Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

На правах рукописи

Маркин Александр Андреевич

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЛОКАЛИЗОВАННЫХ СТАДИЙ

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Титов Константин Сергеевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
1.1 Эпидемиология меланомы кожи в мире и России 10
1.2 Стадирование меланомы кожи 11
1.3 Клинические формы меланомы кожи 12
1.4 Стандартные патоморфологические прогностические факторы меланомы кожи 15
1.4.1 Толщина опухоли по Бреслоу 15
1.4.2 Изъязвление эпидермиса 16
1.4.3 Митотическая активность 17
1.4.4 Лимфоцитарная интра- и паратуморальная инфильтрация меланомы кожи 17
1.5 Опухоль-ассоциированные макрофаги в структуре меланомы кожи 18
1.6 Стволовые опухолевые клетки меланомы кожи 21
1.7 ALK-киназа анапластической лимфомы 26
1.8 Различные молекулярно-генетические факторы прогноза при меланоме кожи 28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 30
2.1 Дизайн исследования 30
2.2 Патоморфологическое исследование 31
2.2.1 Стандартные патоморфологические параметры 31
2.2.2 Иммуногистохимическая оценка наличия и распределения стволовых опухолевых клеток 32
2.2.3 Анализ экспрессии тирозинкиназы ALK 32
2.2.4 Анализ экспрессии маркера макрофагальной инфильтрации CD163 33
2.3 Статистическая обработка данных 34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 35
3.1 Клиническая и морфологическая характеристика пациентов 35
3.2 Встречаемость и прогностическая роль стволовых опухолевых клеток в поверхностно-распространяющихся и узловых формах меланомы кожи I–II стадий 36
3.2.1 Частота встречаемости стволовых опухолевых клеток 36

3.2.2 Прогностическая значимость стволовых опухолевых клеток в прогрессии узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий 39

3.2.3 Прогностическая значимость стволовых опухолевых клеток в общей выживаемости пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий 49

3.3 Экспрессия белка ALK и транслокация его гена в опухолевых клетках поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) и узловых (вертикальная фаза роста) формах меланомы кожи I–II стадий 59

3.3.1 Прогностическая значимость ALK в прогрессии узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий..... 61

3.3.2 Прогностическая значимость ALK в общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий 64

3.4 Наличие, выраженность и прогностическая значимость воспалительной макрофагальной инфильтрации в микроокружении первичной опухоли при узловой форме меланомы кожи I–II стадий 66

3.4.1 Прогностическая роль наличия и выраженности воспалительной макрофагальной инфильтрации в безрецидивной выживаемости пациентов с узловой меланомой кожи I–II стадий..... 67

3.4.2 Прогностическая роль наличия и выраженности воспалительной макрофагальной инфильтрации в общей выживаемости пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий 71

3.5 Прогностическая значимость стандартных морфологических факторов прогноза, молекулярных и иммунологических маркеров 75

3.5.1 Прогрессия и безрецидивная выживаемость 75

3.5.2 Летальный исход и общая выживаемость..... 78

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 83

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 97

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... 100

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Меланома кожи является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей: во многих странах мира наблюдается неуклонный рост заболеваемости с ежегодным приростом до 3 %. Меланома характеризуется самой высокой летальностью в группе онкологических заболеваний кожи (80 %). В Российской Федерации при первичном обращении к онкологу меланома кожи часто выявлялась на ранних стадиях и является гетерогенной группой заболеваний с разными прогнозом, подходами к лечению и частотой динамического наблюдения [29]. При локализованных I–II стадиях меланомы кожи наиболее хорошо изучены и уже давно являются стандартными факторами прогноза такие важные патоморфологические параметры первичной опухоли, как толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, наличие изъязвления эпидермиса, фаза роста опухоли, митотический индекс и др. [3, 86]. Однако с развитием персонализации в онкологии, в частности для меланомы кожи, данные показатели уже недостаточно полно отражают индивидуальность и точность прогноза заболевания. Развитие молекулярной генетики и иммунологии улучшило понимание биологических особенностей меланомы кожи, но большой акцент в данных исследованиях был сделан на изучении III–IV стадий меланомы кожи. Для меланомы кожи I–II стадий на сегодня недостаточно только стандартных патоморфологических параметров – требуются дополнительные и более углубленные факторы прогноза [36]. Наиболее перспективными для точности прогноза меланомы кожи, но, к сожалению, не до конца изученными, являются стволовые опухолевые клетки, а также наличие ALK и опухоль-ассоциированные макрофаги М2. Также следует отметить, что еще в меньшей степени данные биомаркеры изучались для пациентов с I–II стадиями меланомы кожи [76, 125].

Таким образом, актуальным и своевременным представляется изучение и определение прогностического значения дополнительных молекулярных и иммунологических факторов при меланоме кожи локализованных стадий.

Степень разработанности темы исследования. Помимо стандартных клинических и патоморфологических факторов прогноза меланомы кожи ранее в мире неоднократно принимались попытки, найти новые и дополнительные биологические прогностические факторы. Некоторые исследователи изучали наличие и выраженность стволовых опухолевых клеток с маркером ABCB5 при местно-распространенных стадиях меланомы кожи с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов и показали более агрессивное клиническое течение данных опухолей при их наличии. Однако, следует отметить, что при локализованных стадиях меланомы кожи стволовые опухолевые клетки не изучались. Данные в мировой научной литературе по перестройке гена ALK в первичной опухоли при меланоме кожи весьма ограничены, роль опухоль-ассоциированных макрофагов фенотипа М2 при меланоме кожи I–II стадий также на сегодняшний день изучена недостаточно.

Поэтому настоящее диссертационное исследование и посвящено поиску новых маркеров локализованной меланомы кожи. Особенностью данной работы является изучение дополнительных молекулярных и иммунологических биомаркеров для повышения точности прогноза и сравнение их со стандартными патоморфологическими факторами, поскольку прогностическая значимость данных факторов ранее была недостаточно изучена у пациентов с меланомой кожи локализованных стадий.

Цель исследования: улучшить точность прогноза меланомы кожи локализованных стадий за счет выявления дополнительных молекулярных и иммунологических биомаркеров опухоли.

Задачи исследования:

1. Изучить встречаемость и значение стволовых опухолевых клеток для прогноза заболевания у пациентов с поверхностно-распространяющимися и узловыми формами меланомы кожи I–II стадий.

2. Определить экспрессию белка ALK в опухолевых клетках поверхностно-распространяющихся и узловых форм меланомы кожи локализованных стадий в качестве фактора прогноза заболевания.

3. Изучить выраженность и влияние на прогноз макрофагов фенотипа М2 в опухолевом микроокружении при узловой форме меланомы кожи I–II стадий.

4. Сопоставить прогностическую значимость стандартных патоморфологических факторов с исследуемыми молекулярными и иммунологическими биомаркерами у пациентов с локализованными стадиями меланомы кожи.

Научная новизна исследования. Впервые определена прогностическая значимость стволовых опухолевых клеток у пациентов с меланомой кожи I–II стадий. Изучена прогностическая роль экспрессии белка ALK и выраженности макрофагов М2 в первичной опухоли у пациентов с меланомой кожи локализованных стадий. Впервые проведено сравнение стандартных патоморфологических факторов прогноза с дополнительными молекулярными и иммунологическими биомаркерами опухоли.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование было направлено на оценку роли дополнительных молекулярных и иммунологических факторов в определении более точного прогноза для индивидуальной оценки течения меланомы кожи, что расширило фундаментальные представления о биологических свойствах меланомы кожи туловища и конечностей локализованных стадий. Выявленные биомаркеры в комбинации с оценкой фазы роста меланомы кожи могут дополнять стандартные прогностические патоморфологические факторы для более точного определения прогноза заболевания.

На практике пациентам с меланомой кожи I–II стадий целесообразно определять в опухоли наличие экспрессии белка ALK и наличие стволовых опухолевых клеток с маркером АВС-транспортера (ABCB5+), при обнаружении в первичной опухоли данных дополнительных биомаркеров необходимо чаще и более углубленно проводить динамическое наблюдение и обследования.

Методология и методы исследования. Работа содержит анализ историй болезни и амбулаторных карт пациентов с первичной меланомой кожи туловища и

конечностей I–II стадий, которым было проведено хирургическое или комбинированное лечение в онкологических отделениях ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2016 по 2020 гг. Критерием включения в исследование было наличие достаточных клинических и инструментальных данных. Все случаи были гистологически верифицированы с дополнительным проведением иммуногистохимического исследования (ИГХ-исследования). Изучена экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток ABCB5, CD133, экспрессия белка ALK, экспрессия маркера М2- макрофагов CD163. Сбор и обработка материала выполнялись в разработанной электронной базе с деперсонализированными данными пациентов и применением многопольных электронных таблиц Excel (Microsoft). В работе применены современные методы статистического анализа, что позволяет считать полученные данные убедительными и достоверными.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частота встречаемости стволовых опухолевых клеток у пациентов с поверхностно-распространяющимися и узловыми формами меланомы кожи I–II стадий сопоставима. Наличие стволовых опухолевых клеток с маркером ABCB5+ в сочетании с узловой формой меланомы кожи ассоциировано с увеличением риска прогрессии опухолевого процесса и большей вероятностью летального исхода у данных пациентов.

2. Встречаемость экспрессии белка ALK сопоставима у пациентов с поверхностно-распространяющимися и с узловыми формами меланомы кожи локализованных стадий. Наличие экспрессии белка ALK в опухоли увеличивает риски ее прогрессии в 4,29 раза.

3. Наличие макрофагов фенотипа М2 и их выраженность не влияют на прогноз заболевания и не ухудшают выживаемость пациентов с узловой формой меланомы кожи I–II стадий.

4. Прогностическая модель меланомы кожи локализованных стадий при наличии стволовых опухолевых клеток и узловой формы опухоли независимо

улучшает точность прогноза при 5-летнем периоде наблюдения по сравнению со стандартными патоморфологическим факторами прогноза.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения jamovi (версия 2.2.5) и RStudio (версия R 4.3.3).

Оценка характера распределения количественных переменных проводилась с использованием критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Сравнение количественных переменных в двух группах проводилось с использованием критерия Манна – Уитни; сравнение категориальных переменных – с использованием критериев Хи-квадрат, Хи-квадрат с поправкой Йейтса и точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа потенциальных предикторов безрецидивной и общей выживаемости пациентов использован анализ выживаемости с построением кривых Каплана – Майера, а также моделей пропорциональных рисков Кокса. Сравнение кривых выживаемости проводилось с использованием лог-ранк критерия Мантеля – Кокса. Для сравнения моделей пропорциональных рисков Кокса в отношении прогрессии меланомы кожи во времени нами был проведен зависимый от времени ROC-анализ (time-dependent ROC).

По теме диссертации опубликованы 4 работы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них 2 – в изданиях, индексируемых международными базами данных (Scopus, WOS).

Основные положения диссертации доложены на трех научных конференциях: XXVII Российский онкологический конгресс (Москва, 2023); II Научно-практическая конференция «Меланома и рак кожи» (Москва, 2024); 14 Всероссийский Форум Национального Альянса дерматовенерологов и косметологов с международным участием «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики» (Москва, 2024).

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную деятельность ГБУЗ МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ и в учебный процесс кафедры онкологии и рентгенрадтологии имени академика В.П. Харченко медицинского

института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Автор принял активное участие в формировании дизайна исследования, его цели и задач. Также автором был проведен тщательный анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние проблемы, рассматриваемой в диссертации, детально изучены амбулаторные карты и истории болезни пациентов. Автором собрана и обработана информация, необходимая для проведения данного исследования с последующим статистическим анализом, оценкой полученных результатов и заключением.

Диссертация изложена на 116 страницах и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственного исследования, обсуждение полученных результатов, список сокращений и условных обозначений, выводы, практические рекомендации, список литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 34 таблицами и 22 рисунками.

Библиография включает 137 источников, из них 24 – российских и 113 – зарубежных. Количество источников, опубликованных за последние 5 лет (с 2021 г. включительно), составляет 60,6 % (83 источника).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология меланомы кожи в мире и России

Меланома – это злокачественная неэпителиальная опухоль нейроэктодермального происхождения, происходящая из трансформированных меланоцитов, продуцирующих темный пигмент меланин. Помимо кожи, меланома может иногда встречаться в увеальном тракте глаза, на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, бронхов, мозговых оболочках и др. Меланома кожи является наиболее распространенной формой и встречается в 90 % случаев от всех меланом [38].

По данным Li Z. et al. (2022), в период с 1990 по 2019 г. отмечается значительный рост заболеваемости и смертности от меланомы кожи – на 170 и 90 % соответственно. Важным показателем, оценивающим суммарное «бремя болезни», является DALY (disability-adjusted life-years – годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности), который для меланомы кожи за указанный период также повысился на 67 % [120].

По данным GLOBOCAN В 2022 г. по всему миру было выявлено более 330 тысяч случаев меланомы кожи. Общемировой стандартизованный по возрасту показатель распространенности меланомы кожи составил 3,2 на 100 тысяч населения. Самый высокий уровень заболеваемости выявлен в Австралии, где ежегодно регистрируется более 35 новых случаев заболевания на 100 тысяч населения. Такой же высокий показатель отмечается в странах северной Европы – Дании (31,1 на 100 тысяч населения), Норвегии (30,6 на 100 тысяч населения) и Швеции (27,4 на 100 тысяч населения) [29].

В Российской Федерации, как и во всем мире, отмечается неуклонный рост заболеваемости меланомой кожи. По данным на 2023 г., было выявлено более 10 тысяч новых случаев меланомы кожи. Стандартизованный по возрасту показатель распространенности составил 4,9 на 100 тысяч населения. В период с 2013 по 2023 гг. в нашей стране число больных, взятых на учет с впервые

в жизни установленным диагнозом меланомы кожи, увеличилось на 73,1 %, что подчеркивает актуальность данной проблемы и для России [22, 24]. В нашей стране, по данным на 2023 г., меланома кожи в 80,3 % случаев выявлялась на I–II стадиях, что подчеркивает необходимость всестороннего обследования и отслеживания данных пациентов для предотвращения прогрессирования меланомы [22].

1.2 Стадирование меланомы кожи

В настоящее время стадирование меланомы осуществляется с использованием классификации UICC/AJCC TNM, пересмотренной в 2017 г. [86]. Критерий Т опухоли оценивается на основе классификации толщины опухоли по Бреслоу и наличия или отсутствия изъязвлений в ее структуре. По данным восьмого пересмотра AJCC, толщина опухоли по Бреслоу и наличие изъязвлений оказались более информативными предикторами опухоль-специфической выживаемости пациентов с меланомой кожи Т1 по сравнению с митотическим индексом. В результате были пересмотрены определения меланом Т1a и Т1b: к Т1a относятся опухоли с толщиной менее 0,8 мм без изъязвления, тогда как Т1b включает опухоли толщиной от 0,8 до 1 мм как с изъязвлением, так и без него, а также меланомы размером менее 0,8 мм с изъязвлением [7, 86].

Параметр N определяет метастазы в региональные лимфатические узлы, а также в региональные участки, включая транзитные, микросателлитные, сателлитные и подкожные метастазы. Местоположение отдаленных метастазов является ключевым аспектом, определяющим категорию М. Классификация данной категории включает как локализацию метастатического заболевания, так и уровень сывороточной лактатдегидрогеназы. Пациенты с невисцеральными метастазами (кожные, подкожные и лимфатические узлы) относятся к подкатегории М1a и имеют более благоприятный прогноз по сравнению с пациентами с метастазами в других органах [7]. Метастазы в легких классифицируются как М1b. Пациенты с висцеральными метастазами, за

исключением поражения центральной нервной системы (ЦНС), относятся к подкатегории M1c. Поскольку метастазы в ЦНС не вошли в эту классификацию, была разработана новая подкатегория M1d, которая включает пациентов с метастазами в ЦНС как с наличием, так и без других отдаленных метастазов, что отражает самый неблагоприятный прогноз. Дополнительным фактором прогноза для категории M1 является уровень сывороточной лактатдегидрогеназы, высокий показатель выступает негативным прогностическим фактором меланомы кожи [112]. Прогноз меланомы кожи в значительной степени зависит от стадии заболевания. Показатели 5-летней и 10-летней опухоль-специфической выживаемости для IA стадии составляют 97 и 95 %, в то время как для IIC – 53 и 40 % соответственно [14]. Отметим, что на выживаемость пациентов с меланомой кожи, помимо стадии, влияет ряд морфологических и молекулярно-генетических факторов, которые на сегодняшний день активно изучаются в аспекте прогнозирования исхода [8, 23].

1.3 Клинические формы меланомы кожи

Классификация меланомы кожи претерпела значительную эволюцию с момента появления первой гистологической системы в 1970-х гг. до современной многофакторной классификации, принятой Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2018 г. Первые попытки систематизировать меланому, предпринятые в 1970-х гг., основывались преимущественно на гистологических признаках.

Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи (горизонтальная фаза роста опухоли) составляет около 70 % всех случаев данного заболевания. Данный гистологический тип обладает низкой способностью к метастазированию и, как правило, распространяется не глубже сосочкового слоя дермы при наиболее частой локализации на коже спины и голени [15]. Такие опухоли чаще всего характеризуются радиальным ростом, который может продолжаться более 5 лет, достаточно медленным развитием и благоприятным

прогнозом при своевременной диагностике. Однако существуют поверхностно-распространяющиеся формы меланомы кожи с вертикальным ростом при инвазии клеток опухоли в ретикулярный и подкожно-жировой слои. В таком случае прогноз будет неблагоприятным [17].

Лентиго-меланома встречается достаточно редко и составляет около 5 % от всех случаев меланомы кожи. Клинической особенностью лентиго-меланомы является поздний возраст начала заболевания (средний возраст 70 лет), преимущественно локализуется на коже лица, характерен медленный рост. Лентиго-меланома обычно развивается на фоне предракового изменения кожи – злокачественного лентиго, которое характеризуется появлением пигментных пятен, различных по форме и окраске, похожих на крупные веснушки, с длительным хроническим течением и отсутствием инвазии [6]. Как и поверхностно-распространяющаяся меланома, лентиго-меланома имеет две фазы роста. Первая – радиальная (горизонтальная) фаза роста, она может продолжаться более 10 лет. Вторая фаза отличается инвазивным ростом в дерму и может продолжаться несколько лет, а не месяцев, как при поверхностно-распространяющейся меланоме кожи. Такие биологические особенности объясняют отсутствие резких колебаний в течение опухоли и достаточно низкий риск метастазирования. В связи с этим данная форма меланомы менее агрессивная, чем поверхностно-распространяющаяся [134]. Лентиго-меланомы обычно не содержат мутаций BRAF V600E, но вместо этого содержат другие мутации MAPK-киназного пути, такие как мутации BRAF V600K, NRAS, KIT или инактивацию отрицательных регуляторов Ras, NF1 или RASA2 [136].

Акрально-лентигинозная форма меланомы кожи встречается в 10 % случаев, преимущественно у пожилых пациентов на сильно пигментированной коже (у представителей негроидной расы – в 70 % случаев). Опухоль чаще всего локализуется на ладонях, подошвах и ногтевых ложах и в верхних слоях дермы. Акрально-лентигинозная меланома является вариантом поверхностно-распространяющейся меланомы, но с более агрессивным течением, более частым и ранним метастазированием [4]. Специфическая локализация затрудняет

визуализацию опухоли, в большинстве случаев она диагностируется уже на стадии инвазивного роста. Акральная лентигинозная меланома имеет множество генетических драйверных изменений, многие из которых являются перспективными мишенями для создания новых лекарственных средств, включая мутации KIT, мутации BRAF, отличные от V600E. Может быть трудно отличить акрально-лентигинозную меланому с мутацией BRAF V600E от поверхностно-распространяющейся меланомы только по гистопатологическим и клиническим признакам [136].

Узловая меланома кожи (вертикальная фаза роста опухоли) встречается в 15 % случаев и представляет собой узловое образование темно-коричневого или черного цвета, однако в некоторых случаях могут отмечаться беспигментные участки поражения. Узловая меланома отличается вертикальным ростом, быстрым прогрессированием и неблагоприятным прогнозом [18]. Поверхность ее изъязвляется, кровоточит и покрывается корками. По всей видимости, узловая меланома не имеет значительных генетических различий с другими видами меланом внутри одного пути развития, однако предполагается, что ее возникновение связано с «инвертированным» порядком появления патологических мутаций. Начальные изменения не вызывают активного деления клеток, но, когда эти «поврежденные» меланоциты получают онкогенные мутации в сигнальном пути MAPK, они стремительно преобразуются, обходя начальные этапы развития [134]. К редко встречающимся типам меланомы кожи относятся: беспигментная (амеланотическая) меланома, меланосомы которой не синтезируют темный пигмент меланин, в связи с чем опухоль не имеет темной окраски, десмопластическая, или нейротропная, меланома [7]. Представленная классификация, хотя и оказала существенное влияние на практику, не учитывала сложную генетическую природу меланомы и ее эпидемиологические аспекты. Она была преимущественно описательной и не позволяла в полной мере предсказывать поведение опухоли или индивидуализировать лечение. В 2018 г. ВОЗ представила новую, принципиально иную классификацию, которая интегрировала гистологические данные с молекулярно-генетическими и эпидемиологическими

характеристиками. Эта классификация разделяет меланому на 9 отдельных подтипов, определяемых эволюционным путем [36].

В соответствии с новой классификацией меланомы были разделены на этиологически связанные с воздействием солнечных лучей, не связанные с солнечными лучами, а также существует классификация в зависимости от их мутационных перестроек, локализации и эпидемиологии. Меланомы кожи, подверженные воздействию солнечного облучения, были дополнительно разделены по гистопатологической степени кумулятивного солнечного повреждения (CSD) окружающей кожи на меланомы с низким и высоким CSD в зависимости от степени сопутствующего солнечного эластоза. К первой группе относится меланома, связанная с кумулятивным солнечным повреждением. Данная группа подразделяется еще на две категории: с низким CSD – поверхностно-распространяющиеся меланомы, с высоким CSD – злокачественные лентиго, десмопластические меланомы, узловая меланома. Ко второй группе относятся меланомы, не ассоциированные с солнечными повреждениями: акральные меланомы, меланомы врожденных невусов, меланомы голубых невусов, меланомы Шпиц [36].

Ключевое отличие новой классификации заключается в учете мутационных изменений, происходящих в процессе развития опухоли. Это позволяет более точно оценить прогноз заболевания и разработать персонализированную стратегию лечения с учетом индивидуальных генетических особенностей опухоли. Таким образом, современная классификация ВОЗ выходит за рамки чисто гистологического описания, представляя собой многофакторную систему, которая способствует более точному диагнозу и прогнозированию течения меланомы [67].

1.4 Стандартные патоморфологические прогностические факторы меланомы кожи

1.4.1 Толщина опухоли по Бреслоу

Наиболее значимым прогностическим показателем для пациентов с локализованной меланомой I и II стадии является толщина опухоли по Бреслоу

[37, 85]. Измерения этого показателя производятся от верхней границы зернистого слоя или основания язвенного дефекта до самой глубокой точки инвазии опухолевых клеток, при этом не учитываются такие факторы, как распространение в придатках кожи, участки регресса и сателлиты. Хотя классификация Кларка определяет глубину инвазии по анатомическим уровням кожи, она является альтернативным методом оценки, так как считается менее точным, чем измерение толщины по Бреслоу [95].

Многочисленные исследования подтверждают прямую взаимосвязь между толщиной опухоли по Бреслоу и риском развития метастазов. Чем больше значение этого показателя, тем выше вероятность распространения опухоли на регионарные лимфоузлы и отдаленные органы и, соответственно, меньше вероятность выживаемости пациентов [37, 49]. Восьмое издание руководства по стадированию рака AJCC сообщило, что 10-летняя опухоль-специфическая выживаемость составляет 98 % для случаев T1aN0 с толщиной опухоли менее 0,8 мм и 75 % для случаев с толщиной опухоли более 4,0 мм или случаев T4bN0 [97].

1.4.2 Изъязвление эпидермиса

Один из наиболее тревожных признаков, существенно ухудшающий прогноз меланомы кожи, – это изъязвление первичной опухоли. В отличие от изъязвлений, связанных с внешними травмами, истинное изъязвление меланомы возникает вследствие внутренних процессов и является серьезным неблагоприятным прогностическим фактором [67]. Считается, что изъязвление развивается из-за ишемии опухоли, которая возникает в результате ее быстрого роста. Этот процесс визуально проявляется как повреждение целостности кожных покровов в области новообразования, часто сопровождающееся кровоточивостью и выделениями. Изъязвления, как правило, встречаются в меланомах толщиной более 4 мм, хотя и не являются прямым следствием увеличения толщины. По данным последних крупных мета-анализов, изъязвления являются независимым прогностическим фактором, связанным с повышенным риском метастазирования и

ухудшением прогноза [49, 96]. Эти выводы подчеркивают важность определения состояния изъязвления при планировании терапевтических стратегий для пациентов с меланомой.

1.4.3 Митотическая активность

Митотический индекс, представляющий собой количество митозов на квадратный миллиметр ткани, стал важным показателем в оценке пролиферативной активности опухоли. Исследования показывают, что увеличение митотического индекса коррелирует со снижением выживаемости пациентов [55, 66].

В 2009 г. Американский объединенный онкологический комитет AJCC включил количество митозов в систему стадирования меланомы TNM ввиду его независимой прогностической ценности в отношении выживаемости, чтобы подразделить стадию T на T1a и T1b. Однако в 8-м издании системы стадирования AJCC митотический индекс был исключен из критериев, поскольку использование толщины опухоли по Бреслоу в 0,8 мм оказалось более тесно связано с прогнозом заболевания [77]. Это решение подчеркивает важность постоянного переосмысления и обновления методов оценки прогноза в онкологии.

1.4.4 Лимфоцитарная интра- и паратуморальная инфильтрация меланомы кожи

На сегодня роль иммунного ответа организма в борьбе с развитием меланомы привлекает все большее внимание исследователей. В этом контексте лимфоциты, особенно опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TILs), играют ключевую роль в формировании иммунного ответа [25].

Исследования показывают, что наличие TILs в опухолевой ткани связано с более благоприятными прогнозами для пациентов, страдающих меланомой. Например, высокая степень лимфоцитарной инфильтрации может указывать на низкую вероятность положительных результатов биопсии сторожевых

лимфатических узлов, что делает данный показатель потенциальным прогностическим маркером [84]. Это открытие подчеркивает, что активность иммунной системы может быть направлена против опухоли, что в свою очередь может влиять на выживаемость пациентов. Поэтому даже при наличии агрессивных форм меланомы выраженный иммунный ответ может существенно повысить шансы на выживание. Эти результаты подчеркивают важность дальнейшего изучения роли иммунного ответа в контексте меланомы кожи.

В качестве дополнительных параметров, рекомендуемых при морфологической оценке меланомы, рассматриваются лимфаваскулярная и периневральная инвазия, признаки регрессии опухоли, наличие микросателлитов, уровень пролиферативной активности Ki67, статус сторожевого лимфатического узла [1, 5, 12]. Также в некоторых исследованиях показано, что возраст, пол, локализация первичной опухоли и социально-экономический статус связаны с выживаемостью независимо от стадии [20, 21].

Помимо этого, в последние годы особое внимание уделяется различным клеточным и молекулярно-генетическим прогностическим факторам меланомы кожи, выявление которых особенно актуально при более ранних стадиях заболевания с целью выявления группы неблагоприятного течения и, возможно, назначения терапии для профилактики дальнейшего прогрессирования [11].

1.5 Опухоль-ассоциированные макрофаги в структуре меланомы кожи

Макрофаги играют ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза и иммунитета. Как оказалось, макрофаги являются составной частью опухолевого микроокружения и одними из наиболее распространенных клеток иммунной системы в его структуре [10]. Опухоль-ассоциированные макрофаги могут стимулировать прогрессию опухоли за счет усиления ангиогенеза, увеличения выживаемости опухолевых клеток, миграции, инвазии и подавления активности противоопухолевых иммунных механизмов [32, 115]. Опухоль-ассоциированные макрофаги могут влиять на эффективность ингибиторов CTLA-4, PD-1 и PD-L1, в

связи с чем рассматриваются в качестве основной мишени для иммунотерапии [132].

Опухоль-ассоциированные макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток с уникальными генотипическими и фенотипическими профилями. Происхождение опухоль-ассоциированных макрофагов находится на стадии активного обсуждения. Исследования на животных моделях показывают, что опухоль-ассоциированные макрофаги могут происходить как из моноцитов костного мозга, так и из тканевых макрофагов-предшественников [115]. Важно понимать, что фенотип и функциональная активность опухоль-ассоциированных макрофагов не являются статичными. Они динамически изменяются под влиянием микроокружения опухоли. Паракринные сигналы, поступающие от опухолевого микроокружения, обеспечивают дифференцировку макрофагов на 2 субпопуляции – провоспалительные М1-макрофаги и противовоспалительные М2-макрофаги [58]. CD163 часто используется в качестве маркера М2-макрофагов, которые приобретают противовоспалительный фенотип (поляризуются) под действием цитокинов, секретируемых Т-хелперами 2-го типа (интерлейкина-4, 10, 13, TGF-β). Один из главных механизмов, посредством которого ТАМ (опухоль-ассоциированные макрофаги) способствуют метастазированию, – это секреция различных цитокинов и факторов роста. Как показывают исследования, преобладание М2-поляризованных опухоль-ассоциированных макрофагов характеризуется секрецией иммуносупрессивных факторов, стимуляцией ангиогенеза и выработкой факторов, способствующих внедрению опухолевых клеток в окружающие ткани [100]. Показано, что в среде опухоли, богатой опухоль-ассоциированными макрофагами, преобладает интерлейкин-10, мощный иммуносупрессивный цитокин, подавляющий активность цитотоксических Т-лимфоцитов, основных эффекторов противоопухолевого иммунитета. Одновременно уровень провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-12, значительно снижается. Интерлейкин-12 необходим для активации и созревания цитотоксических Т-лимфоцитов, поэтому его недостаток еще больше ослабляет противоопухолевый иммунный ответ [35]. Этот иммуносупрессивный сдвиг

создает благоприятную почву для неограниченного роста и распространения меланомы. Дополнительно было показано, что фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), также продуцируемый опухоль-ассоциированными макрофагами, может вызывать устойчивость меланомы к ингибиторам сигнального пути MAPK [74]. Путь MAPK играет важную роль в пролиферации и выживании меланомных клеток. Устойчивость к ингибиторам этого пути делает терапию неэффективной, усугубляя прогноз заболевания [102].

Таким образом, TNF-α, вырабатываемый TAM, действует не только как проангиогенный фактор, но и как фактор, способствующий лекарственной устойчивости [94, 102]. В рамках экспериментальных моделей меланомы кожи было показано, что CD163+ опухоль-ассоциированные макрофаги поддерживают иммунную супрессию и опосредуют резистентность к ингибиторам PD-1, а таргетное подавление данных опухоль-ассоциированных макрофагов восстанавливает Т-клеточный иммунный ответ [57, 81]. Влияние опухоль-ассоциированных макрофагов на метастазирование меланомы кожи не ограничивается их секреторным профилем, они также участвуют в прямых взаимодействиях с опухолевыми клетками, которые могут усиливать метастатический потенциал. Roh-Johnson et al. (2017) сообщили, что макрофаги могут передавать микроРНК, способствующие инвазии, клеткам меланомы, тем самым изменяя их поведение и способствуя усиленному инфильтративному росту [117]. Цитоплазматическая передача сигнальных молекул является примером сложной коммуникации между опухоль-ассоциированными макрофагами и клетками меланомы.

Таким образом, опухоль-ассоциированные макрофаги играют сложную и многогранную роль в прогрессировании меланомы, действуя как ключевые посредники между опухолевыми клетками и их микроокружением. Их влияние на иммунный ответ, ангиогенез и ремоделирование микроокружения опухоли делает их перспективной мишенью для разработки новых противораковых препаратов. Дальнейшие исследования, направленные на изучение гетерогенности опухоль-ассоциированных макрофагов, их взаимодействия с другими клетками

микроокружения и механизмов регуляции их функции, необходимы для создания эффективных и целевых терапевтических стратегий против меланомы. При этом следует отметить, что роль опухоль-ассоциированных макрофагов при ранних стадиях меланомы кожи на сегодня изучена недостаточно.

1.6 Стволовые опухолевые клетки меланомы кожи

Стволовые опухолевые клетки встречаются в нескольких типах опухолей, одним из которых является меланома кожи. Стволовые опухолевые клетки способны инициировать и поддерживать опухолевый рост путем неконтролируемой пролиферации и дифференцировки, а также возможности самообновления [93]. Считается, что стволовые опухолевые клетки могут способствовать ангиогенезу опухолей [103], а при меланоме кожи отличаются иммуномодулирующим действием, связанным с ослаблением иммунитета организма хозяина [70]. При этом прогностическое значение стволовых опухолевых клеток меланомы кожи все еще остается на стадии активного обсуждения, а клинические исследования, посвященные данному вопросу, крайне ограничены.

Идентификация стволовых опухолевых клеток меланомы кожи все еще находится на стадии активного обсуждения, а сама субпопуляция представляет собой гетерогенный набор клеток, экспрессирующих различные биомаркеры. В качестве потенциальных маркеров стволовых опухолевых клеток меланомы кожи рассматриваются нестин, CD44, CD147, CD271, Oct 3/4, альдегид-дегидрогеназа ALDH1, а также различные представители суперсемейства АВС-транспортеров [116, 123]. В качестве наиболее распространенных и общепризнанных маркеров стволовых опухолевых клеток выступают ABCB5 и CD133 [76].

ABCB5 является представителем суперсемейства АВС-транспортеров, классически состоящих из двух доменов – трансмембранного и нуклеотид-связывающего, ответственного за взаимодействие с аденозинтрифосфорной

кислотой и гидролиз последней [79]. При этом данных относительно структуры и функциональных особенностей ABCB5 крайне мало, а работы последних лет сосредоточены на изучении молекулярных аспектов различных изоформ белка [74, 130].

Клиническая роль ABCB5 также остается не до конца понятной. Показано, что ABCB5 вовлечен в онкогенез ряда заболеваний, таких как рак молочной железы, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, некоторые опухоли кроветворной и лимфоидной ткани [73]. Вероятно, ABCB5 может играть роль и в онкогенезе меланомы кожи, являясь одним из маркеров стволовых клеток меланомы [76], также опосредуя резистентность к ряду химиотерапевтических препаратов [74, 79].

Norihiro Suzuki et al. (2015) показали, что ABCB5 гораздо чаще выявляется в сторожевых лимфатических узлах у пациентов с меланомой кожи при метастатическом поражении последних. Дополнительно было установлено, что наличие мРНК ABCB5 чаще выявляется у пациентов с рецидивом заболевания, а ABCB5 может использоваться в качестве маркера стволовых опухолевых клеток меланомы в сторожевых лимфатических узлах [33].

Согласно данным Rapanotti M.C. et al. (2023), циркулирующие в крови клетки меланомы кожи, выделенные у пациентов с распространенными стадиями заболевания, наряду с CD146, экспрессируют ABCB5 [64]. Фенотип CD45-CD146+ABCB5+ характерен для редкой популяции примитивных стволовых мезенхимальных циркулирующих клеток меланомы кожи, которые ассоциированы с прогрессией заболевания [62], а выделенный фенотип опосредует эпителиально-мезенхимальную трансформацию с дальнейшим метастазированием [64]. Maria Rapanotti C. et al. (2020) также установили, что ABCB5 является эффективным маркером для отслеживания высокоагрессивных циркулирующих клеток меланомы кожи, которые сами по себе являются гетерогенной популяцией, не поддающейся четкому однозначному определению. В ходе работы было показано, что для данных клеток характерна экспрессия ABCB5, который оказался антигеном стволовых клеток меланомы, опосредующих быстрый инфильтративный рост,

пролиферацию, запуск онкогенеза, прогрессию и метастазирование [99], что подтверждалось и в ходе работы Aya-Bonilla C. et al. (2019) [80]. ABCB5+ стволовые опухолевые клетки отличались увеличением экспрессии генов, ответственных за эпителиально-мезенхимальную трансформацию, тем самым обеспечивая их инвазивный фенотип [80].

В ходе работы Wang S. et al. (2017) было установлено, что меланома кожи с положительным ABCB5-статусом отличается более высоким метастатическим потенциалом по сравнению с меланомой с отрицательным ABCB5-статусом [26]. Так, наличие ABCB5 в образцах меланомы кожи было ассоциировано с аномальной активацией сигнального пути NF-kB, характерного для метастатического процесса. Данное заключение было дополнительно подтверждено в ходе эксперимента на животной модели: лабораторным мышам была выполнена инъекция опухолевых клеток меланомы с экспрессией ABCB5 и без нее. Через 4 недели животные были выведены из исследования с последующей оценкой количества легочных метастазов. Как оказалось, гораздо больше метастазов было выявлено в группе особей, привитых ABCB5+ клетками меланомы кожи (среднее значение 90,3 и 13,4 соответственно, $p < 0,001$), что еще раз подтвердило предположение относительно метастатического потенциала ABCB5+ фенотипа [26].

ABCB5+ стволовые опухолевые клетки находятся в тонком взаимодействии с CD133+ стволовыми опухолевыми клетками, что было показано в работе El-Khattouti A. et al. (2015), где изучалась противоопухолевая активность фенетилового эфира кофейной кислоты (CAPE). Оказалось, что CD133+ меланома не реагирует на изучаемый агент, в то время как в опухолевых клетках CD133– под воздействием CAPE происходит апоптоз. Резистентность субпопуляции CD133 исследователи связывали с усиленным выделением CAPE из клеток за счет транспортера ABCB5. Так, нокдаун ABCB5 повышал чувствительность CD133+ клеток к изучаемому веществу, также запуская апоптоз CD133+ стволовых опухолевых клеток меланомы кожи [45].

CD133, также известный как проминин-1, представляет собой трансмембранный гликопротеин, специфически локализующийся в клеточных

выступах. В физиологических условиях точная функция CD133 неизвестна, однако предполагается, что он действует в качестве организатора топологии клеточной мембраны, вовлечен в процессы клеточной дифференцировки и трансдукции сигналов [124]. Наиболее часто CD133 используется в качестве маркера стволовых опухолевых клеток различных опухолей, в том числе меланомы кожи [46]. По данным экспериментальных исследований in vitro и in vivo, наличие CD133, подобно ABCB5, ассоциировано с увеличением пролиферативной активности опухолевых клеток, прогрессией, метастазированием и резистентностью к ряду химиотерапевтических препаратов [43, 46, 107]. Так, по данным Simbulan-Rosenthal C.M. et al. (2019), CD133+ стволовые опухолевые клетки меланомы кожи обладают повышенной выживаемостью после блокировки мультикиназами, что свидетельствует о способности данных клеток уклоняться от терапевтических воздействий [42].

Исследования продемонстрировали, что клетки меланомы, экспрессирующие CD133+, обладают уникальными биологическими свойствами, отличающими их от клеток меланомы CD133–. Например, в работе Sharma B.K. et al. (2012) было установлено, что клональное доминирование CD133+ клеток коррелирует с прогрессированием опухоли и рецидивом заболевания в меланоме кожи, что указывает на то, что эти клетки играют важную роль в процессе метастазирования [52]. Аналогичным образом Julien Boudreault et al. (2024) подчеркнули, что CD133+ клетки меланомы обладают свойствами стволовых клеток, в том числе повышенной пролиферацией и инвазивностью [131].

Связь между CD133 и другими сигнальными путями также имеет большое значение для метастатического потенциала меланомы. Например, Kumar D. et al. (2016) обнаружили, что сигнальная ось Notch1-MAPK регулирует рост меланомы и ангиогенез, которые осуществляются через CD133+ клетки. Это свидетельствует о том, что CD133+ клетки активно участвуют в создании благоприятной микросреды для метастазирования [106]. Кроме того, клетки меланомы с CD133+ могут усиливать экспрессию матриксных металлопротеиназ, тем самым способствуя разрушению внеклеточного матрикса и последующей инвазии [114].

Хорошо известно, что ангиогенез является необходимым фактором опухолевого роста и метастазирования. Оказалось, что CD133 стволовые опухолевые клетки вовлечены в формирование переваскулярной ниши [63]. Lai C.-Y. et al. (2012) показали, что CD133+ стволовые опухолевые клетки способствуют опухолевому росту путем васкулогенной мимикрии, формируя периваскулярную нишу меланомы и кровеносные сосуды, ограниченные базальной мембраной и опухолевыми клетками без эндотелиальных клеток. При этом нокдаун CD133 в условиях in vivo был ассоциирован с более медленным разрастанием опухолевой ткани, что позволило предположить прогностически неблагоприятную функцию CD133+ стволовых опухолевых клеток при меланоме кожи [89].

Однако к противоположному мнению пришли исследователи под руководством Philippe Korn. В работе, опубликованной в мае 2021 г., лабораторные мыши были привиты CD133+ и CD133– стволовыми клетками меланомы с последующей оценкой характеристик сформировавшейся опухоли. Разницы во времени от инъекции до обнаружения меланомы между исследуемыми группами не было ($p = 0,992$). Объем опухоли, а также динамика изменения размера в группах CD133+ и CD133– оказались сопоставимы, опровергая тем самым данные о большей агрессивности и неблагоприятной роли CD133 [124]. К похожим выводам пришли Kloskowski T. et al. (2020). Было показано, что в условиях in vitro CD133+ клетки, по сравнению с CD133– и смешанной популяцией CD133+/–, обладали более высокой пролиферативной активностью и клоногенным потенциалом. Однако в эксперименте in vivo при введении мышам изучаемых групп клеток разницы в морфологических характеристиках меланомы, митотической активности, количестве некрозов между группами CD133+ и CD133– обнаружено не было, что также опровергало прогностически неблагоприятную функцию CD133 стволовых опухолевых клеток меланомы по сравнению с другими стволовыми опухолевыми клетками [41]. Тем самым проблема обнаружения и оценки прогностической роли стволовых опухолевых клеток является нерешенным и актуальным вопросом, требующим дальнейшего изучения. Это особенно важно для пациентов с локализованными формами меланомы, так как раннее обнаружение

рецидивирования заболевания после удаления первичной опухоли у данных пациентов сможет помочь в своевременном назначении необходимой терапии и предотвратить прогрессирование.

1.7 ALK-киназа анапластической лимфомы

Как и любая опухоль, меланома кожи несет свой набор генетических аномалий и перестроек. Одной из нечастых мутаций, выявляемых при меланоме кожи, является транслокация гена киназы анапластической лимфомы ALK, кодирующего одноименную рецепторную тирозинкиназу [51, 69]. Транслокация гена ALK представляет собой внутрихромосомную перестройку, ведущую в 95 % случаев к образованию химерного онкогена ALK-EML4. На фоне данной транслокации ALK попадает под влияние регулирующих последовательностей EML4 и переходит в активное состояние, становясь независимой от лигандов. Тем самым тирозинкиназа ALK осуществляет постоянную передачу внутриклеточного сигнала, нарушая нормальную дифференцировку, пролиферацию и контролируемую клеточную гибель за счет активации целого ряда каскадов, таких как JAK/STAT, PI3K/AKT, MEK/ERK и некоторые другие [19]. Соответственно опухоли с транслокацией ALK имеют выраженную окраску при иммуногистохимическом исследовании [71].

ALK-EML4 встречается в 3–7 % случаев немелкоклеточного рака легкого и у 23–31 % пациентов с метастатическим поражением головного мозга, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания [91]. Реже перестройки гена ALK выявляются при других новообразованиях, таких как рак молочной железы, колоректальный рак, почечноклеточный рак, рак яичников, рак пищевода, анапластическая карцинома щитовидной железы, В-клеточная лимфома и злокачественные новообразования кожи [16, 104].

Данные относительно перестройки гена ALK при меланомах кожи значительно ограничены. В некоторых публикациях изучалось изменение уровня ALK при акральной форме меланомы кожи. Сообщалось, что транслокация ALK

была выявлена у 6,9 % пациентов с акральной меланомой кожи, для которых был характерен более молодой возраст по сравнению с пациентами без транслокации [129]. Yen I. et al. (2019) указывали, что транслокация ALK встречается только в 0,8 % случаев акральной меланомы и ассоциирована с наличием изъязвлений в структуре опухоли [125], что может указывать на неблагоприятную прогностическую роль мутации ALK, однако прямых исследований, подтверждающих такую взаимосвязь, нет.

Генетические перестройки гена ALK были описаны также для шпицоидных новообразований кожи типичного (доброкачественного) и атипичного характера. Согласно данным Yeh I. et al. (2015), скопления ALK-положительных клеток при иммуногистохимическом исследовании можно обнаружить на большом расстоянии от основной опухолевой массы с тенденцией к инвазии соседних структур [50], указывая тем самым на наличие инфильтративного роста на фоне повышения активности ALK.

Тем не менее транслокации ALK выявляются и при доброкачественных шпиц-невусах у детей в 16,7 % случаев при отсутствии морфологических или биологических особенностей меланомы [34]. Перестройки ALK выявляются также у 12,5 % пациентов со шпиц-меланомами с более высокой распространенностью у молодых пациентов с медианой возраста 12 лет. Дополнительно было отмечено, что у пациентов с гиперэкспрессией ALK в шпиц-меланомах в опухолях чаще отсутствует пигмент и чаще наблюдаются скопления крупных веретенообразных меланоцитов [50, 129].

В 2015 г. в журнале Nature были опубликованы результаты исследования, согласно которому в 11 % случаев меланомы определялось нарушение инициации транскрипции, расположенное в 19-м интроне, что приводило к экспрессии новой усеченной изоформы гена ALK – ALK-ATI [30]. Дополнительно была подтверждена преимущественно ядерная и цитоплазматическая локализация белка ALK-ATI, в то время как ALK-EML4 выявлялась в цитоплазме и на клеточной мембране опухолевых клеток [16, 30].

Предполагаемая роль ALK в качестве мишени для лечения меланомы

находится на стадии активного обсуждения. В эксперименте показано, что на фоне транслокации ALK отмечается эффективность иммунотерапии ингибиторами ALK (кризотинибом, церитинибом и TAE-684). В некоторых случаях на фоне терапии кризотинибом отмечалась спонтанная регрессия ALK-ATI меланом [30]. Тем не менее клинические данные не подтверждали экспериментальные результаты. Согласно данным Couts K.L. et al. (2017), опухоли с транслокацией ALK-EML4 отвечали на ингибиторы ALK, в то время как опухоли с ALK-ATI не реагировали на иммунотерапию [28].

Накопление данных относительно дисрегуляции гена ALK в патогенезе меланоцитарных опухолей подчеркивает необходимость дальнейшего развития данного направления, в том числе с определением прогностической роли описываемых мутаций, которые в дальнейшем смогут применяться для оценки исхода заболевания и, возможно, будут дополнительными терапевтическими мишенями при назначении лечения.

1.8 Различные молекулярно-генетические факторы прогноза при меланоме кожи

Помимо рассматриваемых выше маркеров меланомы, на сегодня предлагается большое количество различных молекулярно-генетических прогностических факторов. Все более интересным в контексте диагностики и прогноза становится выявление небольших некодирующих молекул РНК, микроРНК. Показано, что уровень экспрессии определенных микроРНК взаимосвязан со стадией меланомы кожи, вероятностью метастазирования, а также резистентностью к химиотерапевтическим препаратам [101]. Это подчеркивает их потенциал не только как диагностических, но и как прогностических биомаркеров.

В последние годы внимание исследователей привлекли два перспективных биомаркера: циркулирующие опухолевые клетки и циркулирующая опухолевая ДНК, которые обещают революционизировать подходы к диагностике

и прогнозированию меланомы [48, 56]. В контексте меланомы кожи активно изучаются экзосомы, содержащие различные профили мРНК, микроРНК и белков, способных воздействовать на фенотип и функцию окружающих клеток [135]. К другим изучаемым в настоящее время маркерам меланомы кожи относят белок MIA (меланома-ингибирующая активность), опухолевый антиген PRIME, многочисленные генетические мутации в генах, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов, дифференцировке и пролиферации клеток [75].

В заключение отметим, что будущее диагностики и прогнозирования течения меланомы кожи видится многообещающим. Комбинация методов визуализации с передовыми технологиями искусственного интеллекта и новыми прогностическими маркерами позволит создать мощный диагностический инструмент для выявления заболеваний на ранних стадиях, а также отслеживания раннего рецидивирования, когда лечение наиболее эффективно, а прогноз относительно благоприятный. Для реализации всего потенциала этих технологий необходимы дальнейшее развитие и масштабные клинические испытания, направленные на совершенствование алгоритмов и поиск новых высокочувствительных биомаркеров. Только комплексный подход, объединяющий достижения различных областей науки и медицины, позволит обеспечить эффективную диагностику меланомы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

Диссертационное исследование выполнялось с помощью ретроспективного анализа и состояло из двух этапов. На I этапе в патоморфологическое исследование были включены 48 пациентов с меланомой кожи локальных I–IIC стадий, из которых 30 пациентов были с поверхностно-распространяющимися (горизонтальная фаза роста) и 18 – с узловыми (вертикальная фаза роста) формами, проходивших хирургическое или комбинированное лечение в ГБУЗ МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ в период с 2015 по 2016 гг.

На II этапе выполняли исследование на парафиновых блоках операционного материала других 24 пациентов – только с узловыми формами (вертикальная фаза роста) меланомы кожи с толщиной опухоли от 1,0 до 13,0 мм по Бреслоу (T2a – T4b), проходивших хирургическое лечение в ГБУЗ МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ в период с 2017 по 2020 гг. (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Критерии включения в исследование:

– возраст 18–85 лет;

– меланома кожи туловища и конечностей I–II стадий;

– пациенты, проходившие хирургическое или комбинированное лечение в МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ в период с 2015 по 2020 г.;

– ECOG 0-2, полная завершенность лечения;

– пациенты, проходящие контрольные обследования и динамическое наблюдение у районного онколога.

Критерии невключения в исследование:

– меланома кожи головы и шеи;

– меланома кожи in situ (0 стадии), III–IV стадии;

– ECOG 3-4;

– первичные пациенты с локальными рецидивами меланомы кожи;

– первично-множественные злокачественные образования;

– срок хранения биоматериала более 5 лет на момент включения в исследование и проведения иммуногистохимии (ИГХ).

2.2 Патоморфологическое исследование

2.2.1 Стандартные патоморфологические параметры

На I этапе был проведен ретроспективный анализ клинико-анамнестических данных от 48 пациентов с первичной меланомой кожи туловища и конечностей I–II стадий. Все пациенты проходили хирургическое или комбинированное лечение в МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ в период с 2015 по 2016 г. Был выполнен пересмотр готовых гистологических препаратов операционного материала с определением стандартных патоморфологических факторов прогноза: форма меланомы кожи (фаза роста), толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, наличие изъязвления эпидермиса, митотический индекс, нейротропизм, состояние краев резекции.

Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 % нейтральным формалином в течение 24 ч, после стандартной процедуры проводки

заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

2.2.2 Иммуногистохимическая оценка наличия и распределения стволовых опухолевых клеток

На том же послеоперационном материале от 48 пациентов с локальной меланомой кожи проведено иммуногистохимическое исследование с использованием диагностических антител к маркерам стволовых клеток опухоли: кроличьи поликлональные антитела CD133, разведенные 1:100. Abcam, ab140667 для выявления экспрессии ABCB5 – клон 5н3С6, разведение 1:200.

Демаскировку антигенов проводили при обработке срезов на водяной бане при температуре 95 °С в цитратном буфере (Dako, Дания) в течение 30 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 5 мин в темноте с 3 % перекисью водорода. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 10 % раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубация проводилась 16 ч при температуре 4 °С. Инкубация со вторичными антителами (меченными пероксидазой 3 % – REAL Envision+ kit, Dako) проводилась при температуре 18 °С в течение 15 мин. Для визуализации ИГХ-реакции использовался диаминобензидин (Invitrogen). Срезы докрашивались гематоксилином майера (Sigma-Aldrich) и заключались в синтетическую основу Shandon Mount (Thermo). Оценку результатов исследования проводили с применением светового микроскопа NIKON 80i.

Экспрессия маркеров стволовых клеток опухоли оценивалась с помощью шкалы интенсивности (0, 1+, 2+, 3+) и процента (0–100 %) клеток в образце, экспрессирующих маркеры стволовых клеток опухоли.

2.2.3 Анализ экспрессии тирозинкиназы ALK

Анализ экспрессии тирозинкиназы ALK проводился иммуногистохимическим методом на срезах, изготовленных из тех же блоков.

ИГХ-исследование с моноклональными антителами D57.3 к ALK проводилось на иммуностейнере Ventana. В качестве системы детекции использовали Ventana для ALK. Далее на ALK+ образцах проводили генетическое исследование (полимеразная цепная реакция) для подтверждения перестройки гена ALK.

2.2.4 Анализ экспрессии маркера макрофагальной инфильтрации CD163

На втором этапе исследования выполняли проспективный анализ: из парафиновых блоков операционного материала 24 пациентов только с узловой (вертикальная фаза роста) формой меланомы кожи (толщина опухоли от 1,0 до 13,0 мм по Бреслоу (T2a – T4b)), проходивших хирургическое или комбинированное лечение в МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ в период с 2017 по 2020 гг.

Иммуногистохимическое исследование микроокружения узловой меланомы кожи для выявления макрофагов М2 выполнено на иммуностейнере Ventana BenchMark XT с использованием системы детекции ultraView Universal DAB Detection kit и антител CD163 (polyclonal). Подсчет осуществлялся по 7-уровневой шкале, предложенной группой Австралийского института меланомы (2012) и представляющей собой модифицированную систему Кларка (Таблица 1).

Таблица 1 – Градация плотности и распределения макрофагального инфильтрата

Градация	0	1	2	3
Плотность инфильтрата	Отсутствует	Слабая	Умеренная	Выраженная
Распределение инфильтрата	Отсутствует	Фокальное	Мультифокальное	Диффузное

Таким образом, выделяют четыре степени выраженности макрофагальной инфильтрации:

- 0 – отсутствует инфильтрация;
- I – слабая/умеренная фокальная или слабая мультифокальная;
- II – выраженная фокальная или умеренная/выраженная мультифокальная или слабая диффузная;
- III – умеренная/выраженная диффузная инфильтрация.

2.3 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения jamovi (версия 2.2.5) и RStudio (версия R 4.3.3).

Оценка характера распределения количественных переменных проводилась с использованием критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Оказалось, что все количественные переменные имеют распределение, отличное от нормального, что предопределило использование методов непараметрической статистики при их оценке. Количественные переменные были представлены в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (Q1–Q3), в то время как категориальные – в виде абсолютных значений (n) и частотных характеристик (%). Сравнение количественных переменных в двух группах проводилось с использованием критерия Манна – Уитни; сравнение категориальных переменных – с использованием критериев $\chi 2$, $\chi 2$ с поправкой Йейтса и точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа потенциальных предикторов безрецидивной и общей выживаемости пациентов с учетом временного интервала нами был использован анализ выживаемости с построением кривых Каплана – Майера, а также моделей пропорциональных рисков Кокса (регрессионных моделей Кокса с расчетом отношений рисков (ОР) и 95 % доверительных интервалов (ДИ) как в случае наличия одного, так и в случае наличия нескольких предикторов (однофакторные и многофакторные регрессионные модели Кокса соответственно). Сравнение кривых выживаемости проводилось с использованием лог-ранк критерия Мантеля – Кокса. Различия и предикторы считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для сравнения моделей пропорциональных рисков Кокса в отношении прогрессии меланомы кожи во времени нами был проведен зависимый от времени ROC-анализ (time-dependent ROC) с построением графиков зависимых от времени значений площадей (AUC) под ROC-кривыми (time-dependent AUC) с шагом в 1 месяц.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клиническая и морфологическая характеристика пациентов

В исследование были включены 72 пациента с локальными стадиями поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) и узловых (вертикальная фаза роста) форм меланомы кожи, преимущественно стадии T1. Средний возраст пациентов по медиане составил 67,0 лет (Q1–Q3: 46,5–77,3). Преимущественно отмечалась II стадия меланомы. При разделении на подстадии у большинства пациентов были IB и IIC стадии.

Летальный исход за время наблюдения был выявлен у 29,2 % пациентов (21 человек) с медианой времени до летального исхода 24 месяца. Подробная клиническая характеристика пациентов представлена в Таблице 2.

Таблица 2 – Описательная характеристика выборки пациентов

Параметр	Значение (*n* = 72)
Возраст, лет, медиана (Q1–Q3)	67,0 (46,5–77,3)
Стадия T:	
• T1, % (*n*)	34,7 % (25)
• T2, % (*n*)	19,4 % (14)
• T3, % (*n*)	12,5 % (9)
• T4, % (*n*)	33,3 % (24)
Подстадия T:	
• T1a, % (*n*)	5,6 % (4)
• T1b, % (*n*)	29,2 % (21)
• T2a, % (*n*)	9,7 % (7)
• T2b, % (*n*)	9,7 % (7)
• T3a, % (*n*)	4,2 % (3)
• T3b, % (*n*)	8,3 % (6)
• T4a, % (*n*)	2,8 % (2)
• T4b, % (*n*)	30,6 % (22)
Стадия меланомы:	
• I, % (*n*)	44,4 % (32)
• II, % (*n*)	55,6 % (40)
Подстадия меланомы:	
• IA, % (*n*)	6,9 % (5)
• IB, % (*n*)	37,5 % (27)
• IIA, % (*n*)	13,9 % (10)
• IIB, % (*n*)	11,1 % (8)
• IIC, % (*n*)	30,6 % (22)
Прогрессия, % (*n*)	33,3 % (24)

Продолжение таблицы 2

Параметр	Значение *(n* = 72)
Время до прогрессии, месяцы, медиана (Q1–Q3)	12,0 (7,8–19,0)
Общая смертность, % (*n*)	29,2 % (21)
Время до летального исхода, месяцы, медиана (Q1–Q3)	24,0 (17,0–36,0)
Время наблюдения за пациентами, месяцы, медиана (Q1–Q3)	66,0 (31,0–76,0)

Морфологическая характеристика выборки пациентов представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Патоморфологическая характеристика выборки пациентов

Параметр	Значение
Фаза роста: • Вертикальная, % (*n*) • Горизонтальная, % (*n*)	 58,3 % (42) 41,7 % (30)
Толщина опухоли по Бреслоу, мм, медиана (Q1–Q3)	2,0 (0,6–4,8)
Изъязвления, % (*n*)	61,1 % (44)
Митотический индекс: • 0, % (*n*) • 1 и более, % (*n*)	 34,7 % (25) 65,3 % (47)

3.2 Встречаемость и прогностическая роль стволовых опухолевых клеток в поверхностно-распространяющихся и узловых формах меланомы кожи I–II стадий

3.2.1 Частота встречаемости стволовых опухолевых клеток

В рамках первой задачи настоящего исследования нами была оценена встречаемость стволовых опухолевых клеток в поверхностно-распространяющихся и узловых формах меланомы кожи I–II стадий. Наличие и характеристики стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5 и CD133, были оценены у 48 пациентов, из них 18 с узловыми формами меланомы (вертикальная фаза роста) и 30 с поверхностно-распространяющимися (горизонтальная фаза роста). При этом узловая форма меланомы встречалась у 42 пациентов общей выборки.

Возраст пациентов в двух группах был сопоставим (медиана 70,5 лет и 63,5 лет для узловых и поверхностно-распространяющихся опухолей соответственно, p = 0,152). Оказалось, что стволовые клетки, экспрессирующие ABCB5 и CD133, встречаются с одинаковой частотой при изучаемых формах меланомы. Интенсивность окраски ABCB5+ и CD133+ в двух группах также оказалась сопоставима.

При представлении интенсивности окраски ABCB5 (Рисунок 2) в виде бинарной величины «окраска отсутствует/слабая и умеренная/выраженная» статистически значимых различий в зависимости от формы меланомы также не было выявлено (p = 0,483).

Аналогичные данные были получены и для CD133+ стволовых опухолевых клеток. CD133+ выявлялся в 33,3 % случаев узловых форм (вертикальная фаза роста) меланомы (6 из 18 образцов) и в 36,7 % случаев поверхностно-распространяющихся форм (горизонтальная фаза роста) (11 из 30 образцов). Интенсивность окраски CD133+ в двух группах также оказалась сопоставима (p = 0,262). При представлении интенсивности окраски CD133 (Рисунок 3) в виде бинарной величины «окраска отсутствует/слабая и умеренная/выраженная» статистически значимых различий в зависимости от формы меланомы также не было выявлено (p = 0,752).

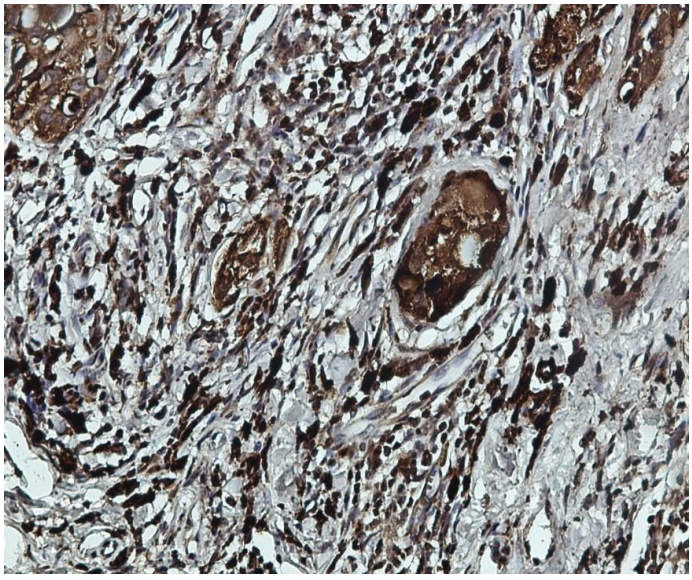


Рисунок 2 – Экспрессия маркера ABCB5 стволовыми клетками (интенсивность3+)

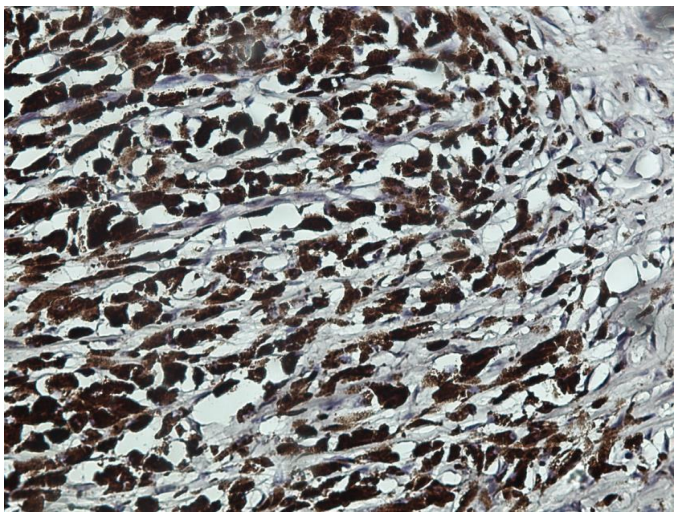


Рисунок 3 – Экспрессия маркера CD133 стволовыми клетками (интенсивность 3+)

Подробная сравнительная характеристика представлена в Таблице 4.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика параметров стволовых опухолевых клеток у пациентов с поверхностно-распространяющимися и узловыми формами меланомы кожи

Параметр	Узловые *n* = 18	Поверхностно-распрост. *n* = 30	p
Наличие ABCB5, % (*n*)	50,0 % (9)	36,7 % (11)	0,545**
Доля клеток, экспрессирующих ABCB5, %, Me (Q1–Q3)	80,0 (80,0–90,0)	90,0 (80,0–90,0)	0,630
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 11,1 % (1) 55,6 % (5) 33,3 % (3)	 18,2 % (2) 18,2 % (2) 63,6 % (7)	0,218*
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 55,6 % (10) 44,4 % (8)	 70,0 % (21) 30,0 % (9)	0,483**
Наличие CD133, % (*n*)	33,3 % (6)	36,7 % (11)	0,938**
Доля клеток, экспрессирующих CD133, %, Me (Q1–Q3)	30,0 (10,0–50,0)	30,0 (20,0–40,0)	1,000
Интенсивность окраски CD133, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 0 % 33,3 % (2) 66,7 % (4)	 9,1 % (1) 63,6 % (7) 27,3 % (3)	0,262*

Примечание – *Критерий Хи-квадрат, **Хи-квадрат с поправкой Йейтса.

Графическое представление распространенности стволовых опухолевых клеток в узловых (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) формах меланомы показано на Рисунке 4.

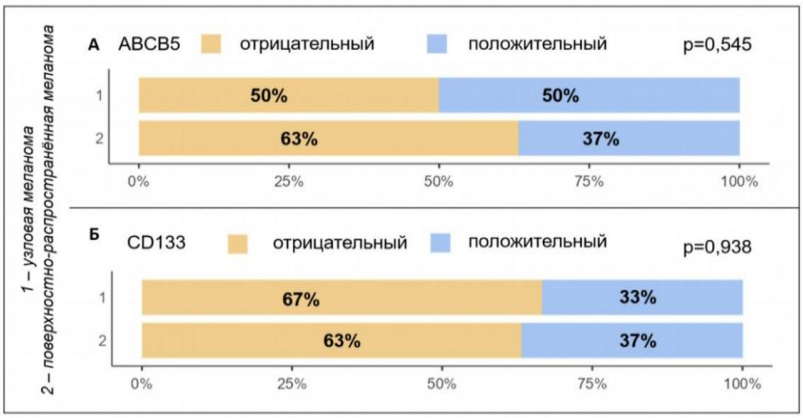


Рисунок 4 – Распространенность стволовых опухолевых клеток ABCB5 (А) и CD133 (Б) в узловых (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) формах меланомы кожи I–II стадий

3.2.2 Прогностическая значимость стволовых опухолевых клеток в прогрессии узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий

Для оценки прогностической значимости стволовых опухолевых клеток в отношении прогрессии заболевания в общей выборке пациентов на первом этапе было проведено сравнение параметров стволовых опухолевых клеток среди пациентов с прогрессией и без нее. Прогрессия встречалась у 33,3 % пациентов общей выборки (24 из 72 пациентов). Возраст пациентов в двух группах оказался сопоставим. Поскольку распространенность и характер распределения опухолевых стволовых клеток были изучены только у 48 пациентов, то дальнейшая сравнительная характеристика выполнялась только с учетом этих пациентов. У пациентов с прогрессией меланомы стволовые опухолевые клетки, экспрессирующие ABCB5, встречались чаще, чем у пациентов без прогрессии (58,3 % и 36,1 % соответственно), однако различия оказались статистически незначимыми (p = 0,310), что может быть связано с небольшим объемом пациентов в каждой из групп. Аналогичная закономерность отмечалась и для интенсивности окраски, представленной в виде бинарной величины «окраска отсутствует/слабая и

умеренная/выраженная»: при прогрессии меланомы умеренная/выраженная окраска на ABCB5 отмечалась у 50 % пациентов, в то время как при отсутствии прогрессии – у 30,6 % пациентов, однако различия также были статистически незначимыми (p = 0,300).

Похожие данные были получены и в отношении стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133. У пациентов с прогрессией меланомы стволовые опухолевые клетки, экспрессирующие CD133, встречались чаще, чем у пациентов без прогрессии (50,0 % и 30,6 % соответственно), однако различия также оказались статистически незначимыми (p = 0,300), что также может быть связано с небольшим объемом пациентов в каждой из групп. Более интенсивная окраска также отмечалась в случае прогрессии заболевания.

Дополнительно было показано, что среди пациентов с прогрессией гораздо выше частота летальных исходов. При этом прогрессия более характерна для пациентов с узловыми формами меланомы (вертикальная фаза роста). Подробная сравнительная характеристика исходов и параметров стволовых опухолевых клеток в общей выборке в зависимости от прогрессии меланомы представлена в Таблице 5.

Таблица 5 – Сравнительная характеристика параметров общей выборки пациентов и исходов в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток и наличия прогрессии меланомы кожи I–II стадий

Параметр	Нет прогрессии, *n* = 48	Есть прогрессия, *n* = 24	p
Возраст, лет, медиана (Q1–Q3)	65,0 (42,0–78,0)	69,0 (59,8–75,0)	0,496
Общая смертность, % (*n*)	20,8 % (10)	45,8 % (11)	**0,028***
Время до летального исхода, месяцы, медиана (Q1–Q3)	23,0 (15,0–29,5)	27,0 (18,0–43,0)	0,503
Фаза роста:			**<0,001**
Вертикальная, % (*n*)	43,8 % (21)	87,5 % (21)	
Горизонтальная, % (*n*)	56,3 % (27)	12,5 % (3)	
Наличие ABCB5, % (*n*)	36,1 % (13)	58,3 % (7)	0,310**
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5, %	90,0 (80,0–90,0)	80,0 (70,0–80,0)	**0,026**
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*):			0,887*
Слабая (1+)	15,4 % (2)	14,3 % (1)	
Умеренная (2+)	38,5 % (5)	28,6 % (2)	

Продолжение таблицы 5

Параметр	Нет прогрессии, *n* = 48	Есть прогрессия, *n* = 24	p
• Выраженная (3+)	45,2 % (6)	57,1 % (4)	
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 69,4 % (25) 30,6 % (11)	 50,0 % (6) 50,0 % (6)	0,300***
Наличие CD133, % (*n*)	30,6 % (11)	50,0 % (6)	0,300***
Процент клеток, экспрессирующих CD133, %	20,0 (17,5–35,0)	35,0 (22,5–47,5)	0,446
Интенсивность окраски CD133, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 9,1 % (1) 54,6 % (6) 36,4 % (4)	 0 % 50,0 % (3) 50,0 % (3)	0,692*

Примечание – *Критерий Хи-квадрат, **Хи-квадрат с поправкой Йейтса, ***Точный критерий Фишера.

Графическое представление распространенности стволовых опухолевых клеток в зависимости от прогрессии меланомы показано на Рисунке 5.

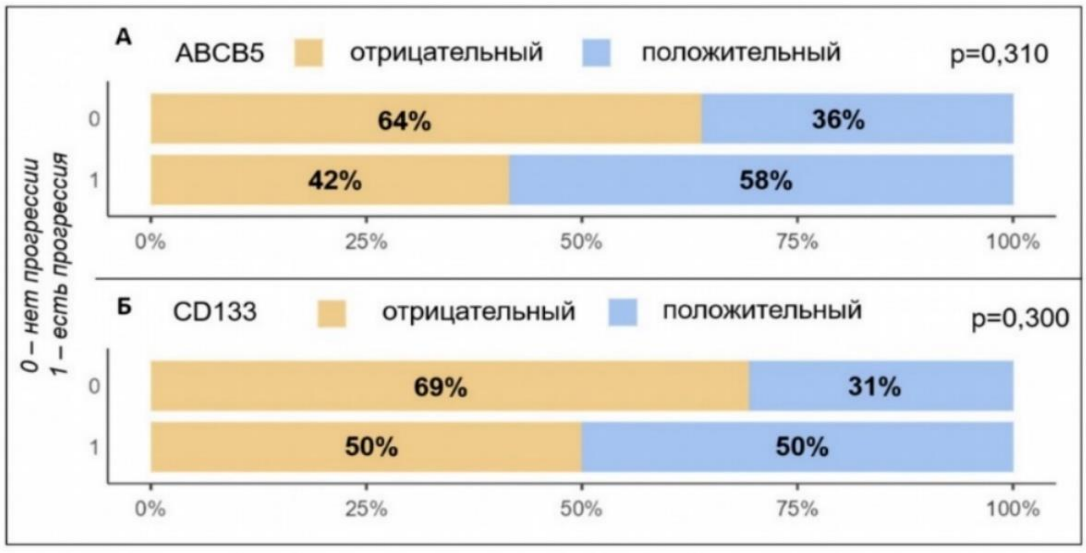


Рисунок 5 – Распространенность стволовых опухолевых клеток ABCB5 (А) и CD133 (Б) в зависимости от прогрессии меланомы кожи I–II стадий

Для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от наличия и отсутствия опухолевых стволовых клеток, экспрессирующих ABCB5 и CD133, был проведен анализ выживаемости и построены Таблицы 6 и 7 соответственно.

Таблица 6 – Безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск рецидива		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5				
3	28	0	0	100
6	28	0	0	100
12	28	0	0	100
18	25	3	11	89
24	25	3	11	89
36	24	4	14	86
48	24	4	14	86
60	22	5	18	82
Наличие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5				
3	20	0	0	100
6	17	2	10	90
12	15	4	21	79
18	13	5	26	74
24	11	6	32	68
36	9	7	39	61
48	9	7	39	61
60	8	7	39	61

Таблица 7 – Безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск рецидива		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133				
3	31	0	0	100
6	30	1	3	97
12	28	3	16	84
18	25	3	16	84
24	24	5	16	84
36	22	6	20	80
48	22	6	20	80
60	21	6	20	80
Наличие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133				
3	17	0	0	100
6	15	1	6	94
12	15	1	6	94
18	13	3	19	81
24	12	4	25	75
36	11	5	31	69
48	11	5	31	69
60	9	6	37	63

Согласно полученным данным, 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов без стволовых опухолевых клеток ABCB5 составила 100 %, 3-летняя – 86 %, 5-летняя – 82 %, что превышало аналогичные показатели для пациентов со стволовыми опухолевыми клетками ABCB5. 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с наличием стволовых опухолевых клеток ABCB5 составила 79 %, 3-летняя – 61 %, 5-летняя – 61 %.

Согласно полученным данным, 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов без стволовых опухолевых клеток CD133 составила 84 %, 3-летняя – 80 %, 5-летняя – 80 %. 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с наличием стволовых опухолевых клеток CD133 составила 94 %, что превышало аналогичный показатель в группе пациентов с отсутствием CD133, однако 3-летняя и 5-летняя выживаемость при наличии CD133 были ниже и составили 69 и 63 % соответственно.

На следующем этапе безрецидивная выживаемость пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия и распределения стволовых опухолевых клеток была представлена с помощью кривых Каплана – Майера (Рисунок 6).

В соответствии с проведенным анализом выживаемости, зависимость риска развития прогрессии от наличия ABCB5, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой при пограничном уровне значимости ($p = 0,086$) (Рисунок 6А). Средний срок возникновения прогрессии не менее чем у 50 % пациентов при отсутствии ABCB5 составил $53,5 \pm 2,9$ месяца, при наличии ABCB5 – $42,3 \pm 5,4$ месяца.

Зависимость риска развития прогрессии от интенсивности ABCB5, наличия CD133+ стволовых опухолевых клеток и их интенсивности, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой ($p = 0,166$, $p = 0,273$ и $p = 0,261$ соответственно) (Рисунок 6Б,В,Г соответственно). При оценке влияния наличия стволовых опухолевых клеток и их характеристик на риски прогрессии у пациентов с меланомой кожи I–II стадии с помощью метода регрессии Кокса были получены следующие однофакторные модели пропорциональных рисков, представленные в Таблице 8.

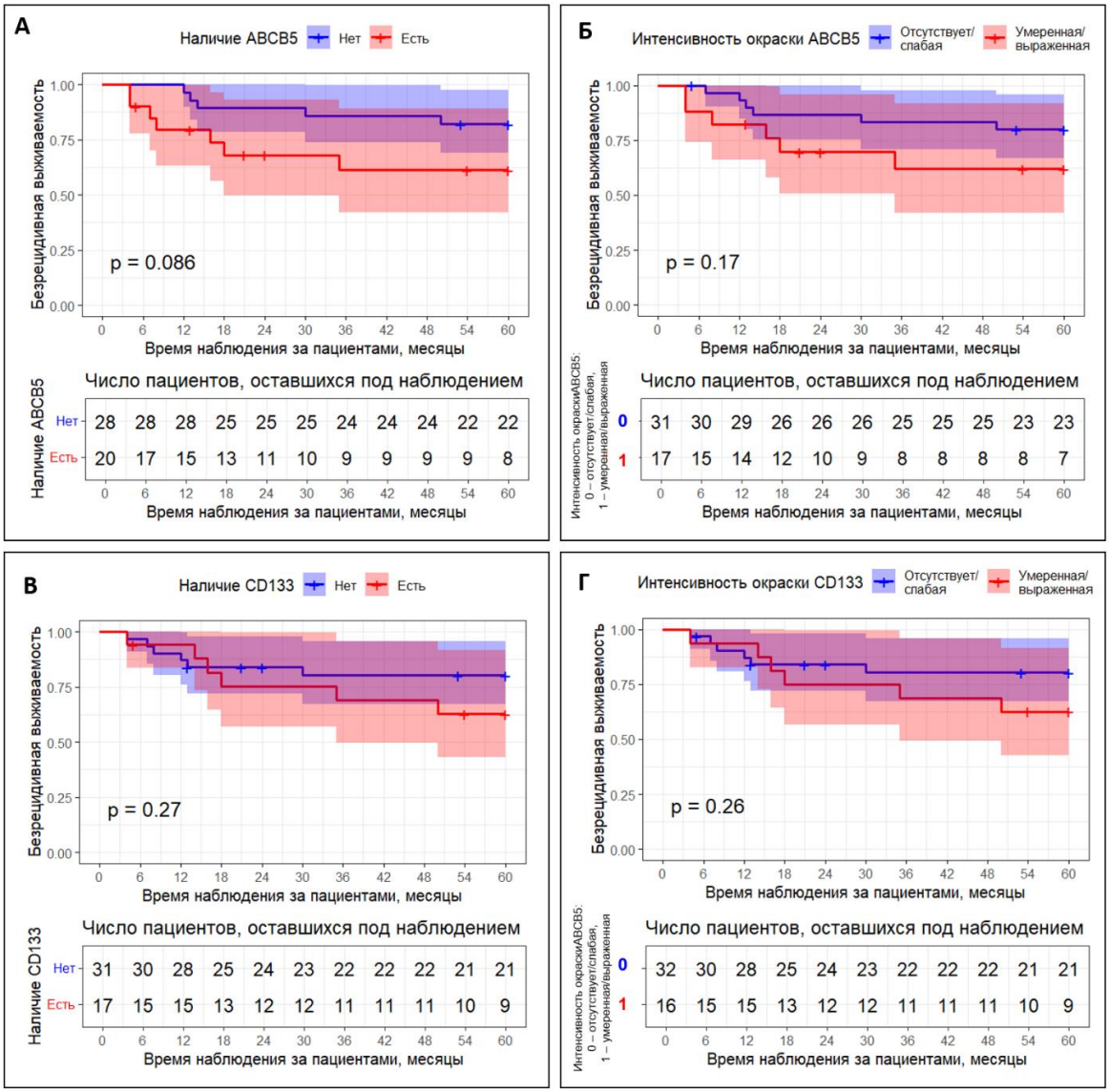


Рисунок 6 – Кривые Каплана – Майера для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток ABCB5 (А), интенсивности распределения стволовых опухолевых клеток ABCB5 (Б), наличия стволовых опухолевых клеток CD133 (В), интенсивности распределения стволовых опухолевых клеток CD133 (Г)

Таблица 8 – Однофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов прогрессии меланомы кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Возраст, лет	1,016 (0,992–1,040)	0,193
Наличие ABCB5	2,639 (0,833–8,359)	**0,099**
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	0,975 (0,947–1,004)	**0,096**

Продолжение таблицы 8

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,625 (0,056–6,973) 0,735 (0,080–6,712)	 – 0,703 0,785
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 2,187 (0,702–6,810)	 – 0,177
Наличие CD133	1,862 (0,600–5,776)	0,282
Процент клеток, экспрессирующих CD133	1,005 (0,975–1,036)	0,742
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+)	 Референс	 –
• Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	– –	0,973 0,971
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,891 (0,610–5,866)	 – 0,270

Из представленных моделей видно, что ни один из параметров не является значимым предиктором прогрессии меланомы кожи I–II стадий, однако такие факторы, как «наличие ABCB5» и «процент клеток, экспрессирующих ABCB5» обладали пограничным уровнем значимости (p = 0,099 и 0,096 соответственно), показывая, что наличие ABCB5 ассоциировано с более высокими рисками прогрессии.

Для данных однофакторных моделей был проведен подгрупповой анализ в группах с поверхностно-распространяющимися и узловыми формами меланомы кожи. Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Подгрупповой однофакторный регрессионный анализ Кокса для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов прогрессии поверхностно-распространяющейся и узловой меланомы кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Поверхностно-распространяющаяся форма		
Возраст, лет	0,992 (0,930–1,058)	0,811
Наличие ABCB5	4,337 (0,392–47,947)	0,231
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	1,012 (0,894–1,145)	0,854
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*):		

Продолжение таблицы 9

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
• Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	Референс – –	– 1,000 0,734
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 5,176 (0,468–57,261)	 – 0,180
Наличие CD133	3,858 (0,350–42,559)	0,270
Процент клеток, экспрессирующих CD133	0,962 (0,848–1,092)	0,550
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,350 (0,022–5,675) –	 – 0,460 –
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 3,858 (0,350–42,559)	 – 0,270
Узловая форма		
Возраст, лет	1,015 (0,990–1,041)	0,238
Наличие ABCB5	1,910 (0,505–7,225)	0,341
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	0,987 (0,958–1,015)	0,357
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,228 (0,017–3,012) 0,361 (0,026–4,977)	 – 0,262 0,447
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,310 (0,349–4,925)	 – 0,689
Наличие CD133	1,396 (0,373–5,226)	0,620
Процент клеток, экспрессирующих CD133	1,013 (0,981–1,046)	0,442
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,638 (0,088–4,620)	 – 0,657
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,396 (0,373–5,226)	 – 0,620

Из представленных однофакторных моделей видно, что ни один из параметров не является значимым предиктором прогрессии как поверхностно-распространяющейся, так и узловой меланомы кожи I–II стадии.

При построении многофакторных моделей (Таблица 10) статистически значимых параметров стволовых клеток, влияющих на риски прогрессии меланомы кожи, также выявлено не было. При этом введение в модели со стволовыми

клетками параметра «фаза роста меланомы» показало, что именно он является независимым фактором прогрессии опухоли I–II стадий с учетом наличия стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 (Модель 3, Таблица 10), а также с учетом с интенсивности их окраски (Модель 4, Таблица 10). Так, риски прогрессии уменьшались в 7,193 раза при поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) форме меланомы кожи и, соответственно, увеличивались на аналогичные показатели при узловой форме (вертикальная фаза роста), независимо от наличия стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 (Модель 3, Таблица 10).

Таблица 10 – Многофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов прогрессии меланомы кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Модель 1		0,244
Наличие ABCB5	2,422 (0,631–9,289)	0,197
Наличие CD133	1,179 (0,315–4,418)	0,807
Модель 2		0,356
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,850 (0,509–6,719)	 – 0,350
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,424 (0,393–5,154)	 – 0,509
Модель 3		0,002
Наличие ABCB5	2,278 (0,607–8,549)	0,222
Наличие CD133	1,216 (0,332–4,454)	0,768
Фаза роста • Вертикальная • Горизонтальная	 7,193 (1,926–26,856) Референс	 **0,003** –
Модель 4		0,003
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,642 (0,448–6,013)	 – 0,454
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,433 (0,393–5,222)	 – 0,586
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 7,064 (1,892–26,372) Референс	 **0,004** –

Риски прогрессии уменьшались в 7,064 раза при поверхностно-

распространяющейся (горизонтальная фаза роста) форме меланомы кожи и, соответственно, увеличивались на аналогичные показатели при узловой форме (вертикальная фаза роста), независимо от интенсивности окраски стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 (Модель 4, Таблица 10).

Для данных многофакторных Моделей 1 и 2 также был проведен подгрупповой анализ в группах с поверхностно-распространяющимися (горизонтальная фаза роста) и узловыми формами (вертикальная фаза роста) меланомы кожи. Результаты представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Подгрупповой многофакторный регрессионный анализ Кокса для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов прогрессии поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Поверхностно-распространяющаяся форма		
Модель 1		
Наличие ABCB5	2,793 (0,152–51,145)	0,489
Наличие CD133	2,144 (0,117–39,196)	0,607
Модель 2		
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 3,605 (0,233–55,880)	 – 0,359
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 2,072 (0,134–32,039)	 – 0,602
Узловая форма		
Модель 1		
Наличие ABCB5	1,840 (0,433–7,829)	0,409
Наличие CD133	1,098 (0,259–4,649)	0,899
Модель 2		
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,171 (0,237–5,033)	 – 0,832
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,307 (0,305–5,607)	 – 0,719

При построении многофакторных моделей в ходе подгруппового анализа (Таблица 11) статистически значимых параметров стволовых клеток, влияющих на риски прогрессии как поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза

роста), так и узловой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи также выявлено не было.

3.2.3 Прогностическая значимость стволовых опухолевых клеток в общей выживаемости пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий

Для оценки прогностической значимости стволовых опухолевых клеток в отношении общей выживаемости пациентов общей выборки на первом этапе было проведено сравнение характеристик стволовых опухолевых клеток среди пациентов с летальным исходом и без него. Общая смертность составила 29,2 % (21 из 72 пациентов). Пациенты с летальным исходом оказались значительно старше: медиана возраста составила 78 лет, в то время как для пациентов без летального исхода – 62 года ($p = 0,004$).

Поскольку распространенность и характер распределения опухолевых стволовых клеток были изучены только у 48 пациентов, то дальнейшая сравнительная характеристика выполнялась только с учетом этих пациентов. У пациентов с летальным исходом стволовые опухолевые клетки, экспрессирующие ABCB5, встречались чаще, чем у пациентов без летального исхода (61,5 и 34,3 % соответственно), однако различия оказались статистически незначимыми при пограничном уровне значимости ($p = 0,085$), что может быть связано с небольшим объемом пациентов в каждой из групп. Интенсивность окраски на ABCB5 в двух группах оказалась сопоставима.

Стволовые опухолевые клетки, экспрессирующие CD133 у пациентов с летальным исходом и без него, встречались с одинаковой частотой: 38,5 % и 34,3 % соответственно, $p = 1,000$. Интенсивность окраски также оказалась сопоставима. Дополнительно было показано, что летальный исход был более характерен для пациентов с узловыми формами (вертикальная фаза роста) меланомы.

Графическое представление распространенности стволовых опухолевых клеток в зависимости от летального исхода у пациентов с меланомой кожи I–II стадий показано на Рисунке 7.

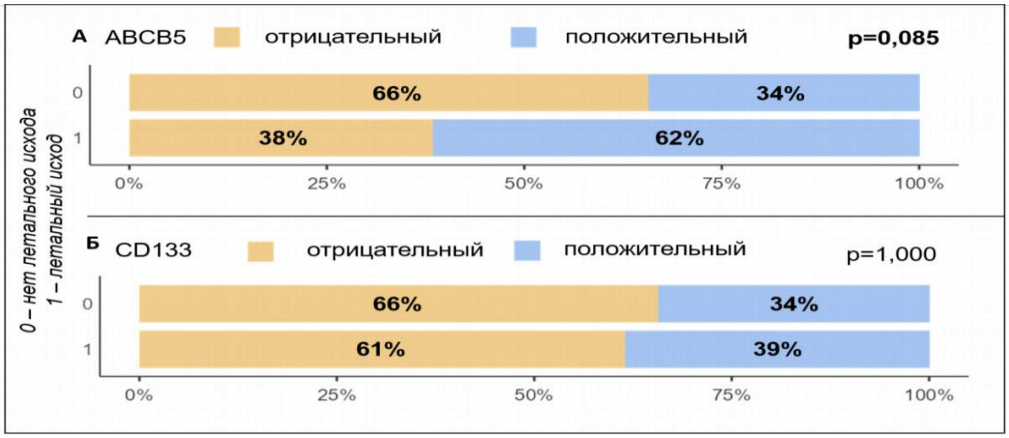


Рисунок 7 – Распространенность стволовых опухолевых клеток ABCB5 (А) и CD133 (Б) в зависимости от летального исхода у пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Подробная сравнительная характеристика исходов и параметров стволовых опухолевых клеток в общей выборке в зависимости от летального исхода пациентов с меланомой кожи I–II стадий представлена в Таблице 12.

Для оценки общей выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от наличия и отсутствия опухолевых стволовых клеток, экспрессирующих ABCB5 и CD133, был проведен анализ выживаемости и построены Таблицы 13 и 14 соответственно.

Таблица 12 – Сравнительная характеристика параметров стволовых опухолевых клеток в общей выборке пациентов с меланомой кожи I–II стадий в зависимости от летального исхода

Параметр	Нет смерти, n = 51	Есть смерть, n = 21	p
Фаза роста: • Вертикальная, % (n) • Горизонтальная, % (n)	 51,0 % (26) 49,0 % (25)	 76,2 % (16) 23,8 % (5)	**0,049***

Продолжение таблицы 12

Параметр	Нет смерти, *n* = 51	Есть смерть, *n* = 21	p
Наличие ABCB5, % (*n*)	34,3 % (12)	61,5 % (8)	**0,085****
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5, %, медиана (Q1–Q3)	90,0 (80,0–90,0)	80,0 (70,0–90,0)	0,415
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 8,3 % (1) 33,3 % (4) 58,3 % (7)	 25,0 % (2) 37,5 % (3) 37,5 % (3)	0,514*
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 68,6 % (24) 31,4 % (11)	 53,9 % (7) 46,2 % (6)	0,498**
Наличие CD133, % (*n*)	34,3 % (12)	38,5 % (5)	1,000***
Процент клеток, экспрессирующих CD133, %, медиана (Q1–Q3)	25,0 (20,0–40,0)	30,0 (10,0–50,0)	0,958
Интенсивность окраски CD133, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 0 % 58,3 % (7) 41,7 % (5)	 20,0 % (1) 40,0 % (2) 20,0 % (2)	0,269*

Примечание – *Критерий Хи-квадрат, **Хи-квадрат с поправкой Йейтса, ***Точный критерий Фишера.

Таблица 13– Общая выживаемость пациентов в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск летального исхода		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5				
3	28	0	0	100
6	28	0	0	100
12	28	0	0	100
18	25	2	7	93
24	25	2	7	93
36	24	3	11	89
48	24	3	11	89
60	22	5	18	82
Наличие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих ABCB5				
3	20	0	0	100
6	17	1	5	95
12	15	3	16	84
18	13	5	28	72
24	11	7	39	61
36	9	8	44	56
48	9	8	44	56
60	8	8	44	56

Таблица 14 – Общая выживаемость пациентов в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск летального исхода		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133				
3	31	0	0	100
6	30	0	0	100
12	28	2	7	93
18	25	4	13	87
24	24	5	17	83
36	22	7	24	76
48	22	7	24	76
60	21	8	27	73
Наличие стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих CD133				
3	17	0	0	100
6	15	1	6	94
12	15	1	6	94
18	13	3	19	81
24	12	4	25	75
36	11	4	25	75
48	11	4	25	75
60	9	5	32	68

Согласно полученным данным, 1-летняя общая выживаемость пациентов без стволовых опухолевых клеток ABCB5 составила 100 %, 3-летняя – 89 %, 5-летняя – 82 %, что превышало аналогичные показатели для пациентов со стволовыми опухолевыми клетками ABCB5. 1-летняя общая выживаемость пациентов с наличием стволовых опухолевых клеток ABCB5 составила 84 %, 3-летняя – 56 %, 5-летняя – 56 %.

Согласно полученным данным, 1-летняя общая выживаемость пациентов без стволовых опухолевых клеток CD133 составила 93 %, 3-летняя – 76 %, 5-летняя – 73 %. 1-летняя общая выживаемость пациентов с наличием стволовых опухолевых клеток CD133 составила 94 %, что превышало аналогичный показатель в группе пациентов с отсутствием CD133 на 1 %, однако 3-летняя и 5-летняя выживаемость при наличии CD133 были несколько ниже и составили 75 и 68 % соответственно.

На следующем этапе общая выживаемость пациентов с меланомой кожи

I–II стадии в зависимости от наличия и распределения стволовых опухолевых клеток была представлена с помощью кривых Каплана – Майера (Рисунок 8).

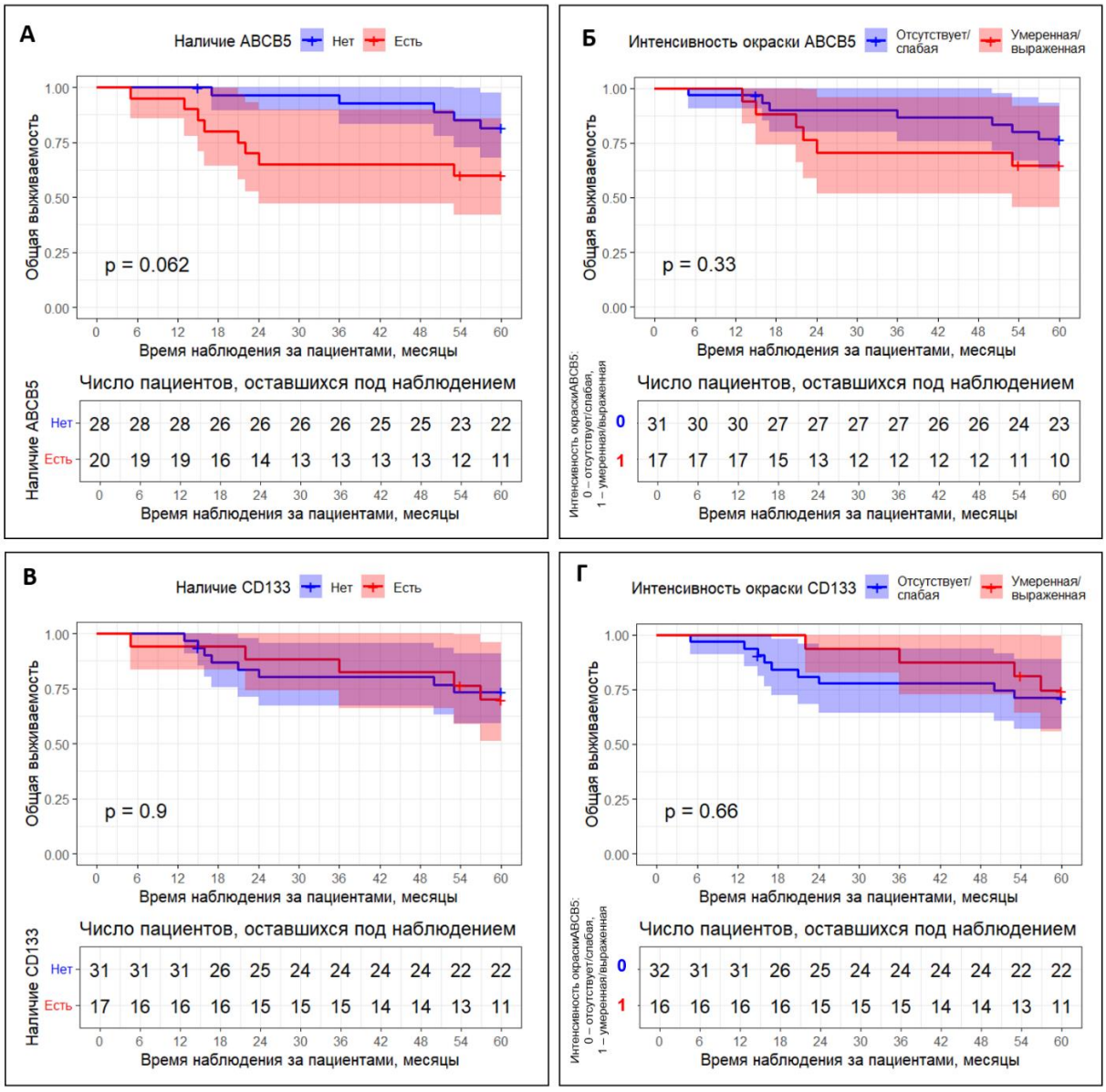


Рисунок 8 – Кривые Каплана – Майера для оценки общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий в зависимости от наличия стволовых опухолевых клеток ABCB5 (А), интенсивности распределения стволовых опухолевых клеток ABCB5 (Б), наличия стволовых опухолевых клеток CD133 (В), интенсивности распределения стволовых опухолевых клеток CD133 (Г)

В соответствии с проведенным анализом выживаемости зависимость риска летального исхода от наличия ABCB5, оцененная с помощью лог-ранк критерия

Мантеля – Кокса, была статистически незначимой при пограничном уровне значимости (p = 0,062) (Рисунок 8А). Средний срок до летального исхода не менее чем у 50 % пациентов при отсутствии ABCB5 составил 56,8 ± 1,8 месяца, при наличии ABCB5 – 44,5 ± 4,7 месяца.

Зависимость риска летального исхода от интенсивности экспрессии ABCB5, наличия CD133+ стволовых опухолевых клеток и интенсивности экспрессии CD133+, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой (p = 0,329, p = 0,902 и p = 0,658 соответственно) (Рисунок 8Б,В,Г).

При оценке влияния наличия стволовых опухолевых клеток и их характеристик на риски летального исхода у пациентов с меланомой кожи I–II стадий с помощью метода регрессии Кокса были получены следующие однофакторные модели пропорциональных рисков, представленные в Таблице 15.

Таблица 15 – Однофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Возраст, лет	1,040 (1,011–1,071)	**0,007**
Наличие ABCB5	2,771 (0,905–8,484)	**0,074**
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	0,988 (0,959–1,018)	0,423
Интенсивность окраски ABCB5: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,423 (0,070–2,562) 0,244 (0,040–1,486)	 – 0,349 0,126
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,710 (0,574–5,094)	 – 0,335
Наличие CD133	1,072 (0,351–3,280)	0,903
Процент клеток, экспрессирующих CD133	1,000 (0,964–1,037)	0,989
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс – –	 – 1,000 1,000

Из представленных моделей видно, что только возраст является значимым предиктором общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий: при увеличении возраста на 1 год риски летального исхода увеличиваются в 1,040 раза, или на 4 % (p = 0,007). При этом параметр «наличие ABCB5» обладал пограничным уровнем значимости (p = 0,074), указывая тем самым, что наличие ABCB5 ассоциировано с более высокими рисками летального исхода. Для данных однофакторных моделей был проведен подгрупповой анализ в группах с поверхностно-распространяющимися (горизонтальная фаза роста) и узловыми формами (вертикальная фаза роста) меланомы кожи. Результаты представлены в Таблице 16.

Таблица 16 – Подгрупповой однофакторный регрессионный анализ Кокса параметров стволовых опухолевых клеток как предикторов общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Поверхностно-распространяющаяся форма		
Возраст, лет	1,018 (0,967–1,072)	0,497
Наличие ABCB5	3,093 (0,515–18,563)	0,217
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	1,001 (0,912–1,100)	0,980
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+)	 Референс –	 – 0,983
• Выраженная (3+)	0,384 (0,034–4,344)	0,440
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,675 (0,279–10,042)	 – 0,572
Наличие CD133	1,240 (0,207–7,427)	0,814
Процент клеток, экспрессирующих CD133	0,902 (0,757–1,047)	0,247
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс – –	 – 0,922 0,944
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 0,479 (0,054–4,285)	 – 0,510
Узловая форма		
Возраст, лет	1,045 (1,010–1,082)	**0,012**

Продолжение таблицы 16

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Наличие ABCB5	2,044 (0,487–8,575)	0,328
Процент клеток, экспрессирующих ABCB5	0,992 (0,961–1,024)	0,609
Интенсивность окраски ABCB5, % (*n*): • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,406 (0,035–4,731) 0,137 (0,007–2,780)	 – 0,472 0,196
Интенсивность окраски ABCB5:		
• Отсутствует/слабая	Референс	–
• Умеренная/выраженная	1,342 (0,335–5,373)	0,678
Наличие CD133	0,839 (0,199–3,540)	0,812
Процент клеток, экспрессирующих CD133	1,016 (0,976–1,057)	0,443
Интенсивность окраски CD133: • Слабая (1+) • Умеренная (2+) • Выраженная (3+)	 Референс 0,237 (0.021–2,674)	 – 0,237
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 0,839 (0,199–3,540)	 – 0,812

Из представленных однофакторных моделей видно, что ни один из параметров не является значимым предиктором общей выживаемости пациентов с поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий. У пациентов с узловыми формами (вертикальная фаза роста) меланомы только возраст является значимым предиктором общей выживаемости: при увеличении возраста на 1 год риски летального исхода увеличиваются в 1,045 раза, или на 4 % (p = 0,012).

При построении многофакторных моделей (Таблица 17) было показано, что наличие стволовых опухолевых клеток ABCB5 является независимым предиктором общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий. Так, риски летального исхода при наличии стволовых опухолевых клеток ABCB5 увеличиваются в 3,719 раза (p = 0,041), независимо от наличия стволовых опухолевых клеток CD133. При этом введение в модели со стволовыми клетками параметра «фаза роста меланомы» показало, что именно данный параметр является независимым прогностическим фактором летального исхода опухоли I–II стадии с

учетом интенсивности окраски стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 (Модель 4, Таблица 17): риски летального исхода уменьшались в 3,168 раза при поверхностно-распространяющейся форме меланомы кожи (горизонтальная фаза роста) и, соответственно, увеличивались на аналогичные показатели при узловой форме (вертикальная фаза роста), независимо от интенсивности окраски стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 (Модель 4, Таблица 17). Гистологический тип меланомы кожи в модели с наличием стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133 обладал пограничным уровнем значимости, наряду с наличием стволовых опухолевых клеток ABCB5, указывая, что риски летального исхода имеют тенденцию быть выше при наличии стволовых опухолевых клеток ABCB5 и узловой формы меланомы кожи, независимо от наличия стволовых опухолевых клеток CD133 (Модель 3, Таблица 17).

Таблица 17 – Многофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для параметров стволовых опухолевых клеток как потенциальных предикторов общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Модель 1		0,110
Наличие ABCB5	3,719 (1,056–13,106)	**0,041**
Наличие CD133	0,550 (0,156–1,935)	0,351
Модель 2		0,373
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 2,304 (0,681–7,799)	 – 0,180
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 0,515 (0,138–1,921)	 – 0,323
Модель 3		0,037
Наличие ABCB5	3,102 (0,881–10,924)	**0,078**
Наличие CD133	0,572 (0,164–1,994)	0,381
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 2,930 (0,942–9,113) Референс	 **0,063** –
Модель 4		0,091

Продолжение таблицы 17

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,910 (0,559–6,527)	 – 0,302
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 9,512 (0,137–1,907)	 – 0,318
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 3,168 (1,017–9,868) Референс	 **0,047** –

При построении многофакторных моделей в ходе подгруппового анализа (Таблица 18) статистически значимых параметров стволовых клеток, влияющих на риски летального исхода у пациентов как с поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста), так и с узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы кожи также выявлено не было.

Таблица 18 – Подгрупповой многофакторный регрессионный анализ Кокса для стволовых опухолевых клеток как предикторов общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Поверхностно-распространяющаяся форма		
Модель 1		
Наличие ABCB5	4,356 (0,540–35,250)	0,167
Наличие CD133	0,536 (0,067–4,319)	0,558
Модель 2		
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 2,889 (0,405–20,629)	 – 0,290
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 0,284 (0,026–3,138)	 – 0,304
Узловая форма		
Модель 1		
Наличие ABCB5	2,579 (0,543–12,244)	0,233
Наличие CD133	0,564 (0,117–2,707)	0,474
Модель 2		

Продолжение таблицы 18

Параметр	ОР (95 % ДИ)	p
Интенсивность окраски ABCB5: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 1,598 (0,339–7,530)	 – 0,553
Интенсивность окраски CD133: • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 Референс 0,675 (0,135–3,374)	 – 0,632

3.3 Экспрессия белка ALK и транслокация его гена в опухолевых клетках поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) и узловых (вертикальная фаза роста) формах меланомы кожи I–II стадий

48 пациентам выполнялся анализ экспрессии ALK, а также определялось наличие транслокации его гена (Таблица 19).

Таблица 19 – Экспрессия ALK в зависимости от гистологического типа меланомы кожи

Экспрессия	Узловая форма	Поверхностно-распространяющаяся форма	Всего
Нет ALK	14 (77,8 %)	27 (90 %)	41 (85,4 %)
Есть ALK	4 (22,2 %)	3 (10 %)	7 (14,6 %)
Всего	18 (100 %)	30 (100 %)	48 (100 %)

Различия в распространенности гиперэкспрессии ALK в зависимости от гистологического типа меланомы кожи I–II стадий оказались статистически незначимыми ($p = 0,245$).

Графическое представление полученных для распространенности ALK данных в зависимости от гистологического типа меланомы кожи I–II стадий представлено на Рисунке 9.

В ходе сравнения исходов у пациентов общей выборки с наличием и отсутствием ALK (Рисунок 10) было установлено, что при наличии ALK прогрессия возникала у 57,1 % пациентов (4 человека), в то время как при отсутствии – у 19,5 % пациентов (8 человек), различия оказались статистически значимыми ($p = 0,034$).

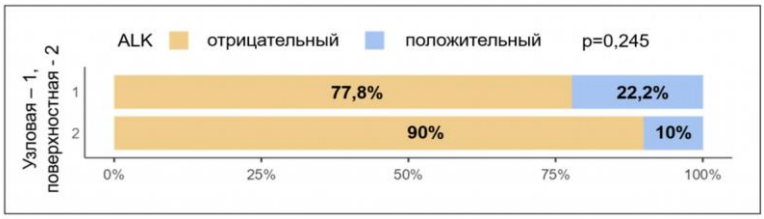


Рисунок 9 – Распространенность ALK в узловых (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) формах меланомы кожи I–II стадий

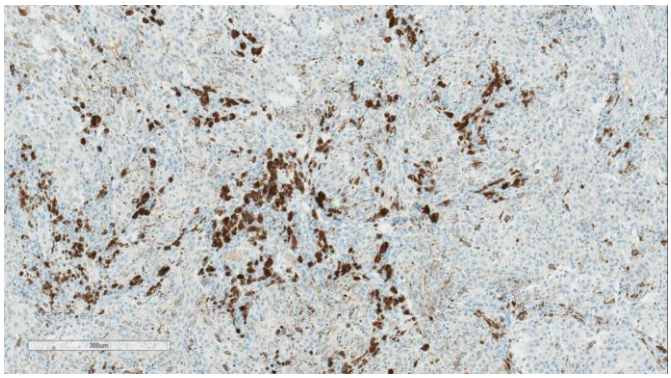


Рисунок 10 – ALK с выраженной очаговой ядерно-цитоплазматической положительной реакцией в клетках опухоли и клетках иммунного окружения, ×100

При этом время до прогрессии было сопоставимо (p = 0,307). Общая смертность у пациентов с ALK была выше, чем у пациентов без ALK (42,9 % и 24,4 % соответственно), однако различия были статистически незначимыми. Подробная сравнительная характеристика представлена в Таблице 20.

Таблица 20 – Сравнительная характеристика исходов меланомы кожи I–II стадий в зависимости от наличия и отсутствия ALK

Параметр	Нет ALK, *n* = 41	Есть ALK, *n* = 7	p
Возраст, лет, медиана (Q1–Q3)	64,0 (42,0–74,9)	68,0 (53,5–70,5)	0,977
Прогрессия, % (*n*)	19,5 % (8)	57,1 % (4)	**0,034***
Время до прогрессии, месяцы, Me (Q1–Q3)	15,5 (11,0–31,3)	10,5 (6,3–14,5)	0,307
Общая смертность, % (*n*)	24,4 % (10)	42,9 % (3)	0,310
Время до летального исхода, месяцы, Me (Q1–Q3)	21,5 (15,5–43,5)	36,0 (26,0–44,5)	0,612

Примечание –*Критерий Хи-квадрат.

Графическое изображение полученных данных показано на Рисунке 11.

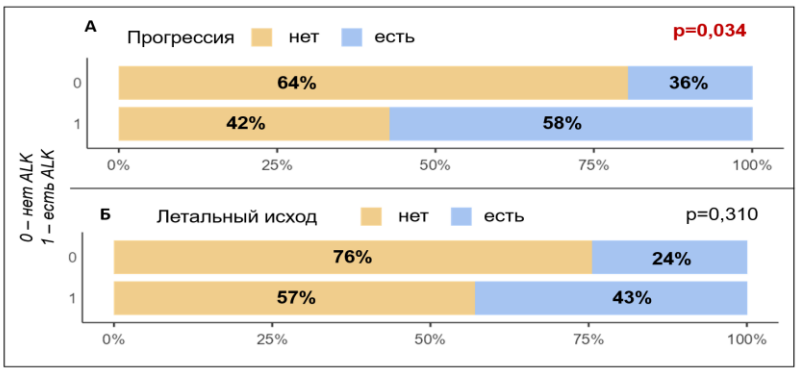


Рисунок 11 – Частота прогрессии (А) и летального исхода (Б) у пациентов с меланомой кожи I–II стадий в зависимости от наличия ALK

3.3.1 Прогностическая значимость ALK в прогрессии узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий

Для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от наличия и отсутствия ALK был проведен анализ выживаемости и построена Таблица 21.

Таблица 21 – Безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от экспрессии ALK

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск рецидива		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие экспрессии ALK				
3	41	0	0	100
6	39	1	2	98
12	38	2	5	95
18	35	4	10	90
24	33	5	13	87
36	30	7	18	82
48	30	7	18	82
60	27	8	21	79
Наличие экспрессии ALK				
3	7	0	0	100

Продолжение таблицы 21

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск рецидива		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
6	6	1	14	86
12	5	2	29	71
18	3	4	57	43
24	3	4	57	43
36	3	4	57	43
48	3	4	57	43
60	3	4	57	43

Согласно полученным данным, 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с меланомой кожи I–II стадии без экспрессии ALK составила 95 %, 3-летняя – 82 %, 5-летняя – 79 %. 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с наличием ALK составила 71 %, 3-летняя и 5-летняя – 43 и 43 %, что было значительно ниже, чем для пациентов без ALK, однако выборка пациентов в группе с наличием ALK оказалась крайне мала и составила 7 человек.

На следующем этапе безрецидивная выживаемость пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии ALK была представлена с помощью кривых Каплана – Майера (Рисунок 12).

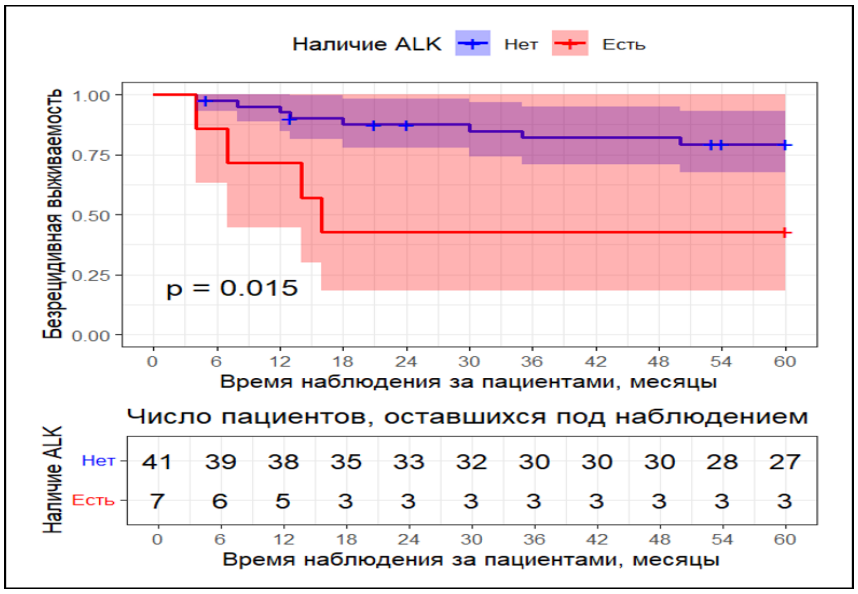


Рисунок 12 – Кривые Каплана – Майера для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии ALK

В соответствии с проведенным анализом выживаемости зависимость риска развития прогрессии от наличия ALK, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически значимой (p = 0,015). Безрецидивная выживаемость пациентов с наличием ALK была ниже (Рисунок 12). Средний срок возникновения прогрессии не менее чем у 50 % пациентов при отсутствии ALK составил 52,1 ± 2,7 месяца, при наличии ALK – 31,6 ± 9,4 месяца.

При оценке влияния наличия ALK на риски прогрессии меланомы кожи I–II стадий с помощью метода регрессии Кокса была получена модель пропорциональных рисков. В соответствии с проведенным анализом показано, что наличие ALK повышает риски прогрессии меланомы кожи I–II стадий в 4,004 раза (p = 0,024).

Для данной модели подгрупповой регрессионный анализ Кокса отдельно в группах с поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы не проводился в связи с небольшим количеством пациентов с экспрессией белка ALK в каждой из групп (3 и 4 человека соответственно).

Для оценки независимого влияния наличия ALK на риски прогрессии меланомы кожи I–II стадий с помощью метода регрессии Кокса была построена многофакторная модель, учитывающая гистологический тип меланомы кожи (Таблица 22).

Таблица 22 – Многофакторная модель пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для оценки потенциальных предикторов прогрессии меланомы кожи I–II стадий

Параметр	Отношение рисков	95 % ДИ	p
Наличие ALK	4,288	1,200 –15,323	**0,025**
Гистологический тип меланомы: • Узловая • Поверхностно-распространяющаяся	 7,705 Референс	 2,019–29,400 –	 **0,003** **–**

В соответствии с проведенным анализом наличие ALK и гистологический

тип меланомы I–II стадии оказались независимыми предикторами прогрессии заболевания. Так, риски прогрессии увеличиваются в 4,288 раза при наличии ALK, независимо от гистологического типа и увеличиваются в 7,705 раза при наличии узловой формы, независимо от ALK.

3.3.2 Прогностическая значимость ALK в общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Для оценки общей выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от наличия и отсутствия ALK был проведен анализ выживаемости и построена Таблица 23.

Таблица 23 – Общая выживаемость пациентов в зависимости от экспрессии ALK

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск летального исхода		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствие экспрессии ALK				
3	41	0	0	100
6	40	1	2	98
12	40	1	2	98
18	36	4	10	90
24	34	6	15	85
36	33	7	17	83
48	33	7	17	83
60	29	10	25	75
Наличие экспрессии ALK				
3	7	0	0	100
6	7	0	0	100
12	7	0	0	100
18	6	1	14	86
24	6	1	14	86
36	6	1	14	86
48	5	2	29	71
60	4	3	43	57

Согласно полученным данным, 1-летняя общая выживаемость пациентов с меланомой кожи I–II стадий без экспрессии ALK составила 98 %, 3-летняя – 83 %, 5-летняя – 75 %. 1-летняя общая выживаемость пациентов с наличием ALK

составила 100 %, что практически соответствовало группе пациентов с отсутствием ALK. 3-летняя и 5-летняя общая выживаемость при наличии ALK составили 86 и 57 %, однако выборка пациентов в группе с наличием ALK оказалась крайне мала и составила 7 человек.

На следующем этапе общая выживаемость пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии ALK была представлена с помощью кривых Каплана – Майера (Рисунок 13). В соответствии с проведенным анализом выживаемости зависимость риска развития прогрессии от наличия ALK, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой (p = 0,364) (Рисунок 13).

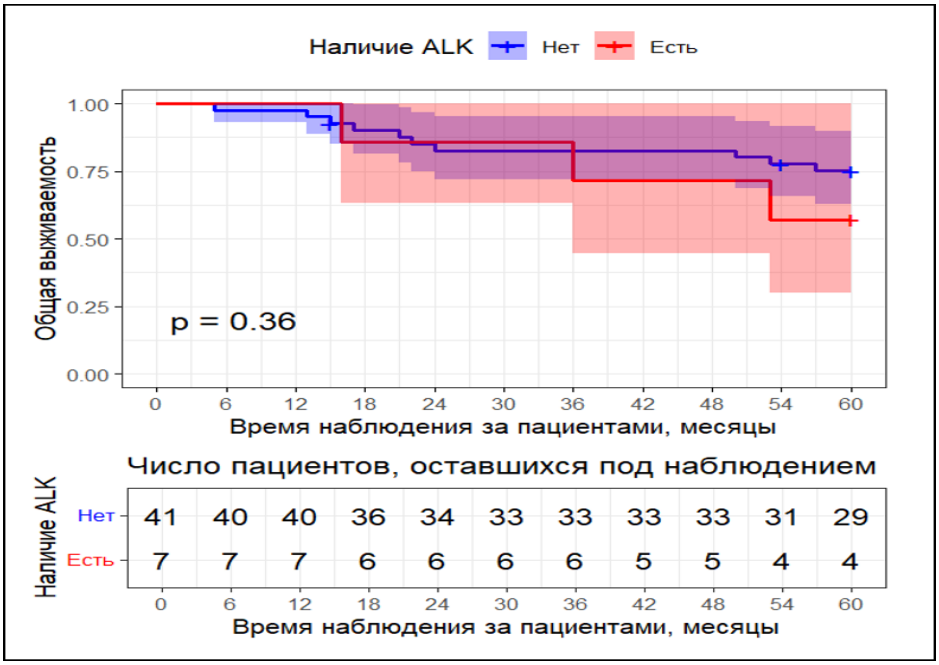


Рисунок 13 – Кривые Каплана – Майера для оценки общей выживаемости пациентов при меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии ALK

Средний срок возникновения летального исхода не менее чем у 50 % пациентов при отсутствии ALK составил 52,0 ± 2,6 месяца, при наличии ALK – 49,3 ± 6,0 месяцев. При оценке влияния наличия ALK на риски общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадии с помощью метода регрессии Кокса была получена модель пропорциональных рисков. В соответствии с проведенным

анализом показано, что наличие ALK не влияет на риски летального исхода от меланомы кожи I–II стадий (p = 0,372).

В соответствии с проведенным анализом показано, что наличие ALK повышает риски летального исхода меланомы кожи I–II стадий в 1,8 раза (p = 0,372).

Для оценки независимого влияния наличия ALK на риски летального исхода пациентов с меланомой кожи I–II стадий с помощью метода регрессии Кокса была построена многофакторная модель, учитывающая гистологический тип меланомы (Таблица 24).

Таблица 24 – Многофакторная модель пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для оценки потенциальных предикторов общей выживаемости пациентов с меланомой кожи I–II стадий

Параметр	Отношение рисков	95 % ДИ	*p*
Наличие ALK	1,449	0,392–5,358	0,578
Фаза роста меланомы: • Вертикальная • Горизонтальная	 3,195 Референс	 1,029–9,918 –	 **0,044** **–**

В ходе многофакторного регрессионного анализа Кокса было показано, что только фаза роста меланомы кожи являлся фактором риска летального исхода: узловая меланома (вертикальная фаза роста) кожи I–II стадий увеличивала риски летального исхода пациентов в 3,195 раза, в то время как наличие ALK не оказывало влияния на общую выживаемость.

3.4 Наличие, выраженность и прогностическая значимость воспалительной макрофагальной инфильтрации в микроокружении первичной опухоли при узловой форме меланомы кожи I–II стадий

В качестве маркера инфильтрации макрофагами нами изучалась экспрессия маркера CD163, а также ее выраженность в микроокружении первичной опухоли

при узловой форме (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий у 24 пациентов. Графическое представление полученных данных показано на Рисунке 14.

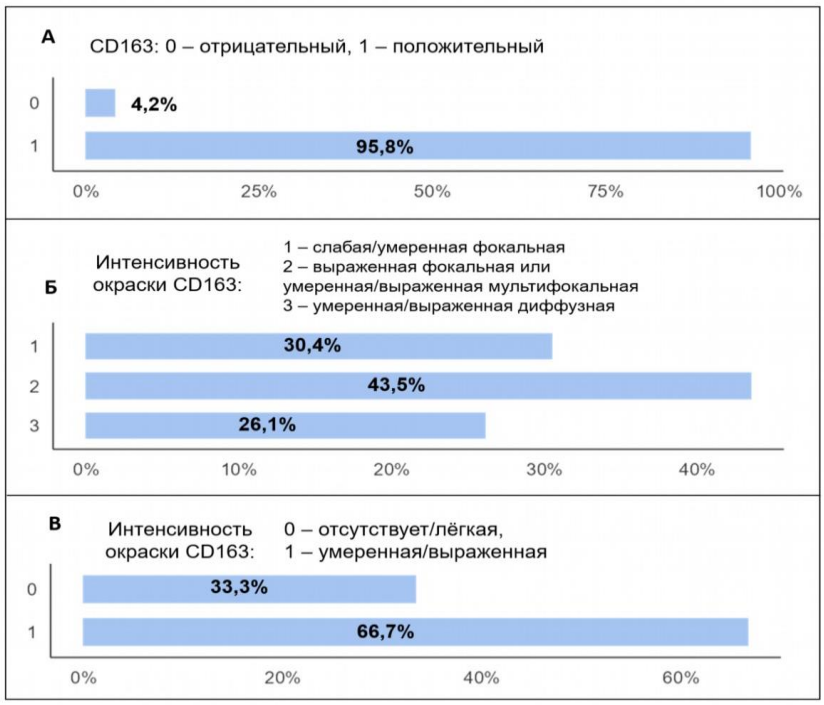


Рисунок 14 – Наличие (А) и выраженность (Б и В) экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163 в микроокружении первичной опухоли при узловой форме (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий

3.4.1 Прогностическая роль наличия и выраженности воспалительной макрофагальной инфильтрации в безрецидивной выживаемости пациентов с узловой меланомой кожи I–II стадий

Из 24 пациентов с узловой формой меланомы кожи I–II стадий с известным CD163-статусом у 12 пациентов (50 %) в течение 5 лет наблюдения отмечалась прогрессия заболевания. Интенсивность окраски CD163 у пациентов с прогрессией меланомы и без нее оказалась сопоставима. Подробная сравнительная характеристика представлена в Таблице 25. Графическое представление полученных данных показано на Рисунке 15.

Таблица 25 – Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от CD163 с прогрессией меланомы кожи I–II стадий и без нее

Параметр	Нет прогрессии n = 12	Есть прогрессия n = 12	p
Наличие CD163, % (n)	91,7 % (11)	100 % (12)	1,000***
Интенсивность окраски CD163, % (n): • Слабая/умеренная фокальная • Выраженная фокальная или умеренная/выраженная мультифокальная • Умеренная/выраженная диффузная	 36,4 % (4) 34,4 % (4) 27,3 % (3)	 25,0 % (3) 50,0 % (6) 25,0 % (3)	0,779*
Интенсивность окраски CD163, % (n): • Отсутствует/слабая • Умеренная/выраженная	 41,7 % (5) 58,3 % (7)	 25,0 % (3) 75,0 % (9)	0,667***

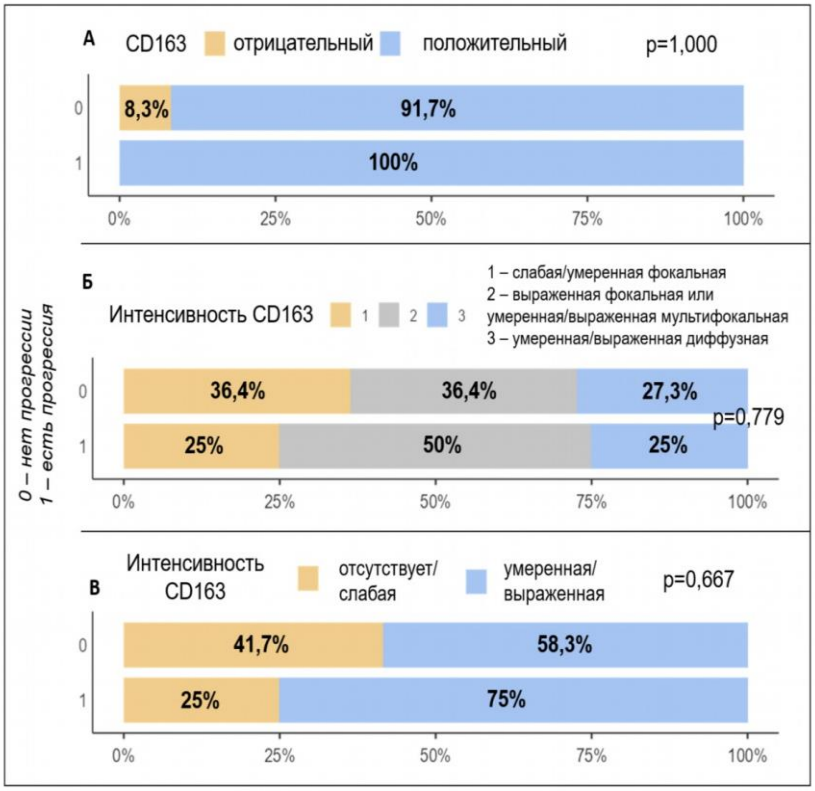


Рисунок 15 – Наличие (А) и выраженность (Б и В) экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163 в микроокружении первичной опухоли при узловой форме (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий в зависимости от прогрессии заболевания

Для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при узловой меланоме

кожи (вертикальная фаза роста) I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от выраженности экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163 в микроокружении первичной опухоли был проведен анализ выживаемости (Таблица 26).

Таблица 26 – Безрецидивная выживаемость пациентов с узловой меланомой кожи I–II стадий в зависимости от выраженности экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск рецидива		Безрецидивная выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствует/слабая интенсивность CD163				
3	8	0	0	100
6	8	0	0	100
12	7	1	12	88
18	6	2	25	75
24	6	2	25	75
36	2	3	40	60
48	1	3	40	60
60	1	3	40	60
Умеренная/выраженная интенсивность CD163				
3	15	1	6	94
6	14	2	12	88
12	9	6	38	62
18	8	7	45	55
24	6	8	52	48
36	3	9	61	39
48	3	9	61	39
60	2	9	61	39

Согласно полученным данным при представлении интенсивности окраски CD163 в виде бинарной величины, 1-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с узловой формой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий с отсутствием/слабой интенсивностью окраски CD163 составила 88 %, 3-летняя – 60 %, 5-летняя – 60 %. 1-летняя, 3-летняя и 5-летняя безрецидивная выживаемость при умеренной/выраженной интенсивности окраски CD163 составили 62 %, 39 % и 39 % соответственно, однако выборка пациентов в каждой из групп оказалась крайне мала.

На следующем этапе безрецидивная выживаемость пациентов при узловой меланоме кожи I–II стадий в зависимости от экспрессии CD163 и интенсивности ее окраски была представлена с помощью кривых Каплана – Майера (Рисунок 16).

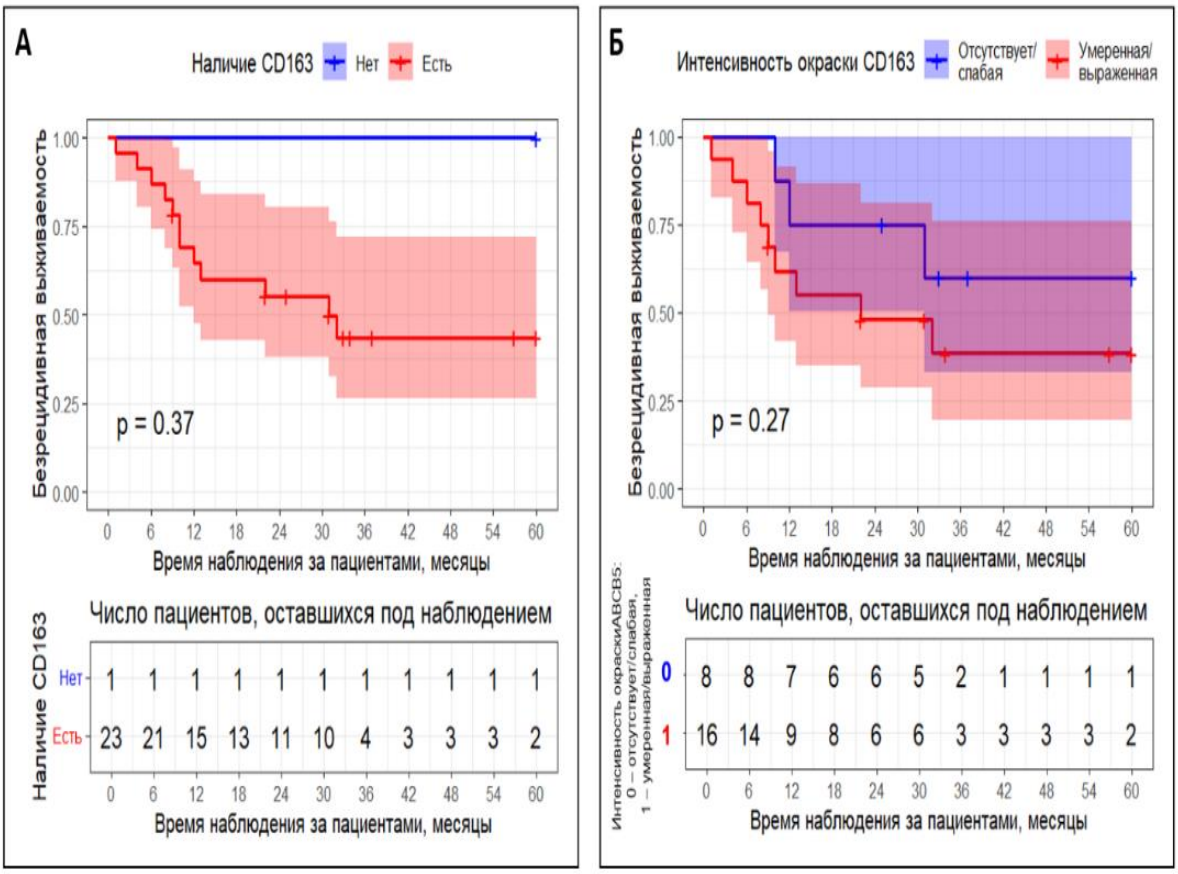


Рисунок 16 – Кривые Каплана – Майера для оценки безрецидивной выживаемости пациентов при узловой меланоме кожи (вертикальная фаза роста) I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии CD163 (А) и интенсивности его окраски (Б)

В соответствии с проведенным анализом выживаемости зависимость риска развития прогрессии от наличия CD163 и выраженности его экспрессии, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой (p = 0,370 и p = 0,265 соответственно) (Рисунок 16А,Б).

При оценке влияния наличия CD163 на риски прогрессии у пациентов с узловой меланомой кожи I–II стадий с помощью метода регрессии Кокса были получены следующие модели пропорциональных рисков, представленные в Таблице 27.

Таблица 27 – Однофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для интенсивности окраски на CD163 как потенциального предиктора прогрессии у пациентов с узловой меланомой кожи (вертикальная фаза роста) I–II стадий

Параметр	Отношение рисков	95 % ДИ	p
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			
• Слабая/умеренная фокальная	Референс	–	–
• Выраженная фокальная или умеренная/выраженная мультифокальная	1,841	0,459–7,387	0,389
• Умеренная/выраженная диффузная	1,592	0,318–7,973	0,572
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			
• Отсутствует/слабая	Референс	–	–
• Умеренная/выраженная	2,065	0,557–7,653	0,278

В соответствие с проведенным анализом показано, что интенсивность окраски на CD163 не влияет на риски прогрессии узловой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий.

3.4.2 Прогностическая роль наличия и выраженности воспалительной макрофагальной инфильтрации в общей выживаемости пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий

Из 24 пациентов с узловой формой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий с известным CD163-статусом у 8 пациентов (33,3 %) в течение 5 лет наблюдения был зафиксирован летальный исход. Интенсивность окраски CD163 у пациентов с летальным исходом и без него оказалась сопоставима. Сравнительная характеристика представлена в Таблице 28.

Таблица 28 – Сравнительная характеристика пациентов с меланомой кожи I–II стадий в зависимости от CD163 и от летального исхода

Параметр	Нет летального исхода, *n* = 16	Есть летальный исход, *n* = 8	p
Наличие CD163, % (*n*)	93,8 % (15)	100 % (8)	1,000***

Продолжение таблицы 28

Параметр	Нет летального исхода, *n* = 16	Есть летальный исход, *n* = 8	p
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			0,363*
• Слабая/умеренная фокальная	40,0 % (6)	12,5 % (1)	
• Выраженная фокальная или умеренная/выраженная мультифокальная	40,0 % (6)	50,0 % (4)	
• Умеренная/выраженная диффузная	20,0 % (3)	37,5 % (3)	
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			0,189***
• Отсутствует/слабая	43,8 % (7)	12,5 % (1)	
• Умеренная/выраженная	56,3 % (9)	87,5 % (7)	

Графическое представление полученных данных показано на Рисунке 17.

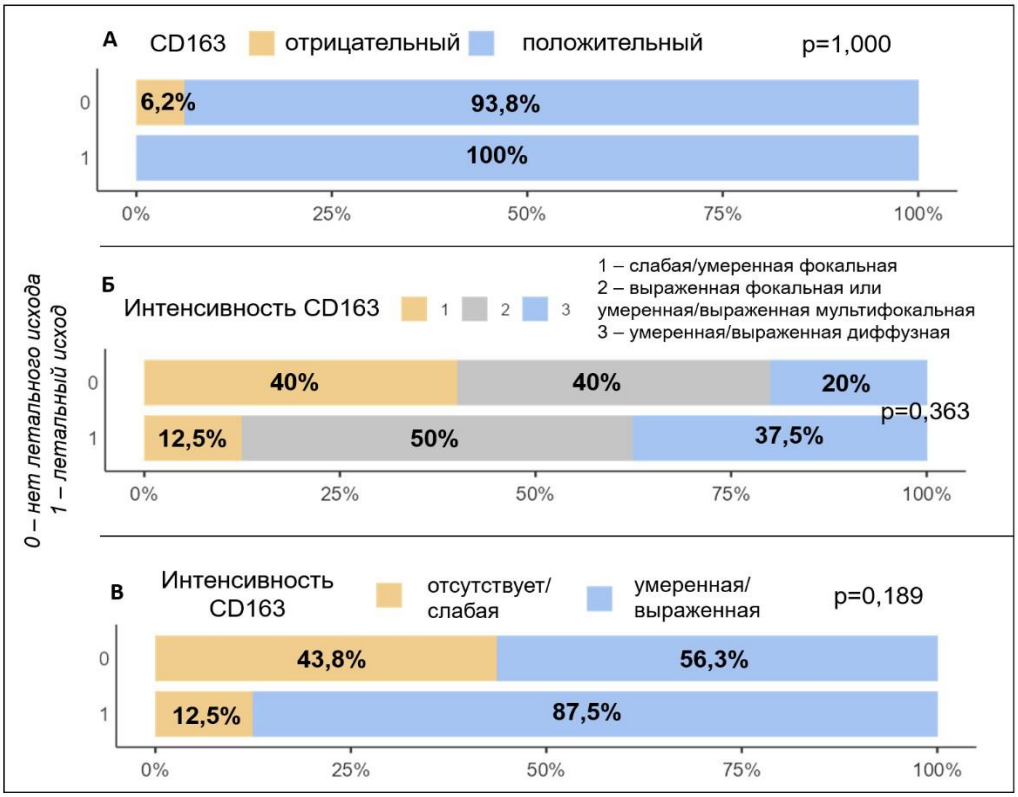


Рисунок 17 – Наличие (А) и выраженность (Б и В) экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163 в микроокружении первичной опухоли при узловой форме (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий в зависимости от летального исхода (общая выживаемость)

Для оценки общей выживаемости пациентов при узловой (вертикальная фаза роста) меланоме кожи I–II стадий при различных сроках наблюдения в зависимости от выраженности экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163 в микроокружении первичной опухоли был проведен анализ выживаемости и построена Таблица 29, однако количество пациентов в каждой из групп было крайне мало.

Таблица 29 – Общая выживаемость пациентов при узловой меланоме кожи I–II стадий в зависимости от выраженности экспрессии маркера воспалительной макрофагальной инфильтрации CD163, представленной в виде бинарной величины

Сроки наблюдения, месяцы	Число пациентов, оставшихся под наблюдением к концу интервала	Риск летального исхода		Общая выживаемость, %
		Абс.	%	
Отсутствует/слабая интенсивность CD163				
3	8	0	0	100
6	8	0	0	100
12	8	0	0	100
18	8	0	0	100
24	8	0	0	100
36	4	1	12	88
48	2	1	12	88
60	1	1	12	88
Умеренная/выраженная интенсивность CD163				
3	16	0	0	100
6	16	0	0	100
12	15	1	6	94
18	15	1	6	94
24	13	3	19	81
36	7	6	40	60
48	5	6	40	60
60	3	7	55	45

Согласно полученным данным, при представлении интенсивности окраски CD163 в виде бинарной величины 1-летняя общая выживаемость пациентов с узловой формой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий с отсутствием/слабой интенсивностью окраски CD163 составила 100 %, 3-летняя – 88 %, 5-летняя – 88 %. 1-летняя, 3-летняя и 5-летняя общая выживаемость при умеренной/выраженной интенсивности окраски CD163 составили 94 %, 60 % и

45 % соответственно, однако выборка пациентов в каждой из групп оказалась крайне мала.

В соответствии с проведенным анализом выживаемости, зависимость риска летального исхода от наличия CD163 и выраженности его экспрессии, оцененная с помощью лог-ранк критерия Мантеля – Кокса, была статистически незначимой (p = 0,428 и p = 0,191 соответственно) (Рисунок 18).

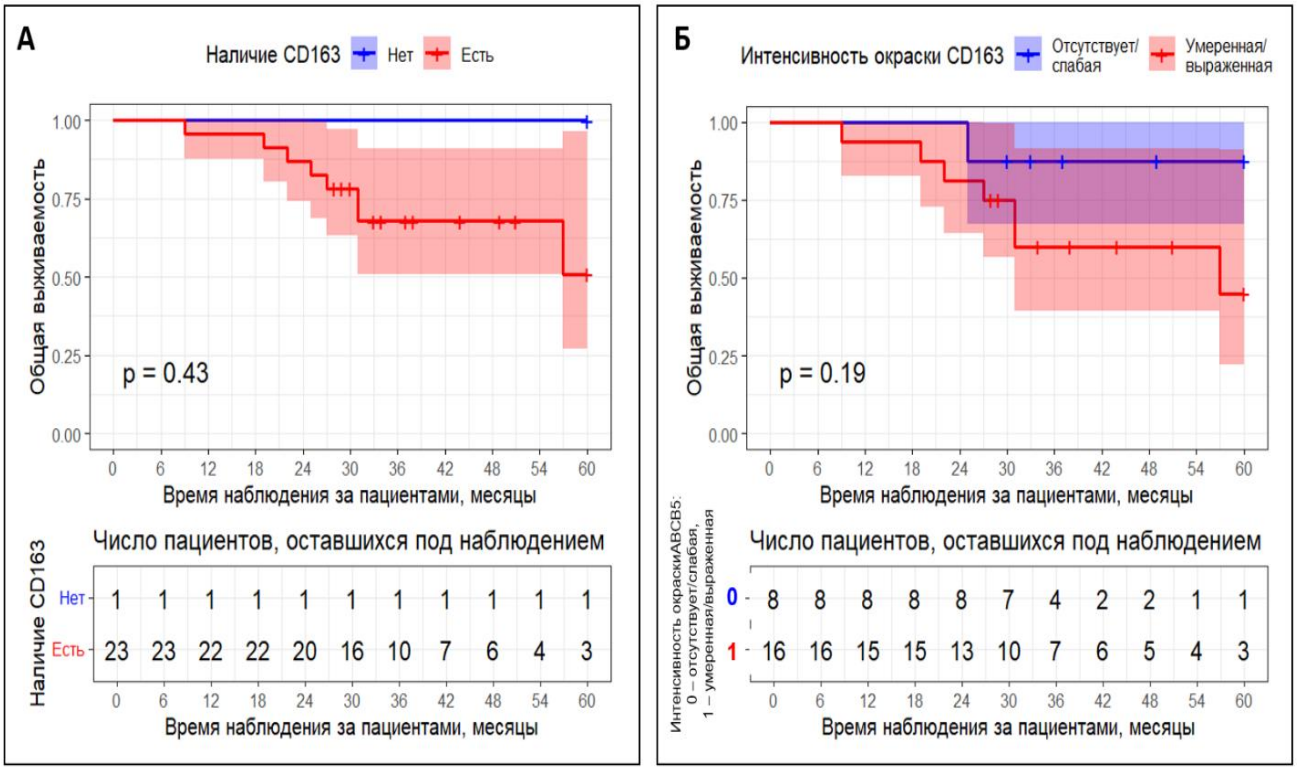


Рисунок 18 – Кривые Каплана – Майера для оценки общей выживаемости пациентов при узловой (вертикальная фаза роста) меланоме кожи I–II стадий в зависимости от наличия экспрессии CD163 (А) и интенсивности его окраски (Б)

При оценке влияния интенсивности CD163 на риски летального исхода с помощью метода регрессии Кокса были получены следующие модели пропорциональных рисков, представленные в Таблице 30.

В соответствие с проведенным анализом показано, что интенсивность окраски CD163 не влияет на риски летального исхода у пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи I–II стадий.

Таблица 30 – Однофакторные модели пропорциональных рисков (регрессия Кокса) для интенсивности окраски на CD163 как потенциального предиктора общей выживаемости пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) меланомой кожи I–II стадий

Параметр	Отношение рисков	95% ДИ	p
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			
• Слабая/умеренная фокальная	Референс	–	–
• Выраженная фокальная или умеренная/выраженная мультифокальная	2,417	0,263–22,222	0,435
• Умеренная/выраженная диффузная	3,953	0,405–38,596	0,237
Интенсивность окраски CD163, % (*n*):			
• Отсутствует/слабая	Референс	–	–
• Умеренная/выраженная	3,661	0,448–29,925	0,226

3.5 Прогностическая значимость стандартных морфологических факторов прогноза, молекулярных и иммунологических маркеров

3.5.1 Прогрессия и безрецидивная выживаемость

С целью разработки наиболее оптимальной модели для прогнозирования безрецидивной выживаемости пациентов с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы кожи нами было построено несколько многофакторных моделей, представленных в Таблице 31.

Модель 1 (f1) включала классические факторы прогноза меланомы: митотический индекс, наличие изъязвлений и толщину опухоли по Бреслоу. Единственным значимым предиктором в данной модели, увеличивающим риски прогрессии локальных стадий поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой форм (вертикальная фаза роста) меланомы кожи оказалась большая толщина опухоли по Бреслоу. Так, увеличение толщины опухоли на 1 мм ассоциировано с увеличением рисков прогрессии в 1,227 раза (ОР = 1,227; 95% ДИ = 1,123–1,340; $p < 0,001$).

Таблица 31 – Многофакторные регрессионные модели Кокса для прогнозирования безрецидивной выживаемости пациентов.

Параметр	ОР (95% ДИ)	p
Модель 1 (f1)		< 0,001
Митотический индекс • 0 • 1 и более	 Референс 1,026 (0,343–3,070)	 – 0,963
Наличие изъязвления	2,218 (0,785–6,269)	0,133
Толщина опухоли по Бреслоу, мм	1,227 (1,123–1,340)	**<0,001**
Модель 2 (f2)		0,002
Наличие ABCB5	2,278 (0,607–8,549)	0,222
Наличие CD133	1,216 (0,332–4,454)	0,768
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 7,193 (1,926–26,856) Референс	 **0,003** –
Модель 3 (f3)		0,001
Наличие ALK	4,288 (1,200–15,323)	**0,025**
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 7,705 (2,019–29,400) Референс	 **0,003** –

Модель 2 (f2) включала наличие стволовых опухолевых клеток ABCB5 и CD133, а также фаза роста меланомы. Последний в данной модели оказался единственным значимым предиктором прогрессии меланомы, показывая, что риски прогрессии увеличиваются в 7,193 раза при наличии узловой формы (вертикальная фаза роста) (95% ДИ: 1,926–26,856; p = 0,003), независимо от наличия стволовых опухолевых клеток.

Модель 3 (f3) включала наличие ALK и фазу роста меланомы, оказавшиеся независимыми предикторами прогрессии заболевания. Так, риски прогрессии увеличиваются в 4,288 раза при наличии ALK (95% ДИ: 1,200–15,323; p = 0,025) и в 7,705 раза при наличии узловой формы (вертикальная фаза роста) меланомы кожи (95% ДИ: 2,019–29,400; p = 0,003) независимо друг от друга.

Графическое представление трех полученных итоговых моделей показано на Рисунке 19.

Для сравнения прогностической ценности каждой из моделей для оценки безрецидивной выживаемости пациентов с локальными стадиями меланомы кожи нами был выполнен зависимый от времени ROC-анализ (time-dependent ROC) с

определением зависимых от времени площадей под ROC-кривой (time-dependent AUC). Значения AUC с 95% ДИ представлены в Таблице 32.

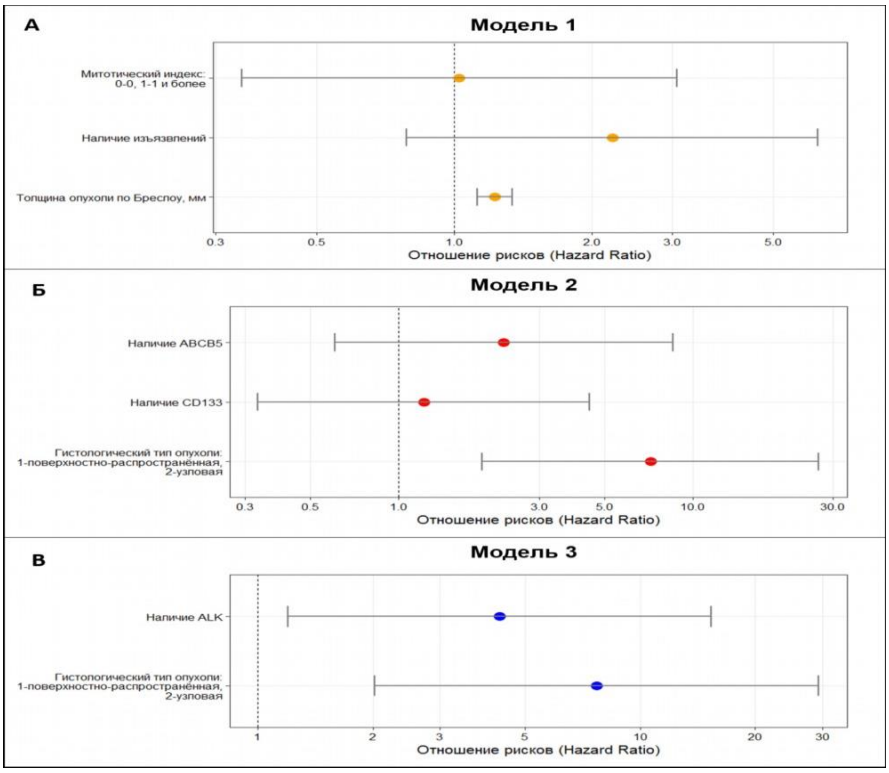


Рисунок 19 – Многофакторные регрессионные модели Кокса для оценки рисков прогрессии локальных стадий поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) форм меланомы кожи: А – модель 1 на основе стандартных морфологических предикторов; Б – модель 2 на основе стволовых опухолевых клеток и гистологического типа меланомы; В – модель 3 на основе ALK и гистологического типа меланомы

Таблица 32 – Значения AUC и 95 % ДИ для моделей прогноза безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от времени наблюдения

Месяцы	Модель 1	Модель 2	Модель 3
	AUC (95 % ДИ)		
3	0,986 (0,958–1,000)	–	–
6	0,835 (0,676–0,923)	0,928 (0,849–1,000)	0,878 (0,740–1,000)
12	0,927 (0,865–0,988)	0,888 (0,792–0,984)	0,883 (0,792–0,974)
18	0,887 (0,800–0,973)	0,885 (0,790–0,981)	0,871 (0,733–1,000)
24	0,856 (0,755–0,957)	0,896 (0,803–0,989)	0,875 (0,738–1,000)
36	0,871 (0,781–0,968)	0,807 (0,655–0,959)	0,767 (0,592–0,942)

Продолжение таблицы 32

Месяцы	Модель 1	Модель 2	Модель 3
	AUC (95 % ДИ)		
48	0,871 (0,775–0,967)	0,807 (0,655–0,959)	0,767 (0,952–0,942)
60	0,842 (0,726–0,958)	0,823 (0,679–0,968)	0,779 (0,615–0,942)

Для упрощенной визуальной оценки прогностической ценности каждой из моделей безрецидивной выживаемости нами был построен Рисунок 20, отражающий площади под ROC-кривой в разные временные промежутки.

Как видно из представленного Рисунка 20 и Таблицы 32, наибольшей прогностической ценностью при прогнозировании прогрессии локальных стадий поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой форм (вертикальная фаза роста) меланомы кожи в сроки 12, 36 и 60 месяцев наблюдения является модель 1 (f1) на основе стандартных морфологических факторов прогноза. Для оценки 1-летней, 3-летней и 5-летней безрецидивной выживаемости целесообразно ориентироваться на данную модель.

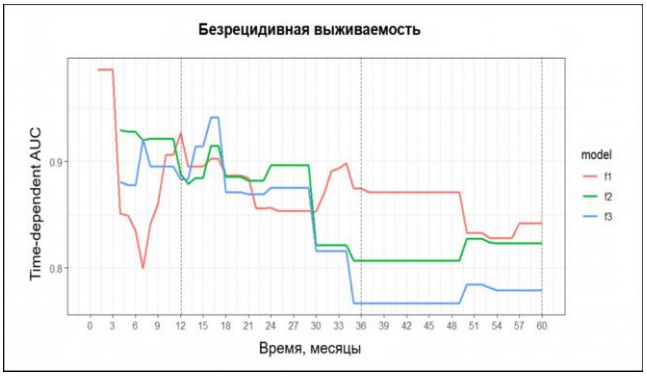


Рисунок 20 – Значения AUC для трех моделей для оценки безрецидивной выживаемости в различные периоды времени наблюдения за пациентами с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся и узловой формами меланомы кожи (time-dependent AUC)

3.5.2 Летальный исход и общая выживаемость

С целью разработки наиболее оптимальной модели для прогнозирования общей выживаемости пациентов с локальными стадиями поверхностно-

распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы кожи нами были протестированы те же многофакторные модели, изученные для прогноза прогрессии. Многофакторные модели для прогноза общей выживаемости представлены в Таблице 33.

Таблица 33 – Многофакторные регрессионные модели Кокса для прогнозирования общей выживаемости пациентов

Параметр	ОР (95% ДИ)	p
Модель 1.1 (f1.1)		0,027
Митотический индекс • 0 • 1 и более	 Референс 2,947 (0,830–10,469)	 – **0,095**
Наличие изъязвления	1,920 (0,673–5,480)	0,223
Толщина опухоли по Бреслоу, мм	1,057 (0,950–1,175)	0,309
Модель 2.1 (f2.1)		0,037
Наличие ABCB5	3,102 (0,881–10,924)	**0,078**
Наличие CD133	0,572 (0,164–1,994)	0,381
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 2,930 (0,942–9,113) Референс	 **0,063** –
Модель 3.1 (f3.1)		0,069
Наличие ALK	1,449 (0,392–5,358)	0,578
Фаза роста меланомы • Вертикальная • Горизонтальная	 3,195 (1,029–9,918) Референс	 **0,044** –

В Модели 1.1 (f1.1) только митотический индекс обладал пограничным уровнем значимости для оценки рисков летального исхода, независимо от наличия изъязвлений и толщины опухоли по Бреслоу (ОР = 2,947; 95% ДИ: 0,830–10,469; p = 0,095), указывая что большие риски летального исхода ассоциированы с большим митотическим индексом.

В Модели 2.1 (f2.1) пограничным уровнем значимости обладали наличие стволовых опухолевых клеток ABCB5 (ОР = 3,102; 95% ДИ: 0,881–10,924; p = 0,078) и фаза роста меланомы (ОР = 2,930; 95% ДИ: 0,942–9,113; p = 0,063), независимо от наличия стволовых опухолевых CD133. Так, большие риски летального исхода ассоциированы с наличием стволовых опухолевых клеток ABCB5 и узловой формой (вертикальная фаза роста) меланомы кожи.

В Модели 3.1 (f3.1), включающей наличие ALK и фазы роста меланомы в качестве потенциальных предикторов летального исхода, оказалось, что узловая форма (вертикальная фаза роста) меланомы ассоциирована с увеличением рисков летального исхода в 3,195 раза, независимо от наличия ALK (ОР = 3,195; 95% ДИ: 1,029–9,918; p = 0,044).

Графическое представление трех полученных итоговых моделей представлено на Рисунке 21.

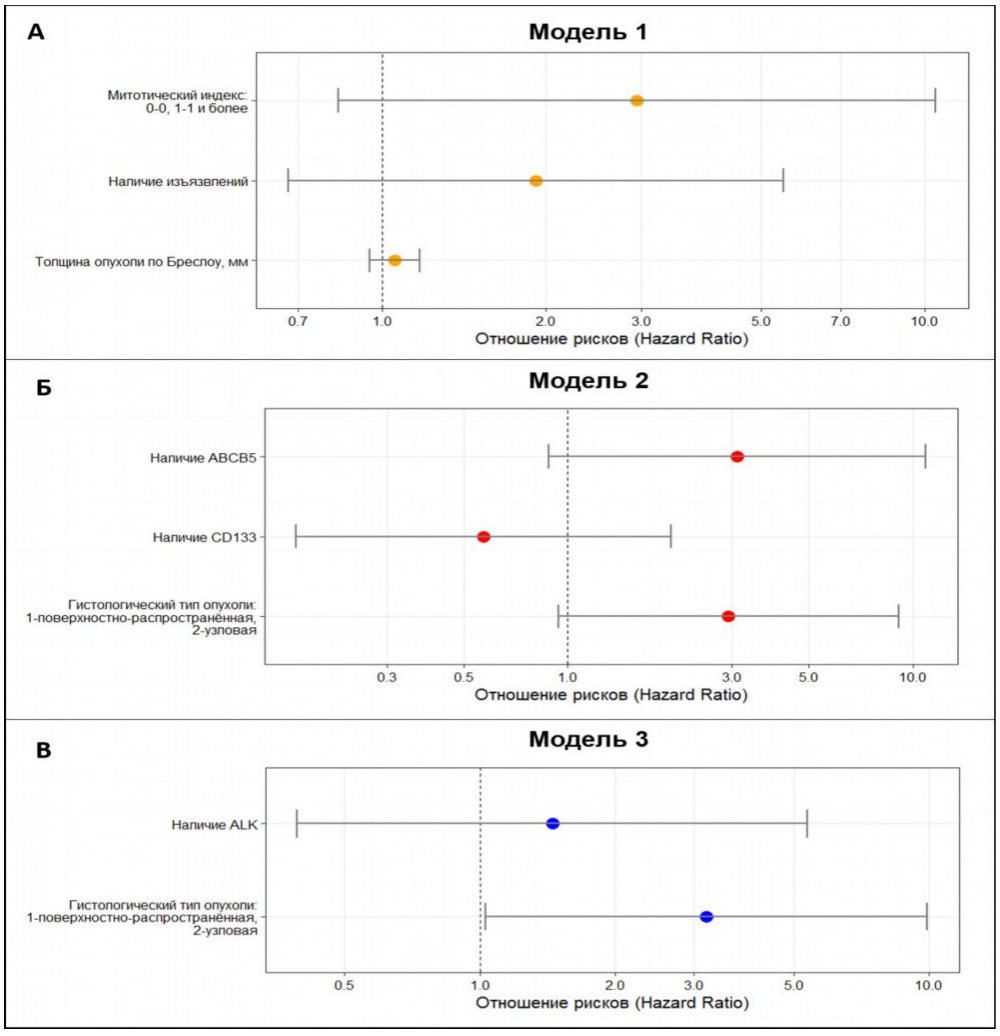


Рисунок 21 – Многофакторные регрессионные модели Кокса для оценки рисков летального исхода у пациентов с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой форм (вертикальная фаза роста) меланомы кожи: А – модель 1 на основе стандартных морфологических предикторов; Б – модель 2 на основе стволовых опухолевых клеток и гистологического типа меланомы; В – модель 3 на основе ALK и гистологического типа меланомы

Для сравнения прогностической ценности каждой из моделей с оценкой общей выживаемости пациентов с локальными стадиями меланомы кожи нами был выполнен зависимый от времени ROC-анализ (time-dependent ROC) с определением зависимых от времени площадей под ROC-кривой (time-dependent AUC). Значения AUC с 95% ДИ представлены в Таблице 34.

Таблица 34 – Значения AUC и 95% ДИ для трех разработанных моделей прогноза общей выживаемости пациентов в зависимости от времени наблюдения

Месяцы	Модель 1	Модель 2	Модель 3
	AUC (95 % ДИ)		
3	–	–	–
6	0,592 (0,478–0,705)	0,521 (0,388–0,654)	0,277 (0,205–0,348)
12	0,679 (0,531–0,826)	0,521 (0,388–0,654)	0,277 (0,205–0,348)
18	0,810 (0,698–0,922)	0,848 (0,691–1,000)	0,742 (0,531–0,953)
24	0,701 (0,537–0,865)	0,848 (0,721–0,974)	0,639 (0,441–0,839)
36	0,726 (0,574–0,878)	0,807 (0,665–0,948)	0,690 (0,499–0,882)
48	0,733 (0,580–0,887)	0,807 (0,665–0,948)	0,690 (0,499–0,882)
60	0,788 (0,660–0,916)	0,712 (0,551–0,873)	0,676 (0,505–0,847)

Для упрощенной визуальной оценки прогностической ценности каждой из моделей общей выживаемости нами был построен Рисунок 22, отражающий площади под ROC-кривой в разные временные промежутки.



Рисунок 22 – Значения AUC для трех моделей для оценки общей выживаемости в различные периоды времени наблюдения за пациентами с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы кожи (time-dependent AUC)

Таким образом, как видно из представленного Рисунка 22 и Таблицы 34, наибольшей прогностической ценностью при прогнозировании общей выживаемости пациентов с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) форм меланомы кожи в сроки 12 и 60 месяцев наблюдения является Модель 1 (f1.1) на основе стандартных морфологических факторов прогноза. Однако для прогнозирования 3-летней общей выживаемости целесообразно ориентироваться на Модель 2 (f2.1) на основе стволовых опухолевых клеток и фазы роста меланомы.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клинической практике меланомы кожи I–IIC стадий уже давно используются стандартные патоморфологические факторы прогноза (толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление эпидермиса, митотический индекс и лимфоцитарная TILs-инфильтрация) [3]. Но данные стандартные прогностические параметры не в полной мере учитывают важные индивидуальные биологические особенности первичной меланомы кожи, понимание которых может помочь в выборе персонализированного режима адъювантной терапии, показаний к проведению биопсии сигнального лимфоузла, а также частоты и объема контрольного обследования [23].

С учетом большого интереса ученых к биологическим особенностям меланомы кожи, как примера гетерогенного онкологического заболевания в нашем исследовании были выделены и проанализированы дополнительные патоморфологические и молекулярные факторы меланомы кожи локальных стадий для оценки их прогностической роли.

Стволовые опухолевые клетки участвуют в процессе метастазирования и устойчивости опухолей к различным препаратам и, следовательно, могут рассматриваться в качестве прогностически неблагоприятных факторов, увеличивающих риск рецидива заболевания. Стволовые опухолевые клетки, помимо способности к самообновлению и дифференцировке, обладают определенной вирулентностью, превращая клетки в мигрирующие и метастазирующие [63]. Для стволовых опухолевых клеток меланомы кожи характерно наличие ряда специфических биомаркеров, наиболее распространенными из которых являются ABCB5 и CD133 [76], используемые нами в настоящей работе.

Как показывают исследования, экспрессия ABCB5 более характерна для пациентов с распространенными стадиями меланомы кожи (III–IV), в то время как встречается гораздо реже при локальных формах заболевания (I–II стадия). По

данным Maria Cristina Rapanotti et al. (2020), среди восьми пациентов с локальными стадиями меланомы ABCB5 встречался только у одного (12,5 %) в структуре субпопуляции циркулирующих стволовых клеток меланомы, в то время как среди 13 пациентов с распространенной формой – у 12 пациентов (92,3 %) в структуре гибридной субпопуляции эпителиальных/стволовых циркулирующих клеток [122]. Согласно Setia N. et al. (2012), экспрессия ABCB5, оцененная путем иммуногистохимической окраски биоптатов, возрастает от меланоцитарного невуса до злокачественной меланомы кожи. Так, средний кумулятивный балл интенсивности окраски на ABCB5 составил 3,8 для невуса, 4,4 для меланомы in situ и 5,3 для распространенной меланомы ($p = 0,005$), тем самым предполагается определенная роль ABCB5 в онкогенезе [110]. В настоящем исследовании экспрессия ABCB5 встречалась у 50 % пациентов с узловой формой (вертикальная фаза роста) и у 37 % с поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) формой меланомы кожи I–II стадий, что было значительно чаще, чем в вышеописанных работах для локальных стадий. Однако большинство исследований было сосредоточено на циркулирующих стволовых опухолевых клетках, в то время как в рамках настоящего исследования мы использовали иммуногистохимический анализ в первичной опухоли кожи.

Стадия первичной меланомы, а также ее фаза роста ни в одном из вышеописанных исследований не учитывалась, однако это было сделано в рамках настоящей работы. Нами было установлено, что безрецидивная выживаемость пациентов с локальными стадиями поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) и узловой (вертикальная фаза роста) формами меланомы кожи с наличием экспрессии ABCB5 была ниже, чем у пациентов с отсутствием экспрессии данного маркера, но при пограничном уровне значимости различий (p для лог-ранк критерия Мантеля – Кокса 0,066). При выполнении однофакторного регрессионного анализа Кокса было выявлено, что неблагоприятное влияние ABCB5 на прогрессию заболевания также обладало пограничным уровнем значимости ($p = 0,099$). Однако при введении поправки на

фазу роста меланомы именно данный параметр оказался более сильным предиктором, нивелируя влияние ABCB5 стволовых опухолевых клеток и повышая риски прогрессии в 7,193 раза независимо от наличия последних. Похожие результаты были получены Reid A.L. et al. (2013), где также учитывалась стадия первичной меланомы кожи, однако не учитывалась ее фаза роста, а идентификация ABCB5 осуществлялась в периферической крови [92]. Оказалось, что ABCB5 выявлялся у 29,3 % пациентов с I–II стадиями меланомы кожи (34 из 116 пациентов), что было значительно меньше, чем для пациентов с III–IV стадиями (51 %) и также значительно меньше, чем в настоящем исследовании. При этом у пациентов с рецидивами меланомы кожи значительно чаще экспрессировался ABCB5 в сравнении с пациентами без рецидива (49 % и 34 % соответственно, $p < 0,01$), однако при данном сравнении стадия не учитывалась, а дальнейшего полноценного анализа выживаемости не проводилось [92]. Такой анализ был проведен в рамках настоящей работы и, как было сказано выше, он показал, что ABCB5 ассоциирован с меньшей безрецидивной выживаемостью, однако данное влияние нивелировалось при учете гистологического типа меланомы. Распространенность ABCB5 стволовых опухолевых клеток у пациентов с прогрессией составила 36,1 %, в то время как у пациентов без прогрессии – 58,3 %.

Оценка общей выживаемости пациентов с учетом стадии меланомы кожи была проведена Gazzaniga P. et al. (2010), где была изучена экспрессия сразу двух изучаемых нами маркеров стволовых опухолевых клеток – ABCB5 и CD133 [40]. Однако, в отличие от нашего исследования, в качестве гистологического материала выступали сторожевые лимфатические узлы. Среди 45 пациентов общей выборки только у 2 отмечалась III стадия, в то время как у подавляющего большинства (43 пациента) меланома была выявлена на локальной стадии (I–II стадии). Экспрессия ABCB5 по результатам полимеразной цепной реакции оказалась положительной у 8 из 43 пациентов с локальными стадиями меланомы (18,6 %), в то время как CD133 – у 18 из 43 пациентов (41,9 %). При проведении анализа выживаемости оказалось, что стволовые опухолевые клетки меланомы в

лимфатических узлах не были ассоциированы с общей выживаемостью пациентов [40]. В настоящей работе распространенность стволовых опухолевых клеток ABCB5 у пациентов с летальным исходом составила 61,5 %, в то время как у пациентов без летального исхода – 34,3 %, а общая выживаемость при наличии ABCB5 оказалась ниже при пограничном уровне значимости различий (p = 0,062). В многофакторной модели, учитывающей наличие как ABCB5, так и CD133 стволовых опухолевых клеток, риски летального исхода при наличии ABCB5+ увеличивались в 3,719 раза (95% ДИ: 1,056–13,106; p = 0,041), независимо от CD133. Последний на риски летального исхода влияния не оказывал. При учете фазы роста меланомы кожи наличие ABCB5 также оказалось ассоциировано с общей выживаемостью пациентов наряду с фазой роста, независимо от наличия CD133 стволовых опухолевых клеток.

Распространенность CD133+ стволовых опухолевых клеток меланомы в опухоли и меланоцитарных новообразованиях кожи значительно варьирует. Согласно результатам работы Sabău A.-H. et al. (2024), экспрессия CD133+ отмечается в 12 % случаев (6 из 50 пациентов) [47]. Согласно данным метаанализа Madjd Z. et al. (2016), около 47,9 % случаев меланомы кожи имеют положительный маркер стволовых опухолевых клеток CD133 (95% ДИ: 23,7–72,1) при сильной гетерогенности данных [65]. В исследовании Thomas-Pfaab M. et al. (2013) CD133 оказался положительным в 28,4 % образцов меланомы (19 из 67 образцов, полученных от 54 пациентов): у 55,6 % – с I–II стадиями заболеваниями и у 42,9 % – с III–IV стадиями [39]. При этом ни в одной из работ не учитывалась фаза роста меланомы кожи и не оценивалась распространенность CD133 как с учетом гистологии, так и с учетом стадии заболевания. Дополнительно не изучалась частота встречаемости отдельно для локальных стадий. Данные недостатки были устранены в настоящей работе. Нами было установлено, что распространенность CD133+ стволовых опухолевых клеток у пациентов с узловой (вертикальная фаза роста) и поверхностно-распространяющейся (горизонтальная фаза роста) формами меланомы составляет 33 и 37 % соответственно. При проведении регрессионного

анализа Кокса как для общей, так и для безрецидивной выживаемости CD133+ стволовых опухолевые клетки не оказывали влияния на прогноз локальных стадий меланомы кожи. При этом единственным предиктором прогрессии оказалась фаза роста меланомы кожи. На общую выживаемость CD133 также влияния не оказывал.

По данным Sabet M.N. et al. (2014), из 16 пациентов с меланомой кожи у всех отмечалась положительная окраска на CD133: у 44 % пациентов слабой интенсивности, у 31 % – умеренной и у 25 % – выраженной. В ходе анализа была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между экспрессией CD133 и наличием метастазов, а также инвазивностью опухоли, указывая, что чем выше CD133, тем более злокачественным потенциалом обладает меланома. Также было установлено, что экспрессия CD133 отличается у пациентов с различными формами меланомы, увеличиваясь в ряду: акральная лентигинозная меланома, лентиго меланома, поверхностно-распространяющаяся меланома и метастатическая меланома [53]. К похожим выводам с учетом формы меланомы пришли Magnoni C. et al. (2014) в исследовании, включающем 11 пациентов с меланомой кожи. Было показано прогрессивное увеличение иммуногистохимической экспрессии CD133 с увеличением злокачественного потенциала меланоцитарных образований в ряду: нормальная кожа, невус, лентиго-меланома, поверхностно-распространяющаяся меланома, узловая меланома, метастатическая меланома [121]. Однако выборка пациентов для однозначных выводов относительно роли CD133 была крайне небольшой. В настоящем исследовании мы впервые оценили распространенность стволовых опухолевых клеток CD133 в зависимости от фазы роста меланомы кожи (узловая или поверхностно-распространяющаяся) на более крупной выборке пациентов. Распространенность CD133+ стволовых опухолевых клеток у пациентов с узловой и поверхностно-распространяющейся формами меланомы составляет 33 % и 37 % соответственно, а различия распространенности были статистически незначимыми ($p = 0,938$).

В работе Speigl L. et al. (2017) изучили прогностическую значимость CD133 стволовых опухолевых клеток у 40 пациентов с метастатической меланомой кожи III–IV стадий (15 пациентов с III стадией, 25 пациентов с IV стадией) [113]. CD133, оцененный при помощи флуоресцентной микроскопии, оказался положительным в 95 % образцов меланомы. При проведении анализа выживаемости было показано, что общая выживаемость пациентов с отрицательным CD133 или низкой интенсивностью окраски гораздо выше, чем у пациентов с высокой интенсивностью окраски ($p = 0,021$), что указывало на неблагоприятную функцию CD133+ клеток, опровергая данные in vitro и in vivo [111].

К противоположным результатам относительно прогностической значимости CD133 пришли González-Herrero I. et al. (2013) в исследовании, включающем 28 пациентов с меланомой кожи. Было показано, что число CD133+ стволовых опухолевых клеток статистически значимо выше у пациентов с меланомой in situ по сравнению с инвазивными формами, у пациентов без вовлечения лимфатических узлов, а также у пациентов с отсутствием прогрессии заболевания. Тем самым CD133+ клетки были ассоциированы с лучшим прогнозом меланомы кожи, а также меньшей агрессивностью опухоли [44], что противоречило данным, описанным выше.

В то же время некоторые исследователи склоняются к мнению об отсутствии прогностической роли CD133+ стволовых опухолевых клеток при меланоме кожи, что было показано в ходе анализа выживаемости в работе Thomas-Pfaab M. et al. (2013) после окраски 67 образцов меланомы, полученных от 54 пациентов [118]. К аналогичным выводам мы пришли в рамках настоящего исследования, где CD133+ стволовые опухолевые клетки не влияли на прогноз локальных стадий меланомы кожи, причем независимо от фазы роста и наличия ABCB5+ стволовых опухолевых клеток, показывая тем самым отсутствие прогностической значимости данного маркера.

Данные относительно распространенности транслокации ALK-EML4 при поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) и узловых

(вертикальная фаза роста) формах меланомы кожи I–II стадий отсутствуют, а большинство исследований сосредоточено на изучении изменений гена ALK в шпицоидных новообразованиях и акральной меланоме [129]. Так, показано, что около 11 % шпиц-невусов содержат мутации в гене ALK, которые также выявляются у 3 % шпицподобной меланомы кожи [87]. В исследовании Cancer Genome Atlas Network (2015) были изучены генетические аномалии 333 образцов меланомы кожи, полученной от 331 пациента, однако изменений гена ALK ни в одном из образцов обнаружено не было [72, 88]. По данным Hai-Tao Niu et al. (2013), изменения гена ALK были обнаружены у 4 из 15 пациентов с первичной акральной меланомой [78]. Yeh I. et al. (2019) обнаружили транслокацию ALK только у 1 из 122 пациентов с акральной меланомой [125].

В работе Busam K.J. et al. (2016) изучили экспрессию белка ALK на выборке из 603 меланом кожи, 303 из которых были первичными, а 300 – метастатическими. Белок ALK экспрессировался у 3 % метастатических меланом (9 образцов), из которых гиперэкспрессия была у 2 % меланом (6 образцов). В группе первичной меланомы белок ALK выявлялся в 2,3 % случаев (7 образцов), 5 из которых (1,7 %) были с гиперэкспрессией белка. Из 5 меланом с гиперэкспрессией ALK 4 оказались узловыми, в то время как 1 – неклассифицируемая. Ни в одном случае гиперэкспрессии белка ALK транслокации гена ALK выявлено не было [109]. Гиперэкспрессия гена ALK на уровне белка была изучена также в рамках национального исследования Финляндии у детей и подростков с меланомой кожи. Из 54 пациентов, у которых проводилась иммуногистохимическая окраска на ALK, гиперэкспрессия выявлялась у 9 % (5 человек, средний возраст 14 лет). Все меланомы оказались шпицподобными, в то время как ни в узловой (вертикальная фаза роста), ни в поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) формах гиперэкспрессии белка ALK обнаружено не было [59]. При этом подробная сравнительная характеристика гиперэкспрессии белка ALK у пациентов с различными формами меланомы кожи ни в одном из исследований не проводилась, однако это было сделано в рамках настоящей работы.

В настоящем исследовании была изучена распространенность гиперэкспрессии ALK у пациентов с локальными стадиями меланомы кожи при поверхностно-распространяющихся (горизонтальная фаза роста) и узловых (вертикальная фаза роста) формах опухоли. Гиперэкспрессия ALK отмечалась у 14,6 % пациентов общей выборки: из них у пациентов с узловой формой – в 22,2 % случаев, с поверхностно-распространяющейся формой – в 10,0 % случаев, однако различия распространенности для разных гистологических типов оказались статистически незначимыми. Во всех случаях при гиперэкспрессии была подтверждена транслокация ALK-EML4. Аналогичные данные для локальных стадий меланомы кожи с учетом фазы роста с последующим сравнением на сегодня отсутствуют. Единственной похожей работой, где экспрессия гена ALK на уровне белка оценивалась при различных формах меланомы кожи, стала статья Osella-Abate S. et al. (2018), однако у всех пациентов меланома была метастатической [27].

Экспрессия ALK по иммуногистохимическому исследованию была выявлена у 14 % пациентов (10 из 71), преимущественно у пациентов с NRAS-мутациями: 4 – в локальном метастазе меланомы на коже, 4 – в метастазах в лимфатические узлы, 1 – в метастазе легкого и 1 – в метастазе в селезенку. При этом ни в одном из образцов не было выявлено транслокации ALK или изоформы ALK-ATI. Из 35 пациентов с поверхностно-распространяющейся формой (горизонтальная фаза роста) меланомы и NRAS-мутациями гиперэкспресия ALK отмечалась у 5 пациентов (14,3 %), в то время как из 12 пациентов с узловыми формами (вертикальная фаза роста) и NRAS-мутациями – у 2 (16,7 %), что практически соответствовало распространенности гиперэкспрессии белка ALK в настоящей работе. У 2 пациентов с NRAS-мутациями гиперэкспрессия ALK выявлялась при других формах меланомы, а у 1 пациента гиперэкспрессия была при отсутствии NRAS-мутаций, тип меланомы при этом не указывался. Дополнительно было показано, что ALK-экспрессия является фактором благоприятного прогноза у пациентов с NRAS-мутантной метастатической меланомой и ассоциирована с большей опухоль-специфической выживаемостью пациентов [27], что не

соответствовало данным настоящего исследования, однако необходимо учитывать, что выборка пациентов в вышеописанной работе и настоящем исследовании были разнородными.

Нами было показано, что гиперэкспрессия ALK ассоциирована с прогрессией заболевания и повышает риски последней в 4,004 раза (95% ДИ: 1,198–13,386; p = 0,024). Такая взаимосвязь сохранялась и с учетом фазы роста меланомы: наличие ALK, независимо от фазы роста, повышало риски прогрессии в 4,288 раза (95% ДИ: 1,200–15,323; p = 0,025).

Считается, что транслокация гена ALK имеет прогностическое значение при ряде онкологических заболеваний, таких как немелкоклеточный рак легкого [19], рак щитовидной железы [105], анапластическая крупноклеточная лимфома [90]. Однако аналогичные данные по прогностической роли ALK-EML4 для меланомы кожи практически отсутствуют и впервые были представлены в рамках настоящего исследования. Предполагается, что активация тирозинкиназы ALK является триггером клеточной пролиферации. Такая митогенная аберрация, по мнению Wiesner T. et al. (2016), инициирует образование шпиц-невусов, которые на фоне адекватной работы супрессоров опухолевого роста не перерождаются в злокачественные новообразования. Однако по мере накопления генетических аномалий в том числе в генах-супрессорах опухолевого роста, клетки приобретают атипичные свойства, трансформируясь в дальнейшем в шпицподобную меланому кожи [71].

В работе Tsukahara S. и Tsukahara T. (2022) была изучена взаимосвязь экспрессии гена ALK с исходом у пациентов при различных онкологических заболеваниях, в том числе при меланоме кожи, на основании данных атласа ракового генома (The Cancer Genome Atlas) [118]. Изменения в гене ALK (мутации, структурные варианты, амплификации, глубокие делеции) выявлялись в 15,9 % случаев меланомы кожи (444 случая). Экспрессия мРНК ALK в образцах кожи пациентов с меланомой кожи оказалась выше в 1,8 раза, чем у здоровых добровольцев (p = 0,028). Дополнительно было показано, что ALK на уровне мРНК

и на уровне белка имеют похожие паттерны экспрессии. При проведении регрессионного анализа Кокса было установлено, что высокая экспрессия мРНК ALK ассоциирована с неблагоприятным прогнозом: общая выживаемость пациентов с высокой экспрессией оказалась в 7,6 раза ниже, чем у пациентов с низкой экспрессией (ОР = 7,58; 95% ДИ: 1,41–40,84; p = 0,018) [118]. В настоящей работе, помимо безрецидивной выживаемости, мы изучили также общую выживаемость пациентов в зависимости от наличия гиперэкспрессии белка ALK, однако наличие ALK, в отличие от описанных работ, не влияло на общую выживаемость пациентов с локальными стадиями меланомы кожи. Это могло быть связано с различными выборками пациентов, а именно отсутствием подгруппового анализа для локальных и распространенных форм заболевания, а также небольшим количеством случаев в группе.

Опухоль-ассоциированные макрофаги являются составной частью микроокружения многих опухолей и часто классифицируются на 2 субпопуляции: провоспалительные М1-макрофаги и противовоспалительные М2-макрофаги. М1-макрофаги вовлечены в начальные этапы канцерогенеза путем создания специфического мутагенного микроокружения, например за счет продукции свободных радикалов [98]. М2-макрофаги ответственны за иммуносупрессию опухолевого микроокружения, в том числе Т-клеток, поддерживая и усиливая тем самым опухолевый рост [98, 115]. Считается, что в большинстве опухолей опухоль-ассоциированные макрофаги представлены преимущественно М2-субпопуляцией, высокоспецифичным маркером которой является скавенджер-рецептор CD163 [68, 98]. Последний экспрессируется в опухолевом микроокружении при раке молочной железы, яичников, легких, раке гепатобилиарной системы и желудочно-кишечного тракта, меланоме кожи и в большинстве случаев ассоциирован с неблагоприятным прогнозом [113]. При этом в отношении меланомы кожи I–II стадии данные крайне ограничены.

В экспериментах in vitro и ex vivo показано, что CD163+ макрофаги стимулируют эпителиально-мезенхимальную трансформацию и могут быть

использованы для идентификации меланомы кожи с высокой вероятностью прогрессии на ранних стадиях [83]. При этом М2-макрофаги встречаются практически во всех меланоцитарных новообразованиях, однако по данным Dabrosin N. et al. (2019), интенсивность окраски при первичной меланоме кожи значительно ниже, чем при метастатической [82]. По данным Salmi S. et al. (2019), интенсивность окраски на CD163 у пациентов с доброкачественными образованиями гораздо ниже. Так, интенсивность окраски на CD163 возрастает в ряду: доброкачественный невус, диспластический невус, меланома кожи in situ, меланома <1 мм, меланома >4 мм, метастазы меланомы кожи в лимфатические узлы. При этом оказалось, что низкая экспрессия CD163+ в строме опухоли оказалась ассоциирована с меньшей безрецидивной и общей выживаемостью в первичной меланоме кожи, однако при подгрупповом анализе для Т1-опухолей CD163 не оказывал влияние на прогноз. Корреляции между выраженностью экспрессии CD163 в строме опухоли и в гнездах опухолевых клеток и прогрессией меланомы кожи также не было выявлено [127]. Похожие результаты были получены в настоящем исследовании. Макрофаги CD163+ встречались в 95,8 % случаев в составе опухолевого микроокружения узловой формы меланомы кожи I–II стадии. Выраженность окраски при этом отличалась, однако при оценке влияния интенсивности окраски на общую выживаемость статистически значимых различий получено не было, как и было показано в вышеописанной работе. Аналогичные результаты были получены и для безрецидивной выживаемости, которая в нашей выборке также не отличалась в зависимости от изменения интенсивности окраски.

Наши данные относительно отсутствия взаимосвязи количества CD163 позитивных макрофагов с прогрессией меланомы кожи были подтверждены Kim Y.J. et al. (2020), однако на гетерогенной выборке пациентов с различными стадиями заболевания (I–II стадии – 75 человек, III–IV стадии – 27 человек). Высокая интенсивность окраски на CD163 (более чем в 35 % клеток в инфильтрате) отмечалась у 38,7 % пациентов (29 из 75 человек), в то время как низкая – у 61,3 %

[54]. В настоящем исследовании, наоборот, чаще встречалась более выраженная окраска на CD163: умеренная/выраженная интенсивность наблюдались в 66,7 % случаев, в то время как отсутствие/низкая интенсивность – в 30,4 % случаев. При этом в ходе многофакторного анализа Kim Y.J. et al. (2020) показали, что высокая экспрессия CD163 увеличивает риски летального исхода (общая выживаемость) в 2,62 раза (95% ДИ: 1,39–4,88; p = 0,033), в то время как аналогичной взаимосвязи для безрецидивной выживаемости выявлено не было (p = 0,159) [54]. Однако в работе Tremble L.F. et al. (2020) при проведении анализа выживаемости интенсивность экспрессии CD163 при распространенных формах меланомы кожи не оказывала влияния на общую выживаемость [60], так же как и по данным Logu F.D. et al. (2021) на выборке пациентов со II–III стадиями заболевания [61]. В настоящем исследовании, как было сказано выше, интенсивность окраски на CD163 в узловой форме меланомы кожи (вертикальная фаза роста) I–II стадий не влияла на безрецидивную выживаемость пациентов.

Ряд исследователей, наоборот, показывали неблагоприятную прогностическую роль CD163+ макрофагов при меланоме кожи. Так, Massi D. et al. (2019) установили, что низкая экспрессия CD163 макрофагов при распространенных формах меланомы кожи ассоциирована с большей вероятностью ответа на терапию ингибиторами МАРК, большей длительностью безрецидивной и общей выживаемости [126], что подтверждалось также данными Falleni M. et al. (2017). Foks M. et al. (2019) показали, что большая интенсивность CD163+ ассоциирована с большей толщиной опухоли по Бреслоу, большей плотностью сосудистого компонента опухоли [128]. Согласно Zúñiga-Castillo M. et al. (2018), увеличение CD163 макрофагов в акральной меланоме связано с наличием изъязвлений в опухоли и большей митотической активностью и развитием метастазов [137], что несколько противоречило результатам настоящего и вышеописанных исследований.

Для оценки безрецидивной и общей выживаемости пациентов с локальными стадиями меланомы кожи предлагаются различные прогностические модели,

каждая из которых стремится улучшить уже имеющиеся варианты, основанные на стандартных клинико-морфологических факторах риска. Так, Mulder E.A.P. Evalyn et al. (2022) предложили модель для оценки рисков безрецидивной выживаемости пациентов с локальными стадиями меланомы кожи на основе возраста и толщины опухоли по Бреслоу в качестве стандартных факторов риска, дополненных экспрессией ряда генов (ITGB3, PLAT, SERPINE2, GDF15, TGFBR1, LOXL4, CXCL8, MLANA). Исследователи показали, что предложенная шкала может эффективно классифицировать пациентов с локальными стадиями меланомы кожи в зависимости от риска рецидива (высокий и низкий риски) [133]. Shannon B. Adrienne et al. (2022) разработали модель для оценки опухоль-специфической выживаемости пациентов с локальными стадиями меланомы кожи, включающую возраст пациентов, мужской пол, размер опухоли, наличие микросателлитов, количество регионарных лимфатических узлов с метастазами и состояние иммуносупрессии [31].

В сентябре 2023 г. был опубликован систематический обзор литературы, в котором оценивались прогностические модели для выживаемости, рецидива и метастазирования меланомы кожи локальных стадий. В 15 исследованиях было продемонстрировано 20 моделей, каждая из которых включала от 3 до 10 предикторов злокачественности. Наиболее часто в модели включались следующие факторы: наличие изъязвлений (17 из 20 моделей), толщина опухоли по Бреслоу (16 из 20), социодемографический статус (15 из 20), локализация опухоли (14 из 20), поражение лимфатических узлов (7 из 20). Реже учитывались такие параметры, как уровень инвазии опухоли по Кларку, митотический индекс, подтип меланомы, фаза роста, наличие микросателлитов, стадия [108]. При этом ни одна из предлагаемых прогностических моделей для меланомы кожи не учитывала изучаемые нами молекулярно-генетические факторы риска. В рамках настоящей работы нами были построены 3 модели для оценки прогноза локальных стадий меланомы кожи. Первая включала классические факторы риска (митотический индекс, наличие изъязвлений и толщину опухоли по Бреслоу), вторая – стволовые

опухолевые клетки меланомы ABCB5 и CD133 с учетом фазы роста опухоли, а третья – наличие гиперэкспрессии ALK также с учетом фазы роста опухоли. Каждая из моделей обладала способностью прогнозировать исход заболевания, однако дополнительно мы выполнили сравнение данных моделей с выявлением наилучшей для оценки общей и безрецидивной выживаемости пациентов. Оказалось, что для оценки безрецидивной выживаемости наилучшей моделью во все временные интервалы (до 60 месяцев) является модель с классическими факторами риска. Для оценки общей выживаемости пациентов в 3-летний временной интервал целесообразно использовать модель, включающую стволовые опухолевые клетки ABCB5 и CD133, а также фазу роста меланомы кожи, которая обладает большей прогностической точностью по сравнению с классическими факторами риска. Аналогичные исследования для сравнения в настоящий момент отсутствуют.

Единственной работой, где изучаемые нами стволовые опухолевые клетки ABCB5 и CD133 сравнивались с классическими факторами риска меланомы кожи I–III стадий, стало исследование Gazzaniga P. et al. (2010), однако поправки на фазу роста опухоли исследователи не вводили, а в качестве гистологического материала для исследования выступали сторожевые лимфатические узлы 65 пациентов. В ходе работы было показано, что ABCB5 и CD133 не были ассоциированы с общей выживаемостью пациентов, а наиболее важным прогностическим фактором оказался статус сторожевых лимфатических узлов, который также рассматривался в качестве стандартного фактора риска [40].

При этом в настоящей работе модель прогноза для оценки риска прогрессирования у пациентов с меланомой кожи туловища и конечностей локализованных стадий, включающая наличие стволовых опухолевых клеток с маркером ABCB5+ (ОР = 3,102; 95% ДИ: 0,881–10,924; p = 0,078) и узловую форму опухоли (ОР = 2,930; 95% ДИ: 0,942–9,113; p = 0,063), продемонстрировала независимую прогностическую значимость в 5-летний интервал по сравнению со стандартными патоморфологическими факторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогнозирование течения меланомы кожи и разработка персонализированных подходов к лечению и диагностике является перспективной тактикой ведения пациентов. Каждая опухоль обладает своими уникальными биологическими особенностями, в связи с чем стало понятно, что стандартные факторы прогноза меланомы кожи не могут в полной степени предсказать дальнейшее поведение опухоли. Современные генетические панели прогноза обладают намного большей прогностической значимостью, однако не учитывают изменчивую биологию опухоли на разных этапах развития и ее иммунное окружение. Генетические панели не помогли понять механизмы приобретения признаков агрессивности, а также слишком дороги для рутинного применения на практике.

В настоящей работе мы изучали некоторые молекулярные и иммунологические факторы прогноза, способные стать независимыми. Так, нами были проанализированы материалы 72 пациентов с локальной меланомой кожи, где помимо стандартных патоморфологических факторов мы исследовали экспрессию стволовых клеток опухоли (CD133, ABCB5), М2-макрофагов (CD163), ALK. В своей работе мы оценивали данные безрецидивной выживаемости и общей выживаемости как главные показатели.

Проведенное нами исследование, направленное на оценку вклада молекулярных и иммунологических факторов прогноза для оценки злокачественности меланомы кожи, расширило представления о биологических свойствах злокачественного процесса. Их изучение выявило, что некоторые из этих биомаркеров в комбинации с оценкой фазы роста меланомы кожи могут предсказывать снижение 5-летней безрецидивной или общей выживаемости пациентов, независимо от стандартных общепринятых прогностических факторов, лишь незначительно им уступая.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы:**

1. Стволовые опухолевые клетки при поверхностно-распространяющихся

и узловых формах меланомы кожи I и II стадий встречаются у 36,7 % и 50,0 % (p = 0,545) и у 33,3 % и 36,7 % пациентов соответственно (p = 0,938). Сильным и независимым фактором неблагоприятного прогноза при меланоме кожи туловища и конечностей является ее узловая форма (вертикальная фаза роста): риски прогрессии увеличиваются в 7,19 раза. Риски летального исхода при наличии стволовых опухолевых клеток с ABCB5+ увеличиваются в 3,71 раза (p = 0,041), независимо от наличия маркера CD133+.

2. Экспрессия белка ALK на опухолевых клетках отмечалась у 10 % пациентов с поверхностно-распространяющимися и у 22,2 % с узловыми формами меланомы кожи I–II стадий (p = 0,245). Наличие в опухоли экспрессии данного белка увеличивает риски прогрессии меланомы кожи в 4,29 раза (95% ДИ: 1,200–15,323; p = 0,025), но при этом не влияет на общую выживаемость пациентов.

3. Макрофаги фенотипа M2 присутствуют в опухолевом микроокружении у 95,8 % пациентов с узловыми формами меланомы кожи, в 66,7 % случаев их интенсивность является умеренной и выраженной. Их наличие и выраженность не влияют на выживаемость пациентов с узловой формой меланомы.

4. Модель прогноза для оценки риска прогрессирования у пациентов с меланомой кожи туловища и конечностей локализованных стадий, включающая наличие стволовых опухолевых клеток с маркером ABCB5+ (ОР = 3,102; 95% ДИ: 0,881–10,924; p = 0,078) и узловую форму опухоли (ОР = 2,930; 95% ДИ: 0,942–9,113; p = 0,063), продемонстрировала независимую прогностическую значимость в 5-летний интервал по сравнению со стандартными патоморфологическими факторами.

Обобщение результатов проведенного исследования позволяет сформулировать следующие **практические рекомендации**:

1. Пациентам с меланомой кожи туловища и конечностей I–II стадий с помощью иммуногистохимического исследования и маркера ABCB5 для более точного прогноза заболевания целесообразно определять стволовые опухолевые клетки.

2. При динамическом наблюдении за пациентами с меланомой кожи I–II

стадий после окончания лечения целесообразно учитывать дополнительные неблагоприятные факторы прогноза заболевания такие, как наличие стволовых опухолевых клеток и узловую форму опухоли. При наличии у пациентов данных факторов, повышающих риск прогрессирования опухолевого процесса, врачам-онкологам необходимо отдавать предпочтение более частому и углубленному их обследованию с осмотром всего кожного покрова и использованием инструментальных методов диагностики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДИ – доверительный интервал

ИГХ – иммуногистохимия

ОР – отношение рисков

ЦНС – центральная нервная система

ABCB5 – ABC-транспортер, маркер стволовых клеток опухоли

ALK – anaplastic lymphoma kinase (киназа анапластической лимфомы)

CAPE – фенетиловый эфир кофейной кислоты

CD133 трансмембранный протеин, ассоциирующийся со стволовыми клетками опухоли

CSD – кумулятивное солнечное повреждение

TILs – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, лимфоцитарная инфильтрация

TNF-α – фактор некроза опухоли-альфа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Взаимосвязь между пролиферативной активностью, содержанием кровеносных и лимфатических сосудов в опухоли и метастазированием в регионарные лимфатические узлы при меланоме кожи / Н. П. Бгатова, А. И. Ломакин, Ю. С. Таскаева [и соавт.] // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям : материалы XIV Международной научно-практической конференции памяти академика Ю. И. Бородина (г. Новосибирск, 26–27 марта 2021 г.) – Новосибирск, 2021. – Т. 1. – С. 61-64.

2. Ганусевич, О. Н. Современные подходы к системному лечению меланомы кожи / О. Н. Ганусевич, Т. Н. Нестерович, И. В. Федоркевич // Новости хирургии. – 2022. – Т. 30, № 6. – С. 583-591.

3. Зарецкий, А. Р. Биомаркеры при метастатической меланоме кожи: можем ли мы точнее выбирать тактику лечения наших пациентов? / А. Р. Зарецкий, Л. В. Демидов, И. В. Самойленко // Медицинский совет. – 2021. – № 9. – С. 48-63.

4. Камбулова, А. В. Злокачественные меланоцитарные поражения акральной локализации: клинико-морфологическая диагностика / А. В. Камбулова, В. С. Будылина // Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты. SMART: Samara Medical Articl : тезисы XVI Всероссийской (90-й итоговой) студенческой научной конференции СНО с международным участием (г. Самара, 13–14 апреля 2022 г.). – Самара : Самарский государственный медицинский университет, 2022. – С. 482-484.

5. Красникова, К. А. Иммуногистохимические маркеры для диагностики меланомы (обзор литературы) / К. А. Красникова, А. Б. Ачилов, Е. В. Балацюк // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии : материалы VII Всероссийской научно-практической конференции (г. Ульяновск, 28 мая 2024 г). – Чебоксары : Изд. дом “Среда”, 2024. – С. 96-100.

6. Малишевская, Н. П. Злокачественное лентиго и лентиго-меланома:

трудности дифференциальной диагностики / Н. П. Малишевская, А. В. Соколова, М. М. Кохан // Клиническая дерматология и венерология. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 89-94.

7. Меланома кожи и слизистых оболочек. Клинические рекомендации. – Москва, 2023. – 139 с.

8. Меланома, молекулярно-генетические аспекты этиопатогенеза: классификация, этиология, факторы риска, BRAF, NRAS мутации / Т. П. Казубская, Л. В. Мехеда, Е. И. Трофимов [и соавт.] // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № 6. – С. 726-732.

9. Место и время повторному назначению BRAF/MEK-ингибиторов в лечении диссеминированной меланомы кожи / А. В. Пудина, Р. В. Орлова, Н. В. Жукова, В. В. Овсяников // Эффективная фармакотерапия. – 2024. – Т. 20, № 5. – С. 62-67.

10. Морфологический и иммуногистохимический анализ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, М2-макрофагов, BCL6 и SOX10 в опухолевом микроокружении узловой меланомы кожи / К. С. Титов, А. А. Маркин, Е. И. Шурыгина [и соавт.] // Опухоли головы и шеи. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 65-74.

11. Некоторые молекулярно-генетические и гистопатологические аспекты анализа предрасположенности к развитию меланомы / Е. И. Антонова, А. В. Куницына, А. В. Ачилов, Н. В. Фирсова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2024. – Т. 2 (140). – С. 1-7.

12. Николаева, Е. А. Прогностические факторы метастазирования меланомы кожи в сторожевые лимфатические узлы / Е. А. Николаева, А. С. Крылов, А. Д. Рыжков // Digital diagnostics. – 2021. – Т. 2, № S1. – С. 34-35.

13. Оценка уровня осведомленности лиц молодого возраста о меланоме и ее профилактике / А. В. Сатырева, И. В. Напреенко, Л. Ф. Азимова, Д. В. Гриева // Студенческий вестник. – 2021. – Т. 8-2 (153). – С. 53-56.

14. Прогноз выживаемости при меланоме различной стадии / В. В. Гонтарь, Е. А. Шмальц, Т. В. Косенкова, С. А. Ральченко // Академический

журнал западной Сибири. – 2021. – Т. 17, № 3 (92). – С. 58-59.

15. Рисс, М. Е. Выявление ранних признаков поверхностно-распространяющихся меланом с использованием компьютерных технологий / М. Е. Рисс, К. П. Нумерицкая // Вестник Новгородского государственного университета. – 2021. – № 4 (129). – С. 97-99.

16. Роль новой изоформы ALK в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи / К. С. Титов, А. А. Маркин, А. М. Казаков, С. В. Чулкова // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20, № 4. – С. 33-41.

17. Романова, О. А. Низкая информированность поликлинических врачей – причина запущенности поверхностно-распространяющейся меланомы кожи / О. А. Романова, Н. Г. Артемьева, М. Г. Безлепко // Лечащий врач. – 2021. – № 5. – С. 38-42.

18. Селицкая, О. В. Особенности узловой меланомы: анализ клинического случая [Электронный ресурс] / О. В. Селицкая // Современные проблемы науки и образования. – 2024. – № 5. – Режим доступа: https://science-education.ru/ru/article/view?id=33661

19. Сибилева, О. Ю. Эпидемиология рака легкого и роль молекулярно-генетического исследования в тераностике заболевания (краткий обзор литературы) / О. Ю. Сибилева, Н. В. Ромашкина // Вестник новых медицинских технологий. – 2023. – Т. 30, № 2. – С. 92-96.

20. Современные представления о клиникоэпидемических и молекулярно-генетических особенностях меланомы кожи и слизистых / В. А. Богданова, Л. В. Спирина, С. Ю. Чижевская [и соавт.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2024. – Т. 11, № 1. – С. 22-30.

21. Соколова, О. В. Анализ заболеваемости злокачественной меланомы кожи на региональном уровне / О. В. Соколова, Ю. С. Шах-Пароньянц, К. С. Алексеева // Современная организация лекарственного обеспечения. – 2021. – Т. 8, № 1. – С. 82-83.

22. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / под редакцией А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва :

МНИОИ им. П. А. Герцена − филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 262 с.

23. Титов, К. С. Молекулярные и иммунологические факторы прогноза локальной меланомы кожи / К. С. Титов, А. А. Маркин // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, № 3S. – С. 484-485.

24. Эпидемиология меланомы кожи в Российской Федерации и в городе Москве за 10 лет (2008–2018 гг.) / Н. Н. Потекаев, К. С. Титов, А. А. Маркин, А. Ю. Кашурников // Клиническая дерматология и венерология. – 2020. – Т. 19, № 6. – С. 810-816.

25. A machine learning model reveals expansive downregulation of ligand-receptor interactions that enhance lymphocyte infiltration in melanoma with developed resistance to immune checkpoint blockade / S. Sahni, B. Wang, D. Wu [et al.] // Nature communications. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 8867.

26. ABCB5 promotes melanoma metastasis through enhancing NF-κB p65 protein stability / S. Wang, L. Tang, J. Lin [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – Vol. 492, № 1. – P. 18-26.

27. ALK expression favorably impacts the prognosis of NRAS-mutated metastatic melanomas / S. Osella-Abate, E. Mereu, E. Pellegrino [et al.] // Oncology letters. – 2018. – Vol. 16, № 6. – P. 7091-7096.

28. ALK Inhibitor Response in Melanomas Expressing EML4-ALK Fusions and Alternate ALK Isoforms / K. L. Couts, J. Bemis, J. A. Turner [et al.] // Molecular cancer therapeutics. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 222-231.

29. Al-Mobeireek, A. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services / A. Al-Mobeireek // Saudi medical journal. – 2024. – Vol. 45, № 3. – P. 326-327.

30. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in cancer / T. Wiesner, W. Lee, A. C. Obenauf [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 526, № 7573. – P. 453-457.

31. An Internally Validated Prognostic Risk-Score Model for Disease-Specific Survival in Clinical Stage I and II Merkel Cell Carcinoma / A. B. Shannon, R. J. Straker

3rd, M. J. Carr [et al.] // Annals of surgical oncology. – 2022. – Vol. 29, № 11. – P. 7033-7044.

32. Antitumour mechanisms of traditional Chinese medicine elicited by regulating tumour-associated macrophages in solid tumour microenvironments / J. Gao, W. Tan, L. Yuan [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10, № 5. – P. e27220.

33. Assessment of melanoma-initiating cell markers and conventional parameters in sentinel lymph nodes of malignant melanoma / N. Suzuki, M. Tanaka, Y. Shirafuji [et al.] // Acta medica Okayama. – 2015. – Vol. 69, № 1. – P. 17-27.

34. Atypical Spitzoid Neoplasms in Childhood: A Molecular and Outcome Study / C. Y. Lee, L. M. Sholl, B. Zhang [et al.] // The American Journal of dermatopathology. – 2017. – Vol. 39, № 3. – P. 181-186.

35. Berberine mediates tumor cell death by skewing tumor-associated immunosuppressive macrophages to inflammatory macrophages / D. Shah, N. Challagundla, V. Dave [et al.] // Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology. – 2022. – Vol. 99. – P. 153904.

36. Bobos, M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update / M. Bobos // Italian journal of dermatology and venereology. – 2021. – Vol. 156, № 3. – P. 300-321.

37. Breslow density ability to predict melanoma survival: should it be used in clinical practice? / P. Gil-Pallares, O. Figueroa-Silva, L. Taboada-Paz [et al.] // Clinical and experimental dermatology. – 2024. – Vol. 50, № 1. – P. 56-61.

38. Carvajal, R. Extracutaneous Melanoma / R. Carvajal, R. Maniar // Hematology/oncology clinics of North America. – 2021. – Vol. 35, № 1. – P. 85–98.

39. CD10 expression by melanoma cells is associated with aggressive behavior in vitro and predicts rapid metastatic progression in humans / M. Thomas-Pfaab, J.-P. Annereau, C. Munsch [et al.] // Journal of dermatological science. – 2013. – Vol. 69, № 2. – P. 105-113.

40. CD133 and ABCB5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients / P. Gazzaniga, E. Cigna, V. Panasiti [et al.] // European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the

British Association of Surgical Oncology. – 2010. – Vol. 36, № 12. – P. 1211-1214.

41. CD133 Antigen as a Potential Marker of Melanoma Stem Cells: In Vitro and In Vivo Studies / T. Kloskowski, J. Jarząbkowska, A. Jundziłł [et al.] // Stem cells international. – 2020. – Vol. 2020. – P. 8810476.

42. CD133 Is Associated with Increased Melanoma Cell Survival after Multikinase Inhibition / C. M. Simbulan-Rosenthal, A. Gaur, H. Zhou [et al.] // Journal of oncology. – 2019. – Vol. 2019. – P. 6486173.

43. CD133 Stimulates Cell Proliferation via the Upregulation of Amphiregulin in Melanoma / C. M. Simbulan-Rosenthal, N. Islam, Y. Haribabu [et al.] // Cells. – 2024. – Vol. 13, № 9. – P. 777.

44. CD133+ cell content correlates with tumour growth in melanomas from skin with chronic sun-induced damage / I. González-Herrero, I. Romero-Camarero, J. Cañueto [et al.] // The British journal of dermatology. – 2013. – Vol. 169, № 4. – P. 830-837.

45. $CD133^{+}$ melanoma subpopulation acquired resistance to caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis is attributed to the elevated expression of ABCB5: significance for melanoma treatment / A. El-Khattouti, N. T. Sheehan, J. Monico [et al.] // Cancer letters. – 2015. – Vol. 357, № 1. – P. 83-104.

46. CD133-Dependent Activation of Phosphoinositide 3-Kinase /AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Melanoma Progression and Drug Resistance / N. Kharouf, T. W. Flanagan, A. A. Alamodi [et al.] // Cells. – 2024. – Vol. 13, № 3. – P. 240.

47. Characterizing CD133 and NANOG Expression in Melanoma: Associations with Histological and Epidemiological Parameters / A.-H. Sabău, R. Niculescu, I.-G. Cocuz [et al.] // Medicina (Kaunas, Lithuania). – 2024. – Vol. 60, № 10. – P. 1658.

48. Circulating tumour DNA in patients with advanced melanoma treated with dabrafenib or dabrafenib plus trametinib: a clinical validation study / M. M. Syeda, J. M. Wiggins, B. C. Corless [et al.] // The Lancet. Oncology. – 2021. – Vol. 22, № 3. – P. 370-380.

49. Clinical, dermatoscopic, histological and molecular predictive factors of distant melanoma metastasis: A systematic review and meta-analysis / K. Lallas,

A. Kyrgidis, A. Chrysostomidis [et al.] // Critical reviews in oncology/hematology. – 2024. – Vol. 202. – P. 104458.

50. Clinical, histopathologic, and genomic features of Spitz tumors with ALK fusions / I. Yeh, A. de la Fouchardiere, D. Pissaloux [et al.] // The American journal of surgical pathology. – 2015. – Vol. 39, № 5. – P. 581-591.

51. Clinical, Morphological and Molecular Features of Spitz tumors / M. Donati, B. Mansour, M. Hagstrom [et al.] // Ceskoslovenska patologie. – 2024. – Vol. 60, № 1. – P. 35-48.

52. Clonal dominance of CD133+ subset population as risk factor in tumor progression and disease recurrence of human cutaneous melanoma / B. K. Sharma, V. Manglik, M. O'Connell [et al.] // International journal of oncology. – 2012. – Vol. 41, № 5. – P. 1570-1576.

53. Co-expression of putative cancer stem cell markers, CD133 and Nestin, in skin tumors / M. N. Sabet, A. Rakhshan, E. Erfani, Z. Madjd // Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. – 2014. – Vol. 15, № 19. – P. 8161-8169.

54. Correlation Between Tumor-Associated Macrophage and Immune Checkpoint Molecule Expression and Its Prognostic Significance in Cutaneous Melanoma / Y. J. Kim, C. H. Won, M. W. Lee [et al.] // Journal of clinical medicine. – 2020. – Vol. 9, № 8. – P. 2500.

55. Could the mitotic count improve personalized prognosis in melanoma patients? / A. Buja, M. Rugge, C. Cozzolino [et al.] // PloS one. – 2024. – Vol. 19, № 4. – P. e0302309.

56. Deacon, D. C. Molecular Biomarkers for Melanoma Screening, Diagnosis and Prognosis: Current State and Future Prospects / D. C. Deacon, E. A. Smith, R. L. Judson-Torres // Frontiers in medicine. – 2021. – Vol. 8. – P. 642380.

57. Deciphering the immune reaction leading to spontaneous melanoma regression: initial role of MHCII(+) CD163(-) macrophages / F. Blanc, N. Bertho, G. Piton [et al.] // Cancer immunology, immunotherapy : CII. – 2023. – Vol. 72, № 11. – P. 3507-3521.

58. Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment:

a call for precision immunotherapy / B. Toledo, L. Zhu Chen, M. Paniagua-Sancho [et al.] // Journal of hematology & oncology. – 2024. – Vol. 17, № 1. – P. 44.

59. Different expression of BRAFV600E, ALK and PD-L1 in melanoma in children and adolescents: a nationwide retrospective study in Finland in 1990-2014 / E. K. Rousi, I. O. Koskivuo, S. M. Juteau [et al.] // Acta oncologica (Stockholm, Sweden). – 2021. – Vol. 60, № 2. – P. 165-172.

60. Differential association of CD68(+) and CD163(+) macrophages with macrophage enzymes, whole tumour gene expression and overall survival in advanced melanoma / L. F. Tremble, M. McCabe, S. P. Walker [et al.] // British journal of cancer. – 2020. – Vol. 123, № 10. – P. 1553-1561.

61. Digital Immunophenotyping Predicts Disease Free and Overall Survival in Early Stage Melanoma Patients / F. De Logu, F. Galli, R. Nassini [et al.] // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 2. – P. 422.

62. Dual-procedural separation of CTCs in cutaneous melanoma provides useful information for both molecular diagnosis and prognosis / M. Tucci, S. D'Oronzo, F. Mannavola [et al.] // Therapeutic advances in medical oncology. – 2020. – Vol. 12. – P. 1758835920905415.

63. Effect of melanoma stem cells on melanoma metastasis / Q. Yin, X. Shi, S. Lan [et al.] // Oncology letters. – 2021. – Vol. 22, № 1. – P. 566.

64. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Gene Signature in Circulating Melanoma Cells: Biological and Clinical Relevance / M. C. Rapanotti, E. Cugini, E. Campione [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11792.

65. Expression of CD133 cancer stem cell marker in melanoma: a systematic review and meta-analysis / Z. Madjd, E. Erfani, E. Gheytanchi [et al.] // The International journal of biological markers. – 2016. – Vol. 31, № 2. – P. e118-25.

66. Factors Affecting Recurrence and Survival for Patients with High-Risk Stage II Melanoma / A. Dedeilia, T. Lwin, S. Li [et al.] // Annals of surgical oncology. – 2024. – Vol. 31, № 4. – P. 2713-2726.

67. Ferrara, G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic

Neoplasms: Suggestions From Routine Practice / G. Ferrara, G. Argenziano // Frontiers in oncology. – 2021. – Vol. 11. – P. 675296.

68. Fujimura, T. Significance of Immunosuppressive Cells as a Target for Immunotherapies in Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancers / T. Fujimura, S. Aiba // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, № 8. – P. 1087.

69. Gene Expression Profile of Benign, Intermediate, and Malignant Spitz and Spitzoid Melanocytic Lesions / A. Giubellino, Y. He, S. A. Munro [et al.] // Cancers. – 2024. – Vol. 16, № 10. – P. 1798.

70. Genetically engineered nanomodulators elicit potent immunity against cancer stem cells by checkpoint blockade and hypoxia relief / Y. Pan, L. Yu, L. Liu [et al.] // Bioactive materials. – 2024. – Vol. 38. – P. 31-44.

71. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy / T. Wiesner, H. Kutzner, L. Cerroni [et al.] // Pathology. – 2016. – Vol. 48, № 2. – P. 113-131.

72. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma / Cancer Genome Atlas Network // Cell. – 2015. – Vol. 161, № 7. – P. 1681-1696.

73. Gerard, L. The uniqueness of ABCB5 as a full transporter ABCB5FL and a half-transporter-like ABCB5β / L. Gerard, J.-P. Gillet // Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.). – 2024. – Vol. 7. – P. 29.

74. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid metabolite (AMPA) modulate the phenotype of murine melanoma B16-F1 cells / Y. C. de S. Salgado Kiefer, M. B. Ferreira, J. Z. da Luz [et al.] // Environmental toxicology and pharmacology. – 2024. – Vol. 107. – P. 104429.

75. Gosman, L. M. Cutaneous Melanoma: A Review of Multifactorial Pathogenesis, Immunohistochemistry, and Emerging Biomarkers for Early Detection and Management / L. M. Gosman, D.-A. Țăpoi, M. Costache // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24, № 21. – P. 15881.

76. Heme Oxygenase-1 Has a Greater Effect on Melanoma Stem Cell Properties Than the Expression of Melanoma-Initiating Cell Markers / A. Kusienicka, K. Bukowska-Strakova, M. Cieśla [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2022. –

Vol. 23, № 7. – P. 3596.

77. How does the mitotic index impact patients with T1 melanoma? Comparison between the 7th and 8th edition of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system / A. Z. Antonialli, E. Bertolli, M. P. de Macedo [et al.] // Anais brasileiros de dermatologia. – 2020. – Vol. 95, № 6. – P. 691-695.

78. Identification of anaplastic lymphoma kinase break points and oncogenic mutation profiles in acral/mucosal melanomas / H.-T. Niu, Q.-M. Zhou, F. Wang [et al.] // Pigment cell & melanoma research. – 2013. – Vol. 26, № 5. – P. 646-653.

79. Identification of two novel heterodimeric ABC transporters in melanoma: ABCB5β/B6 and ABCB5β/B9 / L. Gerard, L. Duvivier, M. Fourrez [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2024. – Vol. 300, № 2. – P. 105594.

80. Immunomagnetic-Enriched Subpopulations of Melanoma Circulating Tumour Cells (CTCs) Exhibit Distinct Transcriptome Profiles / C. Aya-Bonilla, E. S. Gray, J. Manikandan [et al.] // Cancers. – 2019. – Vol. 11, № 2. – P. 157.

81. Inhibition of LILRB2 by a Novel Blocking Antibody Designed to Reprogram Immunosuppressive Macrophages to Drive T-Cell Activation in Tumors / B. Umiker, Y. Hashambhoy-Ramsay, J. Smith [et al.] // Molecular cancer therapeutics. – 2023. – Vol. 22, № 4. – P. 471-484.

82. Innate immune cell infiltration in melanoma metastases affects survival and is associated with BRAFV600E mutation status / N. Dabrosin, K. Sloth Juul, J. Bæhr Georgsen [et al.] // Melanoma research. – 2019. – Vol. 29, № 1. – P. 30-37.

83. Integrative molecular and spatial analysis reveals evolutionary dynamics and tumor-immune interplay of in situ and invasive acral melanoma / H. Liu, J. Gao, M. Feng [et al.] // Cancer cell. – 2024. – Vol. 42, № 6. – P. 1067-1085.e11.

84. Is the presence of tumor-infiltrating lymphocytes predictive of outcomes in patients with melanoma? / S. L. Morrison, G. Han, F. Elenwa [et al.] // Cancer. – 2022. – Vol. 128, № 7. – P. 1418-1428.

85. Jackett, L. A. Evaluation of Multiple Tissue Levels Frequently Upstages Patients With Clinically Localized Thin Primary Cutaneous Melanoma / L. A. Jackett,

J. P. Gullifer, R. A. Scolyer // Journal of cutaneous pathology. – 2026. – Vol. 53, № 1. – P. 71-80.

86. Keung, E. Z. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care / E. Z. Keung, J. E. Gershenwald // Expert review of anticancer therapy. – 2018. – Vol. 18, № 8. – P. 775-784.

87. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas / T. Wiesner, J. He, R. Yelensky [et al.] // Nature communications. – 2014. – Vol. 5. – P. 3116.

88. Kinase gene fusions in defined subsets of melanoma / J. Turner, K. Couts, J. Sheren [et al.] // Pigment cell & melanoma research. – 2017. – Vol. 30, № 1. – P. 53–62.

89. Lai, C.-Y. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry / C.-Y. Lai, B. E. Schwartz, M.-Y. Hsu // Cancer research. – 2012. – Vol. 72, № 19. – P. 5111-5118.

90. Lowe, E. Podcast on Emerging Treatment Options for Pediatric Patients with ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma and Inflammatory Myofibroblastic Tumors / E. Lowe, Y. P. Mossé // Oncology and therapy. – 2024. – Vol. 12, № 2. – P. 247-255.

91. Lung adenocarcinoma with brain metastasis detected dual fusion of LOC399815-ALK and ALK-EML4 in combined treatment of Alectinib and Cyber Knife: A case report / Y. Li, S. Lu, P. Yao [et al.] // Medicine. – 2024. – Vol. 103, № 3. – P. e36992.

92. Markers of circulating tumour cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression / A. L. Reid, M. Millward, R. Pearce [et al.] // The British journal of dermatology. – 2013. – Vol. 168, № 1. – P. 85-92.

93. Mechanisms of Melanoma Progression and Treatment Resistance: Role of Cancer Stem-like Cells / Y. Al Hmada, R. T. Brodell, N. Kharouf [et al.] // Cancers. – 2024. – Vol. 16, № 2. – P. 470.

94. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitor-targeted therapy and overcoming strategies / X. Ou, G. Gao, I. A. Habaz, Y. Wang // MedComm. – 2024. – Vol. 5, № 9. – P. e694.

95. Melanoma Pathology [Электронный ресурс] / Y. Puckett, A. M. Wilson, F. Farci, C. Thevenin // Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing. – 2024. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459367/.

96. Melanoma risk, tumour stage, and melanoma-specific mortality in individuals with diabetes: a systematic review and meta-analysis / J. E. Tønder, M. L. Bønnelykke-Behrndtz, T. Laurberg [et al.] // BMC cancer. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 812.

97. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual / J. E. Gershenwald, R. A. Scolyer, K. R. Hess [et al.] // CA: a cancer journal for clinicians. – 2017. – Vol. 67, № 6. – P. 472-492.

98. Melanoma-associated macrophages-from molecular signals to therapeutic application / E. Chatziioannou, S. A. Aydin, S. Forchhammer [et al.] // Dermatologie (Heidelberg, Germany). – 2022. – Vol. 73, № 12. – P. 915-928.

99. Minimal Residual Disease in Melanoma:molecular characterization of in transit cutaneous metastases and Circulating Melanoma Cells recognizes an expression panel potentially related to disease progression / M. C. Rapanotti, T. M. S. Viguria, G. Spallone [et al.] // Cancer treatment and research communications. – 2020. – Vol. 25. – P. 100262.

100. Modeling tumor-immune interactions using hybrid spheroids and microfluidic platforms for studying tumor-associated macrophage polarization in melanoma / J. Seo, G. Ha, G. Lee [et al.] // Acta biomaterialia. – 2024. – Vol. 190. – P. 233-246.

101. Molecular Investigation of miRNA Biomarkers as Chemoresistance Regulators in Melanoma: A Protocol for Systematic Review and Meta-Analysis / P. Shaw, G. Raymond, K. S. Tzou [et al.] // Genes. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 115.

102. Monitoring melanoma patients on treatment reveals a distinct macrophage

population driving targeted therapy resistance / J. Vasilevska, P. F. Cheng, J. Lehmann [et al.] // Cell reports. Medicine. – 2024. – Vol. 5, № 7. – P. 101611.

103. Murai, T. Targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway involved in vasculogenic mimicry promoted by cancer stem cells / T. Murai, S. Matsuda // American journal of cancer research. – 2023. – Vol. 13, № 11. – P. 5039-5046.

104. New perspectives for targeting therapy in ALK-positive human cancers / S. Zhao, J. Li, Q. Xia [et al.] // Oncogene. – 2023. – Vol. 42, № 24. – P. 1959-1969.

105. Nguyen, M. Clinicopathological and Molecular Features of Secondary Cancer (Metastasis) to the Thyroid and Advances in Management / M. Nguyen, G. He, A. K.-Y. Lam // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, № 6. – P. 3242.

106. Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133(+) Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis / D. Kumar, S. Kumar, M. Gorain [et al.] // The Journal of investigative dermatology. – 2016. – Vol. 136, № 12. – P. 2462-2474.

107. Pharmacological agents targeting drug-tolerant persister cells in cancer / Y.-C. Chen, K. Gowda, S. Amin [et al.] // Pharmacological research. – 2024. – Vol. 203. – P. 107163.

108. Predictive accuracy of risk prediction models for recurrence, metastasis and survival for early-stage cutaneous melanoma: a systematic review / T. P. Kunonga, R. P. W. Kenny, M. Astin [et al.] // BMJ open. – 2023. – Vol. 13, № 9. – P. e073306.

109. Primary and Metastatic Cutaneous Melanomas Express ALK Through Alternative Transcriptional Initiation / K. J. Busam, R. E. Vilain, T. Lum [et al.] // The American journal of surgical pathology. – 2016. – Vol. 40, № 6. – P. 786-795.

110. Profiling of ABC transporters ABCB5, ABCF2 and nestin-positive stem cells in nevi, in situ and invasive melanoma / N. Setia, O. Abbas, Y. Sousa [et al.] // Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2012. – Vol. 25, № 8. – P. 1169-1175.

111. Prognostic impact of the putative cancer stem cell markers ABCG2, CD133, ALDH1A1 and CD44V7/8 in metastatic melanoma / L. Speigl, N. Janssen, B. Weide [et al.] // Br J Dermatol. – 2017. – Vol. 177, № 5. – P. 1447-1449.

112. Prognostic Role of Clinicopathological Characteristics and Serum Markers in Metastatic Melanoma Patients Treated with BRAF and MEK Inhibitors / E. A. Janka, I. L. Szabó, S. Kollár [et al.] // Cancers. – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 2981.

113. Prognostic value of macrophage polarization markers in epithelial neoplasms and melanoma. A systematic review and meta-analysis / Á. López-Janeiro, C. Padilla-Ansala, C. E. de Andrea [et al.] // Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2020. – Vol. 33, № 8. – P. 1458-1465.

114. Prognostic Value of Tumor Stem Cells and Anaplastic Lymphoma Kinase Expression in Patients with Primary Cutaneous Melanoma / T. Sergeevich, K. Mikhailovich, B. Anatolievna [et al.] // Journal of Cancer Treatment and Research. – 2019. – Vol. 7. – P. 62.

115. Proliferating macrophages in human tumours show characteristics of monocytes responding to myelopoietic growth factors / S. M. Park, C.-J. J. Chen, D. J. Verdon [et al.] // Frontiers in immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1412076.

116. Putative Cancer Stem Cell Markers are Frequently Expressed by Melanoma Cells in Vitro and in Situ but are also Present in Benign Differentiated Cells / L. Speigl, N. Janssen, B. Weide [et al.] // Frontiers in bioscience (Landmark edition). – 2023. – Vol. 28, № 9. – P. 193.

117. Roh-Johnson, M. Macrophage-Dependent Cytoplasmic Transfer during Melanoma Invasion In Vivo / M. Roh-Johnson, A. N. Shah, J. A. Stonick [et al.] // Developmental cell. – 2017. – Vol. 43, № 5. – P. 549-562.e6. 95

118. Saifullah Integrated analysis of the clinical consequence and associated gene expression of ALK in ALK-positive human cancers / Saifullah, T. Tsukahara // Heliyon. – 2022. – Vol. 8, № 7. – P. e09878.

119. Single-cell RNA sequencing reveals melanoma cell state-dependent heterogeneity of response to MAPK inhibitors / S. Y. Lim, Y. Lin, J. H. Lee [et al.] // EBioMedicine. – 2024. – Vol. 107. – P. 105308.

120. Spatiotemporal trends of the global burden of melanoma in 204 countries

and territories from 1990 to 2019: Results from the 2019 global burden of disease study / Z. Li, Y. Fang, H. Chen [et al.] // Neoplasia (New York). – 2022. – Vol. 24, № 1. – P. 12–21.

121. Stem cell properties in cell cultures from different stage of melanoma progression / C. Magnoni, S. Giudice, G. Pellacani [et al.] // Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM. – 2014. – Vol. 22, № 3. – P. 171-181.

122. Stem-Mesenchymal Signature Cell Genes Detected in Heterogeneous Circulating Melanoma Cells Correlate With Disease Stage in Melanoma Patients / M. C. Rapanotti, E. Campione, T. M. Suarez Viguria [et al.] // Frontiers in molecular biosciences. – 2020. – Vol. 7. – P. 92.

123. Studies on the effect and mechanism of CD147 on melanoma stem cells / Y. Jiang, R. Liang, L. Li, J. Guan // Allergologia et immunopathologia. – 2024. – Vol. 52, № 1. – P. 71-78.

124. Suitability of CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells in Melanoma / P. Korn, A. Kampmann, S. Spalthoff [et al.] // Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. – 2021. – Vol. 22, № 5. – P. 1591-1597.

125. Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma / I. Yeh, E. Jorgenson, L. Shen [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 2019. – Vol. 111, № 10. – P. 1068-1077.

126. The density and spatial tissue distribution of CD8(+) and CD163(+) immune cells predict response and outcome in melanoma patients receiving MAPK inhibitors / D. Massi, E. Rulli, M. Cossa [et al.] // Journal for immunotherapy of cancer. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 308.

127. The number and localization of CD68+ and CD163+ macrophages in different stages of cutaneous melanoma / S. Salmi, H. Siiskonen, R. Sironen [et al.] // Melanoma research. – 2019. – Vol. 29, № 3. – P. 237-247.

128. The number of CD163 positive macrophages is associatedwith more advanced skin melanomas, microvessels density and patient prognosis / M. Foks, M. Wągrowska-Danilewicz, M. Danilewicz [et al.] // Polish journal of pathology : official

journal of the Polish Society of Pathologists. – 2019. – Vol. 70, № 3. – P. 217-222.

129. The potential diagnostic and predictive role of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene alterations in melanocytic tumors / A. Ronchi, M. Montella, I. Cozzolino [et al.] // European review for medical and pharmacological sciences. – 2020. – Vol. 24, № 7. – P. 3829-3838.

130. The β Isoform of Human ATP-Binding Cassette B5 Transporter, ABCB5β, Localizes to the Endoplasmic Reticulum / A. M. Díaz-Anaya, L. Gerard, M. Albert [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24, № 21. – P. 15847.

131. Transforming Growth Factor-β/Smad Signaling Inhibits Melanoma Cancer Stem Cell Self-Renewal, Tumor Formation and Metastasis / J. Boudreault, N. Wang, M. Ghozlan, J.-J. Lebrun // Cancers. – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 224.

132. Tumor-Associated Macrophages: A Potential Target for Cancer Therapy / Y. Tan, M. Wang, Y. Zhang [et al.] // Frontiers in oncology. – 2021. – Vol. 11. – P. 693517.

133. Using a Clinicopathologic and Gene Expression (CP-GEP) Model to Identify Stage I–II Melanoma Patients at Risk of Disease Relapse / E. Mulder, I. Johansson, D. Grunhagen [et al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – P. 2854.

134. Vaienti, S. Topical Treatment of Melanoma In Situ, Lentigo Maligna, and Lentigo Maligna Melanoma with Imiquimod Cream: A Systematic Review of the Literature / S. Vaienti, P. Calzari, G. Nazzaro // Dermatology and therapy. – 2023. – Vol. 13, № 10. – P. 2187-2215.

135. Whiteside, T. L. Immunosuppressive functions of melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients / T. L. Whiteside // Frontiers in cell and developmental biology. – 2022. – Vol. 10. – P. 1080925.

136. Yeh, I. Melanoma pathology: new approaches and classification / I. Yeh, B. C. Bastian // The British journal of dermatology. – 2021. – Vol. 185, № 2. – P. 282-293.

137. Zúñiga-Castillo, M. High density of M2-macrophages in acral lentiginous melanoma compared to superficial spreading melanoma / M. Zúñiga-Castillo, N. V. Pereira, M. N. Sotto // Histopathology. – 2018. – Vol. 72, № 7. – P. 1189–1198.