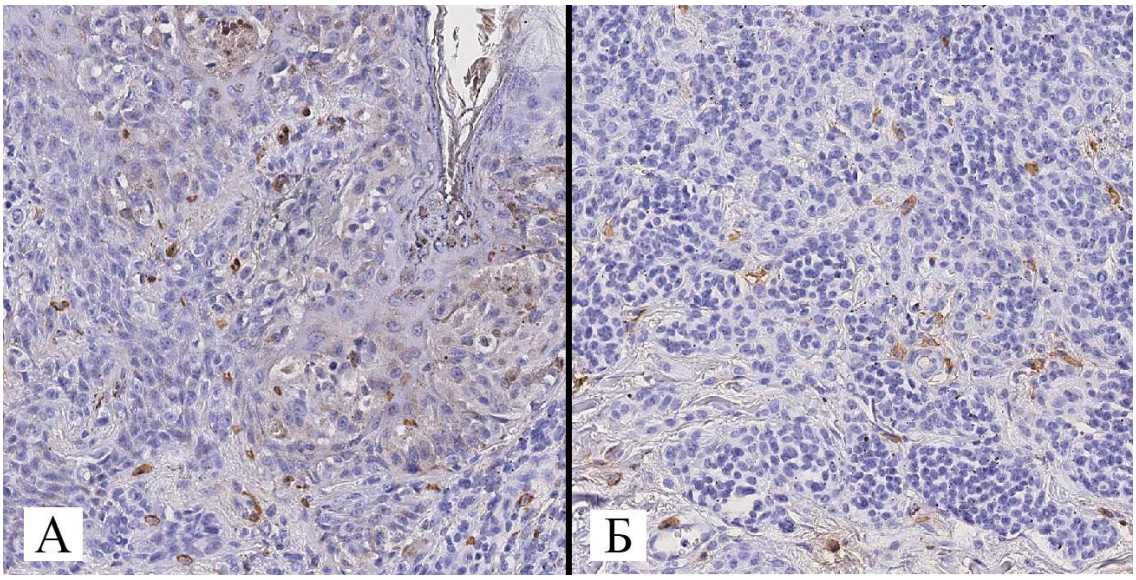


Рисунок 3.22 – Меланома кожи IA стадии, толщина по Бреслоу 0,4 мм (pT1a). Методика: иммуногистохимическое окрашивание триптазы, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

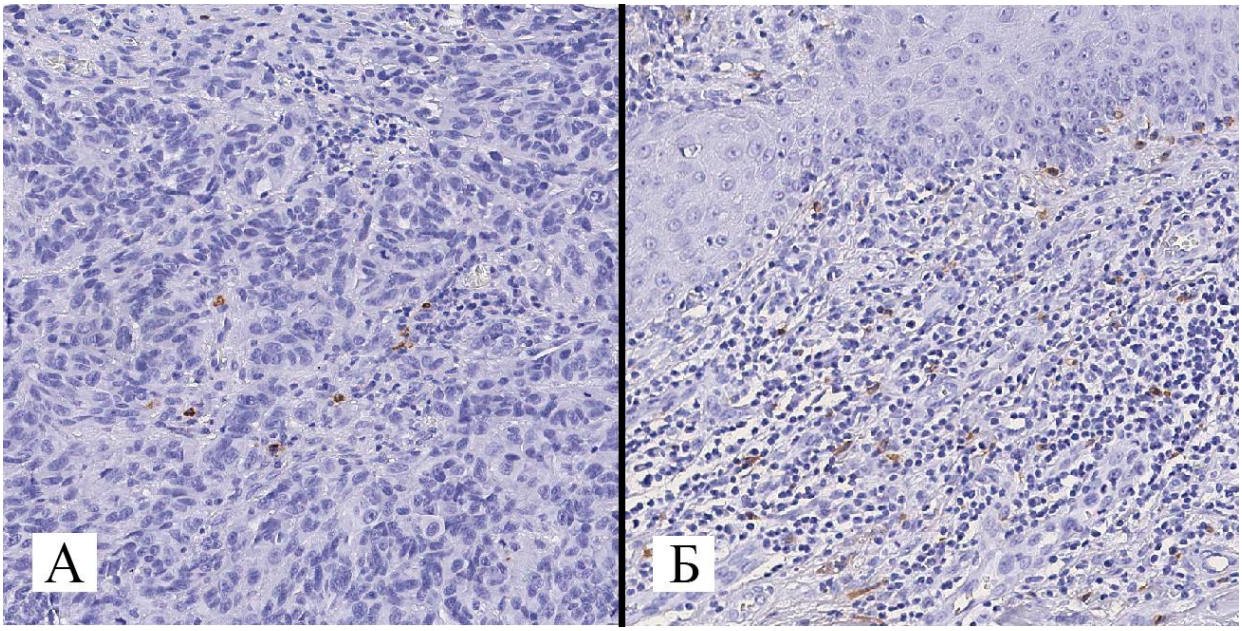


Рисунок 3.23 – Меланома кожи IIC стадии, толщина по Бреслоу 4,3 мм (pT4b). Методика: иммуногистохимическое окрашивание триптазы, ядра контрастированы гематоксилином, увелич. ×200. А – интратуморальная зона; Б – перитуморальная зона

Оценка тучных клеток в зависимости от стадии по классификации AJCC подтвердила описанную тенденцию. Количество триптаза-позитивных клеток в интратуморальной зоне составило 13,8 ($p > 0,05$) и снижалось до 5,9 при стадии IIC ($p < 0,001$), в перитуморальной зоне – от 16,7 до 13,4 ($p < 0,05$; Таблица 3.15).\

Таблица 3.15 – Количество триптаза-позитивных тучных клеток в зависимости от стадии AJCC (M ± SD)

pT категория	**Интратуморальные триптаза-позитивные тучные клетки**	**Перитуморальные триптаза-позитивные тучные клетки**
pT1a	16,3 ± 2,1	17,1 ± 2,3
pT1b	14,1 ± 2,1	17,5 ± 2,7
pT2a	13,8 ± 2,0	17,2 ± 2,6
pT2b	12,9 ± 1,9	16,8 ± 2,5
pT3a	9,5 ± 1,7	16,1 ± 2,3
pT3b	7,8 ± 1,5	15,3 ± 2,4
pT4a	7,2 ± 1,6	14,7 ± 2,2
pT4b	6,1 ± 1,3	13,9 ± 2,5

Морфологические фенотипы триптаза-позитивных ТК в опухолевом микроокружении представлены на Рисунке 3.24. Секреторные гранулы в цитоплазме распределялись равномерно либо локализовались в отдельных участках. Часто наблюдался выход целых триптаза-позитивных гранул различных размеров во внеклеточный матрикс (Рисунок 3.24А, Б). В опухолевом микроокружении ТК нередко приобретали вытянутую форму за счёт формирования цитоплазматических выростов, что особенно отчётливо демонстрируют 3D-модели (Рисунок 3.24В, Е).

По сравнению с интактной дермой, ядра ТК чаще занимали периферическое положение. Наблюдались признаки денуклеации с образованием крупных безъядерных цитоплазматических фрагментов, сохранявших способность к секреции триптазы (Рисунок 3.24Г, Д). Отмечались случаи тесного сближения ядра ТК с ядром соседней клетки; в зоне контакта выявлялось освобождение участка цитоплазмы от секреторных гранул, что обеспечивало максимальное приближение ядер (Рисунок 3.24Ж). В опухоль-ассоциированной популяции ТК также выявлялись двуядерные клетки (Рисунок 3.24З, И). Триптаза-позитивные гранулы часто локализовались вблизи ядер соседних клеток, формируя участки плотной солокализации (Рисунок 3.24Й–Л). В отдельных наблюдениях гранулы выявлялись внутри ядер соседних клеток (Рисунок 3.24Н). Часть ТК демонстрировала признаки цитологической поляризации с локализацией ядра в одном полюсе клетки и накоплением гранул в зоне активной дегрануляции. Секреторные гранулы, покинувшие цитоплазму, располагались на значительном расстоянии от клетки, сохраняя периферическое распределение триптазы (Рисунок 3.24М). Отдельные ТК принимали сильно удлинённую форму, распространяясь на значительные расстояния в опухолевом микроокружении и контактируя с большим числом клеток и внеклеточных структур (Рисунок 3.24П).

Резюме

Снижение количества и функциональной активности триптаза-позитивных тучных клеток по мере прогрессирования опухоли отражает не просто уклонение

новообразования от иммунного надзора, а является результатом их активного ингибирования микроокружением меланомы. Данный феномен обусловлен меланин-зависимой супрессией функций мастоцитов, а также функциональным истощением и апоптозом тучных клеток при непосредственном взаимодействии с Melan-A^{+} атипичными меланоцитами в перитуморальной зоне. Таким образом, падение плотности расположения триптаза-позитивных клеток свидетельствует о срыве первичных механизмов локального противоопухолевого контроля под направленным угнетающим воздействием продуктов меланогенеза.

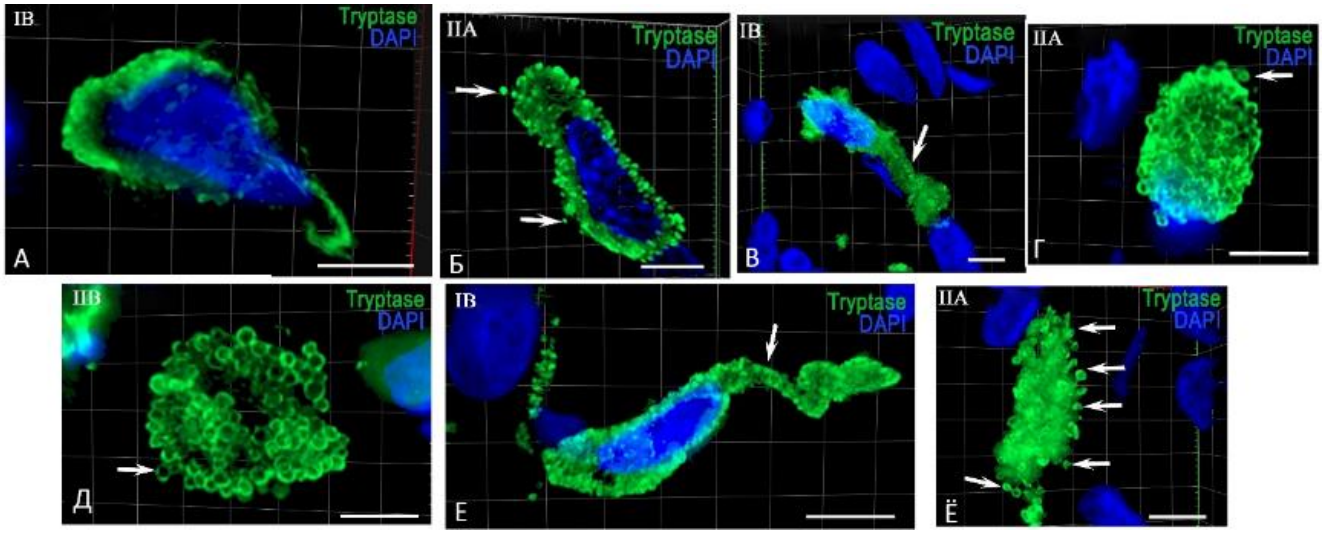
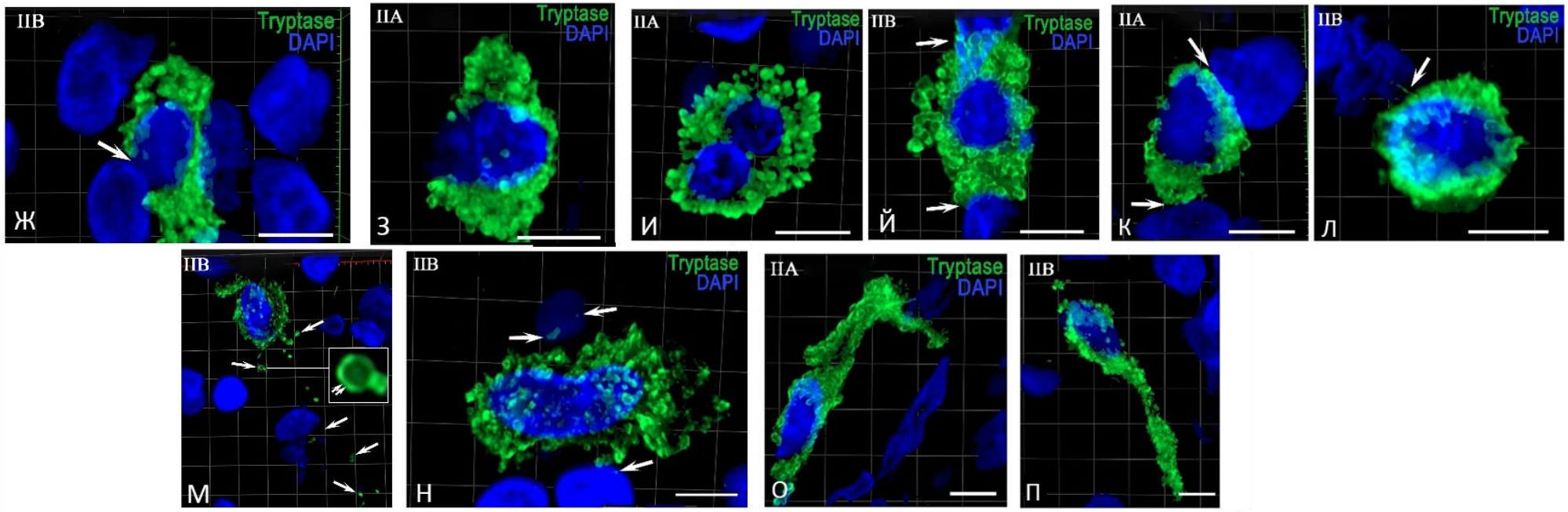


Рисунок 3.24 – Цитологические оссобенности опухоль-ассоциированных тучных клеток меланомы кожи. Методика: Иммуногистохимическое окрашивание триптазы тучных клеток. Ядра контрастированый DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия. А, Б – неравномерное (А) и равномерное (Б) заполнение цитоплазмы тучной клетки секреторными гранулами; В – ТК вытянутой формы (стрелка); Г – периферическое положение ядра в цитоплазме ТК с секрецией в противоположном полюсе клетки (стрелка); Д – цитоплазматический триптаза-позитивный остов ТК, утратившей ядро, заполненной крупными гранулами, с признаками секреторной деятельности (стрелка); Е – ТК вытянутой формы с выраженным цитоплазматическим выростом (стрелка); Ё – безъядерная ТК, утратившая ядро, заполненная крупными гранулами, с признаками секреторной деятельности (стрелка);

Рисунок 3.24 – Продолжение



Ж – тесная солокализация ядра тучной клетки с ядром близлежащей клетки (стрелка); З, И – варианты двуядерных ТК; Й, К – варианты тесной солокализации гранул ТК с ядрами соседних клеток (стрелка); Л-Н – секреция триптазы во внеклеточный матрикс в составе гранул с поступлением в ядра соседних клеток; О, П – ТК, обладающие выраженной удлиненной формой. Шкала: 5 мкм. 3D-модели представлены в приложении А, таблица А.1

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

Профиль Мелан-А$^+$-клеток во внутриопухолевой зоне возрастал с прогрессированием заболевания от I до II стадии (Рисунок 3.24). В перитуморальной зоне наибольшие показатели плотности расположения атипичных меланоцитов отмечались при II стадии меланомы (Рисунок 3.25).

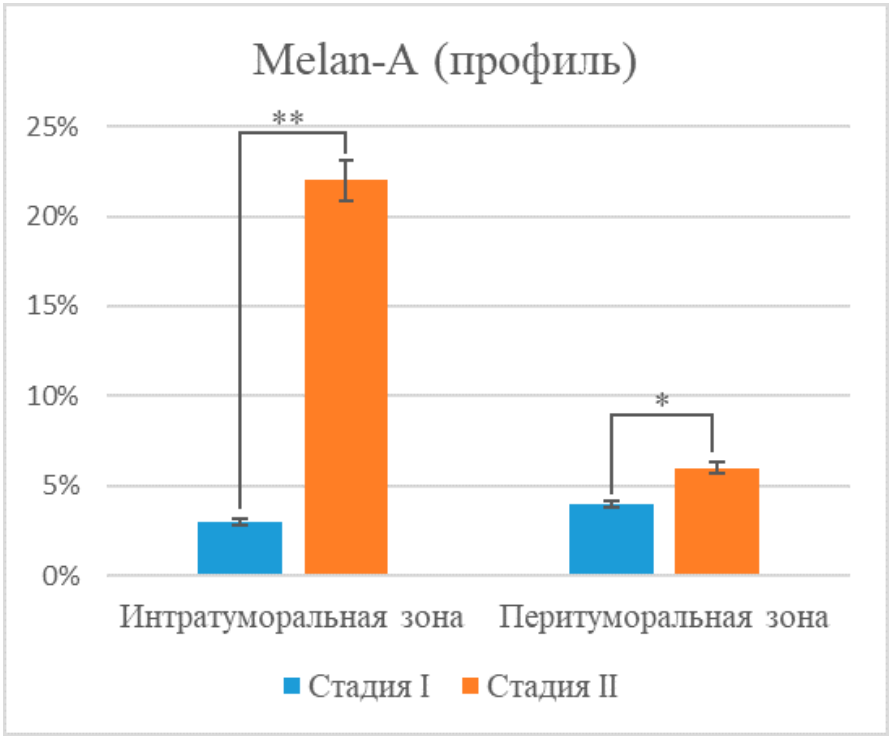


Рисунок 3.25 – Профиль Мелан-А$^+$-клеток во внутриопухолевой и перитуморальной областях (в % по отношению ко всей когорте клеток в соответствующих зонах), * и ** – $p<0,05$ и 0,01 соответственно

Интенсивность юкстакринной и паракринной солокализации ТК с атипичными клетками меланомы была максимальной на II стадии заболевания: около 40 % ТК во внутриопухолевой зоне взаимодействовали с Мелан-А$^+$ клетками (Рисунок 3.26). В перитуморальной области наибольшая активность паракринного взаимодействия ТК с Мелан-А$^+$ клетками наблюдалась на I стадии и превышала значения, зафиксированные при II стадии (Рисунок 3.27).

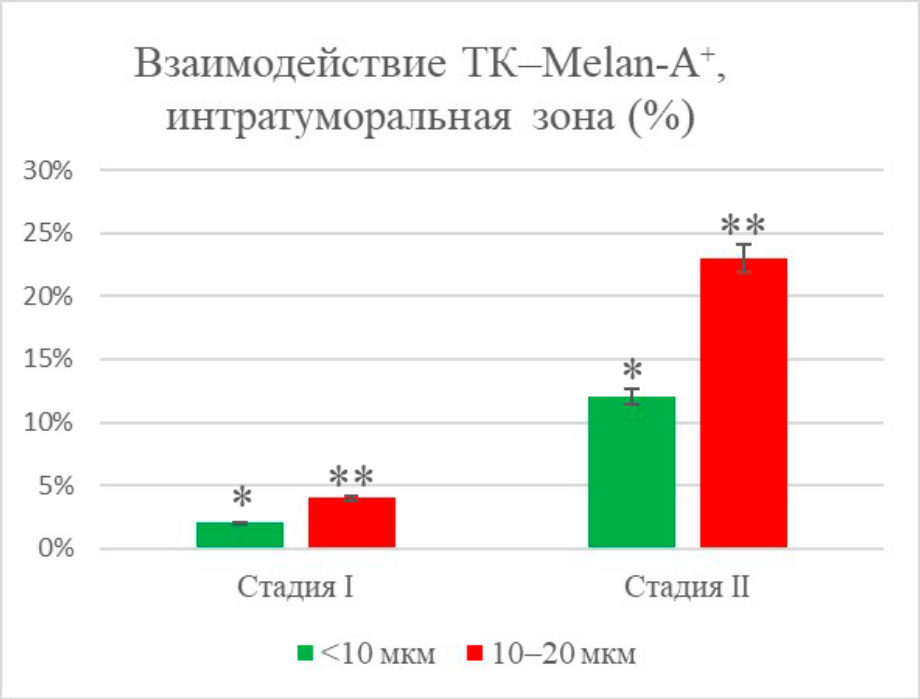


Рисунок 3.26 – Профиль юкстакринной и паракринной солокализации тучных клеток с Мелан-А$^+$-клетками в интратуморальной зоне, * и ** – p<0,05 и 0,01 соответственно

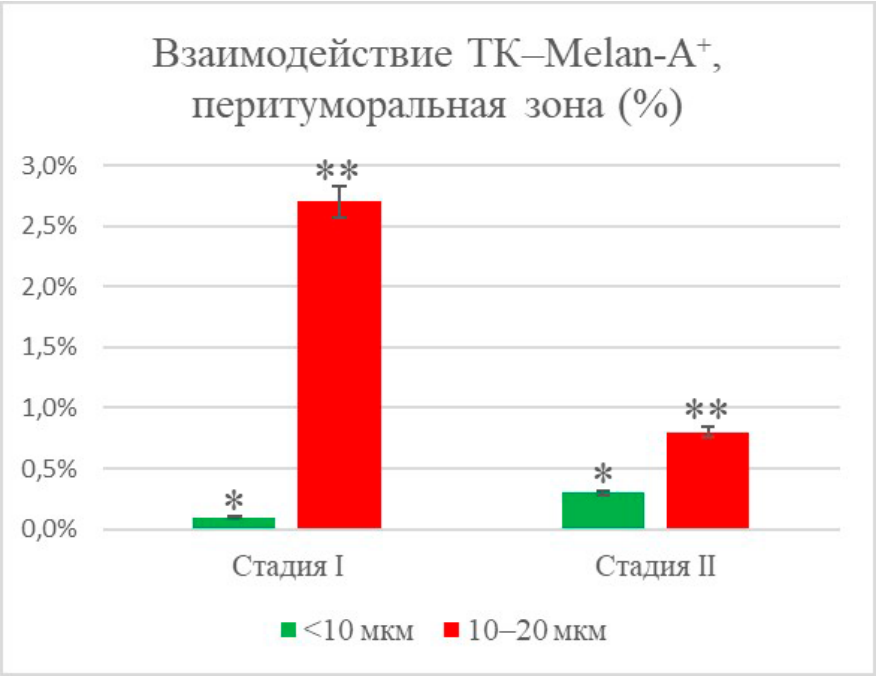


Рисунок 3.27 – Профиль юкстакринной и паракринной солокализации тучных клеток и Мелан-А$^+$-клеток в перитуморальной зоне, * и ** – p<0,05 и 0,01 соответственно

Гистотопографический анализ выявил частое пограничное расположение ТК по отношению к атипичным меланоцитам (Рисунок 3.28А–Е). В зонах

солокализации ТК принимали вытянутую форму, окружая атипичные клетки (Рисунок 3.28А), либо располагались параллельно с ними, формируя протяжённые участки контакта (Рисунок 3.28Е, Ё). Отмечались удлинённые цитоплазматические отростки ТК, примыкающие к поверхности атипичных клеток (Рисунок 3.28Ж). ТК овальной формы нередко локализовались на границе скоплений атипичных клеток (Рисунок 3.28З). ТК секретировали триптазу в составе гранул. Секреция имела направленный характер и могла быть ориентирована к одной из нескольких соседних атипичных клеток (Рисунок 3.28И–К). В некоторых наблюдениях в атипичных клетках фиксировались морфологические признаки апоптоза (Рисунок 3.28К). Помимо монотаргетной секреции триптазы, отмечались случаи дегрануляции ТК по направлению к двум и более атипичным клеткам (Рисунок 3.28Й–О). У части атипичных клеток при взаимодействии с ТК выявлялись признаки апоптоза (Рисунок 3.28Л, О). Зоны солокализации ТК с атипичными клетками характеризовались обширной площадью контакта (Рисунок 3.28И) и таргетной секрецией триптазы (Рисунок 3.28Л). В отдельных случаях ТК располагались в полном окружении опухолевых клеток (Рисунок 3.28К). В ряде наблюдений определялись признаки поступления триптазы в ядра соседних клеток, в том числе по данным трёхмерных реконструкций (Рисунок 3.28Й). Секреция триптазы могла быть направлена к определённым участкам поверхности атипичных клеток. Взаимодействие атипичных клеток меланомы с ТК сопровождалось секрецией меланокоров мелких размеров с их последующим фагоцитированием. В отдельных случаях фиксировались контакты ТК и атипичных клеток с близким расположением ядер (Рисунок 3.28И). Иногда взаимодействие сопровождалось морфологическими признаками апоптоза ТК при сохранении направленной секреции триптазы к атипичным клеткам (Рисунок 3.28Л–О).

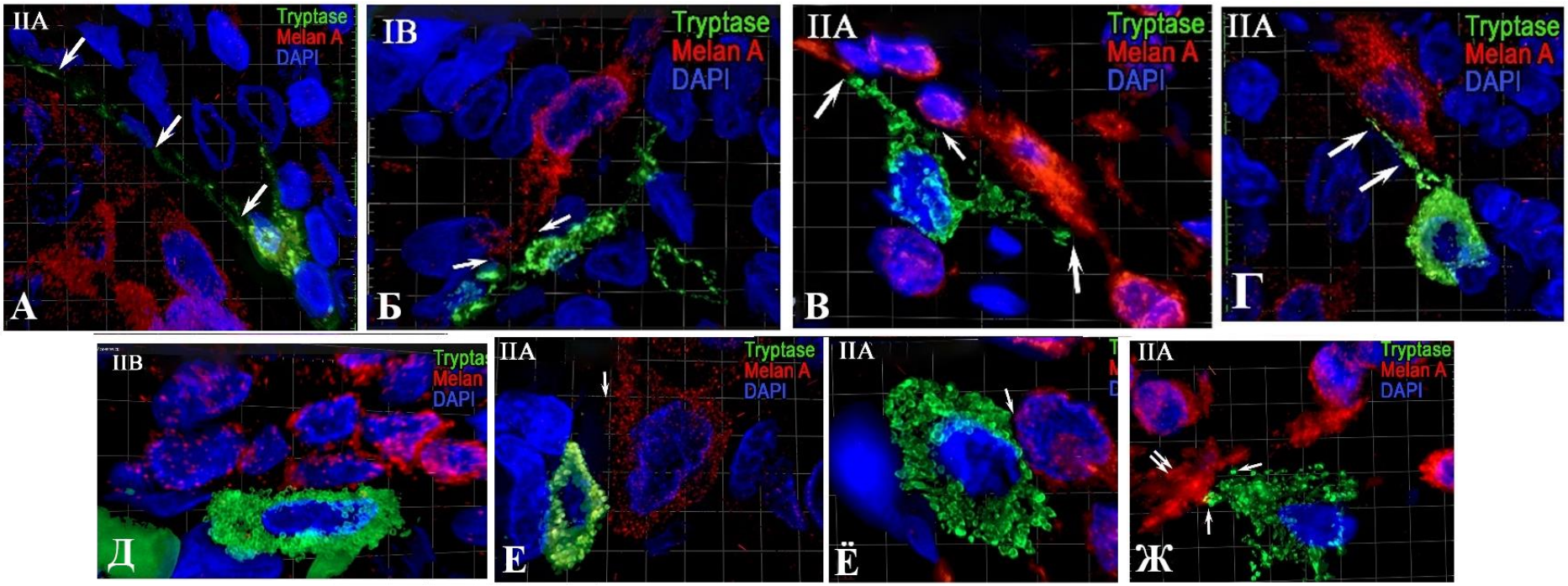
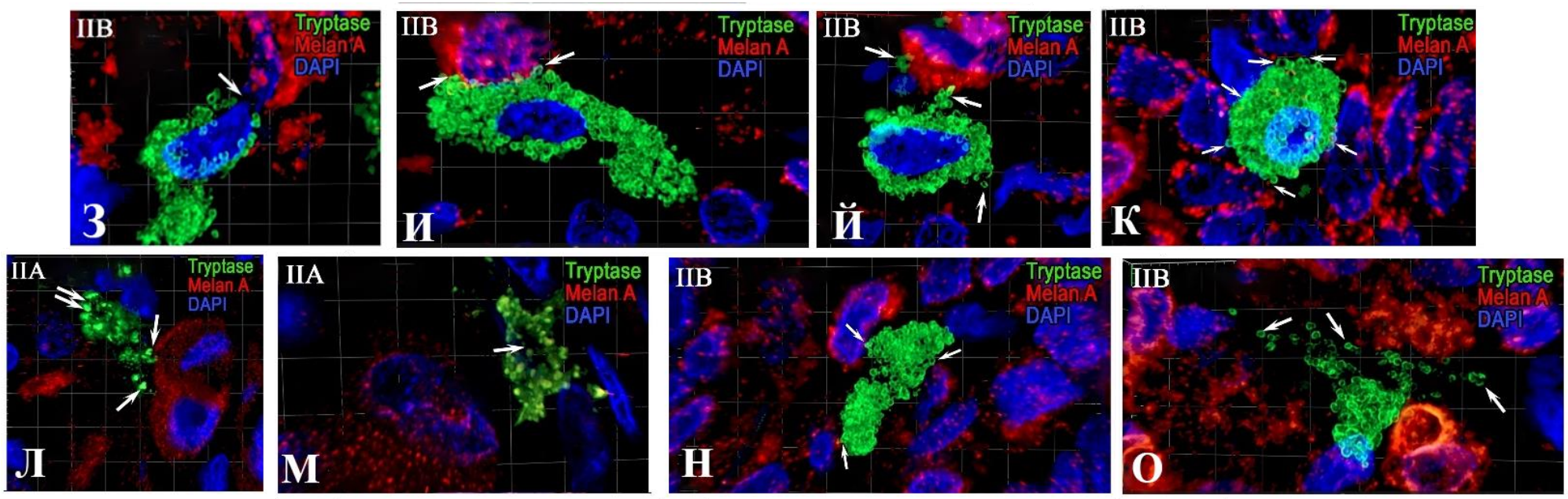


Рисунок 3.28 – Взаимодействие тучных клеток с атипичными клетками меланомы кожи. Методика: Диплексное иммуногистохимическое окрашивание триптазы (зеленый цвет) и Мелан-А (красный цвет) в меланоме кожи. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А – ТК вытянутой формы (стрелка) окружают скопление атипичных клеток; Б, В – ТК повторяют ход расположения атипичных клеток и контактирует с ними (стрелка); Г – отросток ТК солокализован с атипичной клеткой (стрелка); Д – крупная ТК, заполненная секреторными гранулами, находится по границе группы атипичных клеток; Е-Ж – ТК с преимущественной секрецией триптазы (стрелка) к одной атипичной клетке;

Рисунок 3.28 – Продолжение



З – близкая солокализация ядра ТК с ядром атипичной клетки меланомы (стрелка); И – крупная ТК, заполненная большим числом крупных секреторными гранулами, взаимодействует с двумя атипичными клетками, формируя с одной из них обширную площадь соприкосновения (стрелка); Й – солокализация ТК с несколькими атипичными с с реализацией таргетной секреции триптазы к двум из них (стрелка); К – ТК в тотальном окружении атипичных клеток. Визуализируется секреция триптазы к ядрам соседних клеток (стрелка); Л – фрагменты триптаза-позитивных цитоплазматических структур (двойная стрелка), с таргетированием атипичной клетки (стрелка); М – утрата ядра ТК (стрелка); Н – два крупных цитоплазматических остова, сохраняющих автономную секрецию триптазы к атипичным клеткам (стрелка); О – варианты таргетного воздействия триптазы, транспортируемой в гранулах, на атипичные клетки меланомы кожи (стрелка). Масштабная сетка: З-3 мкм, остальные – 5 мкм. 3D-модели представлены в приложении А, таблица А.1

3.8.3. Взаимодействие триптаза-позитивных тучных клеток и CD8+ лимфоцитов.

Профиль $CD8^+$-Т-лимфоцитов ($CD8^+$Л) во внутриопухолевой области меланомы кожи достигал максимальных значений на I стадии заболевания, составляя около 20 % от общей клеточной популяции микроокружения, и снижался примерно в 2,5 раза к II стадии (Рисунок 3.29).

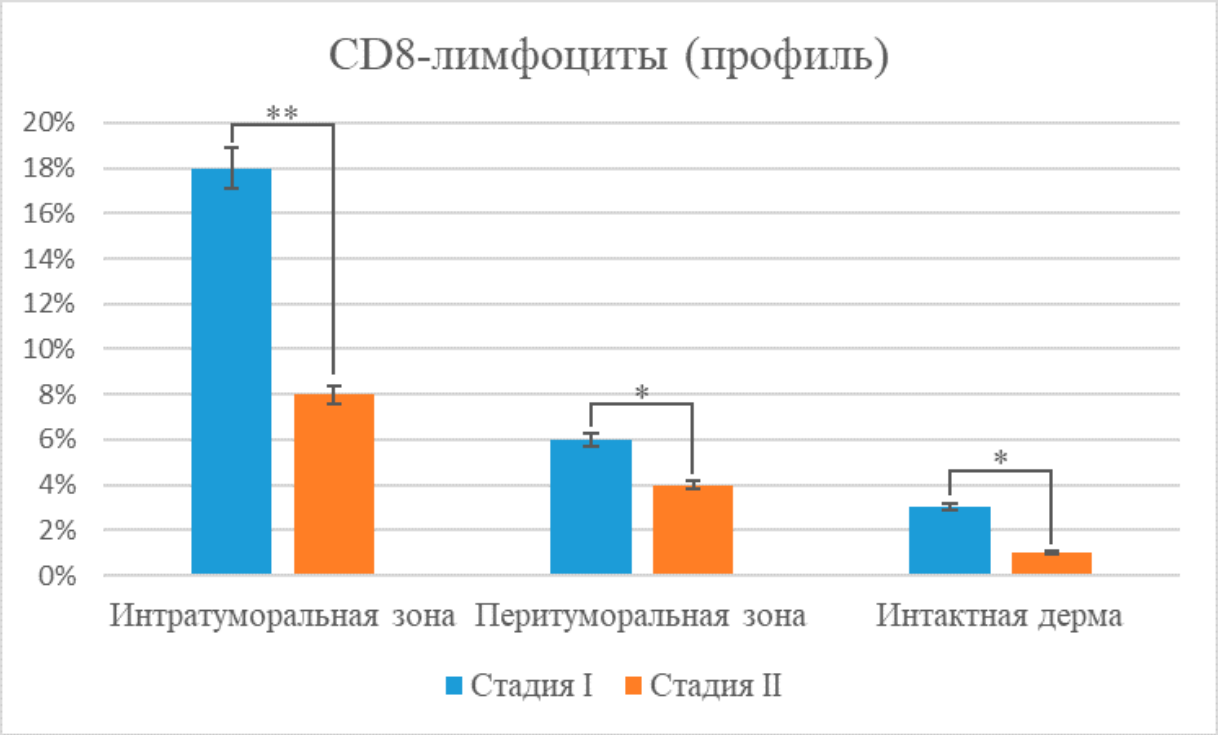


Рисунок 3.29 – профиль содержания CD8+-лимфоцитов в микроокружении меланомы кожи и области кожи без видимых изменений, * и ** – $p<0,05$ и 0,01 соответственно

В перитуморальной области наибольшая плотность расположения $CD8^+$Л отмечалась при I стадии. Взаимодействие ТК с $CD8^+$Л наблюдалось на всех стадиях меланомы (Рисунок 3.30, 3.31).

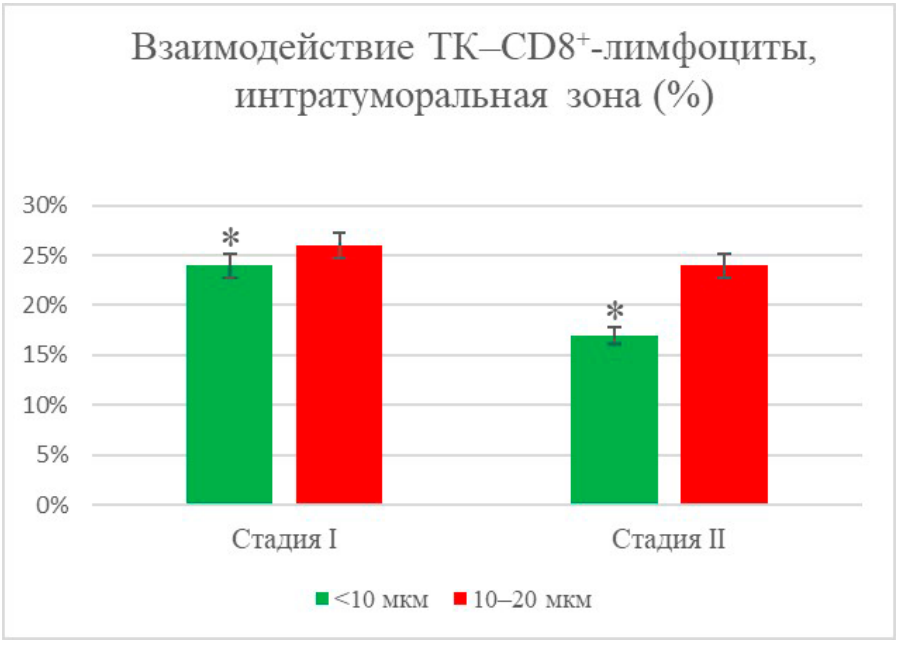


Рисунок 3.30 – Частота юкстракринной и паракринной солокализации тучных клеток к цитотоксическим Т-лимфоцитам в интратуморальной зоне, * – $p<0,05$

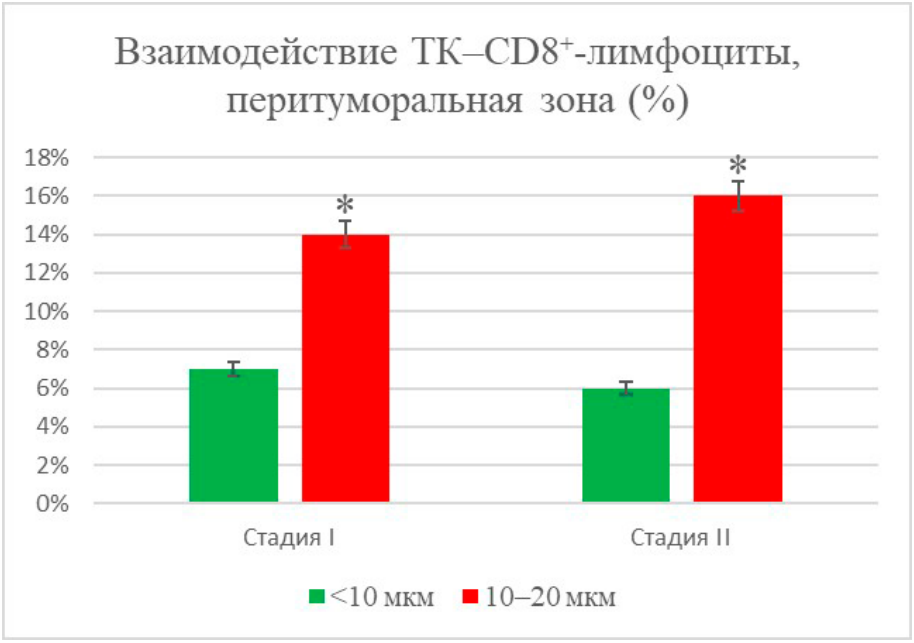


Рисунок 3.31 – Частота юкстракринной и паракринной солокализации тучных клеток с цитотоксическими лимфоцитами в перитуморальной зоне, * – $p<0,05$

Во внутриопухолевой области частота юкстакринного взаимодействия, характеризующегося непосредственным контактированием клеток, была наибольшей на I стадии и постепенно снижалась к II стадии (Рисунок 3.30). Частота паракринной солокализации ТК с $CD8^+$Л, составляя около 25 % от всей популяции, оставалась стабильной при прогрессировании меланомы до II стадии (Рисунок

3.30). В перитуморальной зоне наблюдалась тенденция к увеличению частоты паракринных взаимодействий от I к II стадии, а также возрастанию доли юкстакринных контактов на II стадии, однако статистически значимых различий между стадиями не выявлено (Рисунок 3.31). Во внутриопухолевом микроокружении юкстакринное прилежание ТК и $CD8^+$Л не всегда сопровождалось формированием выраженных морфологических контактов (Рисунок 3.32А, Б). ТК удлинённой формы взаимодействовали с $CD8^+$Л преимущественно через область цитоплазматических отростков (Рисунок 3.32В, Г). Отдельные ТК с удлинёнными выростами контактировали одновременно с двумя $CD8^+$Л как юкстакринно, так и паракринно (Рисунок 3.32Д). Между ТК и $CD8^+$Л визуализировались обособленные зоны контактирования с выраженной площадью соприкосновения (Рисунок 3.32Е). Одна ТК могла формировать одновременные контакты с двумя $CD8^+$Л (Рисунок 3.32Ё) либо с тремя и более $CD8^+$Л (Рисунок 3.32Ж–И).

В перитуморальной зоне наблюдалось чередующееся расположение контактирующих ТК и $CD8^+$Л, формирующее многоклеточные группы с синцитиоподобной организацией. Степень упорядоченности таких структур варьировала в зависимости от последовательности контактирования клеток. У части ТК выявлялась позитивность к CD8, причём интенсивность окрашивания варьировала между пациентами (Рисунок 3.323). Гистотопографически несколько ТК могли локализоваться вокруг одного $CD8^+$Л на паракринной дистанции (Рисунок 3.32К).

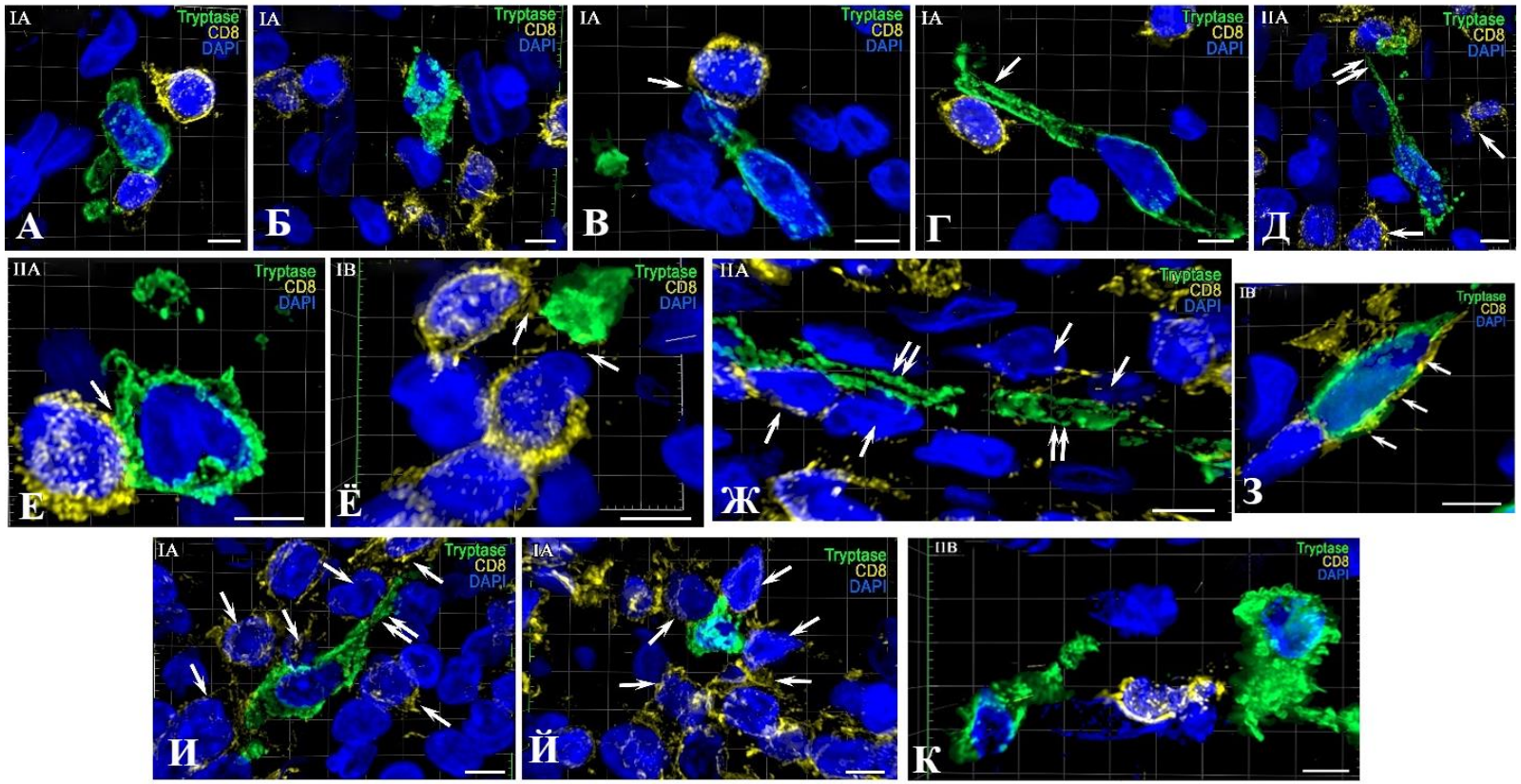


Рисунок 3.32 – Взаимодействие тучных клеток с цитотоксическими Т-лимфоцитами в опузолевом микроокружении меланомы кожи. Методика: диплексное иммуногистохимическое окрашивание триптазы и CD8. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А, Б – юкстакринная солокализация ТК и $CD8^+$ без видимых контактов; В, Г – ТК с выраженным цитоплазматическим отростком, контактирующим с $CD8^+$-Т-лимфоцитом (стрелка); Д – паракринное (стрелка) и юкстакринное (двойная стрелка) взаимодействие ТК с $CD8^+$-Т-лимфоцитом с помощью формирования удлиненного цитоплазматического выроста; Е – юкстакринное взаимодействие ТК и $CD8^+$-Т-лимфоцитом, на большой площади соприкосновения (стрелка); Ё, Ж – одновременное юкстакринное взаимодействия ТК с двумя и более $CD8^+$-Т-лимфоцитами (указано стрелкой); З – экспрессия CD8 на поверхности ТК (стрелка); И-Й. ТК контактируют с несколькими $CD8^+$-лимфоцитами. К – $CD8^+$-Т-лимфоцит в окружении двух ТК. Условные обозначения: в левом верхнем углу указана стадия меланомы кожи. 3D-модели представлены в приложении А, таблица А.1

3.8.4. Взаимодействие CD8+-лимфоцитов с Мелан А+-атипичными меланоцитами.

Исследование взаимодействия $CD8^+$-Т-лимфоцитов и Мелан-$А^+$-клеток опухоли показало, что профиль юкстакринного и паракринного воздействия Т-киллеров на атипичные клетки во внутриопухолевой области был наименьшим в первой стадии меланомы и достоверно возрастал при прогрессировании до II стадии заболевания, составляя около 30 % всей популяции $CD8^+$-Т-лимфоцитов (Рисунок 3.33).

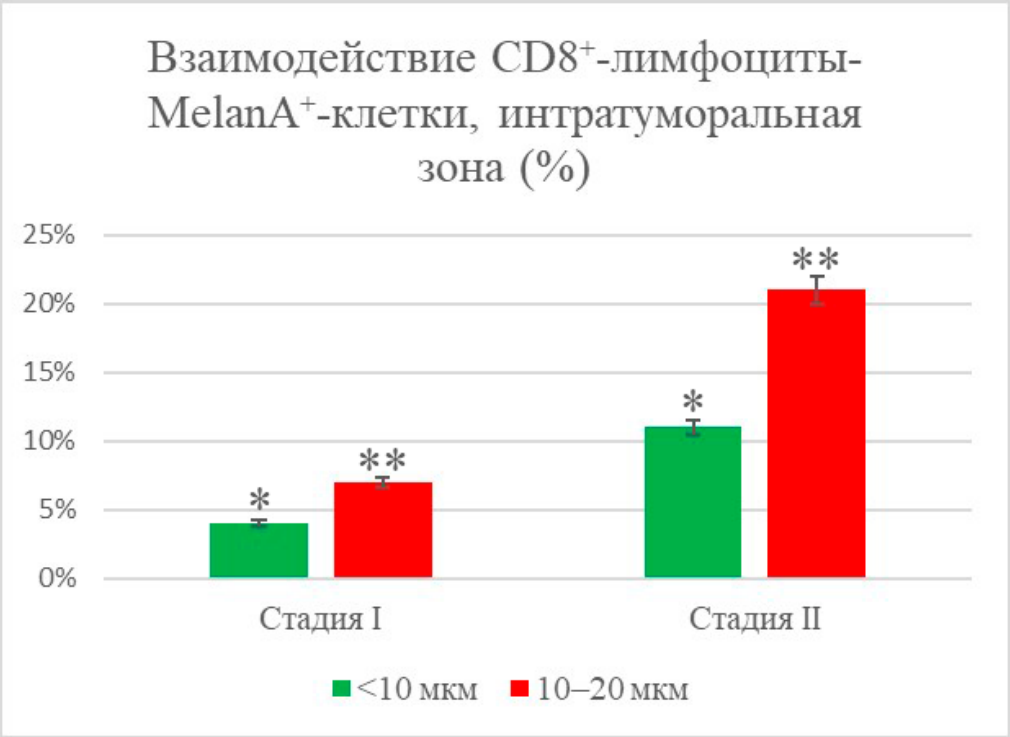


Рисунок 3.33 – Профиль юкстакринной и паракринной солокализации в популяции $CD8^+$Л с атипичными Мелан-$А^+$-клетками в интратуморальной зоне, * и ** – $p<0,05$ и 0,01 соответственно

В перитуморальной зоне активность прямого воздействия $CD8^+$-Т-лимфоцитов на атипичные клетки меланомы была гораздо слабее по сравнению с показателями внутриопухолевой зоны (рисунок 3.34).

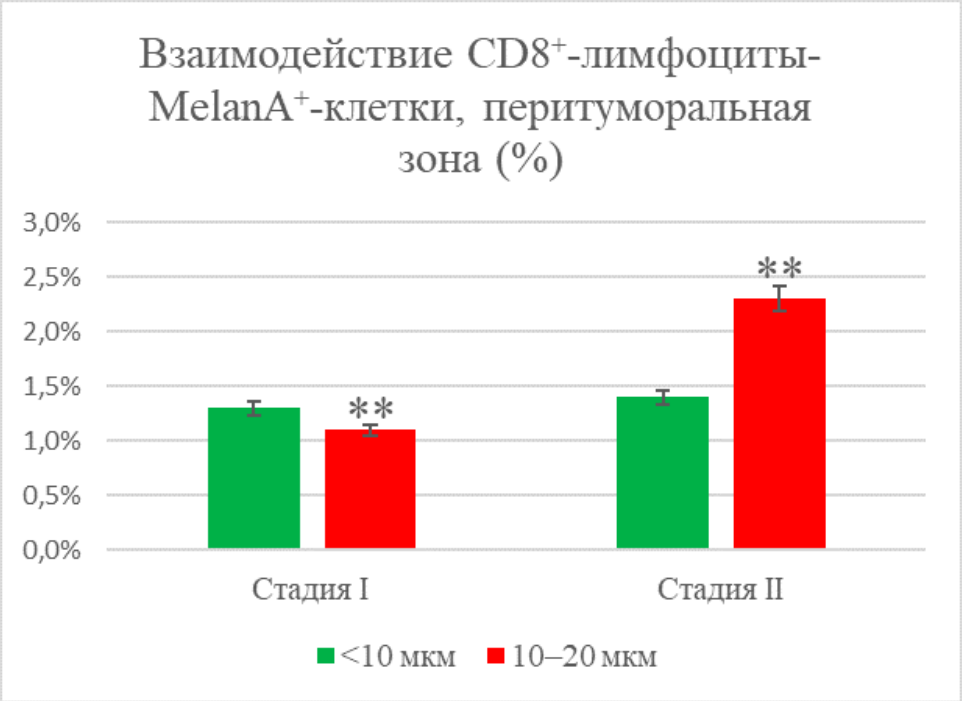


Рисунок 3.34 – Профиль юкстакринной и паракринной солокализации $CD8^+$Л с атипичными Мелан-A^+-клетками в перитуморальной зоне, ** – $p<0,01$

В то же время, повышение профиля взаимодействия $CD8^+$Л с Мелан-A^+-клетками от первой стадии заболевания к последующим достоверно возрастал только за счет паракринного воздействия, а юкстакринные контакты даже уменьшались (Рисунок 3.34). С точки зрения цитотопографии можно было видеть воздействие одной, двух или трех $CD8^+$Л на одну атипичную клетку (Рисунок 3.35А–В). При этом $CD8^+$Л могли буквально проникать в группы атипичных клеток (Рисунок 3.35Г), или окружать их (Рисунок 3.35Д). Наблюдалась и секреция меланокоров к $CD8^+$Л. При воздействии на атипичные клетки $CD8^+$Л могли формировать диады, а также одновременно быть солокализованными с двумя опухолевыми (Рисунок 3.35Д). При прогрессировании меланомы до II стадии те $CD8^+$Л, которые оказывали цитотоксические эффекты на клетки опухоли, оказывались в микроокружении, наполненном меланокорами мелких размеров (рисунок 3.35Е).

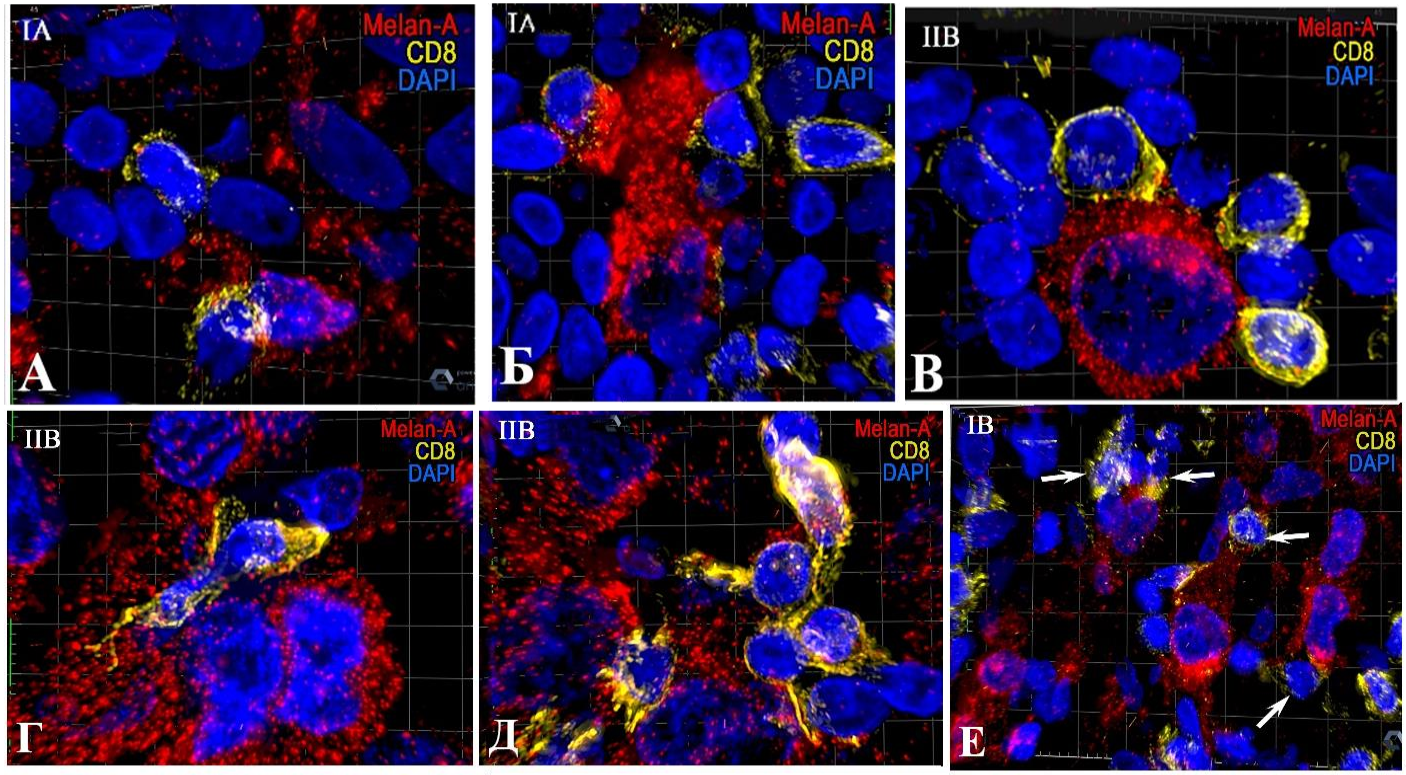


Рисунок 3.35 – Взаимодействие цитотоксических Т-лимфоцитов с атипичными клетками меланомы кожи. Методика: Диплексное иммуногистохимическое окрашивание CD8 и Мелан-А. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А – преимущественное воздействие $CD8^+$Л на одну атипичную клетку; Б – воздействие двух $CD8^+$Л на Мелан-$А^+$-клетку; В – три $CD8^+$Л прилежат к одной атипичной клетке; Г – проникновение $CD8^+$Л в скопление атипичных клеток; Д – Многоклеточная группа $CD8^+$Л в тесном взаимодействии с Мелан-$А^+$-клетками; Е – Локус внутриопухолевой области, в котором визуализируется активное воздействие $CD8^+$Л на атипичные меланоциты, в том числе одновременное воздействие лимфоцитов на две клетки опухоли (стрелка). Условные обозначения: в левом верхнем углу указана стадия меланомы кожи. Масштабная сетка Е – 10 мкм, остальные – 5 мкм. 3D-модели представлены в приложении А, таблица А.1

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

Мультиплексное окрашивание триптазы, Melan-A и CD8 позволило идентифицировать солокализацию тучных клеток (ТК), атипичных клеток меланомы и $CD8^+$-Т-лимфоцитов ($CD8^+$Л), находящихся в пределах юкстакринного или паракринного взаимодействия. Наибольшая частота формирования клеточных триад определялась во внутриопухолевой зоне, преимущественно на II стадии заболевания (Рисунок 3.36).

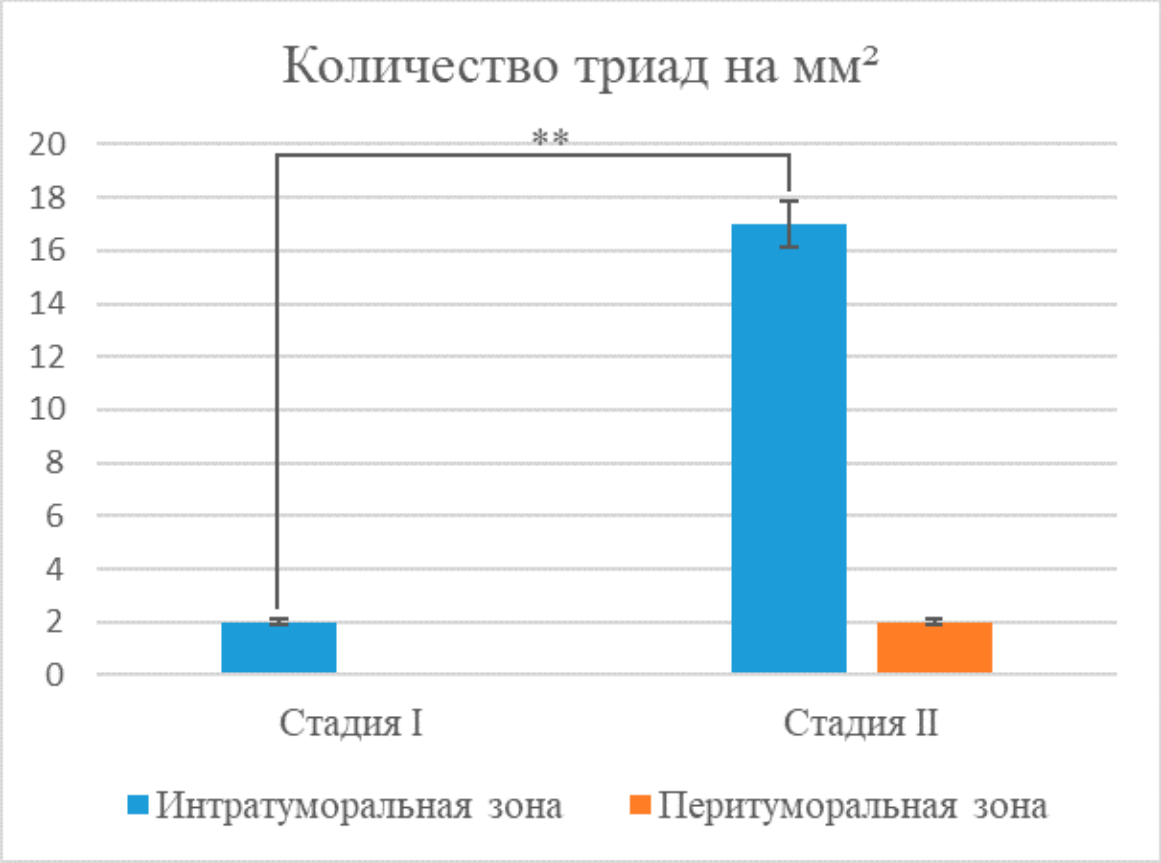


Рисунок 3.36 – Содержание триад «ТК - $CD8^+$Л - Атипичная клетка меланомы» в интратуморальной и перитуморальной зонах меланомы кожи, ** – $p<0,01$

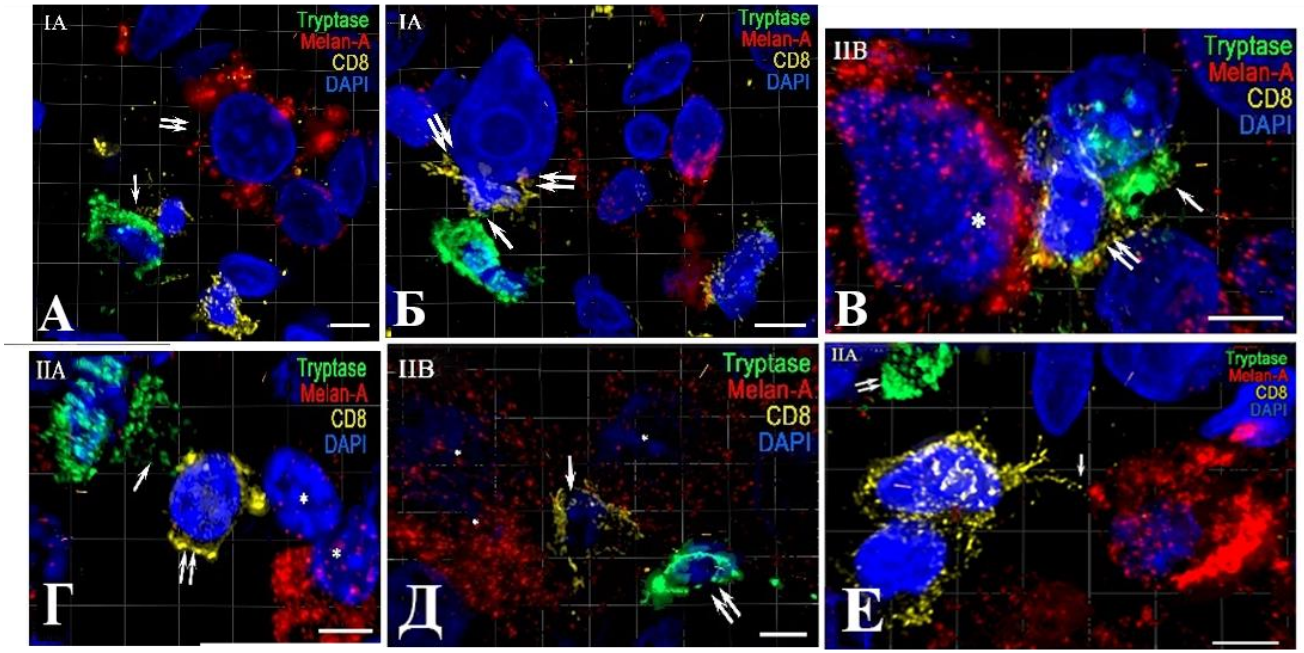
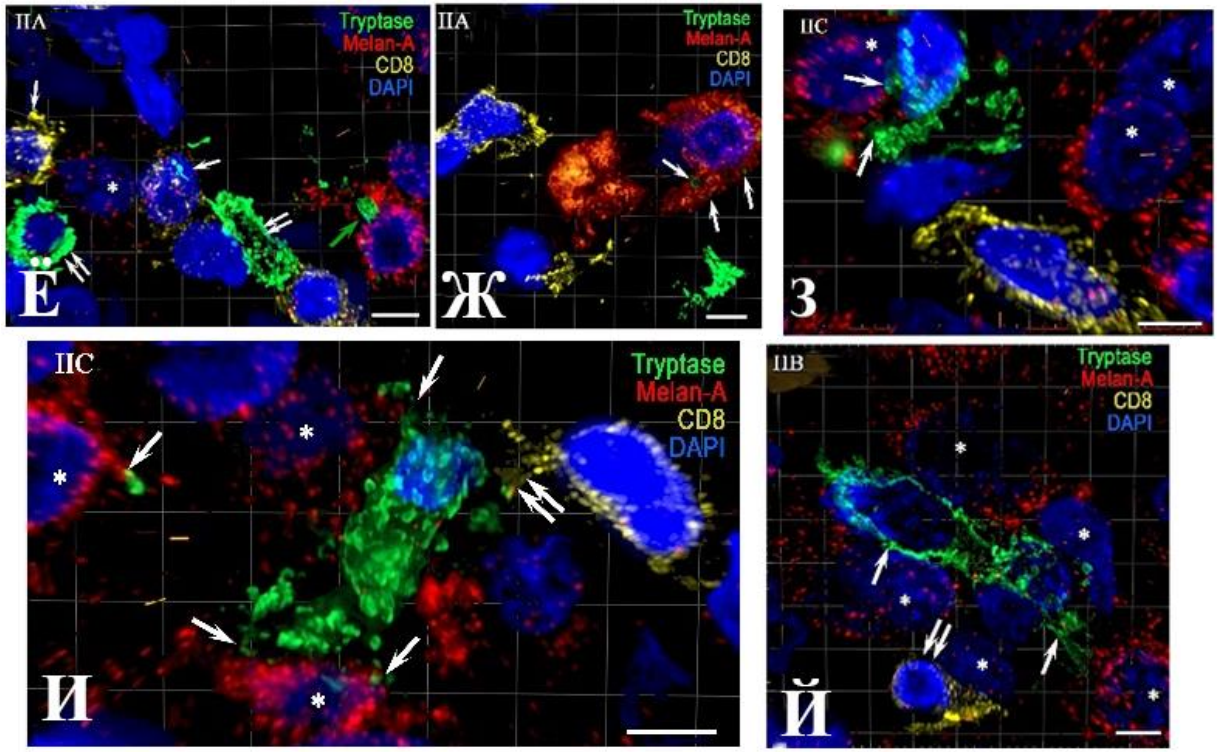


Рисунок 3.37 – Взаимодействие тучных клеток, цитотоксических Т-лимфоцтов и атипичных клеток в опухолем микроокружении меланомы кожи. Методика: мультиплексное имуногистохимическое окрашивание триптазы, CD8 и Мелан-А. Ядра контрастированы DAPI. Флуоресцентная микроскопия. А - взаимодействующие ТК и $CD8^+$Л (стрелка) локализованы на паракринном расстоянии от атипичного меланоцита (двойная стрелка); Б – секреция триптазы к CD8+ Т-лимфоциту (стрелка), солокализованному на большой площади (двойная стрелка) с атипичной клеткой; В – юкстакринное взаимодействие ТК (стрелка), $CD8^+$-Т-лимфоцита (двойная стрелка) и атипичной клетки (звездочка); Г – воздействие $CD8^+$-Т-лимфоцита (двойная стрелка) на атипичную клетку опухоли (звездочка), секреция триптазы ТК к $CD8^+$-Т-лимфоциту (стрелка); Д – $CD8^+$Л воздействует на две атипичные клетки (звездочка), в межклеточном пространстве (стрелка), ТК на паракринном расстоянии от $CD8^+$Л (двойная стрелка), взаимодействующего с атипичными клетками; Е – воздействие цитотокического Т-лимфоцита на атипинчую клетку меланомы путем формирования тонких выростов цитоплазмы (стрелка), в паракринной солокализации с фрагментом триптаза-позитивной цитоплазмы (двойная стрелка);

Рисунок 3.37 – Продолжение



Ё – атипичная клетка (звездочка) находится под одновременным воздействием нескольких $CD8^{+}$Л (стрелка) и ТК (двойная стрелка), находящихся в юкстакринной солокализации. Визуализируется поступление триптазы в цитоплазму атипичной клетки (зеленая стрелка); Ж – атипичная клетка в паракринной солокализации $CD8^{+}$Л и фрагмента цитоплазмы ТК, с поступлением триптазы в цитоплазму (стрелка); З, И – варианты прямого воздействия тучной клетки (стрелка) на атипичные клетки (звездочка) меланомы, при этом CD8+ Т-лимфоцит может формировать таргетные выросты цитоплазмы к ТК (двойная стрелка); Й – изолированное влияние двух ТК (стрелка) и $CD8^{+}$Л (двойная стрелка) на атипичные клетки (звездочка). Условные обозначения: в левом верхнем углу указана стадия меланомы кожи. Масштабная шкала: 5 мкм. 3D-модели представлены в приложении А, таблица А.1

Уже на I стадии выявлялись триады, в которых ТК располагались вблизи $CD8^+$Л, контактировавших с атипичными клетками (Рисунок 3.37А, Б). При этом наблюдалась направленная секреция триптазы к $CD8^+$Л, взаимодействующему с атипичной клеткой на значительной площади (Рисунок 3.37Б).

Тесная солокализация ТК, $CD8^+$Л и атипичных клеток регистрировалась как в микроокружении с высоким содержанием меланокоров (Рисунок 3.37В), так и при их отсутствии (Рисунок 3.37Г).

Некоторые ТК определялись на паракринном расстоянии от одиночных или групп $CD8^+$Л, взаимодействующих с атипичными клетками (Рисунок 3.37Д). В других случаях ТК, находившиеся в тесной солокализации с несколькими $CD8^+$Л, располагались у поверхности опухолевых клеток. Воздействие $CD8^+$Л на атипичные клетки фиксировалось с разных направлений, с участием ТК в пределах общей зоны контакта (Рисунок 3.37В). Цитотоксическое взаимодействие $CD8^+$Л с атипичными клетками нередко осуществлялось через тонкие цитоплазматические выросты, при паракринном присутствии ТК (Рисунок 3.37Е). Отмечались случаи, когда атипичные клетки оказывались полностью окружены взаимодействующими ТК и $CD8^+$Л. В ряде наблюдений ТК занимали промежуточное положение между $CD8^+$Л и атипичной клеткой, контактируя с обеими (Рисунок 3.37И). Одна ТК могла взаимодействовать одновременно с $CD8^+$Л и несколькими атипичными клетками (Рисунок 3.37З).

ТК и $CD8^+$Л воздействовали на атипичные клетки как независимо, так и находясь в юкстакринной солокализации друг с другом (Рисунок 3.37Й). В цитоплазме атипичных клеток, контактировавших с ТК, определялась триптаза (Рисунок 3.37З, Ж). Взаимодействие ТК с атипичными клетками сопровождалось формированием направленных цитоплазматических выростов $CD8^+$Л по направлению к ТК (Рисунок 3.37З, И). Наряду с триадами, наблюдались диады «ТК–$CD8^+$Л», воздействующие на разные атипичные клетки (Рисунок 3.37З). В отдельных случаях ТК взаимодействовали между собой в составе триад (Рисунок 3.37И). Отмечались примеры экспрессии CD8 в ТК, участвующих в триадах.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые проведена комплексная оценка количественных и пространственных характеристик компонентов опухолевого микроокружения – $CD8^+$-лимфоцитов, $CD68^+$-макрофагов и триптаза-позитивных тучных клеток – при неметастатической меланоме кожи I и II стадий по AJCC. Определены закономерности их распределения и динамики в интра- и перитуморальных зонах, а также взаимосвязи этих показателей с основными морфологическими параметрами опухоли – толщиной инвазии по Breslow, категорией pT и стадией по AJCC. Также изучена экспрессия меланоцитарных маркеров HMB-45, Melan-A/MART-1 и S100 в зависимости от толщины инвазии, что позволило установить их диагностическую ценность на ранних стадиях. Полученные данные раскрывают механизмы опухолевой прогрессии, связанные с дисбалансом иммуносупрессивных и противоопухолевых компонентов микроокружения, и подчёркивают роль пространственного распределения в выявлении закономерностей межклеточных взаимодействий. Результаты исследования вносят вклад в понимание механизмов регуляции опухолевого роста на ранних этапах и открывают перспективы для разработки тканевых биомаркеров и новых терапевтических стратегий.

4.1. Особенности иммунофенотипа атипичных меланоцитов в процессе инвазивного роста меланомы кожи

Проведенное исследование иммунофенотипического профиля атипичных меланоцитов выявило важные закономерности их фенотипической пластичности на ранних стадиях онкогенеза.

Стабильная гомогенная экспрессия дифференцировочных маркеров Melan-A/MART-1 и S100 на всех уровнях инвазии по Бреслоу и независимо от гистологического подтипа подтверждает их статус базовых маркеров

меланоцитарного гистогенеза [54]. Их постоянный уровень отражает сохранность фундаментальных программ тканевой идентичности опухолевых клеток даже в условиях активного микроокружения и локальной стромальной перестройки.

В отличие от них, пропорциональный рост доли HMB-45^{+}-атипичных меланоцитов по мере увеличения категории pT и прогрессирования стадии по AJCC отражает функциональную активацию синтетического аппарата клетки при переходе к фазе вертикального роста. Антитело HMB-45 распознает сиалированную форму гликопротеина gp100 (Pmel17) – ключевого структурного белка, обеспечивающего фибриллярный матрикс и созревание премеланосом I – II стадий [53]. Нарастание экспрессии HMB-45 коррелирует с интенсификацией меланогенеза, гиперплазией органелл и пролиферативной реорганизацией атипичных меланоцитов [39].

Этот феномен отражает адаптацию опухолевых клеток при переходе к активному росту: сохраняя свои базовые признаки меланоцита (Melan-A и S100), опухолевые клетки усиливают синтез белков меланосом, поэтому увеличение доли HMB-45-клеток служит маркером прогрессирования меланомы.

4.2. Роль тучных клеток в прогрессировании неметастатической меланомы кожи

В настоящем исследовании впервые проведена комплексная оценка количественных и качественных характеристик тучных клеток в микроокружении неметастатической меланомы кожи I и II стадий по AJCC. Для их выявления использовались как гистохимическое окрашивание толуидиновым синим (для общей идентификации тучных клеток по метахроматически окрашенным гранулам), так и иммуногистохимическое исследование с использованием антител к триптазе. Такой подход позволил получить полное представление об изменении популяций тучных клеток в зависимости от толщины опухоли по Бреслоу, категории pT и стадии заболевания по AJCC.

Результаты продемонстрировали устойчивую тенденцию к снижению общей численности тучных клеток (по толуидиновому синему) как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах по мере прогрессирования заболевания. Максимальная плотность регистрировалась на ранних стадиях при минимальной толщине по Бреслоу, после чего наблюдалось поэтапное уменьшение их числа с увеличением глубины инвазии и переходом к более высоким стадиям.

Особое внимание уделено динамике триптаза-позитивных тучных клеток в процессе опухолевой прогрессии. Установлено, что триптаза-позитивная субпопуляция тучных клеток сохраняется на протяжении всех стадий развивающейся меланомы кожи, что указывает на её высокий адаптивный потенциал к изменениям локального стромального ландшафта [119]. Обладая способностью стимулировать ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, активировать опухолеассоциированные фибробласты и индуцировать процессы неоангиогенеза, триптаза-позитивные тучные клетки продолжают стабильно определяться в опухолевой ткани даже на поздних стадиях заболевании, обеспечивая непрерывное формирование воспалительно-фиброзного и иммуносупрессивного микроокружения [70].

Выявленные тенденции согласуются с данными литературы, подчёркивающими функциональную гетерогенность тучных клеток и их двойственную роль в опухолевом процессе. В начальных стадиях они могут выполнять как протуморогенные функции (ангиогенез, ремоделирование ткани, иммуносупрессия), так и участвовать в противоопухолевых реакциях за счёт секреции провоспалительных медиаторов [28, 51]. Однако по мере прогрессирования меланомы их количество закономерно снижается. Данный феномен обусловлен не только общими факторами стресса микроокружения, такими как гипоксию, ацидоз и накопление реактивных форм кислорода [139], но и прямым супрессивным действием продуктов меланогенеза. Показано, что направленная секреция атипичными меланоцитами меланокор (меланосомальных микровезикул) и гранул меланина с их последующим поглощением тучными клетками напрямую угнетает функциональную активность последних, блокируя

дегрануляцию и запуская механизмы апоптоза [131]. Дополнительную роль могут играть изменения в системе цитокиновых сигналов (TNF-α, TGF-β) и нарушение функционирования SCF/c-Kit каскада, обеспечивающего хемотаксис и выживаемость тучных клеток [32]. В совокупности эти процессы приводят к истощению популяции тучных клеток и смещению иммуносупрессивных и ангиогенных функций в сторону других элементов опухолевого микроокружения, таких как опухоль-ассоциированные макрофаги и Т-лимфоциты [35].

Особенно важно отметить, что уменьшение численности триптаза-позитивных тучных клеток на поздних стадиях меланомы носит неравномерный характер, что отражает пластичность их функционального профиля в гетерогенном микроокружении. Снижение плотности расположения этой инфильтрации может быть связано с критическим нарушением метаболического ландшафта опухоли, включая нарастающую гипоксию, локальный ацидоз и деструкцию микрососудов, которые на этапах выраженной прогрессии угнетают выживаемость и функциональную активность резидентных клеток стромы [144]. В то же время определенный пул триптаза-позитивных тучных клеток, обладая устойчивыми механизмами адаптации к тканевому стрессу, сохраняется в перитуморальной зоне дольше. Эти клетки продолжают локально поддерживать ремоделирование внеклеточного матрикса, активацию ассоциированных с опухолью фибробластов и стимуляцию неоангиогенеза за счет направленной секреции VEGF, FGF-2 и матриксных металлопротеиназ [29, 133]. Данный процесс вносит весомый вклад в формирование локального про-опухолевого микроклимата, благоприятного для дальнейшей инвазии новообразования [98].

В рамках мультиплексного анализа обращает на себя внимание пространственная организация тучных клеток: при ранних стадиях чаще регистрировались контакты «ТК – атипичная клетка» в интратуморальной зоне и выраженная перитуморальная локализация ТК; по мере прогрессии частота интратуморальных контактов снижалась. Дополнительно зафиксирована обратная корреляция между числом ТК и количеством Melan-A^{+} клеток в пределах опухоли: увеличение одной популяции сопровождалось уменьшением другой. Это может

отражать меланин-опосредованную супрессию функций ТК (снижение пролиферации, дегрануляции, сдвиг цитокинового профиля), о чём сообщают экспериментальные работы [130]. Одновременно описан и противоположный вектор – антиопухолевая активность ТК (триптаза/химаза, гистамин), включая контакт-зависимые эффекты [82, 113, 142]. Учитывая дуализм эффектов и влияние PAR-2/SCF-c-KIT-сигнализации, наблюдаемые нами сдвиги следует трактовать как результат динамического ребалансирования ТК между про- и антиопухолевыми состояниями [152]. При II стадии отмечено увеличение частоты триад «ТК – $CD8^+$ – атипичная клетка», что может служить косвенным признаком активации цитотоксического звена на фоне рекрутирования ТК; данное наблюдение требует валидации на расширенной когорте [59].

4.3. Роль лимфоцитов в развитии неметастатической меланомы кожи

Иммуногистохимическое исследование лимфоцитарного инфильтрата при меланоме кожи выявило отчетливую зависимость численности $CD8^+$-клеток от толщины опухоли, категории pT и стадии заболевания по AJCC. В целом, как интратуморальные, так и перитуморальные лимфоциты демонстрировали более высокую плотность на ранних стадиях болезни и снижение по мере её прогрессирования.

Наиболее выраженное падение численности было отмечено для лимфоцитов, особенно в перитуморальной зоне при стадиях с изъязвлением (pT категории с индексом «b»). Это может отражать утрату локальных механизмов контроля опухолевого роста, поскольку именно $CD8^+$-лимфоциты способны формировать перитуморальные лимфоидные скопления и поддерживать антитуморальный иммунный ответ [12, 135]. Их резкое уменьшение при более агрессивных формах меланомы может быть связано с несколькими факторами. Во-первых, в условиях прогрессирования опухоли происходит ремоделирование микроокружения с преобладанием иммуносупрессивных сигналов, включая продукцию TGF-β, IL-10

и VEGF, которые препятствуют созреванию и выживанию Т-лимфоцитов [106]. Во-вторых, хроническая антигенная стимуляция и контакт с опухолевыми клетками способны индуцировать апоптоз или истощение Т-клеточных клонов [89, 145]. Кроме того, нарушение архитектоники перитуморальных лимфоидных структур на фоне инвазивного роста и деградации стромы под действием протеаз также ведёт к их деструкции [40]. Наконец, часть функций, связанных с локальной иммуносупрессией, может переходить к другим элементам опухолевого микроокружения, прежде всего к М2-поляризованным макрофагам и регуляторным Т-лимфоцитам, что дополнительно уменьшает роль лимфоцитарного звена [72]. Снижение численности $CD8^+$-клеток, также объясняется их ключевой ролью в непосредственном уничтожении опухолевых клеток: даже при развитии выраженной иммуносупрессии часть этих лимфоцитов продолжает сохраняться в тканях в качестве эффекторного и резидентного пула. Однако по мере прогрессирования меланомы в микроокружении усиливаются механизмы, ограничивающие активность $CD8^+$-клеток. Среди них можно выделить: экспрессию опухолевыми клетками PD-L1 и активацию сигнального пути PD-1/PD-L1, индуцирующего истощение Т-лимфоцитов; секрецию иммуносупрессивных цитокинов (TGF-β, IL-10), угнетающих их пролиферацию и продукцию цитотоксических молекул; а также локальную гипоксию и ацидоз, которые нарушают метаболизм и снижают выживаемость Т-лимфоцитов [123, 154, 156]. В интратуморальной зоне это проявлялось наиболее отчетливо на поздних стадиях, что связано с формированием выраженной иммуносупрессивной ниши, препятствующей инфильтрации и цитотоксической активности $CD8^+$-клеток. В перитуморальной зоне их количество сохранялось дольше и в большей степени, что отражает наличие своеобразного «иммунного фронта» между опухолью и окружающей стромой, где сохранялись условия для поддержания противоопухолевого ответа [94]. Тем не менее при дальнейшем прогрессировании меланомы даже эта зона демонстрировала закономерное снижение $CD8^+$-клеток, что указывает на истощение и функциональную блокаду Т-клеточного звена иммунного надзора.

Мультиплексная ИГХ и 3D-фенотипирование выявили частые юкстакринные контакты «ТК–CD8⁺», потенциально соответствующие иммунологическим синапсам. Учитывая способность ТК рекрутировать Т-клетки (CCL2/3/5, TNF-α), осуществлять презентацию антигена через MHC-I после процессинга и усиливать цитотоксический ответ CD8⁺-клеток (повышение IFN-γ, гранзима B), подобные контакты могут рассматриваться как локальный усиливающий модуль антиопухолевого иммунитета [96, 111, 115]. Пространственные метрики, такие как плотность и доля контактов «ТК–CD8⁺», могут представлять интерес в качестве дополнительных количественных характеристик иммунного ландшафта меланомы кожи и потенциальных прогностических параметров, требующих дальнейшего изучения.

4.4. Роль макрофагов в неметастатической меланоме кожи

В настоящем исследовании проведена количественная оценка CD68⁺-макрофагов в интратуморальной и перитуморальной строме меланомы кожи. Было выявлено устойчивое нарастание инфильтрации макрофагами по мере утолщения опухоли по Бреслоу, а также с увеличением категорий pT и стадий AJCC. Данный результат подчёркивает ключевое значение макрофагов как клеток врождённого иммунитета, вовлечённых в формирование воспалительного и ремоделирующего компонента опухолевого микроокружения.

Особое внимание заслуживает выявленная зависимость между ростом численности CD68⁺ макрофагов и стадиями с изъязвлением (pTb). Более выраженное накопление этих клеток в интратуморальной зоне может отражать активацию локального воспалительного ответа в условиях изъязвления опухоли. Последнее сопровождается разрушением эпидермального барьера и высвобождением сигналов повреждения (DAMPs), которые стимулируют экспрессию хемокинов (CCL2, CCL5) и провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β, IL-6) в окружающей ткани [44, 127]. Эти медиаторы индуцируют активную

миграцию моноцитов из кровотока и их дифференцировку в макрофаги с преимущественно $CD68^+$ фенотипом [104]. Дополнительно, в зоне изъязвления происходит активация ангиогенеза и деградация внеклеточного матрикса под действием протеаз, что облегчает проникновение макрофагов внутрь опухолевого узла [44]. В совокупности эти процессы формируют очаг выраженного воспаления и создают условия для дальнейшего накопления макрофагов в интратуморальном компартменте.

Перитуморальные макрофаги, напротив, демонстрировали постепенное и стабильное увеличение численности, что, вероятно, обусловлено хроническим воспалением, ремоделированием стромы и инвазивным ростом опухоли, а не острыми изменениями, связанными с изъязвлением. В этой зоне макрофаги активно рекрутируются под действием провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β, IL-6) и хемокинов (в первую очередь CCL2/MCP-1), продуцируемых опухолевыми клетками, фибробластами и эндотелием [112]. Их накопление связано с хронической активацией ангиогенеза, усилением секреции факторов роста (VEGF, PDGF, TGF-β) и протеаз, способствующих деградации внеклеточного матрикса и облегчению инвазивного роста опухоли [129].

Таким образом, увеличение численности $CD68^+$-макрофагов по мере прогрессирования заболевания отражает их активное участие в канцерогенезе меланомы кожи. При этом ключевое прогностическое значение имеет дифференцированный характер их распределения: выраженное интратуморальное накопление макрофагов ассоциировано с процессами изъязвления, тогда как стабильный рост их плотности расположения в перитуморальной зоне отражает масштабы инвазии и хронического ремоделирования стромы. Это позволяет рассматривать особенности пространственного распределения $CD68^+$-клеток как перспективные прогностические маркеры и потенциальные мишени для таргетных иммунотерапевтических подходов.

4.5. Итоги выполнения диссертационной работы

Иммуногистохимическое исследование тучных клеток в образцах меланомы кожи показало их максимальную численность на ранних стадиях заболевания с последующим закономерным снижением по мере увеличения толщины опухоли и прогрессирования стадии. Обнаруженная динамика указывает на функциональную гетерогенность тучных клеток и на возможную смену их роли в патогенезе меланомы по мере прогрессирования заболевания.

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование позволило уточнить пространственные взаимоотношения тучных клеток с другими элементами опухолевого микроокружения. Установлено, что на ранних стадиях заболевания тучные клетки чаще локализуются в непосредственной близости от $CD8^+$-Т-лимфоцитов и атипичных меланоцитов, формируя участки тесных межклеточных контактов. Эти взаимодействия, вероятно, реализуются в юкстакринном и паракринном форматах и могут играть роль локальных регуляторных узлов, обеспечивающих координацию врождённого и адаптивного звеньев иммунного ответа. По мере прогрессирования меланомы количество таких контактов снижалось, что согласуется с общим уменьшением численности тучных клеток и нарастанием иммуносупрессивных механизмов.

Анализ макрофагальной инфильтрации подтвердил закономерный рост числа $CD68^+$-клеток как в интратуморальной, так и в перитуморальной зонах при увеличении толщины опухоли, категории pT и стадии по AJCC. Более выраженное накопление $CD68^+$-клеток в интратуморальной зоне наблюдалось на стадиях с изъязвлением, что может быть связано с активацией локального воспалительного ответа, усиленной миграцией моноцитов из кровотока и ремоделированием микросреды. Полученные данные подтверждают ведущую роль опухоль-ассоциированных макрофагов в канцерогенезе меланомы и их значимость как потенциальных прогностических маркеров.

Исследование $CD8^+$-лимфоцитов выявило противоположные тенденции. $CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты снижались умеренно, особенно в

интратуморальной зоне, что может быть связано с развитием иммуносупрессивных механизмов микроокружения (экспрессия PD-L1, продукция TGF-β и IL-10, гипоксия и метаболическое истощение). В перитуморальной зоне они сохранялись дольше, формируя своеобразный «иммунный фронт» на границе опухоли и стромы.

Применение мультиплексной ИГХ позволило визуализировать in situ пространственные взаимодействия ТК с атипичными клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами и макрофагами, потенциально соответствующие иммунологическим синапсам, а также впервые рассматривать роль формирования триад (ТК-Цитотоксический Т-лимфоцит – Атипичная клетка; ТК – макрофаг - атипичная клетка) в опухолевой прогрессии. Контактирующие пары «ТК–$CD8^+$» преимущественно регистрировались в перитуморальной зоне на ранних стадиях заболевания, что может отражать кооперацию врождённого и адаптивного звеньев иммунитета. Снижение частоты таких контактов при поздних стадиях согласуется с развитием иммуносупрессивного фенотипа микроокружения. Прямые цитотоксические эффекты ТК по отношению к атипичным клеткам меланомы, а также формирование диад с лифоцитами и макрофагами для воздействия на опухолевые клетки с образованием триад представляет собой важный патоненетический аспект эволюции опухоли и новые перспективные трансляционные маркеры меланомы кожи для улучшения диагностики, прогнозирования и оценки проводимой терапии, требующие дальнейшего изучения.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что прогрессирование меланомы кожи сопровождается сложной перестройкой клеточного состава иммунного микроокружения: снижением числа тучных клеток, выраженным ростом макрофагальной инфильтрации и ослаблением адаптивного звена иммунного надзора за счет уменьшения $CD8^+$-лимфоцитов. Эта динамика отражает последовательный переход от локализованного воспалительного и ремоделирующего ответа на ранних стадиях к иммуносупрессивному и прометастатическому состоянию на более поздних стадиях заболевания.

Установленные закономерности могут служить основой для разработки новых прогностических моделей и иммуномодулирующих терапевтических стратегий, направленных на коррекцию опухолевого микроокружения при меланоме кожи. Мультиплексный подход и пространственное фенотипирование позволили детализировать топографию клеточных взаимодействий и подтвердили наличие функциональных связей между компонентами врождённого и адаптивного иммунитета в опухолевом микроокружении. Эти данные углубляют понимание пространственно-временной организации иммунного ответа при меланоме кожи и подчёркивают значение комплексного морфологического анализа для прогностической стратификации пациентов.

4.6. 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 (Рисунок 4.38):

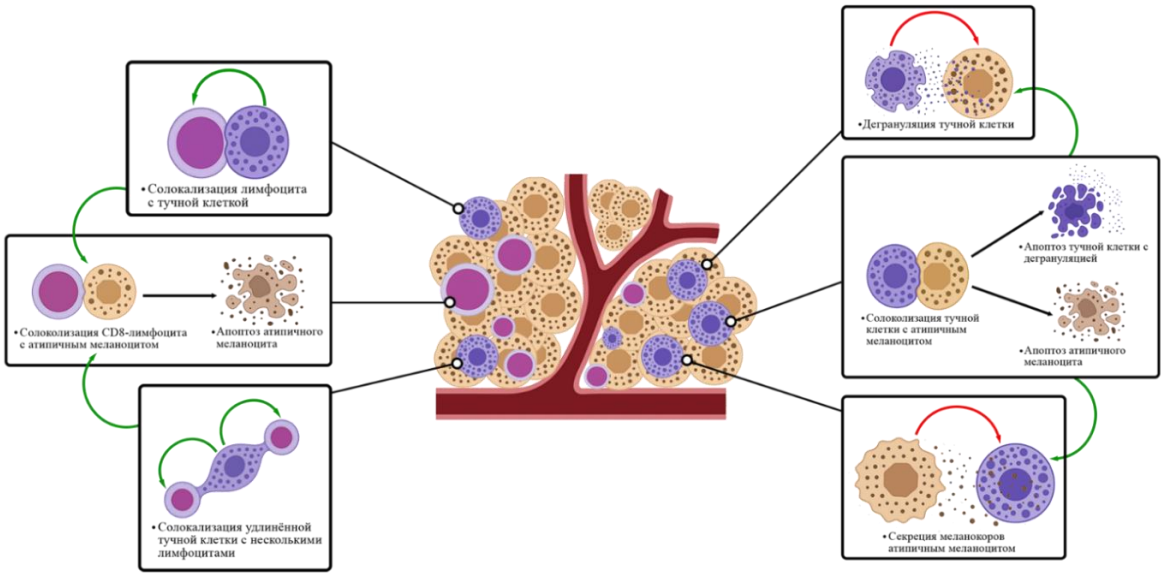


Рисунок 4.38 – Схема взаимодействия тучных клеток, лимфоцитов и атипичных меланоцитов

1) Иммуносупрессивный (локальный):

а) снижение плотности расположения $CD8^+$-Т-лимфоцитов в перитуморальной зоне, обратно пропорциональное стадии, приводит к ослаблению цитотоксического контроля над атипичными Melan-A^+-меланоцитами.

б) накопление $CD68^+$-макрофагов в интра- и перитуморальной зонах, прямо пропорциональное стадии заболевания, отражает функциональную гетерогенность макрофагального инфильтрата и его участие в процессах стромального ремоделирования, индуцированного ангиогенеза и локальной иммуномодуляции

2) Противоопухолевый (локальный)

а) максимальная кооперация триптаза-позитивных тучных клеток (ТК) с $CD8^+$-Т-лимфоцитами и Melan-A^+-клетками внутри опухоли на I и II стадиях, включая таргетную секрецию гранул ТК к опухолевым клеткам и цитотоксическое воздействие через триады «ТК – $CD8^+$Л – атипичная меланоцит»;

б) удлинённый фенотип ТК, обеспечивающий координацию множества клеток в локусах с низкой плотностью Melan-A^+-клеток.

3) Опухолевая адаптация микроокружения

а) способность опухолевой микросреды подавлять популяцию ТК (обратная зависимость их плотности расположения от концентрации Melan-A^+-клеток в интратуморальной зоне);

б) направленная секреция меланокоров атипичными меланоцитами к ТК как механизм уклонения от иммунного контроля.

4) Смещение активности

а) переход наибольшей активности взаимодействия ТК и $CD8^+$Л из интратуморальной зоны (I и II стадии) в перитуморальную зону на поздних стадиях;

б) индивидуальная вариабельность формирования триад и межклеточных контактов у каждого пациента, определяющая 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 эмбриологических концепций для понимания механизмов онкогенеза и открывает новые направления для поиска терапевтических мишеней, основанных на блокаде патологически реактивированных эмбриональных путей.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физиологический статус здоровой кожи обеспечивается сложным межклеточным взаимодействием, в котором ведущие позиции занимают резидентные Т-лимфоциты, обширная популяция дермальных макрофагов и постоянный пул тучных клеток. Именно этот клеточный комплекс гарантирует сохранение тканевого баланса и барьерной состоятельности. Детальное осмысление функций каждой из указанных популяций крайне необходимо для правильной трактовки патоморфологических процессов, развивающихся в ткани меланомы и прилегающих к ней областях.

На основании полученных данных область, непосредственно окружающую опухоль, целесообразно определять как специфический пограничный компартмент. В этой зоне происходит активная перестройка иммунного микроокружения. Нормальная архитектоника тканей здесь постепенно утрачивается, а формирующийся клеточный инфильтрат берет на себя функцию барьера, препятствующего как горизонтальной, так и вертикальной экспансии злокачественных меланоцитов. Подобная стромальная реорганизация возникает вследствие ответной реакции здоровых структур на присутствие атипии, а также под дистанционным воздействием гуморальных факторов, секретируемых самой меланомой.

На границе с опухолью образуется своеобразная буферная территория, где на начальных этапах развития патологии защитные механизмы функционируют достаточно эффективно. Здесь запускается мощный иммунный ответ: регистрируется усиленная инфильтрация цитотоксическими $CD8^+$ Т-клетками с образованием структурированных скоплений, происходит фенотипическая перестройка макрофагов ($CD68^+$) и активируются тучные клетки, продуцирующие триптазу. При минимальной толщине образования (в рамках градации pT1) скоординированное действие этих популяций успешно сдерживает инвазию. Тем не менее, по мере утолщения опухоли защитные резервы истощаются, что ведет к

неконтролируемому росту и глубоким метаболическим сдвигам в микроокружении.

Сравнительный анализ интактной дермы и тканей, прилегающих к новообразованию, раскрывает динамику локального ремоделирования. В то время как Т-киллеры пытаются блокировать атипичные клетки, другие участники микроокружения – макрофаги и тучные клетки – подвергаются истощению либо кардинально меняют свои функции на фоне увеличения глубины инвазии по Бреслоу. В результате защитный контур трансформируется в проопухолевую среду, которая начинает способствовать проникновению злокачественных клеток вглубь стромы. Оценка структурной организации этой приграничной области дает ценную информацию о возможном векторе развития патологии и обладает высоким прогностическим потенциалом в клинической практике.

Интеграция морфологических данных с клиническими параметрами позволяет выявить следующие закономерности. Углубление новообразования и появление изъязвлений (что соответствует индексу «b» в категории pT) прямо коррелируют с резким уменьшением пула эффекторных $CD8^+$ клеток и триптаза-позитивных тучных клеток в пограничной зоне. Такая деградация локальной защиты сопровождается массивной инфильтрацией самого опухолевого узла макрофагами ($CD68^+$), которые привлекаются хемокинами в ответ на тканевое повреждение. Одновременно у пациентов с высоким риском прогрессирования фиксируется усиление иммуносупрессивного воздействия со стороны продуктов меланогенеза и непрерывной антигенной нагрузки. Это провоцирует программируемую гибель мастоцитов и критическое истощение Т-клеточного звена.

Следовательно, стабильность межклеточных связей и сохранение гомеостаза дермы выступают фундаментом нормальной физиологии кожи. В свою очередь, разрушение этих коммуникаций, инициированное злокачественными меланоцитами, является основополагающим фактором дальнейшего прогрессирования меланомы.

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.

2. Полученные данные о снижении плотности распределения 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИГХ – иммуногистохимия

ТК – тучные клетки

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

APC – антигенпрезентирующая клетка (англ. Antigen-Presenting Cell)

BRAF – протоонкоген BRAF (англ. v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B)

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

CD8+Л – CD8-положительный Т-лимфоцит

CCL – хемокин семейства CCL (англ. Chemokine (C-C motif) ligand)

DAMPs – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (англ. Damage-Associated Molecular Patterns)

DNA – дезоксирибонуклеиновая кислота (англ. Deoxyribonucleic Acid)

EMT – эпителиально-мезенхимальный переход (англ. Epithelial-Mesenchymal Transition)

EGR1 – ранний фактор ответа роста 1 (англ. Early Growth Response 1)

FGF-2 – фактор роста фибробластов 2 (англ. Fibroblast Growth Factor 2)

H&E – окрашивание гематоксилином и эозином (англ. Hematoxylin and Eosin)

HMGA1 – белок высокой подвижности группы A1 (англ. High Mobility Group AT-hook 1)

HRP – пероксидаза хрена (англ. Horseradish Peroxidase)

IFN-γ – интерферон гамма (англ. Interferon gamma)

IHC – иммуногистохимия (англ. Immunohistochemistry)

IL – интерлейкин (англ. Interleukin; IL-1β, IL-6, IL-10 и др.)

MHC-I – главный комплекс гистосовместимости I класса (англ. Major Histocompatibility Complex class I)

MMP – матриксная металлопротеиназа (англ. Matrix Metalloproteinase)

mRNA – матричная РНК (англ. Messenger RNA)

NRAS – протоонкоген NRAS (англ. Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)

PD-L1 – лиганд запрограммированной клеточной смерти 1 (англ. Programmed Death-Ligand 1)

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

RNA – рибонуклеиновая кислота (англ. Ribonucleic Acid)

SCF – фактор стволовых клеток (англ. Stem Cell Factor)

TGF-β – трансформирующий фактор роста β (англ. Transforming Growth Factor beta)

TILs – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (англ. Tumor-Infiltrating Lymphocytes)

TNF-α – фактор некроза опухоли α (англ. Tumor Necrosis Factor alpha)

TPSAB1 – ген триптазы α/β1 (англ. Tryptase alpha/beta 1 gene)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (англ. Vascular Endothelial Growth Factor)

DAB – диаминобензидин (англ. 3,3′-Diaminobenzidine)

UV – ультрафиолетовое излучение (англ. Ultraviolet Radiation)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Н.Т., Клочкова С.В., Никитюк Д.Б Морфологическая характеристика тучных клеток при регенерации кожи // // Оренбургский медицинский вестник. 2016. № 16 (4).

2. Атякшин Д.А., Бурцева А.С., Алексеева Н.Т Триптаза как полифункциональный компонент секретома тучных клеток // // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. № 1 (6).

3. Афанасьев Ю.И. [и др.]. Гистология, эмбриология, цитология: учебник // 2016. С. 6-.

4. Белоусов Л.В Основы общей эмбриологии: учебник // 2005. С. 3-.

5. Блох А. И., Стасенко В. Л Эпидемиологический надзор за заболеваемостью населения меланомой и другими злокачественными новообразованиями кожи на региональном уровне // // Фундаментальная и клиническая медицина. 2020. № 1 (5).

6. Божченко Я. А., Вишневская Я. В., Покатаев И. А Влияние соотношения CD8/FoxP3 Т-лимфоцитов в перитуморальной зоне первичной меланомы кожи на прогноз течения заболевания // // Архив патологии. 2016. № 4 (78).

7. Васильев Р.Г. [и др.]. Постнатальные мультипотентные стволовые/прогениторные клетки – производные нервного гребня: трансляция в клиническую практику // Гены и клетки. 2017. № 3 (12). С. 59–70.

8. Георгиева А. Ю., Пасечникова Е. А., Кадомцев Д. В Роль опухолевого микроокружения в механизмах канцерогенеза // Современные проблемы науки и образования // 2025. С. 1-74.

9. Голиченков В. А., Иванов Е.А., Никерясова Е.Н Эмбриология: Учеб. для студ. университетов // 2004. С. 224 ,.

10. Гусейнов А. З., Федорищев В. И Лекарственная терапия меланомы кожи: современное состояние и перспективы (обзор литературы // 2023. Т. 30. № 2.

11. Демченко А.С., Синяков А.Г Мутации в генах при меланоме кожи // Университетская медицина Урала. 2021. № 3(26 (7). С. 27–28.

12. Жиемуратова Г. К., Жанабаева Г. У., Отекеева С. С Иммунологические механизмы защиты кожи // // Бюллетень науки и практики. 2020. № 5 (6).

13. Журман В.Н Иммунные клетки микроокружения рака яичников // // Поволжский онкологический вестник. 2023. № 54 (2).

14. Казубская Т.П. [и др.]. Меланома, молекулярно-генетические аспекты этиопатогенеза: соматические и герминальные мутации // Вопросы онкологии. 2023. № 1 (69). С. 30–37.

15. Калинчук А. Ю., Таширева Л. А., Перельмутер В. М Фенотипическое разнообразие M1 и M2 макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с раком молочной железы: ассоциация с клинико-патологическими параметрами // // Клиническая и экспериментальная морфология. 2023. № 3 (12).

16. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность ред.С. 276.

17. Кичигина Т.Н. [и др.]. Меланоциты: строение, функции, методы выявления, роль в кожной патологии // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2007. № 4 (6). С. 5–16.

18. Костенко Н.К. [и др.]. Значение Wnt-сигнализации в эмбрио- и онтогенезе // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2018. № 2 (8). С. 25–31.

19. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н Гистология, цитология и эмбриология: учебник // 2016. С. 3-.

20. Кутилин Д.С. [и др.]. Меланома кожи: эпидемиология, этиология и молекулярно-генетические основы патогенеза // Современные проблемы науки и образования. 2025. (1). С. 80.

21. Мазуренко Н.Н., Гуляева Л.Ф., Кушлинский Н.Е Генетические маркеры и мишени таргетной терапии меланомы // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. № 6 (62). С. 363–371.

22. Мнихович М. В., Ерофеева Л. М., Борисов Д. А Возможности использования различных параметров опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в клинической практике при колоректальном раке // // Вопросы онкологии. 2024. № 5 (70).

23. Оганесян Л. В., Завалишина Л. Э., Огнерубов Н. А Иммуногистохимические факторы прогноза иммунотерапии метастатической меланомы // // Современная онкология. 2024. № 2 (26). С. 190-196.

24. Паталяк С. В. [и др.]. Прогностическое значение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (CD3+/CD8+) у больных II–III стадией колоректального рака // // Биология и интегративная медицина. 2024. С. 5 70-65-74.

25. Пахомова Н.Ю. [и др.]. История изучения нервного гребня (обзор // Сибирский научный медицинский журнал. 2023. № 1 (43). С. 13–29.

26. Поддубная И. В. [и др.]. Гистологические и гистоиммунохимические особенности увеальной меланомы при первично-множественном поражении и солитарной увеальной меланоме // // Современная онкология. 2003. № 3 (5).

27. Пшенникова Е.С., Воронина А.С Нервный гребень – своеобразная популяция эмбриональных клеток // Молекулярная биология. 2019. № 2 (53). С. 256–267.

28. Тимофеева Н. Ю., Бубнова Н. В., Самакина Е. С Роль тучных клеток в канцерогенезе (обзор литературы // // Acta Medica Eurasica. 2023. С. 1-147-159.

29. A. K. D. E., A R. F. Role of mast cells in shaping the tumor microenvironment // // Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2020. (58).

30. Abbas A. K. C., Molecular Immunology / A. K. Abbas S. Pillai. – A. H. Lichtman / A. K. C. Abbas, S. Pillai. – Molecular Immunology / A. K. Abbas A. H. Lichtman, 10th-e изд., Philadelphia: Elsevier, 2021. 584 – с.

31. Adeuyan O. [и др.]. An update on methods for detection of prognostic and predictive biomarkers in melanoma // // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2023. (11).

32. Alda S. [и др.]. Mast cells in skin cancer (Review // // In Vivo. 2024. № 1 (38).

33. Alvares-Vilela M. M. [и др.]. Role of tumor-infiltrating lymphocytes and miR-155 in breast cancer: Insights into carcinogenesis and their potential as prognostic biomarkers (Review // // Oncology Reports. 2026. № 3 (55).

34. Angappulige D. H. [и др.]. Regulatory B Cells at the Crossroads of Epigenetic Control and Immune Homeostasis / // // Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2026. № 1 (69).

35. Aoki M. [и др.]. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES // // International Archives of Allergy and Immunology. 2003. № 3 (130).

36. Arnold M. [и др.]. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040 // // JAMA Dermatology. 2022. № 5 (158).

37. Atiakshin D. [и др.]. Protease profile of tumor-associated mast cells in melanoma // // International Journal of Molecular Sciences. 2022. № 16 (23).

38. Azenkot T., Dang T., Park S Skin Cancers and Acquired Immunosuppression: Epidemiology and Emerging Management Strategies // // touchREVIEWS in Oncology & Haematology. 2026. № 1 (22).

39. B. Crosby, B. Crosby, M. Guerra Biomarkers in Melanoma: Updates in Prognosis and Management // // Cancers. 2026. № 12 (18).

40. Balkwill F. R., Capasso M., Hagemann T The tumor microenvironment at a glance // // Journal of Cell Science. 2012. (125, Pt. 23).

41. Bankhead P. [и др.]. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis // Scientific Reports. 2017. № 1 (7). С. 16878.

42. Bao M., Gempeler M., Campiche R Melanosome Transport and Processing in Skin Pigmentation: Mechanisms and Targets for Pigmentation Modulation // // International Journal of Molecular Sciences. 2025. № 17 (26).

43. Bardi G. T., Smith M. A., Hood J. L Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization // // Cytokine. 2018. (105).

44. Barricklow Z. [и др.]. Ulcerated cutaneous melanoma: a review of the clinical, histologic, and molecular features associated with a clinically aggressive histologic phenotype // // Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 2022. (15).

45. Basu A., Ramamoorthi G., Albert G Differentiation and regulation of Th cells: a balancing act for cancer immunotherapy // // Frontiers in Immunology. 2021. (12).

46. Beigi Y. Z. [и др.]. Heterogeneity and molecular landscape of melanoma: implications for targeted therapy // // Molecular Biomedicine. 2024. № 1 (5).

47. Benito-Martin A., Nogués L., Hergueta-Redondo M Mast cells impair melanoma cell homing and metastasis by inhibiting HMGA1 secretion // // Immunology. 2023. № 2 (168).

48. Bertolucci R. V. [и др.]. Immunosuppressive Pathways in Cutaneous Melanoma: Functional Integration Between PD-1 and CD73 and Therapeutic Implications // Pharmaceuticals. 2026. № 6 (19). С. 913.

49. Betof Warner A., Corrie P. G., Hamid O Tumor-infiltrating lymphocyte therapy in melanoma: facts to the future // // Clinical Cancer Research. 2023. № 10 (29).

50. Betti R. [и др.]. Nodular melanomas: analysis of the casistic and relationship with thick melanomas and diagnostic delay // // The Journal of Dermatology. 2008. № 10 (35).

51. Bian X., Chen Y., Zhang C NR4A3high mast cells promote ovarian cancer metastasis by reprogramming tumor-associated macrophages via JAK2/STAT6 signaling // // Translational Oncology. 2025. (60).

52. Blanc-Durand F., Clemence Wei Xian L., Tan D.S. P Targeting the immune microenvironment for ovarian cancer therapy // // Frontiers in Immunology. 2023. (14).

53. Bolovan L. M. [и др.]. Correlation Studies between S100 Protein Level and Soluble MIA or Tissue MelanA and gp100 (HMB45) Expression in Cutaneous Melanoma / // // Journal of Personalized Medicine. 2023. № 6 (13).

54. Boroojerdi S. [и др.]. Staining pattern of specific and cross-reacting Melan-A antibodies: A comparative study on 15,840 samples from 133 human tumor types / // 2024. Т. 132. № 7.

55. Bourhim T. [и др.]. Elucidation of Melanogenesis-Associated Signaling Pathways Regulated by Argan Press Cake in B16 Melanoma Cells // // Nutrients. 2021. № 8 (13).

56. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma // // Annals of Surgery. 1970. № 5 (172).

57. Brombin A., Patton E.E Melanocyte lineage dynamics in development, growth and disease // // Development. 2024. № 151 (l). С. 15.

58. Buchwalow I. [и др.]. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts // // Scientific Reports. 2011. (1).

59. Bulfone-Paus S., Bahri R. Mast Cells as Regulators of T Cell Responses // Frontiers in Immunology. 2015. (6).

60. Bullock T. N. The Biology of Immune Checkpoint Blockade под ред. O. A. O'Connor, S. M. Ansell, J. G. Gribben, Wiley, 2024.С. 123–138.

61. Busam K. J Desmoplastic melanoma // // Clinics in Dermatology. 2025. № 3 (43).

62. Cabrita R. [и др.]. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma / // // Nature. 2020. № 7791 (577).

63. Cai L. Z. Regulatory B. Cells in Tumor Microenvironment /. Z. Cai Xie // // 2026. Т. 48. № 1.

64. Callender G. G. [и др.]. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker // American Journal of Surgery. 2011. № 6 (202). С. 659–664; discussion 664-665.

65. Calonje J. E. [и др.]. McKee's Pathology of the Skin // 2019. С. 1800.

66. Caraviello C. [и др.]. Melanoma Skin Cancer: A Comprehensive Review of Current Knowledge // // Cancers. 2025. № 17 (17).

67. Dennis L. K Cumulative Sun Exposure and Melanoma in a Population-Based Case–Control Study: Does Sun Sensitivity Matter? // // Cancers. 2022. № 4 (14).

68. DeWane M. E. [и др.]. Melanoma on chronically sun-damaged skin: Lentigo maligna and desmoplastic melanoma // // Journal of the American Academy of Dermatology. 2019. № 3 (81).

69. Ei Z. Z. [и др.]. Mechanistic Insights into Anti-Melanogenic Effects of Fisetin: PKCα-Induced β-Catenin Degradation, ERK/MITF Inhibition, and Direct Tyrosinase Suppression // // International Journal of Molecular Sciences. 2025. № 23 (26).

70. Elieh Ali Komi D. [и др.]. Mast Cell Biology at Molecular Level: A Comprehensive Review / // Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2020. № 3 (58).

71. Elieh Ali Komi D., Komi D. E. A., A. The emerging role of mast cells in skin cancers: involved cellular and molecular mechanisms / // International Journal of Dermatology. 2022. № 7 (61).

72. Facciabene A., Motz G. T., Coukos G T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis // // Cancer Research. 2012. № 9 (72).

73. Falleni M. [и др.]. M1 and M2 macrophages in cutaneous melanoma: a quantitative immunohistochemical study // // Melanoma Research. 2017. № 3 (27).

74. Fitzpatrick T. B The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI // // Archives of Dermatology. № 6 (124). С. 1988-.

75. Fu Q. [и др.]. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis // // Oncoimmunology. 2019. № 7 (8).

76. Gama Duarte J., Peyper J. M., Blackburn J. M B cells and antibody production in melanoma // // Mammalian Genome. 2018. № 11–12 (29).

77. Gao S. H. [и др.]. CXCL13 in Cancer and Other Diseases: Biological Functions, Clinical Significance, and Therapeutic Opportunities / // Life (Basel. 2021. № 12 (11).

78. Garaud S. [и др.]. T follicular helper and B cell crosstalk in tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy / // Nature Communications. 2022. № 1 (13).

79. Gershenwald J. E., Scolyer R. A., Hess K. R. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual // // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2017. № 6 (67).

80. Goydos J. S., Shoen S. L Acral lentiginous melanoma // // Cancer Treatment and Research. 2016. (167).

81. Göze Ö. F. [и др.]. Genetic diversity in melanomagenesis: a comprehensive analysis of BRAF, NRAS, KIT and novel mutations across melanoma subtypes // // BMC Cancer. 2025. № 1 (26).

82. Grujic M. [и др.]. Protective role of mouse mast cell tryptase Mcpt6 in melanoma // Pigment Cell Melanoma Res. 2020.

83. Guermazi D., Saliba E The Genetics and Evolution of Human Pigmentation // // Biology (Basel. 2025. № 8 (14).

84. Gunassekaran G. R. [и др.]. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages // // Biomaterials. 2021. (278).

85. Guo X., Liu R Role of mast cells activation in the tumor immune microenvironment and immunotherapy of cancers // // European Journal of Pharmacology. 2023. (960).

86. Hay Z.L. Z., Slansky J. E Granzymes: The Molecular Executors of Immune-Mediated Cytotoxicity // // International Journal of Molecular Sciences. 2022. № 3 (23).

87. Hodis E. [и др.]. A landscape of driver mutations in melanoma // // Cell. 2012. № 2 (150).

88. Hoeffel G., Ginhoux F Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages // // Cellular Immunology. 2018. (330).

89. Hutter-Karakoc I. [и др.]. Chronic antigen stimulation in melanoma induces T cell exhaustion and limits efficacy of T cell bispecific therapies // // OncoImmunology. 2025. № 1 (14).

90. Jackson C. W. [и др.]. Mast Cells and Their Cellular Interactions Within the Tumor Environment // // Cancer Immunology / ed. 2025. (N. Rezaei).

91. Janka E. A. [и др.]. Predictive performance of serum S100B versus LDH in melanoma patients: a systematic review and meta-analysis // // Frontiers in Oncology. 2021. (11).

92. Jeon T. J. [и др.]. Preadipocytes potentiate melanoma progression and M2 macrophage polarization in the tumor microenvironment // // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2024. (721).

93. Jin S. G. [и др.]. UVA-induced DNA damage and mutations in human melanocytes: relevance for melanoma mutations // // Nucleic Acids Research. 2025. № 17 (53).

94. Kather J. N., Suarez-Carmona M., Charoentong P Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors // // 2018. Т. 7.

95. Kawabe T. Homeostasis and immunological function of self-driven memory-phenotype CD4+ T lymphocytes // // Immunological Medicine. 2023. № 1 (46).

96. Komi D.E.A., Grauwet K Role of Mast Cells in Regulation of T Cell Responses in Experimental and Clinical Settings // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2017. (54). С. 432–445.

97. Komuro H., Shinohara S., Fukushima Y Single-cell sequencing on CD8+ TILs revealed the nature of exhausted T cells recognizing neoantigen and cancer/testis antigen in non-small cell lung cancer // // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2023. № 8 (11).

98. Kurihara-Shimomura M. [и др.]. Mast cell chymase promotes angiogenesis and lymphangiogenesis mediated by activation of melanoma inhibitory activity gene family

members in oral squamous cell carcinoma // // International Journal of Oncology. 2020. № 5 (56).

99. Kwong M.L. M., Lifileucel Y. J. C. FDA-approved T-cell therapy for melanoma // // Oncologist. 2024. № 8 (29).

100. Langselius O. [и др.]. Global burden of cutaneous melanoma incidence attributable to ultraviolet radiation in 2022 // // International Journal of Cancer. 2025. № 6 (157).

101. Larionova I., Tuguzbaeva G., Ponomaryova A. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers // // Front Oncol. 2020. (10).

102. LeBoit P. E Spitz melanoma // // Clinics in Dermatology. 2025. № 3 (43).

103. Li C. [и др.]. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects / // J. Wang // Molecular Cancer. 2020. № 1 (19).

104. Li C. [и др.]. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer // // Journal for Immunotherapy of Cancer. 2021. (9).

105. Li M. [и др.]. Metabolism, metabolites, and macrophages in cancer // // Journal of Hematology & Oncology. 2023. № 1 (16).

106. Liang Y. [и др.]. Immune checkpoint inhibitors in melanoma: mechanisms, immune cell interactions, and the tumour microenvironment // // Frontiers in Immunology. 2025. (16).

107. Loghavi S. [и др.]. Melanoma arising in association with blue nevus: a clinical and pathologic study of 24 cases and comprehensive review of the literature // // Modern Pathology. 2014. № 11 (27).

108. Longo C., Pellacani G Melanomas // // Dermatologic Clinics. 2016. № 4 (34).

109. Longo V. [и др.]. Controversial role of mast cells in NSCLC tumor progression and angiogenesis // Thoracic Cancer. 2022. № 21 (13).

110. Ma Y. [и др.]. Tumor-infiltrating mast cells confer resistance to immunotherapy in pancreatic cancer // // Т. 27. № 11. С. 2024-.

111. Malaviya R. [и др.]. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells // J Immunol. 1996. (156). С. 1490–6.

112. Mantovani A. [и др.]. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology // // Nature Reviews Clinical Oncology. 2017. № 7 (14).

113. Massari N. A. [и др.]. Histamine therapeutic efficacy in metastatic melanoma: role of histamine H4 receptor agonists and opportunity for combination with radiation // Oncotarget. 2017. (8). С. 26471–26491.

114. McNutt N. S. [и др.]. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity // // Journal of Cutaneous Pathology. 1995. № 6 (22).

115. Metz M., Maurer M. Mast cells–key effector cells in immune responses // Trends Immunol. 2007. № 5 (28). С. 234–241.

116. Montgomery T. H. [и др.]. Tissue-Resident Memory T Cells in Cancer Metastasis Control // Cells. 2025. № 16 (14). С. 1297.

117. Morton D. L. [и др.]. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness // // Cancer. 1993. № 11 (71).

118. M.T.Few Majorini, Majorini M. T., Colombo M. P. The Role of Mast Cells in Breast Cancer and Other Solid Tumors / // Cancer Research. 2022. № 8 (82).

119. Nishimura H. [и др.]. Increased chymase-positive mast cells in high-grade mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland // // International Journal of Molecular Sciences. 2023. № 9 (24).

120. Not O. J. van [и др.]. Long-Term Survival in Patients With Advanced Melanoma // JAMA Network Open. 2024. № 8 (7). С. e2426641–e2426641.

121. Nunes S. C Tumor microenvironment – selective pressures boosting cancer progression // // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2020. (1219).

122. Oble D. A. [и др.]. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma // // Cancer Immunology. 2009. (9).

123. O.’Garra A. [и др.]. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease // // Immunological Reviews. 2008. (223).

124. Oh D. Y., Fong L Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: expanding the immune effector toolbox // // Immunity. 2021. № 12 (54).

125. Oliveira G., Stromhaug K., Klaeger S Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8+ T cells in melanoma // // Nature. 2021. № 7870 (596).

126. Olla D., Neumeister M. W Mucosal melanoma // // Clinics in Plastic Surgery. 2021. № 4 (48).

127. Pieniazek M., Matkowski R., Donizy P Macrophages in skin melanoma – the key element in melanomagenesis // // Oncology Letters. 2018. № 4 (15).

128. Plunkett K. R. [и др.]. Tissue-resident memory T cells in the era of (Neo) adjuvant melanoma management / // Frontiers in Immunology. 2022. (13).

129. Qian B. Z., Pollard J. W Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // // Cell. 2010. № 1 (141).

130. Rabelo Melo F. [и др.]. Melanoma cells suppress mast cell function via a melanin-dependent mechanism // // FEBS Journal. 2025. № 22 (292).

131. Rabelo Melo F [и др.]. Melanoma cells suppress mast cell function via a melanin-dependent mechanism // FEBS J. 2025.

132. Rajabi P., Bagheri A., Hani M Intratumoral and peritumoral mast cells in malignant melanoma: an immunohistochemical study // // Advanced Biomedical Research. 2017. (6).

133. Ribatti D. Tryptase and tumor angiogenesis // // Frontiers in Oncology. 2024. (14).

134. Ridolfi L. [и др.]. Adjuvant immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with resected stage III and IV melanoma // // Journal of Immunotherapy. 2003. № 2 (26).

135. Sabbatino F. [и др.]. Peritumoral Immune Infiltrate as a Prognostic Biomarker in Thin Melanoma // // Frontiers in Immunology. 2020. (11).

136. Salgado R., Denkert C., Demaria S The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 // // Annals of Oncology. 2015. № 2 (26).

137. Sarnaik A. A., Hamid O., Khushalani N. I Lifileucel, a tumor-infiltrating lymphocyte therapy, in metastatic melanoma // // Journal of Clinical Oncology. 2021. № 24 (39).

138. Schmidt U. [и др.]. Cell Detection with Star-Convex Polygons Lecture Notes in Computer Science / под ред. A. F. Frangi [и др.]., Cham: Springer International Publishing, 2018.С. 265–273.

139. Segura-Villalobos D. [и др.]. Mast cell–tumor interactions: molecular mechanisms of recruitment, intratumoral communication and potential therapeutic targets for tumor growth // // Cells. 2022. № 3 (11).

140. Shen M. [и др.]. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors // // Oncotarget. 2016. № 34 (7).

141. Shouse A. N. [и др.]. Interleukin-2 signaling in the regulation of T cell biology in autoimmunity and cancer // Immunity. 2024. № 3 (57).

142. Siiskonen H., Harvima I. T. Mast cell chymase is in contact with melanoma cells in vivo and it detaches melanoma cells from the substratum in vitro // Transl Cancer Res. 2022. (Dec;11(12):4315-4325).

143. Sikorski H., Żmijewski M. A., Piotrowska A Tumor microenvironment in melanoma – characteristic and clinical implications // // International Journal of Molecular Sciences. 2025. № 14 (26).

144. Souza Junior D. A. [и др.]. The role of mast cell specific chymases and tryptases in tumor angiogenesis // // BioMed Research International. 2015. (2015).

145. Thorarinsdottir K., Camponeschi A., Cavallini N CD21(−/low) B cells in human blood are memory cells // // Clinical and Experimental Immunology. 2016. № 2 (185).

146. Timofeeva N.Yu. [и др.]. The Role of Mast Cells in Carcinogenesis (Literature Review // // Acta medica Eurasica. 2023. С. 1-147-159.

147. Tremble L. F., McCabe M., Walker S. P. Differential association of CD68+ and CD163+ macrophages with macrophage enzymes, whole tumour gene expression and overall survival in advanced melanoma // // Br J Cancer. 2020. № 10 (123).

148. Trocchia M. [и др.]. Innate Immune Cells in Melanoma: Implications for Immunotherapy // // International Journal of Molecular Sciences. 2024. № 15 (25).

149. Tumeh P., Harview C., Yearley J. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance // // Nature. 2014. (515).

150. Varela-Poblete J. [и др.]. Melanocytic lesions of the central nervous system: a case series // // Arquivos de Neuro-Psiquiatria. 2022. № 2 (80).

151. Vargas G. M. [и др.]. Tumor-infiltrating lymphocytes as a prognostic and predictive factor for Melanoma // // Expert Review of Molecular Diagnostics. 2024. № 4 (24).

152. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine // Mol Immunol. 2015. (63). С. 18–24.

153. Wang Q., Lang Z., Yin G Analysis on the involvement of phosphoglycerate mutase 1 in the aerobic glycolysis of melanoma cells // // International Journal of Biological Macromolecules. 2024. (283, Pt. 4).

154. Wang Y. [и др.]. Research Progress of Immune Cells Against Tumor // Chengdu, China:, 2023.С. 3-.

155. Wevers K. P. [и др.]. Therapeutic lymph node dissection in melanoma: different prognosis for different macrometastasis sites? // // Annals of Surgical Oncology. 2012. № 12 (19).

156. Wherry E. J., Kurachi M Molecular and cellular insights into T cell exhaustion // // Nature Reviews Immunology. 2015. № 8 (15).

157. Whiteman D. C., Green A. C., Olsen C. M The growing burden of invasive melanoma: projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031 // // Journal of Investigative Dermatology. 2016. № 6 (136).

158. X. Yin, X. Yin, Y. Yang Cancer immunotherapy by adenosinergic CD39 and CD73 as emerging immune checkpoints / // Discovery Oncology. 2025. № 1 (16).

159. Yang Q. [и др.]. The immune landscape of melanoma microenvironmental crosstalk // // Frontiers in Immunology. 2026. (17).

160. Yang Y. [и др.]. A mast cell-related prognostic model for non-small cell lung cancer // // Journal of Thoracic Disease. 2023. № 4 (15).

161. Zhang C., Shen H., Yang T A single-cell analysis reveals tumor heterogeneity and immune environment of acral melanoma // // Nature Communications. 2022. № 1 (13).

162. Zhang Q., Sioud M Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting // // International Journal of Molecular Sciences. 2023. № 8 (24).

163. Zheng C., Sarin K. Y Unveiling the genetic landscape of hereditary melanoma: From susceptibility to surveillance // // Cancer Treatment and Research Communications. 2024. (40).

164. Zilberg C. [и др.]. The tumor immune microenvironment in primary cutaneous melanoma // // Archives of Dermatological Research. 2025. № 1 (317).

165. Zong S. [и др.]. LncRNA-SNHG1 promotes macrophage M2-like polarization and contributes to breast cancer growth and metastasis // // Aging (Albany NY. 2021. № 19 (13).

166. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Today // 2020.

167. WHO Classification of Skin Tumours 5-th ed. /-е изд., Lyon:, 2025.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1. Ссылки на 3D-модели мультиплексной визуализации клеточных элементов микроокружения меланомы кожи

Рисунок в тексте	**Ссылка на 3D модель**
Рисунок 3.24А	https://disk.yandex.ru/i/ZUDG1ZkaGnxn3w
Рисунок 3.24Б	https://disk.yandex.ru/i/3vqilLTzWTG3Ww
Рисунок 3.24В	https://disk.yandex.ru/i/-6ZKMyQD0EAkdQ
Рисунок 3.24Г	https://disk.yandex.ru/i/D5l3E9YBOc0ruA
Рисунок 3.24Д	https://disk.yandex.ru/i/jfSWfbJdUEv5GA
Рисунок 3.24Е	https://disk.yandex.ru/i/0ocdDn9BcxxnGA
Рисунок 3.24Ё	https://disk.yandex.ru/i/dDQgfgZnNpTWFQ
Рисунок 3.24Ж	https://disk.yandex.ru/i/Zrfw4BgiVd9G4Q
Рисунок 3.24З	https://disk.yandex.ru/i/wWgrrXUbd1fF0Q
Рисунок 3.24И	https://disk.yandex.ru/d/2k-sUlD4cAwCiQ
Рисунок 3.24Й	https://disk.yandex.ru/i/R9l2WxdYdsJ9Qg
Рисунок 3.24К	https://disk.yandex.ru/i/64pqGg7yiHQV2g
Рисунок 3.24Л	https://disk.yandex.ru/i/-o9J6EEsUz7spg
Рисунок 3.24М	https://disk.yandex.ru/i/U8TpZlKJ1ulvrA
Рисунок 3.24Н	https://disk.yandex.ru/i/qvp2oQAKe7d2Ug
Рисунок 3.24О	https://disk.yandex.ru/i/NiSjxfcHH25h0Q
Рисунок 3.24П	https://disk.yandex.ru/i/10zf8zdGhWd8_g
Рисунок 3.28А	https://disk.yandex.ru/i/yu9wmFUzN2JDuQ
Рисунок 3.28Б	https://disk.yandex.ru/i/8aGFUO9rsK7rIA
Рисунок 3.28В	https://disk.yandex.ru/i/dJqgxULEDSvonQ
Рисунок 3.28Г	https://disk.yandex.ru/i/d6uxX4fDiFOcJw
Рисунок 3.28Д	https://disk.yandex.ru/i/jU_ZSXTEq_oalQ
Рисунок 3.28Е	https://disk.yandex.ru/i/kns3rlaFiOZrWw
Рисунок 3.28Ё	https://disk.yandex.ru/i/4PqT5IligNWjyg
Рисунок 3.28Ж	https://disk.yandex.ru/i/Luulu80_Fve7vQ
Рисунок 3.28З	https://disk.yandex.ru/i/iZHkln1mQ_sKcw
Рисунок 3.28И	https://disk.yandex.ru/i/RMgjN68cY3P6NQ
Рисунок 3.28Й	https://disk.yandex.ru/i/r67Kv7gEy6ZtzA

Таблица А.1 – Продолжение

Рисунок 3.28К	https://disk.yandex.ru/i/LN54YmuUezCu5Q
Рисунок 3.28Л	https://disk.yandex.ru/d/K3gaLZmuCSiRgw
Рисунок 3.28М	https://disk.yandex.ru/d/ZYjciOvw6IA4LA
Рисунок 3.28Н	https://disk.yandex.ru/d/hSAcGqOLfkUdYA
Рисунок 3.28О	https://disk.yandex.ru/i/tPUhlBE4jsccyA
Рисунок 3.32А	https://disk.yandex.ru/i/3gAWk1F36ADHew
Рисунок 3.32Б	https://disk.yandex.ru/i/lFXtD2KwDn9Kew
Рисунок 3.32В	https://disk.yandex.ru/i/L3h7WOkzXTM1ZQ
Рисунок 3.32Г	https://disk.yandex.ru/i/B0AxMJ3Y5etzMQ
Рисунок 3.32Д	https://disk.yandex.ru/d/rOeta8XkurhT9A
Рисунок 3.32Е	https://disk.yandex.ru/i/oYFeVLsPHqlFWg
Рисунок 3.32Ё	https://disk.yandex.ru/d/NvtwnqttOHHHoA
Рисунок 3.32З	https://disk.yandex.ru/d/n7RYgtF2qemk4Q
Рисунок 3.32И	https://disk.yandex.ru/i/GwhWhW0r3l1csA
Рисунок 3.32Й	https://disk.yandex.ru/i/Es96tdTxdzVJ0A
Рисунок 3.35В	https://disk.yandex.ru/i/N0IF0wfpKOrvwQ
Рисунок 3.35Г	https://disk.yandex.ru/i/_-jotswYUqTyaw
Рисунок 3.35Д	https://disk.yandex.ru/i/rE7zI-QuvqkPLg
Рисунок 3.35Е	https://disk.yandex.ru/i/uo6GtNxjos88jQ
Рисунок 3.37Б	https://disk.yandex.ru/i/Cz4on2r-K_Y7sw
Рисунок 3.37В	https://disk.yandex.ru/d/SHw4ds9dnrnSNw
Рисунок 3.37Г	https://disk.yandex.ru/d/Gdq-xmEecQIADg
Рисунок 3.37Д	https://disk.yandex.ru/i/FAZ7irBPPohSfg
Рисунок 3.37Е	https://disk.yandex.ru/i/C18b4zvGHxgIcA
Рисунок 3.37Ё	https://disk.yandex.ru/i/hJPToDfJ0VE1LA
Рисунок 3.37Ж	https://disk.yandex.ru/i/MDTWYrjaTYc6mw
Рисунок 3.37З	https://disk.yandex.ru/i/3mC4pWCaHXuprw
Рисунок 3.37И	https://disk.yandex.ru/d/Rh9RVLLefgEUHA
Рисунок 3.37Й	https://disk.yandex.ru/i/PIx4eE1tE0j_oQ