

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

*На правах рукописи*

**БОРИСОВ**

**Алексей Викторович**

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ,  
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПОВЕРХНОСТНЫХ МЕЛАНОМ КОЖИ  
И ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ  
ЭНДОГЕННЫХ ПИГМЕНТАЦИЙ В ТКАНИ ОПУХОЛИ**

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация  
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Кириллов Юрий Александрович  
доктор медицинских наук

Тюмень, 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЛАНОМ КОЖИ; СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ДИАГНОСТИКИ (обзор литературы) .....	16
1.1. Дефиниции меланом кожи, особенности их эпидемиологии и возникновения .....	16
1.2. Классификация, клинико-морфологические и иммуногистохимические особенности меланом кожи .....	19
1.3. Разновидности реализации эндогенных пигментаций в меланомах кожи .....	30
1.4. Использование рамановской спектроскопии для диагностики опухолевых заболеваний и предопухолевых патологических состояний различных локаций.....	34
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	38
2.1. Характеристика клинического материала .....	38
2.2. Морфологические методы исследования .....	42
2.3. Молекулярно-генетическое исследование поверхностных меланом кожи .....	45
2.4. Метод рамановской спектроскопии .....	45
2.5. Статистическая обработка результатов исследования .....	46
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	48
3.1. Клинико-морфологическая, иммуногистохимическая характеристика поверхностно-распространяющейся меланомы кожи в стадию радиального роста и особенности реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли .....	48

3.2. Клинико-морфологическая, иммуногистохимическая характеристика поверхностно-распространяющейся меланомы кожи в стадию вертикального роста и особенности реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли .....	59
3.3. Оценка диагностического и предиктивного значения результатов иммуногистохимического исследования, лимфоваскулярной инвазии, содержания компонентов-аналитов эндогенных пигментаций и их статистической связи с инвазивной компетентностью поверхностных меланом кожи .....	75
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	97
ВЫВОДЫ .....	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	101
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	104
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА .....	122

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Как правило, в большинстве публикаций, касающихся изложения этиологии, инициации и прогрессирования, клинических и морфологических проявлений, существа морфогенеза новообразований различной локализации в соответствии с правилами *bon ton* приводятся результаты различных исследований по эпидемиологии онкологических заболеваний [33; 78; 79]. Это утверждение полностью применимо и для тех случаев, когда речь заходит об опухолях кожной локализации [7; 11]. Эти статистические данные зачастую становятся фундаментом, на котором зиждется обоснование актуальности предполагаемого исследования. Вероятно, это можно считать вполне логичным и обоснованным, однако отождествлять актуальность научного направления с исключительно статистическими показателями заболеваемости вряд ли оправдано. Актуальность изучения различных аспектов кожных меланом, на долю которых, по разным сведениям, приходится от 72 до 80 процентов [113] всех диагностируемых опухолей, развивающихся из меланинобразующей ткани, определяется прежде всего потребностями практической медицины, регистрирующей, несмотря на достижения частного характера, отсутствие стабильного успеха в их лечении [34]. Свидетельствами актуальности являются также неослабевающий в течение многих лет и сохраняющийся поныне интерес к изучению этиологии, пато- и морфогенеза [66; 143], клинических и морфологических проявлений [12; 59], осложнений и вторичных изменений [138], разработке технологий ранней [4; 67; 73; 108] и дифференциальной диагностики [140] таргетной и иммунотерапии меланомы [87; 115; 119; 145; 164] и высокая публикационная активность её исследователей [43; 60; 105; 109]. Пожалуй, не будет преувеличением отметить, что меланома кожи, ввиду её поверхностной локализации и доступности для мониторинга, является

довольно благодатным объектом для изучения последнего специалистами различных специальностей. В связи с необходимостью осуществления постоянной и подчас непростой дифференциальной диагностики между различными пигментсодержащими новообразованиями и пороками развития кожи [136; 157], с одной стороны, и пигментными и беспигментными меланомами [68; 142], с другой, меланома в настоящее время является тем самым своеобразным оселком, на котором оттачиваются и проверяются истинные квалификация и мастерство патоморфолога. С появлением технологий эпилюминесцентной поверхностной микроскопии (дерматоскопии) [3; 62; 142], глубинной дерматоскопии (сиаскопии) [22] и прочих устройств для оценки существа патологического процесса клиницисты стали обладателями мощного инструмента, способного, если не диагностировать, то, по крайней мере, получить веские основания для аргументированного клинического диагноза меланомы [107]. Патоморфологи, в свою очередь, получили в распоряжение набор прецизионных методов и технологий, включая иммуногистохимическое исследование для определения иммунофенотипа опухоли [48; 58; 77; 86] и молекулярно-генетическое изучение биологических объектов с использованием полимеразно-цепной реакции с целью выявления мутаций различных генов, в частности, BRAF, NRAS [88] и некоторых других [83].

В то же время результаты увеличивающихся год от года экспериментальных исследований по воспроизведению меланомы у лабораторных животных [15; 31; 129] способствовали пониманию существа реализующихся в коже подопытного животного первоначальных, едва осязаемых с помощью обычных клинико-лабораторных методов, стромально-паренхиматозных изменений, знаменующих начало опухолевого роста [31]. Вместе с тем, эти исследования практически не учитывают особенностей реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли. Отсюда актуальной задачей представляется как установление конкретных механизмов пигментации, происходящих в морфологическом субстрате опухоли, так и изучение их сопряженности с реализацией злокачественного потенциала меланомы. Последний, прежде всего, проявляется формированием инвазивной и

метастатической компетентностей, реализующихся посредством сосудистой и периневральной инвазии, и вторичных изменений.

## **Степень разработанности темы исследования**

В силу своей, большей частью, поверхностной локализации и, как следствие, доступности для мониторинга, меланома, по мнению исследователей, не может более считаться *terra incognita* [2; 139]. Мнения исследователей меланомологов, касательно причин и условий возникновения и развития меланомы были ещё в прошлом веке обобщены Clark и McGovern [54; 101], которые отмечали, что «multiconditions» и полиэтиологичность, свойственные некоторым опухолям, для меланомы являются исключительными прерогативами не только и не столько в качестве составляющих, сколько в качестве взаимных контаминаций. В то же время в результате проведённых экспериментальных исследований [15; 31; 129] достоянием научного сообщества стали сведения о морфогенезе меланом и реализации в динамике их злокачественного потенциала. Следует отметить и существенный прогресс в части диагностики меланом в результате использования новых подходов к осуществлению иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования. Значительные успехи достигнуты в таргетной и иммунотерапии меланом [34; 129; 119]. Что касается клинико-морфологических особенностей меланом кожи с учётом своеобразия реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли и их потенциальной сопряженности с реализацией злокачественного потенциала меланом, формированием инвазивной и метастатической компетентности, развитием сосудистой и периневральной инвазии, возникновением вторичных изменений и иных его проявлений, то эти вопросы не могут считаться достаточно изученными, ибо такая возможность представляется лишь в случае использования результатов мультиплексного анализа морфологического субстрата опухоли [16] или иного биологического

объекта [17]. В последнее десятилетие появились публикации об использовании результатов мультиплексного анализа, полученных при помощи метода рамановской спектроскопии ткани опухолей различной [5; 76], в том числе и кожной [57] локализаций. Осуществленный на основании использования рамановской спектроскопии образцов описываемых в публикациях опухолей, мультиплексный анализ полученных данных позволил идентифицировать в каждом образце биологического объекта одновременно значительное количество молекул многочисленных анализаторов [132], включая представителей различных классов хромопротеидов.

**Цель исследования:** оценка клинико-морфологических и иммуногистохимических особенностей поверхностных меланом кожи и результатов мультиплексного анализа эндогенных пигментаций в ткани опухоли.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить сопряжённость морфологических проявлений и спектроскопических характеристик поверхностных меланом кожи, реализуемых в зависимости от стадии опухоли, а также диагностическое и предиктивное значение компонентов-анализаторов эндогенных пигментаций, идентифицируемых в новообразовании.

2. Определить иммунофенотипы поверхностных меланом кожи при помощи панели маркеров Melan A, HMB45, S100 и иммуногистохимической идентификации мутированного белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1, и наличие статистической значимой связи между фазами роста опухоли и результатами иммуногистохимического исследования.

3. Изучить возможность конъюнкции алгоритмов получения и интерпретации данных мультиплексного анализа морфологического субстрата опухоли для оценки инвазивной компетентности новообразования в дифференциальной диагностике фаз (стадий) роста поверхностных меланом кожи.

### **Научная новизна**

В результате проведенного исследования впервые установлено, что своеобразие клинико-морфологических и иммуногистохимических характеристик поверхностных меланом кожи ассоциируется с особенностями реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли. Проведенное исследование впервые показало, что, несмотря на наличие индивидуальных особенностей, каждая стадия развития поверхностной меланомы, каждый период реализации вторичных изменений и осложнений характеризуется определенным набором и соотношением представителей различных классов хромопротеидов.

Проведённое иммуногистохимическое исследование с антителами к Melan A, Melanoma Marker (HMB45), S100 Protein и иммуногистохимическое выявление мутированного белка BRAF V600E впервые показали, что экспрессия указанных иммуногистохимических маркеров, а также результаты молекулярно-генетической идентификации мутаций генов BRAF и NRAS, несмотря на увеличение частоты их выявляемости с реализацией злокачественного потенциала меланомы, не корреспондируют стадии роста опухоли. Также впервые показано, что использование конъюнкции алгоритмов получения и интерпретации данных мультиплексного анализа морфологического субстрата опухоли позволяет выявить предиктивное значение компонентов-аналитов каротиноидов, тирозина, триптофана, фенилаланина и статистически значимое снижение вероятности их обнаружения при переходе опухоли из фазы радиального в фазу вертикального роста.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что гистогенез поверхностных меланом кожи теперь может быть представлен в виде сочетания двух различных, но сопряжённых друг с другом патологических процессов – изменения морфологического субстрата опухоли в динамике (морфогенез, онкогенез, канцерогенез) и реализации эндогенных пигментаций. Именно это сочетание, или комбинация создает такое количество различных, характеризующихся морфологическим изобилием, клинико-морфологических форм меланом, тем самым подтверждая общую закономерность формирования патологических структур известную под названием закона комбинационных или рекомбинационных преобразований [26]. Это в полной мере относится к меланоме, как опухоли вообще, и к каждой её клинико-морфологической форме, в частности. Практическая же значимость работы заключается в том, что в ней выявлены морфологические особенности и определены оптимальные подходы к идентификации протеиногенных (меланин), гемоглобиногенных (порфирин) и липидогенных (липофусцин, липохромы, цероид) пигментов, в состав которых помимо липидов входят каротиноиды, при помощи новых и усовершенствованных существующих технологий их выявления. Установлено, что первоначальная гетерогенность пигментного состава поверхностных меланом кожи, проявляющаяся в том числе и высокими значениями инициальной флуоресценции, по мере их прогрессирования и реализации злокачественного потенциала становится не столь выраженной, характеризуется уменьшением содержания и процентного соотношения выявляемых компонентов-аналитов в сочетании со снижением показателей флуоресценции. Таким образом, данные настоящего исследования, не только имеют важное теоретическое значение, но могут быть использованы и практически, будучи положенными в основу разработки алгоритмов таргетной и иммунотерапии меланом кожи, учтены при пересмотре и усовершенствовании Стандартов оказания медицинской помощи пациентам,

страдающим меланомами кожи, использованы в учебном процессе на лечебном, педиатрическом и стоматологическом факультетах в образовательных учреждениях высшего и дополнительного профессионального образования.

## **Методология и методы исследования**

Для достижения цели исследования и решения поставленных в настоящей работе задач была использована усовершенствованная методология, предусматривающая, во-первых, осуществление тщательного и системного анализа отечественной и зарубежной литературы, посвященной оценке клинико-морфологической, иммуногистохимической и молекулярно-генетической характеристик поверхностных меланом кожи. Особое внимание при этом было уделено работам, ставящим своей целью идентификацию пигментного состава и, как следствие, цветовой гаммы данных опухолей с учётом вероятной сопряжённости патогистологических характеристик новообразований с вариантами реализации эндогенных пигментаций. Во-вторых, предварительный анализ и последующее практическое использование методов и технологий, позволяющих на практике идентифицировать в морфологическом субстрате опухоли компоненты-аналиты эндогенных пигментаций, имея в виду гистологические окраски и гистохимические реакции, а также электронномикроскопическое исследование. В-третьих, экстраполяция методических подходов, использованных при спектроскопическом исследовании опухолей иных (некожных) локаций на алгоритм изучения поверхностных меланом кожи для идентификации особенностей реализации их злокачественного потенциала.

## **Личный вклад автора**

Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы заключается, прежде всего, в организации и осуществлении набора необходимого количества репрезентативного материала, формировании групп наблюдений. Автором также проведен анализ историй болезни пациентов и амбулаторных карт клинических наблюдений больных с поверхностными меланомами кожи. Автором лично осуществлён отбор случаев, вошедших в исследование, проведено патогистологическое исследование, оценены данные иммуногистохимического исследования и ультраструктурного анализа, дана оценка результатов. В ходе выполнения диссертационного исследования все полученные результаты автором были анализированы, интерпретированы и обобщены в картах клинического наблюдения. Автор, проведя широкомасштабное статистическое исследование обширного фактографического материала, обеспечил реализацию принципов доказательной медицины и высокую аргументированность научных результатов проведенного исследования.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Морфологическим проявлениям поверхностных меланом кожи и их спектроскопическим характеристикам присуща сопряжённость, своеобразно реализуемая в зависимости от стадии развития. Идентифицируемые в новообразовании компоненты-аналиты эндогенных пигментаций имеют диагностическое и предиктивное значение в оценке инвазивной компетентности опухоли.

2. Результаты использования панели маркеров Melan A, HMB45, S100 и иммуногистохимической идентификации мутированного белка BRAF V600E с

помощью моноклонального антитела VE1 позволяют в значительной части наблюдений определить иммунофенотипы поверхностных меланом кожи, однако в то же время указывают на отсутствие статистически значимой связи между стадиями роста опухоли и результатами иммуногистохимического исследования.

3. Морфологическая гетерогенность поверхностных меланом, обусловленная фазой роста опухоли и сопряжёнными с ней различными соотношениями паренхиматозного и стромального компонентов и степенью реализации вторичных изменений, обуславливает непреложность осуществления мультиплексного анализа результатов анализов из различных участков новообразования с целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных заключений.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности

#### **3.3.2. Патологическая анатомия<sup>1</sup>:**

п. 1 – «распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных патологоанатомических исследований клеток, тканей, органов и организма при использовании современных методических и технологических возможностей морфологии в сочетании с молекулярной биологией, молекулярной генетикой и эпигенетикой»;

п. 2 – «научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов»;

---

<sup>1</sup> Приказ Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 24 февраля 2021 г. № 118 «Об утверждении номенклатуры научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, и внесении изменения в Положение о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденное приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 10 ноября 2017 г. № 1093»

п. 3 – «исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярногенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность научных положений и выводов исследования базируется на тщательном и системном анализе большого объёма и количества работ по теме диссертации, опубликованных как в отечественных, так и зарубежных научных изданиях. Высокая достоверность результатов обеспечивается также использованием усовершенствованной методологии исследования, изучением значительного объёма операционного и биопсийного материала с помощью современных адекватных технологий и сертифицированного оборудования, разрешённого в установленном порядке для медицинского применения. Достоверность и аргументированность выводов и результатов исследования, посвященного оценке клинико-морфологической, иммуногистохимической и молекулярно-генетической характеристик поверхностных меланом кожи, обеспечена также и осуществлением широкомасштабного статистического исследования обширного фактографического материала, обеспечивающего реализацию принципов доказательной медицины.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на XXXIII Европейском конгрессе патологов (Базель, Швейцария, 2022 г.), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики» (г. Челябинск, 7–8 апреля 2023 г.), Международной научно-практической конференции «Информационные технологии и математическое моделирование в фундаментальной и клинической медицине», посвященной памяти доктора

медицинских наук, профессора, заслуженного работника высшей школы Российской Федерации Пантелеева Сергея Михайловича (г. Тюмень, 15–16 февраля 2024 г.), Всероссийском научном форуме с международным участием «Неделя молодёжной науки – 2024», посвященном 300-летию Российской академии наук, V Всероссийской морфологической конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» (г. Тюмень, 28–30 марта 2024 г.), XIV Пленуме Российского общества патологоанатомов (г. Уфа, 24–26 мая 2024 г.), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики» (г. Челябинск, 18–19 октября 2024 г.).

## **Внедрение результатов исследования**

Результаты научного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 15.05.2024): излагаются на лекциях, практических и семинарских занятиях при изучении вопросов морфогенеза и морфологических проявлений смешанных дистрофий, патологической анатомии опухолей, развивающихся из меланинобразующей ткани, студентам по направлениям подготовки 31.05.01. Лечебное дело, 31.05.02. Педиатрия, 31.05.03. Стоматология, ординаторам, обучающимся по специальности 31.08.07. Патологическая анатомия, слушателям циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации. Используются в подразделениях патологоанатомической службы ГБУЗ «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения города Москвы» (акт внедрения от 21.05.2024) – при осуществлении дифференциальной диагностики по верхностных меланом кожа в различные фазы их роста, а также при реализации программ стажировки

слушателей, обучающихся по специальности 31.08.07. Патологическая анатомия, на циклах профессиональной переподготовки и повышения квалификации.

## **Публикации результатов работы**

По результатам исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в ведущих журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, и 3 публикации в журналах, индексируемых в международных реферативных базах данных (Scopus, Web of Science).

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 124 страницах, состоит из введения, 4 глав с изложением состояния и степени разработанности темы исследования на основании анализа современной литературы, использованных методик исследования, основных результатов проведенной работы, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы, включающего 164 источника, в том числе 33 отечественных и 131 иностранный, списка иллюстративного материала, состоящего из 17 таблиц и 13 рисунков.

# Глава 1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЛАНОМ КОЖИ; СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ДИАГНОСТИКИ (обзор литературы)

## 1.1. Дефиниции меланом кожи, особенности их эпидемиологии и возникновения

Каждому исследователю-патоморфологу, по роду своей деятельности занимающемуся, в том числе, вопросами патогистологической, иммуноморфологической диагностики меланомы любой локализации, практически ежедневно приходится углубляться в существо её дефиниции. Иными словами, на практике повседневно определять, с одной стороны, наиболее существенные признаки данной опухоли, а, с другой стороны, выявлять её важнейшие особенности, позволяющие отличить пигментную меланому от других пигментсодержащих опухолей, патологических состояний и пороков развития кожи, а также осуществить дифференциальную диагностику между пигментными и беспигментными меланомами.

В многочисленных работах, посвященных изучению меланомы кожи, к числу наиболее существенных признаков, ей присущих, относятся наличие всех прерогатив злокачественности (тканевой и клеточный атипизм [1; 21; 44], раннее и распространенное метастазирование [105], реализация вторичных изменений [103, 120], рецидивы [41]). В литературе, посвященной изучению источников возникновении и развитии данной опухоли, подчеркивается ведущая роль пигментных клеток меланоцитов меланинобразующей ткани [1; 111]. К отличительным признакам практически всех без исключения меланом по мнению классиков [51, 53] следует отнести наличие альвеолярных и солидных структур, своеобразие ангио- и гистоархитектоники опухоли, характер клеточной составляющей новообразования, распределение хроматина в ядрах клеток

меланомы, а также наличие выраженной лимфоидной и лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации вокруг опухолевых комплексов [75], которая в современных публикациях и руководствах носит название перитуморальной [21].

Общеизвестное утверждение о том, что среди заболеваний и патологических состояний человека, оказывающих существенное влияние на формирование показателей заболеваемости и смертности населения подавляющего большинства стран мира, по-прежнему преобладают новообразования различных локализаций подкреплено результатами многочисленных эпидемиологических исследований [7; 84; 126]. Это положение полностью применимо и для тех случаев, когда речь идёт об опухолях каждой локализации [11]. В частности, приводятся данные о том, что в 2020 году в США было зарегистрировано 100350 новых случаев меланомы и 6850 летальных исходов от неё [137], хотя отдельные исследователи этого утверждения не разделяют и, наоборот, констатируют некоторую стабилизацию показателей заболеваемости и смертности от меланомы [55; 161].

Другая часть исследователей, наоборот, констатируя снижение показателей заболеваемости многими типами опухолей, выражает озабоченность увеличением показателей заболеваемости меланомой различных локализаций и смертности от неё [113]. Особенно ярко эта тенденция прослеживается среди популяций светлокожего населения планеты [107; 137].

В многочисленных работах, посвященных разработке статистических показателей частоты различных онкологических заболеваний, отмечается неуклонный рост показателей заболеваемости новообразованиями кожи и её придатков [64]. Предпринимаются многочисленные попытки объяснить эту тенденцию реализацией мероприятий по улучшению ранней диагностики новообразований за счёт внедрения в практику мирового и отечественного здравоохранения новых диагностических методов и технологий [20; 21], изменениями окружающей среды, условий питания и обитания [91]. Что касается меланомы кожи, то её возникновение и увеличение частоты связывается исследователями с преимущественно экзогенными причинами, прежде всего, воздействием либо естественного ультрафиолетового излучения на открытые

участки тела [138], либо вызванного искусственно с целью придания коже смуглого оттенка [66]. Степень совокупного солнечного повреждения CSD (cumulative solar damage) кожи, травмы предсуществующих пигментных образований, имея в виду постоянное воздействие на них предметов одежды, условий труда, а также различные парамедицинские манипуляции, проводимые посредством применения различных добавок, снадобий, либо воздействия ультразвуком, магнитным полем. Причём в первом случае избыточное естественное ультрафиолетовое воздействие приводит к различным генетическим нарушениям, а во втором инициация опухоли связывается с возникновением воспаления в морфологическом субстрате пигментного образования. Особенно негативно комплекс экзогенных воздействий проявляется в широтах с преобладающим проживанием представителей европеоидной расы [137].

В некоторых работах, а ещё чаще в материалах многочисленных презентаций, представляемых на различных научно-практических мероприятиях, утверждается, что в качестве наиболее характерного представителя злокачественных опухолей кожной локализации меланома известна с глубокой древности. Несмотря на то, что ссылка на необходимый в таких случаях первоисточник отсутствует, в это утверждение верится легко, так как трудно допустить, что во все времена появление на коже человека участка с изменённой окраской вдруг осталось незамеченным, как для самого индивидуума, так и для окружающих. А вот в то, что именно в древности появился термин *меланома*, верится с трудом, хотя бы по причине отсутствия данных и методологий, необходимых для подведения итогов, и обобщений. Вместе с тем, наши попытки отыскать первую, единственную, а потому и приоритетную работу по описанию клинической и морфологической картины меланомы не увенчались успехом. Наибольшие основания считаться таковой приоритетной работой имеет фундаментальное руководство Р. Вирхова по онкологии, вышедшее в свет в 1863 году, в котором, в частности, приводятся описания наблюдений меланом, предпринимаются попытки их ранжирования и классификации [159]. Несколько позже в одном из выпусков первого отечественного учебника по патологической

анатомии, написанного классиком отечественной патоморфологии М.Н. Никифоровым более ста лет назад, также приводится описание меланомы [18]. В литературе, посвященной изучению этиологии и морфогенеза меланомы кожи, значительное место отводится обсуждению источника её развития. В многочисленных работах безапелляционно утверждается, что меланома развивается из меланоцитов базального слоя эпидермиса и меланофоров дермы [1; 25]. Другие исследователи считают, что источником меланомы являются преимущественно меланобласти [109]. В фундаментальных руководствах по патологической анатомии, напротив, подчёркивается, что меланома развивается из меланинобразующей ткани [53; 102] и эта точка зрения также имеет многочисленное количество сторонников и последователей. В её основе лежит комплексный подход, учитывающий тонкие непрерывные взаимодействия между эпителием, стромой и внеклеточным матриксом в поддержании оптимального гомеостаза кожи и возникновении общепатологических процессов и заболеваний кожи при различных нарушениях этих взаимодействий.

## **1.2. Классификация, клинико-морфологические и иммуногистохимические особенности меланом кожи**

Прежде всего, характеризуя алгоритм диагностики меланоцитарных образований кожи, следует отметить, что подходы к осуществлению традиционного, уже ставшего хрестоматийным, патоморфологического исследования и интерпретации его результатов за последние сто лет не претерпели существенных изменений. На этом основании представляется вполне уместным констатировать наличие некоей сформировавшейся к настоящему времени довольно заскорузлой парадигмы идентификации меланом, представляющей собой комплекс статичных диагностических аксиом. Что же касается классификации меланом, то последняя, являясь фундаментом вышеупомянутой диагностической

парадигмы, напротив, характеризуется некоторой пластичностью, периодически пересматривается и дополняется в установленном Всемирной организацией здравоохранения порядке [105]. В настоящее время легитимной считается классификация меланом, входящая в качестве составляющей в официальное издание «Классификация опухолей кожи» (ВОЗ, 2018, 4-е издание) [148]. Следует, впрочем, констатировать, что и это издание, по сравнению с предыдущим, является в какой-то степени исправленным и дополненным, поскольку вобрало в себя весь предшествующий положительный опыт патоморфологов [1; 38; 101], приобретённый благодаря широкому использованию прецизионных диагностических методов и технологий в данной области. В основе классификационного деления меланом положена, как это отчасти наблюдалось и ранее, степень совокупного солнечного повреждения CSD кожи, согласно которой все меланомы подразделяются на новообразования, обычно связанные со степенью совокупного солнечного повреждения (поверхностно-распространяющаяся меланома с низким уровнем CSD; лентиго-меланома с высоким уровнем CSD; десмопластическая меланома) и меланомы, при которых сопряженность с совокупным солнечным повреждением не всегда прослеживается или вовсе отсутствует (меланома, ассоциированная с невусом Шпица [140]; акральная меланома; меланомы, возникающие на различных слизистых оболочках [117]; меланомы, развивающиеся из врожденных невусов; меланомы, ассоциированные с голубыми невусами). В эту рубрику включена также и увеальная меланома. Каждая из вышеперечисленных меланом отличается специфичным, присущим только ей, морфогенетическим путём (pathway). Несколько обособленное место в Классификации занимает узловая (нодулярная) меланома, для которой может быть присущ любой или большинство из вышеперечисленных путей развития. Особенностью данной классификации, по нашему мнению, является излишнее постулирование, граничащее с менторством, и отсутствие тем не менее чётких критериев отнесения опухоли к той или иной клинико-морфологической форме. Впрочем, другой особенностью приводимой классификации является её лабильность, открывающая возможности для расширения и внесения дополнений.

Наглядным примером является тот факт, что в настоящее время, наряду с широким использованием вышеописанных клинико-морфологических форм меланом используется для постановки диагноза акрально-лентигиозная форма (в Классификации ВОЗ просто акральная), отличающаяся от прочих прежде всего локализацией новообразования на коже верхних и нижних конечностей преимущественно в области околоногтевого валика и ногтевого ложа [40]. Вместе с тем, в немногочисленных публикациях находят отражение и иные попытки коррекции Классификации ВОЗ посредством внесения в неё корпоративных [156] и индивидуальных [162] дополнений. Клинико-морфологические особенности меланом кожи могут быть выявлены уже при обычном осмотре. При макроскопическом описании биообъекта, полученного интраоперационно, врач-патологоанатом, так же, как и до него клиницист, отмечает локализацию опухоли, исследует новообразование морфометрически, оценивает интенсивность распределения меланина и наличие вторичных изменений, реализующихся в опухоли. Уже на этапе макроскопической визуализации в большей части случаев представляется возможность предположить клинико-морфологическую форму меланомы. При осмотре имеются все предпосылки детального описания опухоли и оценки её площади, состояния границ новообразования, характера поверхности (гладкая, шероховатая, с наличием или отсутствием изъязвлений), особенностей и интенсивности распределения меланина (равномерное диффузное, неравномерное очаговое, глыбчатое, крапчатое, с чередованием участков гипер- и гипопигментаций), а также возможность осуществлять мониторинг новообразования. Вместе с тем, R.J. Friedman ещё в 1985 году предложил, учитывая обилие выявляемых макроскопически клинико-морфологических особенностей, характеризующих меланому, их упорядочить и сосредоточиться на оценке главных, ключевых, по его мнению, признаках [75]. Как это зачастую бывает на практике, решение, после его принятия, оказалось очень простым. С этой целью им был использован несложный мнемонический приём, облегчающий ранжирование признаков меланомы, обозначенных латинской аббревиатурой ABCDE. Это асимметрия участка пигментации (A), оценка состояния его границ (B),

констатация неравномерности распределения меланина, оценка, так называемого «цветового разнообразия» (C), в отсутствие выраженной асимметрии измерение диаметра пигментного образования в миллиметрах (D) и, наконец, наличие или отсутствие возвышения (E). Впрочем, эти же авторы, спустя двадцать лет [39] в качестве условия успешного использования данного мнемонического приёма в алгоритме оценки новообразования отметили необходимость наличия определенного опыта и стажа работы в онкологии с целью исключения как ложноположительных, так и ложноотрицательных диагнозов. С появлением технологий эпилюминесцентной поверхностной микроскопии (дерматоскопии) и устройств для оценки существа патологического процесса клиницисты стали обладателями мощного инструмента, благодаря которому стало возможным получить веские основания не только для аргументирования клинического диагноза меланомы [3], но и чёткой дифференциации амеланотических и гипомеланотических меланом (*Sic!*) [142]. Эта и ей подобные работы [77] пролили свет на природу беспигментных и гипомеланотических меланом. Кроме общеизвестных азбучных истин о том, что беспигментные меланомы встречаются редко, а гипомеланотические несколько чаще, авторы приводят убедительные данные о том, что показатели частоты встречаемости беспигментных и гипомеланотических меланом гораздо выше, нежели приводимые в литературе. Авторы приводят свою классификацию подобных меланом, деля их на амеланотические, частично пигментированные и светлоокрашенные. При частично пигментированных меланомах, вопреки общепринятым мнению, их существование сводится не к количеству пигмента и интенсивности окраски опухолевого субстрата, а к его преимущественному очаговому (менее 25 процентов поверхности опухоли содержат пигмент) распределению. В светлоокрашенных меланомах процент пигментированной территории несколько выше, но интенсивность пигмента остаётся невысокой. Беспигментные и гипопигментированные меланомы так же, как и их антиподы подразделяются на поверхностно-распространяющиеся и узловые. На развитие этих типов меланом влияют три ведущих фактора: фототип, генетический фон кожи, а также индивидуальные особенности дифференциации

меланоцитов. Беспигментным может быть любой гистологический тип меланомы, но всё-таки чаще это встречается среди десмопластических меланом. Из-за задержки идентификации и лечения беспигментные меланомы имеют гораздо более худший прогноз. При помощи дерматоскопии помимо чёткой дифференциации опухолей по количеству пигмента, стало возможным конкретизировать данные, полученные в результате визуального изучения опухоли, оценить ангиоархитектонику новообразования и окружающих его тканей, выявить участки максимальной концентрации пигмента и его взаимоотношения со структурно-функциональными элементами эпидермиса и дермы, установить особенности реализации вторичных изменений в опухоли, констатировать наличие нерегулярной пигментированной ретикулярной сети и участков регрессии новообразования [147]. Кроме того, используя дерматоскоп, в ряде случаев стало возможным диагностировать конкретную клинико-морфологическую форму опухоли на основании оценки её локализации и вектора распространения: радиально, параллельно поверхности кожи или вглубь её. Алгоритм диагностики и лечения меланомы стал для клиницистов выглядеть настолько очевидным и отработанным, что это позволило свести все диагностические и лечебные манипуляции в Клинические рекомендации «Меланома кожи и слизистых оболочек», первоначально утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации в 2019 году [13], а затем переработанные и дополненные в 2023 году.

Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи, длительное время называвшаяся меланомой Clark [53; 54] является наиболее распространенной клинико-морфологической формой и одним из преобладающих её гистопатологических типов. В литературе есть указания, что процентный показатель поверхностно-распространяющейся меланомы может достигать 70 и более процентов [113]. Опухоль чаще диагностируется у лиц сравнительно молодого и зрелого возраста, имеет вид пигментированной макулы или папулы, обычно развивается на закрытых частях тела и характеризуется выраженной стадийностью-фазностью [50]. Растущая первоначально радиально (radial growth

phase – RGP), опухоль тем не менее нередко и сравнительно рано приобретает признаки педжетоидной меланомы (педжетоид-меланома), впервые описанной в 1970 году [102], для которой характерным является приобретение крупными опухолевыми меланоцитами признаков клеток Педжета, рассеянных по всему эпидермису и располагающихся между и среди кератиноцитов [100; 149]. Эти же авторы впервые определили два возможных пути распространения опухоли внутри эпидермиса, назвав их педжетоидным и лентигиозным [54; 102]. Дальнейшая реализации опухолевого потенциала поверхностно-распространяющейся меланомы обычно выражается в появлении признаков инвазии, связанной со сменой вектора распространения опухоли с горизонтального (радиального) на вертикальный (vertical growth phase – VGP), выходом её за пределы дерматоэпидермального соединения и *volens nolens* приобретением опухолью впоследствии черт узловой меланомы. В англоязычной литературе к вертикальной фазе роста меланомы относятся также случаи роста опухоли в направлении, противоположном дерматоэпидермальному соединению, а именно с приподниманием эпидермиса, тенденцией к развитию вертикальной оси и формированию узла, расположенного выше уровня кожи [38; 54; 102; 149].

Вопрос чёткого разграничения фазы радиального роста опухоли от фазы вертикального её распространения является ключевым в диагностике поверхностных меланом, и наш собственный опыт, и данные литературы в некоторой степени предостерегают от гипердиагностики узловой формы меланомы [1; 49]. Вместе с тем, инициальные моменты вертикального распространения (инвазии) меланомы зачастую бывают настолько тонкими и едва осязаемыми, что идентифицировать их не всегда представляется возможным. Образцы поверхностной меланомы не столь часто подвергаются иммуногистохимическому исследованию [10; 135], так как клинические признаки и морфологическая патогистологическая картина опухоли обычно не оставляют сомнений в диагнозе поверхностной меланомы [125; 128]. В тех случаях, когда возникает необходимость выявления иммунофенотипа опухоли, например, в случае обнаружения нетипичной для меланомы макулы или эритемы, необходимым и достаточным

признается использование стандартного набора реагентов S-100, НМВ-45, Melan A, тирозиназы [112; 128]. Впрочем, некоторые авторы весьма скептически относятся к практике огульного и бесконтрольного использования иммуногистохимического исследования [86], мотивируя это тем, что необходимым и достаточным для этого является изучение биообъектов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Узловая (нодулярная) форма меланомы, к которой подчас без достаточных на то оснований относят проявления вертикальной фазы поверхностно-распространяющейся опухоли, может встречаться как на открытых, так и на закрытых, преимущественно труднодоступных для обозрения, участках тел. Исключительной прерогативой узловой формы меланомы являются морфологические проявления, обусловленные вертикальной фазой роста опухоли с инвазией подлежащих дермы и жировой клетчатки [114], появлением в дерме так называемых «онкогенных» кластеров атипичных клеток, превышающих по размерам самые крупные кластеры клеток в эпидермисе [64]. Важной особенностью является также полиморфизм клеток опухоли, которые могут иметь вид эпителиоидных, быть мелкими «невоидными», полигональными, гигантскими, веретенообразными, иметь одно ядро или быть многоядерными [61]. При узловой форме гораздо чаще, по сравнению с другими клинико-морфологическими формами, наблюдается реализация в опухоли вторичных изменений в виде некроза, изъязвлений, кровоизлияний, а также метастазирование [83]. Важным и одним из самых ранних признаков узловой меланомы является повышение митотической активности в «онкогенных» кластерах клеток дермы [48], выражющееся не только в числе митозов на единицу площади опухоли, но и в более высокой скорости митозов, а также отсутствие или минимальная инфильтрация опухоли лимфоцитами (TILs) [54] в сочетании с микросателлитной нестабильностью [111].

С давних пор медицинское сообщество всегда полагало, что «золотым стандартом» диагностики меланом является традиционное патогистологическое исследование, обязательно учитывающее анамнестические данные [1; 2], а впоследствии также результаты иммуногистохимического [29; 58; 85; 118] и

молекулярно-генетического анализа [23; 35; 80]. Это положение долгое время никем не оспаривалось. Ведь при окраске биологических образцов гематоксилином и эозином представляется возможность, если не утверждать наверняка, то, по крайней мере, заподозрить озлокачествление пигментныхnevусов, диагностировав атипичные меланоциты, формирующие «онкогенные кластеры, наличие как единичных, так и многочисленных митозов, изъязвление покровного эпителия. Даже, использовав эту, одну-единственную окраску, можно обнаружить и другие признаки злокачественной опухоли в виде полиморфизма клеток не только и не столько в поверхностных отделах опухоли, но и в более глубоких слоях эпидермиса, а также в участках дермы, как непосредственно прилежащих к эпидермису (сосочковый слой), так и более глубоко расположенных (сетчатый слой, подкожная жировая клетчатка). Эти и некоторые другие признаки озлокачествленияnevусов в отечественной литературе были впервые описаны и упорядочены при исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином [1]. Даже применение этого, ставшего рутинным метода окрашивания биообъекта, позволяет получить много сведений об исследуемом образце: оценить особенности гистогенеза, описать проявления и выраженность полиморфизма клеток и состояние стромальной составляющей опухоли. В большинстве случаев, как правило, если локализация опухоли не ограничивается базальным слоем эпидермиса, удается определить глубину её прорастания в подлежащие слои дермы и/или подкожную жировую клетчатку и выразить глубину прорастания в метрических единицах. Именно этому подходу обязано появление общеизвестных классификаций, основывающихся на определении уровня инвазии меланомы [38], а также максимальной толщины опухоли в миллиметрах, содержащихся или упоминающихся едва ли не в каждом руководстве, учебном пособии, методических рекомендациях и многочисленных публикациях [21; 51; 64; 65]. Вместе с тем, несмотря на исключительную важность патогистологического исследования, ряд авторитетных специалистов совершенно обоснованно предостерегает от попыток его абсолютизации, справедливо обращая внимание на ограниченность возможностей патогистологического исследования [80] особенно в тех случаях,

когда возникают проблемы с необходимостью различения доброкачественных невусов от меланомы или определения иммунофенотипа последних. Особую озабоченность медицинского сообщества вызывают случаи, так называемых тонких первичных меланом, которые, будучи радикально удалёнными хирургически, проявляются через некоторое, подчас весьма непродолжительное время, распространённым массивным метастазированием [80; 114], поэтому эти авторы полагают, что в ближайшие годы именно тонкие первичные биологические ранние меланомы должны быть и, по видимому, будут точкой максимального приложения усилий медицинского сообщества для достижения благоприятных перспектив их ранней диагностики и терапии. Вместе с тем, по мере внедрения в диагностический процесс новых методов и технологий диагностики меланом существование «золотого стандарта» диагностики меланом стало подменяться и периодически переосмысливаться [50; 89]. В качестве «золотого стандарта» стало без достаточных на то оснований декларироваться дерматоскопическое, имmunогистохимическое исследование и некоторые другие виды различных диагностических манипуляций и их комбинаций [12; 62; 71].

К сожалению, в настоящее время с появлением иммуногистохимического и молекулярно-генетического подходов исследования меланом [69; 116; 130], многие гистологические окраски, широко использовавшиеся ранее, утратили своё первоначальное значение. Давно ушли в небытие полезные с диагностической точки зрения гистохимические методы и технологии, а вместе с ними и реактивы, и кадры. Вместе с тем, представляется очевидным, что их использование принесло бы исключительную пользу для понимания существа и правильной диагностики меланом. Так, в частности, общеизвестно, что наряду с меланином, коричневую окраску на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, могут иметь самые различные каротиноиды, прежде всего, липохромы, ряд липофусцинов, а также некоторые гемоглобиногенные пигменты, как содержащие железо (гемосидерин), так и не содержащие его (гематоидин). Меланин, в отличие от всех других пигментов, имеющих на срезах коричневую окраску, способен восстанавливать аммиачное серебро без применения восстановителя и импрегнироваться серебром

при других методах серебрения. Кроме того, меланин не способен растворяться в органических красителях, а при обработке среза ткани окислителями, например, перекисью водорода, обесцвечивается. Метод Хека, включающий окраску срезов нильским синим сульфатом с последующей их обработкой перекисью водорода позволяет чётко идентифицировать липофусцины, принимающих вид синих зерен, от бесцветных гранул меланина [98]. Использование для дифференциальной диагностики реакции Перлса или реакции с турбулевой синью (*Sic!*) позволяет выявить включения железа и его солей, приобретающих синюю или голубую окраску.

Исключительно редко осуществляется в настоящее время и ультраструктурный анализ этих новообразований [71; 77]. Заменившие их тонкие прецизионные методы иммуногистохимии и молекулярно-генетическое исследование, диагностический потенциал которых, к слову сказать, проявляется не всегда, на практике используются далеко не во всех случаях прежде всего в силу своей дороговизны и чёткой регламентации применения.

В настоящее время в диагностике значительной части опухолей большое, едва ли не определяющее, значение имеет иммуногистохимическое исследование образцов опухоли, полученных при биопсии, или всего опухолевого узла, удалённого посредством хирургического вмешательства. Применительно к опухолям кожной локализации проведение иммуногистохимического исследования, в силу его относительной дороговизны, осуществляется не походя, а лишь в случаях необходимости установления или подтверждения предполагаемого гистогенеза опухоли, определения её иммунофенотипа, выбора варианта последующей таргетной и/или иммунотерапии и идентификации в лимфатических узлах малых количеств клеток злокачественной опухоли в случае подозрения на метастазирование. В случаях пигментных опухолей кожи иммуногистохимическое исследование применяется также для осуществления дифференциальной диагностики между различными пограничными невусами и меланомами.

Существенную помощь в идентификации и типировании поверхностно-распространяющихся меланом кожи может оказать использование различных меланоцитарных маркеров, часто именуемых стандартными, таких как S100, HMB45, Melan A/MART-1, MITF и SOX10 [135]. Маркер S100, с одной стороны, отличается высокой чувствительностью к меланомам всех подтипов, включая вариант десмопластической меланомы [63] и неоценим при прогнозировании возможных рецидивов заболевания, с другой же стороны, обладает ограниченной специфичностью, поскольку проявляется и при некоторых других злокачественных новообразованиях. Несравненно большая специфичность присуща меланоцитарным маркёрам HMB-45 и Melan A/MART-1. Так, HMB-45 обладает способностью идентифицировать компоненты меланосомного комплекса меланоцитов меланомы [151] и особенно незаменим в дифференциальной диагностике между доброкачественными и злокачественными пигментными образованиями, поскольку в процессе созревания невусы исподволь утрачивают HMB-45 [58]. Вместе с тем, применение данного маркёра ограничено и сдерживается его низкой чувствительностью при идентификации, в частности, метастатических меланом [83]. Melan A/MART-1 обладает ещё большей чувствительностью по сравнению с HMB-45, так как локализуется не только в меланосомах меланоцитов, но и в их эндоплазматическом ретикулуме. Melan A/MART-1 оказывается незаменимым при идентификации отдельных изолированных опухолевых меланоцитов в дерме в случае постановки диагноза меланома *in situ* [65; 151]. Однако использование Melan A/MART-1 ограничено при меланомах, ассоциированных с пигментным лихеноидным пигриазом, морфологическим проявлением которого являются псевдомеланоцитарные скопления Melan A/MART-1-положительных клеток [124]. Этим же автором было предложено сочетанное применение ядерных маркеров MITF (микрофталмия ассоциированный транскрипционный фактор) и SOX10, которые как в совокупности, так и каждый в отдельности обладают гораздо большей специфичностью нежели Melan A/MART-1 особенно в тех случаях, когда речь идёт об идентификации эпидермальных меланоцитов и правильной постановке диагноза

лентиго [32; 36], но уступают Melan A в части чувствительности [150]. Последнее десятилетие ознаменовалось выходом работ с результатами использования в диагностике меланом нейронных сетей [125], искусственного интеллекта [52; 128] и создания на этой основе различных обучающих программ [104; 128].

### **1.3. Разновидности реализации эндогенных пигментаций в меланомах кожи**

Кожа, представляющая собой наружный покров тела человека, обременённая выполнением большого количества функций (защитная, выделительная, терморегуляционная, рецепторная), является обособленной совокупностью различных, в том числе весьма специализированных, клеток и тканей [2; 6]. Цвет кожи популяций людей, длительное время обитающих в различных природных и климатических зонах, обычно отличается интенсивностью окраски и оттенками пигментаций. Несомненно, ключевым топовым пигментом, определяющим в известной степени окраску кожных покровов, общеизвестно является меланин [32], относящийся к группе протеиногенных (тироzin-триптофановых) пигментов, синтез которого в коже осуществляется в меланоцитах базального слоя эпидермиса. Биохимия меланогенеза хорошо изучена и подробно изложена в многочисленных руководствах и учебниках [85; 147]. Под действием тирозиназы, содержащейся в специализированных компартментах меланоцитов – меланосомах, из тирозина образуется диоксифенилаланин (ДОФА) – соединение, являющееся предшественником меланина – промеланином или меланином-мономером. Сам процесс полимеризации промеланина и превращения его в меланин также осуществляется в меланосомах, которые в конечном итоге приобретают вид пигментных гранул [47; 160]. Локализоваться меланин может как в клетках преимущественно базального слоя эпидермиса, так и располагаться внеклеточно. В последнем случае меланин может поглощаться меланофорами (меланофагами) и перемещаться ими как в пределах базального слоя, так и в дерму. В отличие от

других протеиногенных пигментов меланин совершенно чётко определяется при окраске гематоксилином и эозином в виде гранул и зёрен коричневого и темно-коричневого цвета. Обладая способностью восстанавливать металлическое серебро в его аммиачном растворе, может быть легко идентифицирован и дифференцирован от других пигментов при помощи серебрения по Коссу. При затруднениях с помощью гистохимической реакции Ромье могут быть идентифицированы прекурсоры меланина тирозин и триптофан [98].

Гораздо меньше сведений посвящено описанию и изучению свойств липофусцина и других представителей липидогенных хромопротеидов. Анализ литературных источников позволяет сделать вывод о том, что первоначальные представления о липофусцине, как о некоем «клеточном шлаке», метаболите белкового и жирового обменов, неоднократно переосмысливались, а значение липофусцина либо гиперболизировалось, либо, наоборот, минимизировалось, либо вовсе предавалось забвению [95; 117]. Хотя в клетках паренхиматозных органов при окраске срезов гематоксилином и эозином липофусцин выявлялся в виде светло-коричневых или коричнево-жёлтых включений, его идентификация в иных биологических объектах всегда была сопряжена со значительно большими трудностями, нежели обнаружение меланина. Чаще всего для выявления липофусцина использовали реакцию (окраску) с нильским голубым, больше известную как метод Хека, либо AFIP метод или ORO метод [98]. Из работ последних лет наиболее убедительной может считаться цикл работ, выполненных под руководством P.N. Tonolli (2020), которые демонстрируют достижение научного консенсуса в части, касающейся липофусцина кожи [95]. Наиболее важным и значительным это представляется потому, что долгое время локализация липофусцина считалась исключительной прерогативой клеток паренхиматозных органов. P.N. Tonolli сумел свести воедино два ключевых представления об этом пигменте. Во-первых, он подтвердил, что более быстрое старение клеток и накопление липофусцина происходит вследствие дисфункции митохондриально-лизосомальной оси клеточного гомеостаза. Во-вторых, он доказал, что липофусциногенез напрямую зависит от индукции сенесцентного фенотипа,

инициирующего многие последовательные циклы клеточного деления, путём воздействия на клетки кожи ультрафиолетового излучения или перекиси водорода. При этом этапы (модули) липофусциногенеза, происходящего в коже, и свойства гранул липофусцина, накапливающихся там же, могут не вполне совпадать со свойствами, скажем, липофусцина, входящего в состав пигментного эпителия сетчатки. Кератиноциты, содержащие липофусцин, генерировали значительное количество синглетного кислорода (1O<sub>2</sub>) и в отличие от липофусцина пигментного эпителия сетчатки вовсе не содержали биоретиноидов и каротиноидов. Наконец, в опытах с иммортализованными доброкачественными кератиноцитами человека (НaCaT) последние в два с лишним раза содержали больше липофусцина, нежели неиммортализованные кератиноциты, обработанные ультрафиолетовым излучением. Это утверждение несколько диссонирует с общераспространенным мнением о возможности локализации липофусцина исключительно в неделящихся клетках.

Наличие в нормальной коже липохромов, в состав которых, как и в случае с липофусцином, помимо липидов входят обычно в них растворенные каротиноиды, представляющие собой окрашенные углеводороды, никем не оспаривается и признаётся всеми исследователями. Также не подвергается сомнению утверждение, что липохромы обуславливают окраску подкожной жировой клетчатки. Большинство исследователей придерживаются мнения, что липидогенный пигмент цероид по своему химическому составу и физическим свойствам весьма близок к липофусцину, однако отличается от него механизмом возникновения. Если липофусцин представляет собой продукт многостадийного клеточного синтеза, происходящего в клетках паренхиматозных органов и эпителии, и заключительным этапом его морфогенеза является аутофагия, то цероид, напротив, образуется в макрофагах путём гетерофагии при резорбции липидов [95]. В своё время известные российские учёные-патоморфологи в своих трудах [1; 2] отмечали исключительную непохожесть меланом кожи друг на друга, имея в виду их макроскопические особенности и, прежде всего, окраску, так называемый цветовой тембр (цветовая гамма) опухоли. В многочисленных

последующих работах, посвященных изучению меланом, подчеркивается, что узел опухоли при его поверхностном расположении может быть окрашен в чёрный цвет, иметь различные оттенки коричневого цвета, быть коричнево-красным, серо-красным, серо-жёлтым и даже белесоватым. При этом на цветовую гамму опухоли могут оказывать влияние реализовавшиеся вторичные изменения в виде некроза, изъязвлений и кровоизлияний. В литературе, как посвященной описанию клинических наблюдений и случаев из практики, публикуемых в журналах под рубриками «Обмен опытом» или «В помощь практическому врачу», так и оригинальных исследованиях, чаще всего безапелляционно и безальтернативно утверждается, что меланомы либо содержат меланин (пигментные, меланобластические), либо его вовсе не содержат (беспигментные, ахроматические). Проведение серии гистохимических исследований, позволяющих осуществить идентификацию пигментов в меланоме в настоящее время считается едва ли не проявлением *mauvais ton*. Многие исследователи, желающие постоянно быть «в тренде» новомодных научных веяний, увлеченные абсолютизацией иммуногистохимических и молекулярно-генетических технологий идентификации меланом, стали относиться к гистохимии как к некоему недостойному их внимания архаизму. Вместе с тем, гистохимия, возникшая на стыке биохимии и гистологии, вовравшая в себя всё лучшее от этих дисциплин, предоставила возможность наряду с биохимией идентифицировать количественный и качественный состав ткани и представить это визуально. Однако, в отличие от биохимии, имевшей и имеющей дело с разрушенной в соответствии с большинством алгоритмов исследования тканью, гистохимия имела дело с поврежденной, то есть изменённой предшествующим патологическим процессом, но неразрушенной тканью. Благодаря применению исключительно гистохимических методов, о которых шла речь выше, например, доказано, что при содействии меланофоров происходит формирование не вполне типичного, а скорее атипичного вертикального вектора миграции меланина, что проявляется появлением меланина в виде вкраплений-островков в зернистом, блестящем и роговом слоях эпидермиса [1]. Нарушения синтеза, нестойкость, ведущая к повышенному разрушению данного пигmenta

положены в основу деления нарушений его обмена на местные (локальные, очаговые) и общие (распространенные, диффузные), проявления гипер- и гипопигментаций, наследственно-обусловленные и наследственно-необусловленные.

#### **1.4. Использование рамановской спектроскопии для диагностики опухолевых заболеваний и предопухолевых патологических состояний различных локаций**

Специалистам патологоанатомам, называющих себя в настоящее время чаще онкоморфологами, в своей повседневной практической деятельности постоянно приходится преодолевать определенные трудности в осуществлении дифференциальной диагностики между злокачественными и доброкачественными опухолями различных локализаций, пигментными образованиями, пороками развития и предопухолевыми процессами кожи. Всё это мотивирует исследователей на разработку и использование новых и усовершенствование существующих методов и технологий ранней и эффективной диагностики меланом, основывающихся на оценке состояния и модификации метаболома морфологического субстрата опухоли. Вместе с тем, следует отметить, что широкое использование иммуногистохимических и молекулярно-генетических технологий идентификации меланом сдерживается их дороговизной, наличием жёстких показаний, определенных стандартами ведения больных этой патологией и, наконец, сравнительно невысоким процентом выявления мутаций генов BRAF, NRAS, KIT, TP 53, что затрудняет назначение и осуществление таргетной и иммунотерапии опухоли. Будучи далёкими от попыток абсолютизации лазерной оптической спектроскопии, следует тем не менее отметить увеличение публикационной активности исследователей Российской Федерации и мира в направлении использования метода, так называемой, «оптической биопсии» в

диагностике некоторых опухолевых и неопухолевых заболеваний [5; 76; 90]. В основе этого метода лежит феномен комбинационного неупругого рассеяния света, источником которого первоначально был солнечный луч [57], впоследствии заменённый лазером. Поскольку явление комбинационного неупругого рассеяния света было открыто индийскими физиками Ч. Раманом и К. Кришнаном (1928), то и метод, в основу которого был положен данный эффект получил название рамановской спектроскопии, сочетающей в себе флуоресценцию и спектроскопию комбинационного рассеяния. Отличительной особенностью комбинационного рассеяния является наличествующая разница между частотами падающего (исходного) и рассеянного (отраженного) излучения лазера [74]. Коль скоро не существует двух биологических объектов, сходных по своим морфологическим и биохимическим характеристикам и агрегатному состоянию, то и получаемые спектры будут отличаться уникальностью. От исследователя требуется лишь разместить образец на предметном стекле, направить на него луч лазера и зарегистрировать спектр. Следует отметить, что в некоторых случаях при исследовании биологических объектов, обладающих избыточной флуоресценцией, под стеклом размещается специальная металлическая подложка, позволяющая в случае необходимости снизить эффект флуоресценции. Посредством оптических измерений представляется возможным не только регистрировать отдельные вторичные метаболиты, но и оценить существование общепатологического процесса в биологическом объекте. В отличие от ионизирующих оптическое излучение безвредно для человека и может проводиться неоднократно. Описаны случаи осуществления рамановской спектроскопии *in vivo* [90] посредством встраивания миниатюрных детекторов в волоконно-оптические зонды и их использования в эндоскопическом оборудовании. К настоящему времени мировое медицинское сообщество располагает не только опытом применения, но и материалом для осуществления обобщений данных использования рамановской спектроскопии в диагностике заболеваний и патологических состояний в орофациальной области [76], гинекологии [74] урологии и других локализаций. Специалисты отмечают уникальные возможности рамановской спектроскопии не только в осуществлении

скрининговых исследований, но и определения гистогенеза опухоли, степени дифференцировки и прогноза [5]. В литературе, посвященной диагностике новообразований, значительное место отводится обсуждению возможностей применения рамановской спектроскопии для диагностики различных форм рака почки [5]. Следует отметить, что применение рамановской спектроскопии в диагностике предраковых заболеваний и опухолей кожи вышло на качественно новый клеточный и субклеточный уровень. Согласно результатам исследования [74] использование данного метода в кожной патологии позволяет идентифицировать «потенциально метастатические клетки» посредством исследования метаболитов в отдельных клетках опухоли и осуществлять их пространственное картирование. В последующем это позволяет выявить чувствительность метаболитов клеток опухоли к лекарственным препаратам, применяемым в таргетной терапии. В культурах клеток меланомы детально прослеживается липидогенез, анализируются его особенности и отличия от такового в дифференцированных меланоцитах как по существу, так и качественные отличия образующихся внутриклеточных липидных включений. О роли интеграции субклеточной рамановской спектроскопии с липидомикой и транскриптомикой, позволяющих раскрыть возможные механизмы регуляции липидов в меланоме говорят в своих работах [46; 74; 131]. Использование анализа главных компонент позволяет резко расширить диагностические возможности рамановской спектроскопии, посредством неинвазивной оценки биохимических характеристик отдельных клеточных составляющих опухоли: меланобластов, меланоцитов и кератиноцитов, различающихся в зависимости от типа клеток. Комплекс этих биохимических характеристик авторы метафорически называют их эталонной биохимической подписью [76; 90]. Исследователи глубоко проникают в протеомику и метаболомику меланом, обнаруживая меланоцит-специфические накопления  $\beta$ -каротина, его прекурсоров или иных вторичных метаболитов, являющихся контаминантами эталонной биохимической подписи этого новообразования. Всё это свидетельствует о том, что результаты работ по изучению эпидемиологических, этиологических, морфологических особенностей

меланом кожи и анализу используемых в настоящее время новых и усовершенствованных, в том числе прецизионных, методов и технологий диагностики меланом кожи противоречивы. В то же время, существующий до настоящего времени алгоритм диагностики меланом кожи всё ещё представляет собой довольно статичный комплекс диагностических аксиом, использование которого не всегда способствует удовлетворению потребностей практической медицины в части их эффективной диагностики и лечения. В настоящее время медицинское сообщество, озабоченное поисками существа меланом всё больше и больше склоняется в сторону так называемых «омических наук», видя в этом ключ к его пониманию [122]. По их мнению, подоплётка меланомы должна обязательно заключаться в особенностях её метаболизма. Определить весь метаболом меланомы использованием одного аналитического метода вряд ли представляется возможным ввиду его исключительной динамичности и большого количества метаболитов. Вместе с тем, некоторые вторичные метаболиты, к коим относятся эндогенные пигменты, а также их реализации в биологических объектах, именуемые эндогенными пигментациями, могут в перспективе стать искомыми диагностическими критериями [106], определяющими таргетную и иммунотерапию меланом. Решению задачи выявления аналитов эндогенных пигментаций и особенностей их реализации в морфологическом субстрате поверхностных меланом кожи, установлению статистических значимостей каждого из исследованных аналитов с целью оценки возможности их использования в качестве предикторов инвазивной компетентности опухоли посвящено настоящее исследование.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика клинического материала

Были изучены удаленные во время радикального хирургического иссечения фрагменты кожи, содержащие морфологический субстрат поверхностной меланомы. Всего было изучено 128 образцов поверхностно-распространяющейся меланомы, направленных в установленном порядке для проведения патогистологического исследования в соответствии с приказом Минздрава России от 24 марта 2016 года № 179н «О Правилах проведения патологоанатомических исследований» и утвержденными данным Приказом формами № 014/у «Направление на прижизненное патолого-анатомическое исследование биопсийного (операционного) материала» и № 014-1/у «Протокол прижизненного патолого-анатомического исследования биопсийного (операционного) материала». Регламентация алгоритма исследования нормативными документами Минздрава России не предусматривала проведение процедуры дополнительного информированного согласия, тем не менее вопрос о соответствии этическим принципам GCP (Good Clinical Practice – надлежащей клинической практики) данного исследования был рассмотрен и одобрен Комитетом по этике при ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 121 от 22.05.2024). Протокол исследования, клиническая карта пациента, использовавшаяся в качестве первичного документа в данном конкретном исследовании, были также рассмотрены и одобрены решением Комитета по этике при ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 121 от 22.05.2024).

К критериям включения случая в данное исследование послужили следующие признаки: типичный характер интрапидермальной меланоцитарной дифференцировки опухоли; инвазивный рост; выраженный интрадермальный компонент; возраст старше 18 лет.

Для каждого случая в протоколе исследования и клинической карте отражали следующие признаки: дату исследования, возраст (Таблица 1), пол (Таблица 2), локализацию опухолевого процесса по клиническим данным (Таблица 3), результаты распределения в соответствии с классификацией по Международной классификации стадий злокачественных новообразований (Таблица 4), стадию опухолевого процесса, кодировку по Международной классификации онкологических заболеваний, а также фиксировали макроскопические и микроскопические составляющие, позволяющие идентифицировать в дальнейшем фазу роста опухоли, принимавшую бинарное значение (радиальная (горизонтальная) или вертикальная).

Таблица 1 – Распределение пациентов с поверхностно-распространяющейся меланомой по возрасту

Возрастная группа, лет	Абс.ч.	%
18-29	5	3,9
30-39	16	12,5
40-49	17	13,3
50-59	20	15,6
60-69	26	20,3
70-79	30	23,4
80-90	10	7,8
>90	4	3,1
Всего	128	100

Таблица 2 – Распределение пациентов с поверхностно-распространяющейся меланомой по полу

Пол	Абс.ч.	%
женский	79	61,7
мужской	49	38,3
Всего	128	100

Таблица 3 – Распределение опухоли по локализации (клинические данные)

Локализация	Абс.ч.	%
верхние конечности, включая лопатку	29	22,7
лицо	3	2,3
нижняя конечность, включая бёдра	37	28,9
поясничная область	3	2,3
туловище	55	43
ухо	1	0,8
Всего	128	100

Таблица 4 – Распределение клинического материала по Международной классификации стадий злокачественных новообразований (Tumor, Nodus, Metastasis) (n = 128)

Признак	Абс.число	%
T1a	52	40,6
T1b	16	12,5
T2a	5	3,9
T2b	5	3,9
T3a	11	8,6
T3b	11	8,6
T4a	7	5,5
T4b	21	16,4
N0	125	97,7
N1	2	1,6
N2a	1	0,8
M0	128	100
<i>Примечание: T - Tumor, N - Nodus, M - Metastasis</i>		

Из 128 случаев поверхностно-распространяющейся меланомы, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и специалистов-меланомологов [1; 51; 54; 149], 83 наблюдения составили первую группу, в которой преобладали патогистологические признаки, позволяющие диагностировать её

горизонтальную фазу, зачастую с проникновением новообразования кнаружи с приобретением признаков педжетоидной меланомы [102]. В качестве критериев отнесения наблюдения в эту группу были использованы признаки, описанные ранее в работах авторитетных ученых онкологов и патоморфологов: локализация опухолевых комплексов и отдельных клеток, не входящих в их состав, помимо эпидермиса, в участках его соединения с дермой и распространение в сосочковый слой дермы [38; 50]; размерам и характеристикам опухолевых комплексов и отдельных клеток вышеуказанных локализаций присуща определённая однотипность [54]; минимальное число митозов (1-2 на  $\text{мм}^2$ ) [152]; спектральным характеристикам образцов опухоли, наоборот, свойственна гетерогенность как в части интенсивности флуоресценции, так и значений рамановского сдвига ( $\text{см}^{-1}$ ) [8].

Оставшиеся 45 наблюдений поверхностно-распространяющейся меланомы, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и специалистов-меланомологов [1; 51; 54; 149], составили вторую группу, в которой преобладали патогистологические признаки, позволяющие диагностировать её вертикальную фазу, зачастую с сохранением отдельных характеристик, присущих случаям, включённых в первую группу: локализация опухолевых комплексов и отдельных клеток, не входящих в их состав, преимущественно в дерме [38; 50]; размерам и характеристикам опухолевых комплексов и отдельных клеток вышеуказанных локализаций присущ полиморфизм [54]; число митозов не менее 3-4 на  $\text{мм}^2$ ) [152]; спектральным характеристикам образцов опухоли, наоборот, свойственна относительная гомогенность, как в части интенсивности флуоресценции, так и значений рамановского сдвига ( $\text{см}^{-1}$ ) [8].

Контрольная группа ( $n = 10$ ) включала образцы кожи лиц (секционный материал) с отсутствием каких бы то ни было проявлений кожной патологии в анамнезе и на момент наступления летального исхода. Было осуществлено как проспективное исследование морфологического субстрата всех поверхностно-распространяющихся меланом кожи, независимо от локализации, возраста и пола пациентов, полученного в течение установленного для исследования срока в

результате радикального хирургического иссечения опухоли в соответствии со Стандартными операционными процедурами, утвержденными в установленном порядке, так и ретроспективное изучение образцов (архивный материал) поверхностно-распространяющихся меланом кожи пациентов, оперированных ранее и недостающих до получения запланированных контрольных цифр.

## **2.2. Морфологические методы исследования**

Морфологическое исследование материала, содержащего субстрат опухоли, осуществляли в соответствии со «Стандартными технологическими процедурами при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала» [19], согласно которым его фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере ( $\text{pH} = 7,4$ ) в течение 24–36 часов.

При макроскопическом исследовании операционного материала детально описывали опухоль, определяли её размеры и примерную площадь, оценивали состояние границ новообразования, характер поверхности, особенности и интенсивность распределения меланина, а также наличие и степень выраженности вторичных изменений. Вырезку и последующее расположение материала в гистологической кассете осуществляли таким образом, чтобы *ad oculus* субстрат опухоли, все слои эпидермиса, дермы и подкожная жировая клетчатка были доступны для изучения.

### **Гистологическое и гистохимическое исследование**

Постфиксационную проводку материала, предназначенного для последующего патогистологического исследования, осуществляли на

гистологическом процессоре Pathos Delta (Milestone, Италия), заливали в парафин также в автоматическом режиме при помощи Leica HistoCore (Leica, Германия). Серийные срезы (3–4 мкм), полученные на ротационном микротоме Thermo Fisher Scientific HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США) окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, по Маллори. Для идентификации меланина использовали реакцию серебрения по Массон-Фонтана.

### **Иммуногистохимическое исследование**

Для верификации гистогенеза опухоли и определения иммунофенотипа было проведено иммуногистохимическое исследование с ограниченным количеством антител вследствие малого объема материала. С парафинового блока сделаны срезы, на стекла нанесены внешние контроли из других тканей и проведены иммуногистохимические реакции с антителами к Melan A, Melanoma Marker (HMB45), S100 Protein (Ventana Medical System, США) с использованием иммуногистостейнера Ventana BenchMark ULTRA. Предварительно была произведена оценка качества экспрессии антител в контрольных тканях: во внешнем позитивном контроле (тканях, нанесенных на эти же стекла) была выявлена экспрессия антител, во внешнем негативном контроле (тканях, нанесенных на эти же стекла) экспрессия антител отсутствовала. Положительный внешний контроль был расценен как позитивный, отрицательный внешний контроль – как негативный. Также осуществляли иммуногистохимическую идентификацию мутированного белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1 (Ventana Medical System, США).

## Электронномикроскопическое исследование

Для изучения материала на ультраструктурном уровне образцы кожи с меланомой объемом примерно 2  $\text{мм}^3$  фиксировали в 2,5 %-ном растворе глютаральдегида на коллидиновом буфере ( $\text{pH} = 7,4$ ) при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Затем материал промывали несколькими порциями того же буфера в течение 30 минут. Кусочки ткани дофиксировали в 1 %-ном растворе тетроксида осмия на коллидиновом буфере в течение 1,0–1,5 часов при температуре +4 – +6 $^{\circ}\text{C}$ . Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (от 50 $^{\circ}$  до 96 $^{\circ}$ ) и нескольких порциях эфира. В течение 3-х часов образцы кожи пропитывали смесями эфир-аралдит последовательно в соотношениях от 1 : 1 до 1 : 17 при температуре от 37  $^{\circ}\text{C}$  до 45  $^{\circ}\text{C}$ . Заливочный аралдит готовили из Araldit M и Araldit HY (фирма «Serva») в пропорции 1 : 1 с добавлением Araldit beschleuniger (фирма «Serva») в количестве 0,35 мл на 10 мл смеси. Кусочки ткани, помещенные в углубления (диаметр 5 мм) пластиковых плат, заливали готовой смесью аралдитов и помещали для полимеризации в термостат с температурой 56  $^{\circ}\text{C}$  на 48 часов. Каждый блок полимеризованного аралдита с заключенным в него образцом устанавливали в подставку под лупу ультратома (Ultratome III, LKB Швеция), с помощью которого приготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Исследование и фотографирование проводили на сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO LS10 (Zeiss, Германия) с установленным детектором для просвечивающей микроскопии (STEM).

## **2.3. Молекулярно-генетическое исследование поверхностных меланом кожи**

Было осуществлено молекулярно-генетическое исследование биообъекта с использованием полимеразно-цепной реакции с целью выявления мутации гена BRAF и NRAS. Мутации гена BRAF исследовали на предмет наличия мутации V600. Мутации гена NRAS изучали с целью идентификации 3 мутаций, локализованных в 12 кодоне 2 экзона (Gly12Asp, Gly12Cys, Gly12Ser); 2 мутаций, локализованных в 13 кодоне 2 экзона (Gly13Asp, Gly13Arg); 3 мутаций, локализованных в 61 кодоне 3 экзона (Gln61Lys, Gln61Leu, Gln61Arg). Источником для выполнения молекулярно-генетических исследований являлись парафиновые срезы (стружка) с блоков, содержащих фрагменты опухоли.

## **2.4. Метод рамановской спектроскопии**

Было осуществлено также спектроскопическое исследование биообъекта с использованием спектрометра «ИнСпектр М», вариант исполнения: М-532 (РУ от 18.06.2021 № РЗН 2015/2419, производитель: ООО «РамМикс», Россия), состоящего из оптического микроскопа Olympus CX41 и блока спектрометра с длиной волны возбуждающего излучения 532 нм. Диаметр лазерного пятна в фокусе составлял 10 мкм, мощность лазерного излучения – 10 мВт. Управление прибором, регистрацию и запись спектров производили с помощью специальной компьютерной программы ИнСпектр, также разработанной сотрудниками ООО «РамМикс» (г. Черноголовка). Программа осуществляла идентификацию химических веществ и регистрировала изменения их количественного и качественного состава в изучаемом биологическом объекте по спектрам, сочетающим сигнал рамановского рассеяния и флуоресценции. Для сравнения выявленных изменений использовались результаты исследований контрольных

выборок тканей кожи, полученных у лиц данной возрастной группы с отсутствием патологии кожи.

## **2.5. Статистическая обработка результатов исследования**

Для наполнения базы данных и последующей статистической обработки использовали специализированное программное обеспечение: R-4.3.0 (The R Foundation, Вена, Австрия), RStudio Desktop (Version 2023.06.1, RStudio Inc, США). Использовали методы описательной статистики, при этом результаты исследования для качественных (категориальных) переменных представляли в виде процентных долей, для количественных – в виде средних арифметических. Использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой на множественные сравнения, используемую для управления уровнем ложноположительных результатов (ошибок первого рода) в случае нескольких парных сравнений между группами, точного критерия Фишера.

Оценку влияния факторных признаков на результативные производили методом логистической регрессии. Чувствительность и специфичность оценивали при помощи ROC-анализа. Для оценки качества модели рассчитывали показатель AUC (Area under ROC curve – площадь под ROC-кривой). Учитывая, что в исследовании присутствовало несколько независимых переменных, то их отбор выполняли при помощи пошаговой регрессии с использованием критерия информационной сложности Акаике (AIC), идея которого заключается в том, чтобы найти модель, которая наилучшим образом подходит для исследуемых данных, используя минимальное количество параметров. Различия между группами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

Таким образом, для достижения цели и решения задач данной работы был определён, на наш взгляд, оптимальный комплекс методов и технологий, сочетающий набор рутинных гистологических и гистохимических методов и

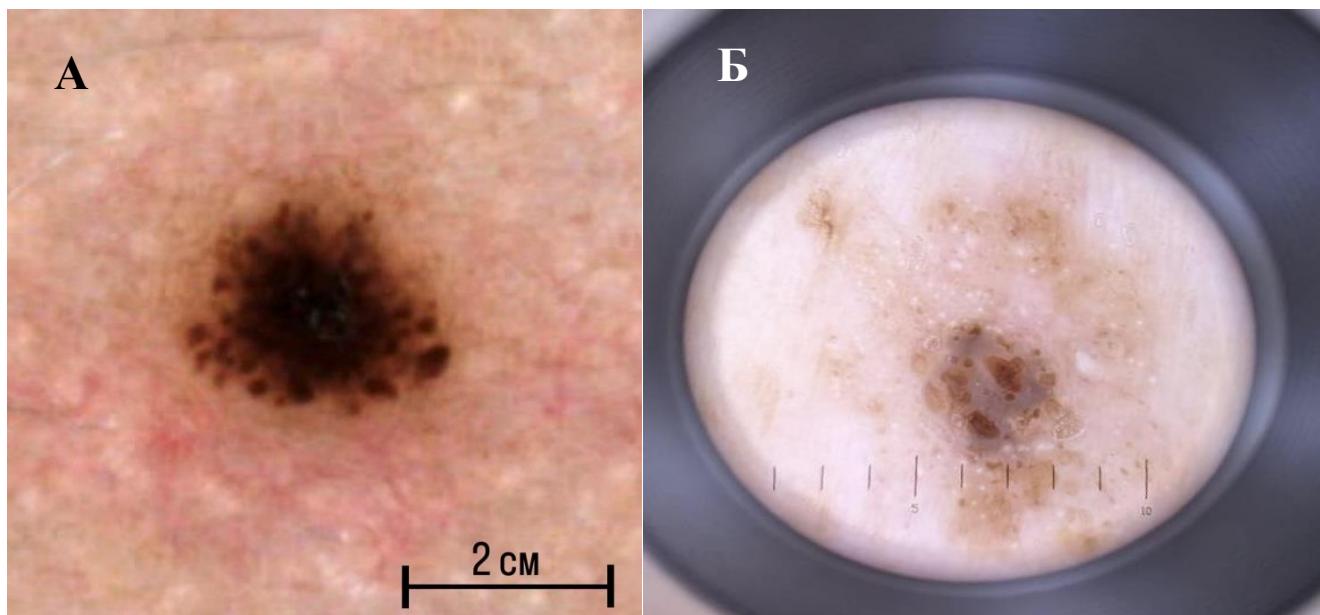
прецизионных технологий изучения биологических объектов, а также метод мультиплексного анализа, предусматривающий использование оригинальных компьютерных программ. Всё это составило существо оригинальной методологии исследования, реализованной при выполнении данной работы.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **3.1. Клинико-морфологическая, иммуногистохимическая характеристика поверхностно-распространяющейся меланомы кожи в стадию радиального роста и особенности реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли**

В группу поверхностно-распространяющихся меланом кожи с преимущественно радиальной (горизонтальной) фазой роста, имея в виду распространение её по радиусам несовершенного круга, было отнесено 83 наблюдения согласно критериям, изложенным в подглаве 2.1. В соответствии с установленным нами регламентом исследования каждое наблюдение было изучено комплексно с использованием всех методов и технологий, изложенных в Главе 2. Макроскопические размеры новообразования, отнесённого впоследствии к радиальной фазе роста, варьировали от 2,1 до 20 мм, при этом размеры опухоли в 31 наблюдении (37,4 %) колебались в промежутке от 2,1 до 3,0 мм, а в 35 наблюдениях (42,2 %) были от 3,1 до 5,0 мм. В пяти случаях (6,0 %) размер меланомы был менее 2 мм и в трёх случаях (3,6 %) превышал 20 мм (Рисунок 1А; Рисунок 1Б).

В 17 наблюдениях (20,5 %), отнесённых впоследствии к радиальной фазе роста меланомы, на поверхности опухолевого узла макро- и дерматоскопически были обнаружены очаговые, радиальные, либо точечные фокусы изъязвлений. В большинстве наблюдений (66 случаев – 79,5 %) изъязвления отсутствовали. При патогистологическом исследовании в подавляющем большинстве наблюдений (54 случая – 65,1 %) был зафиксирован II уровень инвазии по Clark [53; 155] и в 26 случаях (31,3 %) – III уровень. В трёх случаях (3,6 %) при локализации меланомы в области лица был определен IV уровень инвазии.



А – неравномерности границ новообразования и распределения пигмента, цветовое разнообразие, отсутствие выраженной асимметрии и возвышения, многочисленные глобулы, локализованные на периферии опухолевого узла; реальный размер – фото;  
Б – фотофиксация изображения новообразования, полученного при помощи дерматоскопа

Рисунок 1 – Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи туловища

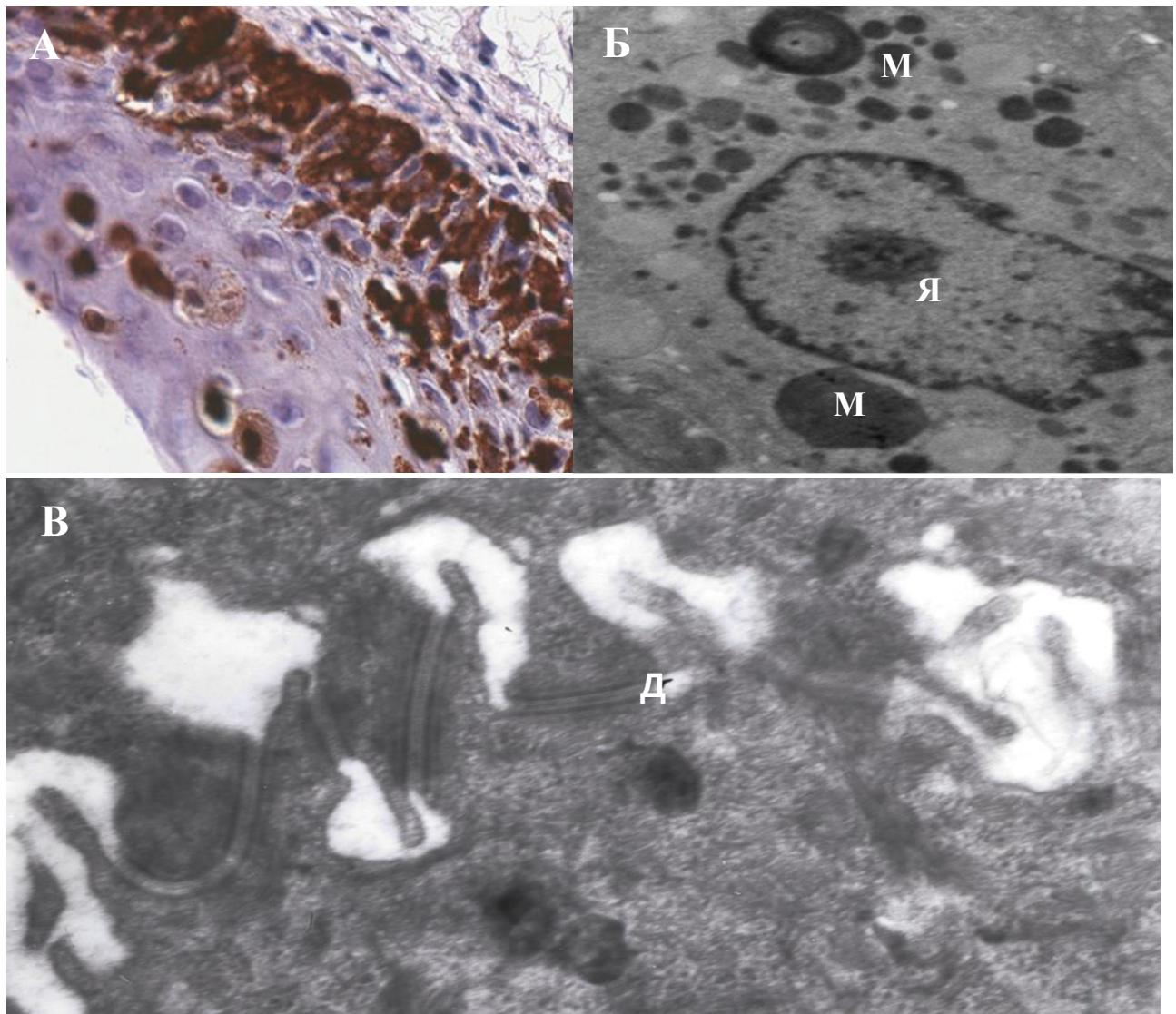
Сравнительную редкость представляли собой поверхностно-распространяющиеся меланомы, локализация которых ограничивалась лишь базальным слоем эпидермиса, несмотря на распространение атипичных меланоцитов в вышележащие его слои. В подобных случаях трудно было удержаться от соблазна установления степени инвазии Clark I. Сомнения рассеивались при осуществлении иммуногистохимической реакции с антителами к Melan A, положительный результат которой был зафиксирован в базальном и вышележащих слоях эпидермиса (Рисунок 2А), а в участках дермы, непосредственно прилежащих к эпидермису были идентифицированы также отдельные атипичные меланоциты. При электронномикроскопическом исследовании они были расположены среди кератиноцитов базального слоя, характеризовались непропорционально крупным ядром с небольшим количеством преимущественно маргинально расположенного хроматина, множественными инвагинациями кариолеммы. Среди клеточных компартментов во множестве были представлены меланосомы, различающиеся по электронной плотности

(Рисунок 2Б). Кроме меланоцитов включения меланина были обнаружены в апикальной части кератиноцитов базального слоя эпидермиса и в части клеток шиповатого слоя, непосредственно прилежащих к базальному. Поскольку пролиферация атипичных меланоцитов в базальном слое эпидермиса явилась своеобразной *vis agendi ex infra* для вышележащих слоев эпидермиса, вполне ожидаемым было развитие в шиповатом слое спонгиоза – межклеточного отёка (Рисунок 2В), морфологическим проявлением которого были дискомплексация десмосом и появление многочисленных электроннопрозрачных пространств между отростками клеток.

Базальная мембрана эпидермиса имела нечёткие границы и контуры, характеризовалась наличием разволокнений, очаговых утолщений и дефектов (Рисунок 3А). Часть меланоцитов, локализованных в базальном слое эпидермиса, содержала в своей цитоплазме лишенные пигмента меланосомы (Рисунок 3Б). Иммуногистохимическое исследование выполнили во всех 83 случаях поверхностно-распространяющейся меланомы с использованием следующей панели маркеров Melan A, HMB45, S100. Была осуществлена также иммуногистохимическая идентификация мутировавшего белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1. Результаты иммуногистохимического исследования оценивали качественно и отражали в соответствующей карте клинического наблюдения с признаком «Да» – в случае наличия специфической реакции, проявляющейся в окрашивании образца и признаком «Нет» – при его отсутствии. Применительно к вышеперечисленным маркерам положительный результат с антителами к Melan A был зафиксирован в 69,9 % случаев, HMB45 – в 57,8 %, а S100 – 38,6 % случаев. Что касается иммуногистохимической идентификации BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1, то положительный результат был отмечен всего в 25,3 % случаев.

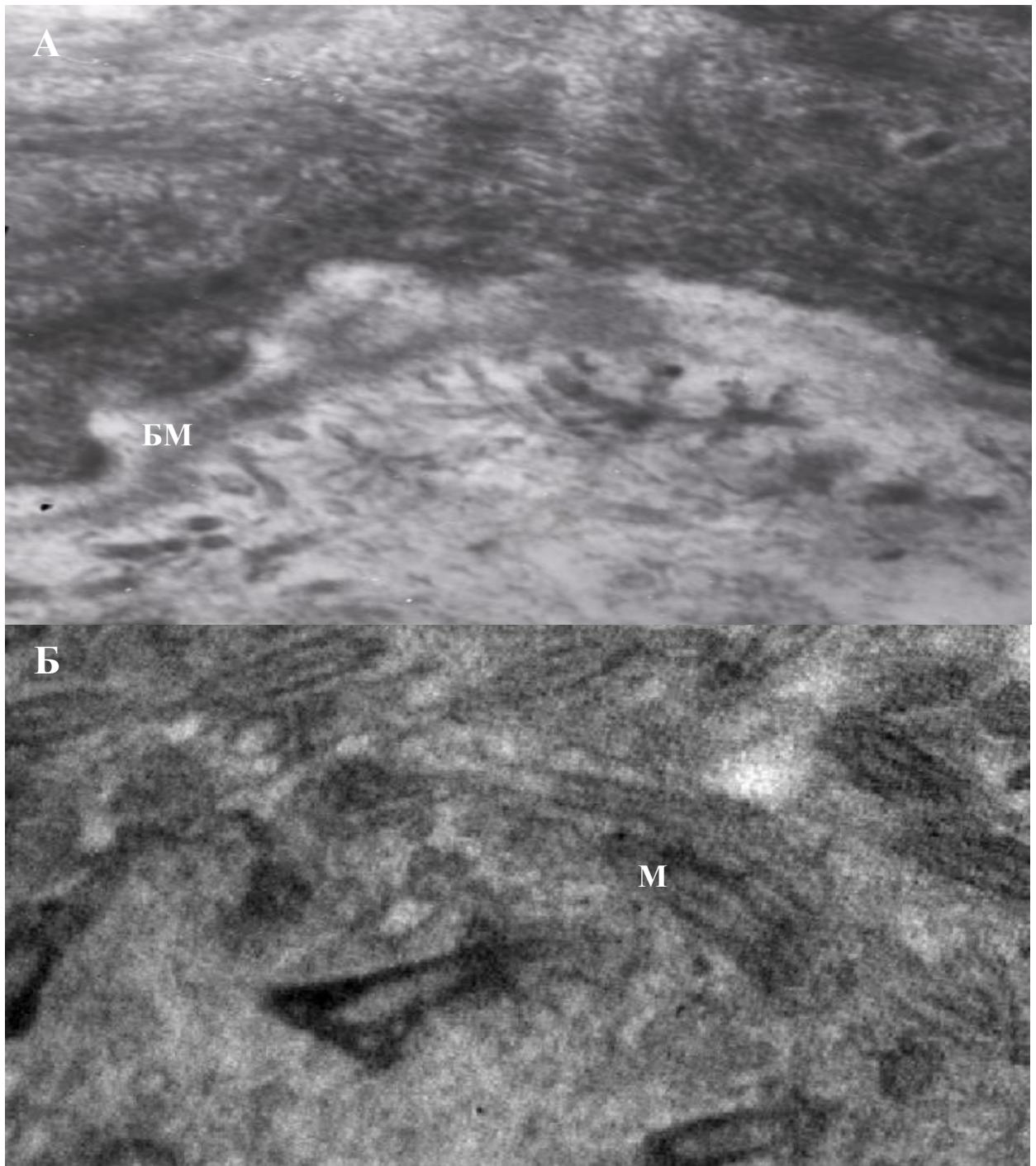
В фенотипических проявлениях экспрессии антител к вышеупомянутым маркерам не было выявлено закономерности. В большинстве случаев она носила характер ядерно-цитоплазматической, диффузной. В части наблюдений экспрессия

антител отличалась гетерогенностью и в разных участках одного и того же препарата могла быть ядерной, цитоплазматической либо мембранный.



А – иммуногистохимическая реакция с антителами к Melan A x 100;  
 Б – атипичный меланоцит: крупное ядро (Я) с преимущественно маргинальным расположением хроматина, множественными инвагинациями кариолеммы; меланосомы (М), различающиеся по электронной плотности, ТЭМ x 8000;  
 В – спонгиоз (межклеточный отек) в шиповатом слое эпидермиса, многочисленные электронно прозрачные пространства между отростками клеток, очаговая дискомплексация и деструкция десмосом (Δ), ТЭМ x 15000

Рисунок 2 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи в фазу радиального (горизонтального) роста



А – базальная мембрана (БМ) эпидермиса с нечёткими контурами, разволокнениями, очаговыми утолщениями и дефектами, ТЭМ x 15000;  
Б – меланосомы (М), лишённые пигмента, в цитоплазме меланоцитов базального слоя, ТЭМ x 15000

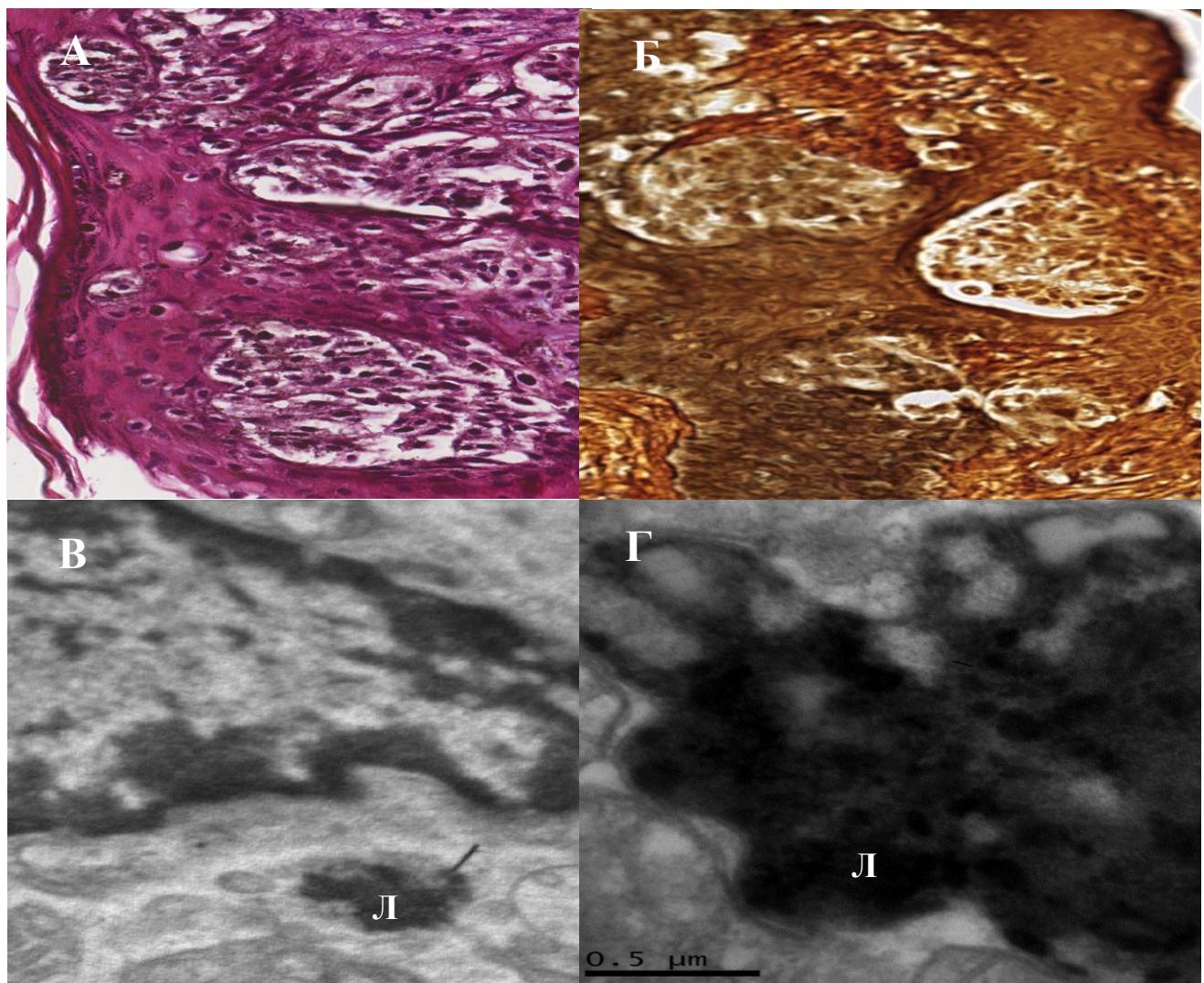
Рисунок 3 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи в фазу радиального (горизонтального) роста

В подавляющем большинстве наблюдений, в которых в качестве доминирующей была определена фаза радиального (горизонтального) роста опухоли, отмечали наличие как минимум четырёх из шести признаков, определенных в качестве критериев данной фазы роста: локализация опухолевых комплексов и отдельных клеток, не входящих в их состав, помимо эпидермиса, в участках его соединения с дермой и распространение в сосочковый слой дермы [38; 50]; размерам и характеристикам опухолевых комплексов и отдельных клеток вышеуказанных локализаций присуща определённая однотипность [54]; минимальное число митозов (1–2 на  $\text{мм}^2$ ) [152]; спектральным характеристикам образцов опухоли, наоборот, свойственна гетерогенность как в части интенсивности флуоресценции, так и значений рамановского сдвига ( $\text{см}^{-1}$ ) [8].

Как правило, подобные наблюдения в большинстве случаев имели довольно типичную патогистологическую картину (Рисунок 4А) поверхностно-распространяющейся педжетоидной пигментной меланомы без изъязвления. В подавляющем большинстве наблюдений (65 случаев – 78,4 %) толщина опухоли, выраженная в метрических единицах Breslow, не превышала 1 миллиметра. В 8 случаях (9,6 %) толщина варьировала от 1,1 до 2,0 мм и в 10 наблюдениях (12,0 %) была более 2,1 мм, но не превышала 3,0 мм. Констатация прочих признаков также не отличалась разнообразием. Митотическая активность опухоли в фазу радиального роста, проявлявшаяся в числе митозов на единицу площади опухоли ( $1 \text{ мм}^2$ ) характеризовалась умеренными значениями: в 41 наблюдении (49,4 %) митозы либо отсутствовали, либо их число было минимальным и не превышало одного. В 32 наблюдениях (38,6 %) идентифицировали 2-3 митоза на  $1 \text{ мм}^2$  опухоли и лишь в 10 случаях (12,0 %) выявили более 4 митозов на единицу площади опухоли. Для радиальной фазы роста меланомы лимфоваскулярная инвазия оказалась нехарактерной и была идентифицирована лишь в двух наблюдениях (2,5 %). Лимфоидная инфильтрация обычно носила умеренный, преимущественно перитуморальный, характер и в 25 наблюдениях (30,1 %) опухоль инфильтрирующие лимфоциты (TILs) не были идентифицированы. Из оставшихся 58 случаев в 17 (20,5 %) были выявлены Brisk, а в 41 наблюдении (49,4 %) Nonbrisk

лимфоциты. Среди кератиноцитов всех слоёв эпидермиса была обнаружена россыпь атипичных меланоцитов пейджетоидного типа, интрапидермально расположены кластеры опухолевых клеток по своим размерам превышающие или соответствующие аналогичным кластерам, расположенным в сосочковом слое дермы. Как единичные атипичные меланоциты, так и таковые, составляющие опухолевые кластеры содержали довольно значительное количество меланина, выявляемого серебрением методом Массон-Фонтана (Рисунок 4Б) и на ультраструктурном уровне. При электронномикроскопическом исследовании в цитоплазме кератиноцитов базального слоя эпидермиса были обнаружены также отложения липофусцина, имевшие вид аморфных включений и/или зёрен, уступавших по своей электронной плотности меланину (Рисунок 4В). В их локализации не наблюдалось закономерности: включения липофусцина могли располагаться как перинуклеарно, так и на периферии клетки и обычно соседствовали с оптически «пустыми» клеточными компартментами (митохондриями, лизосомами). При большем увеличении включения липофусцина, в отличие от меланина, не были однородными и представляли собой образования, в которых электроннодense отложения чередовались с аналогичными электроннопрозрачными участками или фрагментами меньшей электронной плотности. При этом даже в самих электроннодense участках были видны зёरна большей или меньшей электронной плотности (Рисунок 4Г).

В меньшем числе наблюдений включения клеточного липофусцина, также идентифицированного спектроскопически посредством выявления входящих в его состав каротиноидов, имели вид линейных электроннодense депозитов, отделённых друг от друга электроннопрозрачными промежутками. В отличие от «традиционного аморфного» липофусцина, не имевшего чёткой локализации в кератиноците, линейные депозиты располагались вблизи их ядер.



А – поверхностно распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи; окраска гематоксилином и эозином, х 200; Б – меланин в единичных клетках, формирующих опухолевые кластеры; серебрение по Массон-Фонтана, х 200; В – липофусцин (Л) в цитоплазме кератиноцита базального слоя эпидермиса, ТЭМ х 20000; Г – то же, х 40000

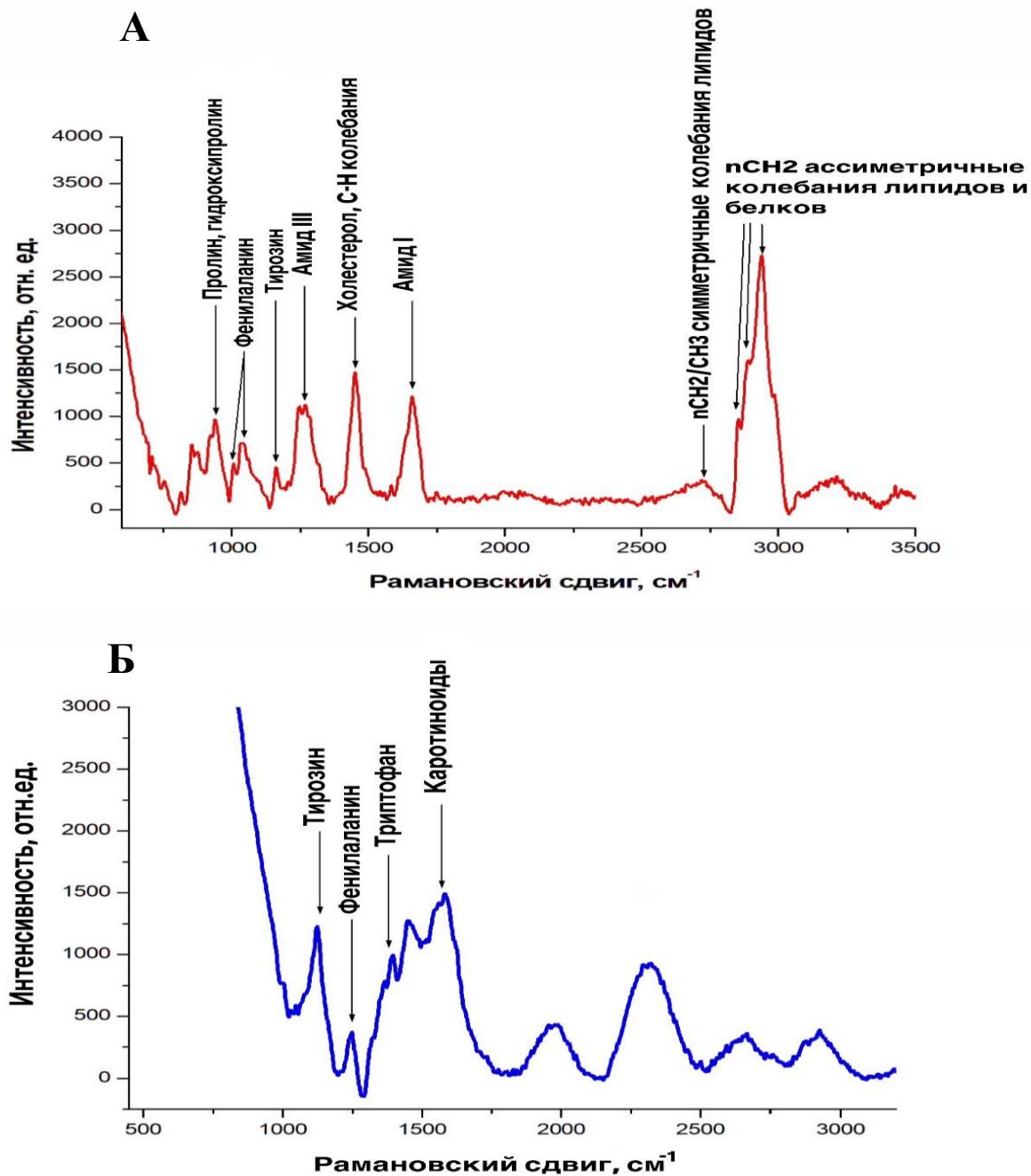
Рисунок 4 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи

Проведённое спектроскопическое исследование образцов кожи контрольной группы и поверхностно распространяющейся меланомы (фаза радиального роста), показало, что для спектров образцов кожи контрольной выборки были свойственны высокие значения инициальной флуоресценции (2000 относительных единиц) и распределение интенсивности молекулярных колебаний фенилаланина ( $1003,8 \text{ см}^{-1}$  и  $1045,1 \text{ см}^{-1}$ ) и тирозина ( $1172,4 \text{ см}^{-1}$ ) (Рисунок 5А). По сравнению с ними спектры образцов кожи с поверхностно распространяющейся меланомой (фаза радиального

роста) имели ещё более высокие значения инициальной флуоресценции (3000 относительных единиц) и разнообразный состав специфических анализаторов с интенсивностью молекулярных колебаний фенилаланина ( $1208\text{ см}^{-1}$ ), тирозина ( $1172,4\text{ см}^{-1}$ ), триптофана ( $1365,4\text{ см}^{-1}$ ) и каротиноидов ( $1540\text{ см}^{-1}$ ) (Рисунок 5Б).

Что касается представителей гемоглобиногенных пигментов (порфирина), то в образцах нормальной кожи они идентифицировались исключительно редко, а в группах с меланомой чаще определялись при толщине опухоли не более 1 мм или превышающей 4,1 мм.

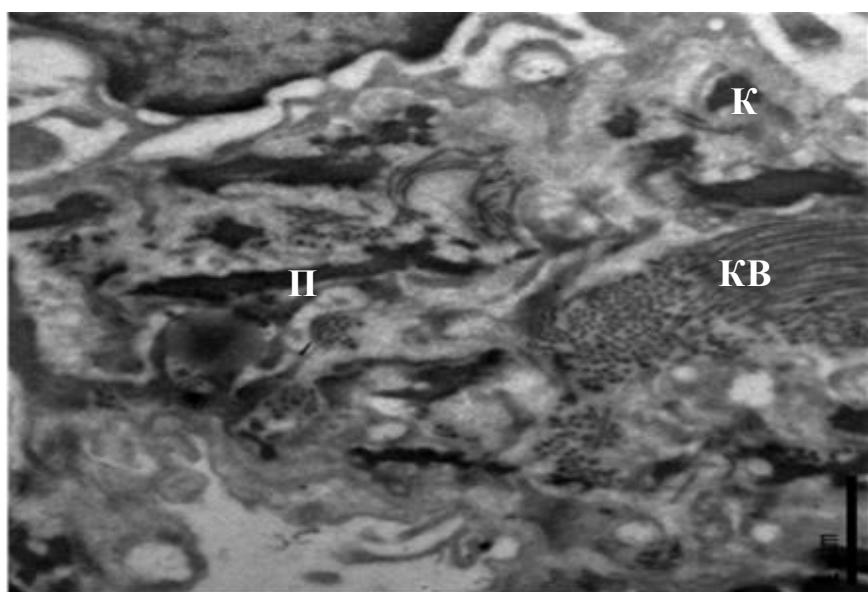
Морфологическая и спектроскопическая идентификация порфиринов, входящих в группу гемоглобиногенных пигментов, в образцах поверхностно распространяющихся меланом могла быть осуществлена при наличии двух условий: инвазии опухоли и выходе последней за пределы дерматоэпидермального соединения (абриса) и реализации в той или иной степени расстройств кровообращения и ассоциированных с ними вторичных изменений (изъязвления, кровоизлияния, некроз). При этом электронномикроскопически порфирин идентифицировался в виде умеренно электронноплотных игольчатых образований, расположенных в сосочковом слое дермы в непосредственной близости с коллагеновыми фибрillами и внеклеточными отложениями липидогенных пигментов (Рисунок 6А). При этом в кератиноцитах базального слоя эпидермиса была отмечена вакуолизация цитоплазмы, разволокнение, фрагментация и деструкция базальной мембранны эпидермиса. Спектр образца кожи поверхностно распространяющейся меланомы (фаза радиального роста) характеризовался высокими значениями инициальной флуоресценции (3000 относительных единиц) и распределением интенсивности молекулярных колебаний фенилаланина ( $1003,8\text{ см}^{-1}$  и  $1208\text{ см}^{-1}$ ), тирозина ( $1614,4\text{ см}^{-1}$ ), порфиринов ( $1122,4\text{ см}^{-1}$ ) и каротиноидов ( $1344\text{ см}^{-1}$ ) (Рисунок 6Б).



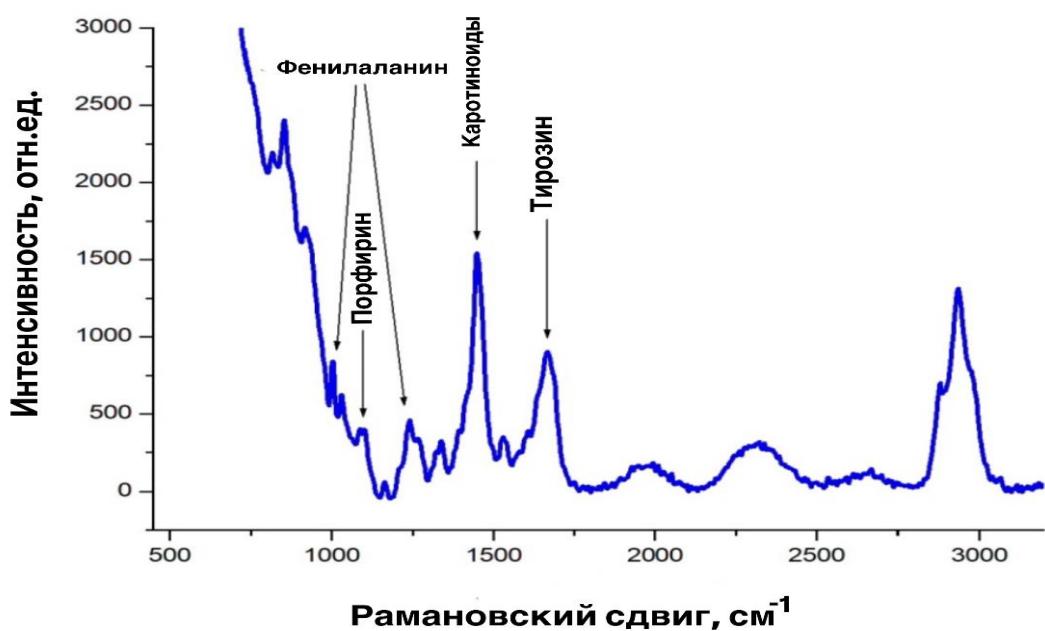
А – спектр образца кожи контрольной выборки; высокие значения инициальной флуоресценции (2000 относительных единиц) и распределение интенсивности молекулярных колебаний фенилаланина ( $1003,8 \text{ см}^{-1}$  и  $1045,1 \text{ см}^{-1}$ ) и тирозина ( $1172,4 \text{ см}^{-1}$ );  
Б – спектр образца кожи поверхностно распространяющейся меланомы (фаза радиального роста); высокие значения инициальной флуоресценции (3000 относительных единиц) и распределение интенсивности молекулярных колебаний фенилаланина ( $1208 \text{ см}^{-1}$ ), тирозина ( $1172,4 \text{ см}^{-1}$ ), триптофана ( $1365 \text{ см}^{-1}$ ) и каротиноидов ( $1540 \text{ см}^{-1}$ )

Рисунок 5 – Сравнительная характеристика образцов кожи контрольной группы и поверхностно распространяющейся меланомы (фаза радиального роста)

А



Б



А – вакуолизация цитоплазмы кератиноцитов базального слоя эпидермиса, разволокнение и деструкция базальной мембраны эпидермиса; каротиноиды (К) и порфирины (П) в участках дерматоэпидермального соединения, коллагеновые волокна (КВ), ТЭМ X 15000;

Б – спектр образца кожи поверхностно распространяющейся меланомы (фаза радиального роста); высокие значения инициальной флуоресценции (3000 относительных единиц) и распределение интенсивности молекулярных колебаний фенилаланина ( $1003,8 \text{ см}^{-1}$  и  $1208 \text{ см}^{-1}$ ), тирозина ( $1614,4 \text{ см}^{-1}$ ), порфиринов ( $1122,4 \text{ см}^{-1}$ ) и каротиноидов ( $1344 \text{ см}^{-1}$ )

Рисунок 6 – Морфологическая и спектроскопическая идентификация каротиноидов и порфиринов в образце кожи поверхностно-распространяющейся меланомы (фаза радиального роста)

Было осуществлено также молекулярно-генетическое исследование биообъектов с использованием полимеразно-цепной реакции с целью выявления мутации гена BRAF и NRAS. Мутации гена BRAF исследовали на предмет наличия мутации V600. Мутации гена NRAS изучали с целью идентификации 3 мутаций, расположенных в 12 кодоне 2 экзона (Gly12Asp, Gly12Cys, Gly12Ser); 2 мутаций, расположенных в 13 кодоне 2 экзона (Gly13Asp, Gly13Arg); 3 мутаций, расположенных в 61 кодоне 3 экзона (Gln61Lys, Gln61Leu, Gln61Arg). В результате проведенного исследования 63 случаев меланомы<sup>2</sup>, находящейся в радиальной фазе роста, BRAF V600 мутация была обнаружена в 33 наблюдениях (52,4 %), и не идентифицирована в 30 случаях (47,6 %). Мутации гена NRAS были исследованы в 62 случаях меланомы<sup>3</sup> с радиальной фазой роста и в 13 наблюдениях (21 %) обнаружены в 12/13 кодоне 2 экзона и 61 кодоне 3 экзона. В 49 случаях (79,0 %) мутации гена NRAS не были идентифицированы.

### **3.2. Клинико-морфологическая, иммуногистохимическая характеристика поверхностно распространяющейся меланомы кожи в стадию вертикального роста и особенности реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли**

Группа наблюдений ( $n = 45$ ) с диагностированной фазой вертикального распространения опухоли тем не менее сохраняла отдельные прерогативы (векторы несовершенного круга) фазы радиального роста. Макроскопические размеры новообразования, отнесённого впоследствии к вертикальной фазе роста, варьировали от 2,0 до 20 мм, и лишь в трёх случаях (6,5 %) превышали 20 мм (Таблица 5).

<sup>2</sup> В остальных 20 наблюдениях показания для проведения молекулярно-генетического исследования отсутствовали.

<sup>3</sup> В остальном 21 наблюдении показания для проведения молекулярно-генетического исследования отсутствовали.

Таблица 5 – Распределение опухоли в зависимости от макроскопических размеров (измерение наибольшего диаметра новообразования)

Фаза роста	Длина наибольшего диаметра, мм	Абс.число	% общ.числа	% внутри группы
радиальная	до 2	5	3,9	6,0
радиальная	от 2,1 до 3	31	24,2	37,4
радиальная	от 3,1 до 5,0	35	27,4	42,2
радиальная	от 5,1 до 10	3	2,3	3,6
радиальная	от 10,1 до 15	5	3,9	6,0
радиальная	от 15,1 до 20	1	0,8	1,2
радиальная	>20	3	2,3	3,6
<b>Итого</b>		83	64,8	100
вертикальная	до 2	1	0,8	2,3
вертикальная	от 2,1 до 3	4	3,1	8,8
вертикальная	от 3,1 до 5,0	12	9,4	26,7
вертикальная	от 5,1 до 10	12	9,4	26,7
вертикальная	от 10,1 до 15	7	5,5	15,6
вертикальная	от 15,1 до 20	6	4,7	13,4
вертикальная	> 20	3	2,3	6,5
<b>Итого</b>		45	35,2	100

В 30 наблюдениях (66,7 %), отнесённых впоследствии к вертикальной фазе роста меланомы, на поверхности опухолевого узла макро- и дерматоскопически были обнаружены очаговые, радиальные, либо точечные фокусы изъязвлений. В остальных наблюдениях (15 случаев – 33,3 %) изъязвления отсутствовали (Таблица 6).

Таблица 6 – Совокупная частота изъязвлений поверхности опухоли по данным макро- и микроскопического исследования

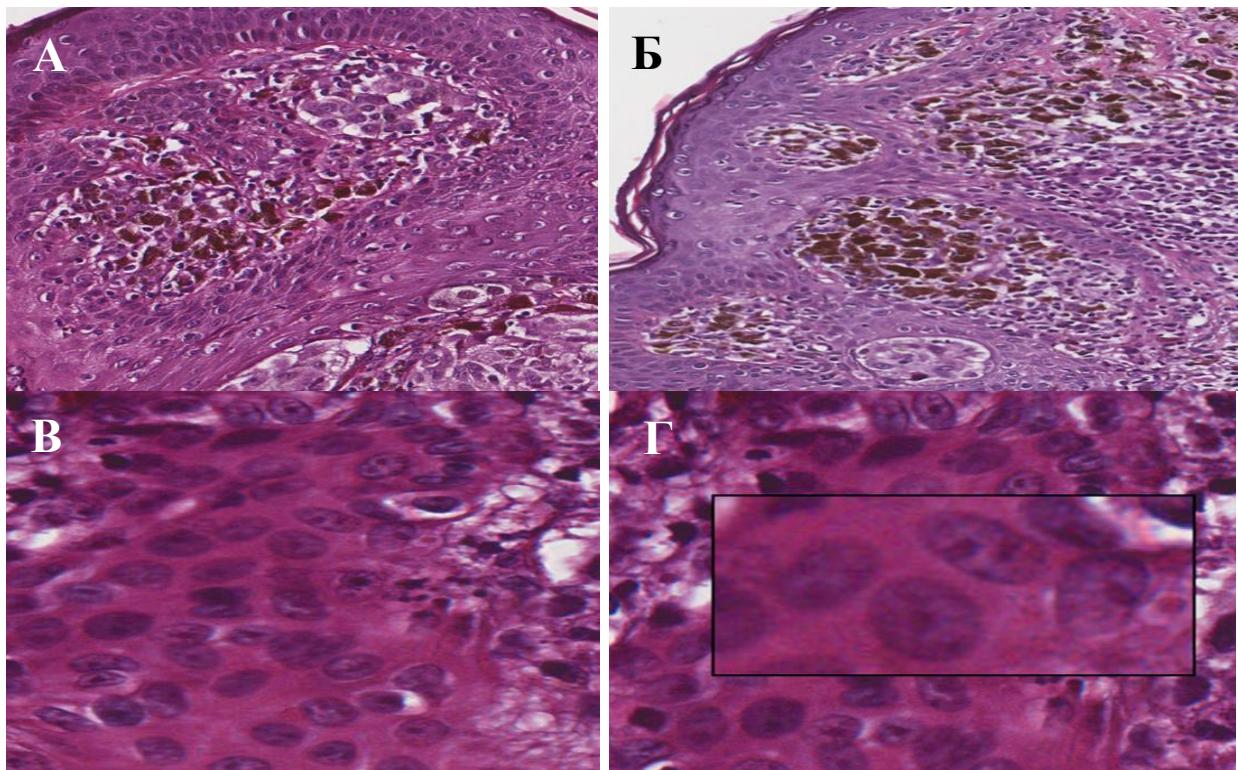
Фаза роста	изъязвление	Абс.число	% общего числа	% внутри группы
радиальная	Да	17	13,3	20,5
радиальная	Нет	66	51,6	79,5
вертикальная	Да	30	23,4	66,7
вертикальная	Нет	15	11,7	33,3

При патогистологическом исследовании в подавляющем большинстве наблюдений (42 случая – 93,5 %) был зафиксирован либо III, либо IV уровень инвазии по Clark [49; 50]. В трёх случаях (6,5 %) при локализации меланомы в области туловища был определен V уровень инвазии (Таблица 7).

Таблица 7 – Распределение наблюдений в зависимости от уровня инвазии

Фаза роста	Уровень инвазии по Clark	Абс.число	% общего числа	% внутри группы
радиальная	II	54	42,2	65,1
радиальная	III	26	20,3	31,3
радиальная	IV	3	2,3	3,6
вертикальная	III	23	18,0	51,3
вертикальная	IV	19	14,8	42,2
вертикальная	V	3	2,3	6,5

В большинстве наблюдений, отнесённых в эту группу, отмечали превалирующий над образцами первой группы полиморфизм патогистологических признаков (Рисунок 7А). Уровень инвазии новообразования по Clark превышал второй [38], число отдельных атипичных меланоцитов и количество формируемых ими комплексов в дерме преобладали над интрапидермальными [50] (Рисунок 7Б), показатели митотической активности превышали таковые в группе с радиальной фазой роста опухоли, в большей части наблюдений было идентифицировано 4 и более митозов в 1  $\text{мм}^2$  площади опухоли [152] (Рисунок 7В; Рисунок 7Г; Таблица 8).



А – поверхностно распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи; окраска гематоксилином и эозином, х 200; Б – меланин в клетках, формирующих опухолевые кластеры; окраска гематоксилином и эозином, х 200; В – полиморфизм опухолевых клеток; окраска гематоксилином и эозином, х 400; Г - то же, х 450

Рисунок 7 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи в фазу вертикального роста

Таблица 8 – Характеристика митотической активности на 1 мм<sup>2</sup> опухоли

Фаза роста	Число митозов	Абс.число	% общего числа	% внутри группы
радиальная	до 1	41	32,0	49,4
радиальная	2 – 3	32	25,0	38,6
радиальная	>4	10	7,8	12,0
вертикальная	до 1	4	3,1	8,8
вертикальная	2 – 3	7	5,5	15,6
вертикальная	>4	34	26,6	75,6

В качестве ещё одного из основных критериев определения инвазивной компетентности меланомы и отнесения её к радиальной или вертикальной фазе (стадии) роста была использована толщина опухоли, выраженная в метрических

единицах (миллиметрах), также предложенная классиком мировой патоморфологии Breslow [51] и широко используемая в отечественной практике (Таблица 9).

Таблица 9 – Распределение наблюдений в зависимости от глубины проникновения (инвазии). Толщина опухоли по Breslow (мм)

Фаза роста	Толщина по Breslow, мм	Абс.число	% общего числа	% внутри группы
радиальная	до 1	65	50,8	78,4
радиальная	1,1 – 2,0	8	6,2	9,6
радиальная	2,1 – 3,0	10	7,8	12,0
вертикальная	до 1	2	1,6	4,5
вертикальная	1,1 – 2,0	2	1,6	4,5
вертикальная	2,1 – 3,0	5	3,9	11,1
вертикальная	3,1 – 4,0	10	7,8	22,2
вертикальная	>4,1	26	20,3	57,7

Как для радиальной, так и вертикальной фазы роста меланомы лимфоваскулярная инвазия оказалась нехарактерной и была идентифицирована лишь в 13 наблюдениях (29,0 %) (Таблица 10).

Таблица 10 – Распределение наблюдений в зависимости от наличия или отсутствия патогистологических признаков лимфоваскулярной инвазии (LVI)

Фаза роста	Наличие LVI	Абс.число	% общ. числа	% внутри группы
радиальная	да	2	1,6	2,5
радиальная	нет	78	60,9	94,0
радиальная	нет данных	3	2,3	3,5
вертикальная	да	13	10,2	29,0
вертикальная	нет	30	23,4	66,5
вертикальная	нет данных	2	1,6	4,5

Лимфоидная инфильтрация, как и в наблюдениях с радиальной фазой роста, носила умеренный, преимущественно перитуморальный, характер, в 3 наблюдениях (6,6 %) опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TILs) не были идентифицированы. Из оставшихся 42 случаев в 11 (24,5 %) были выявлены Brisk, а в 31 наблюдении (68,9 %) Nonbrisk лимфоциты (Таблица 11).

Таблица 11 – Характеристика лимфоцитарного (иммунного) инфильтрата в зависимости от категориальности лимфоцитов

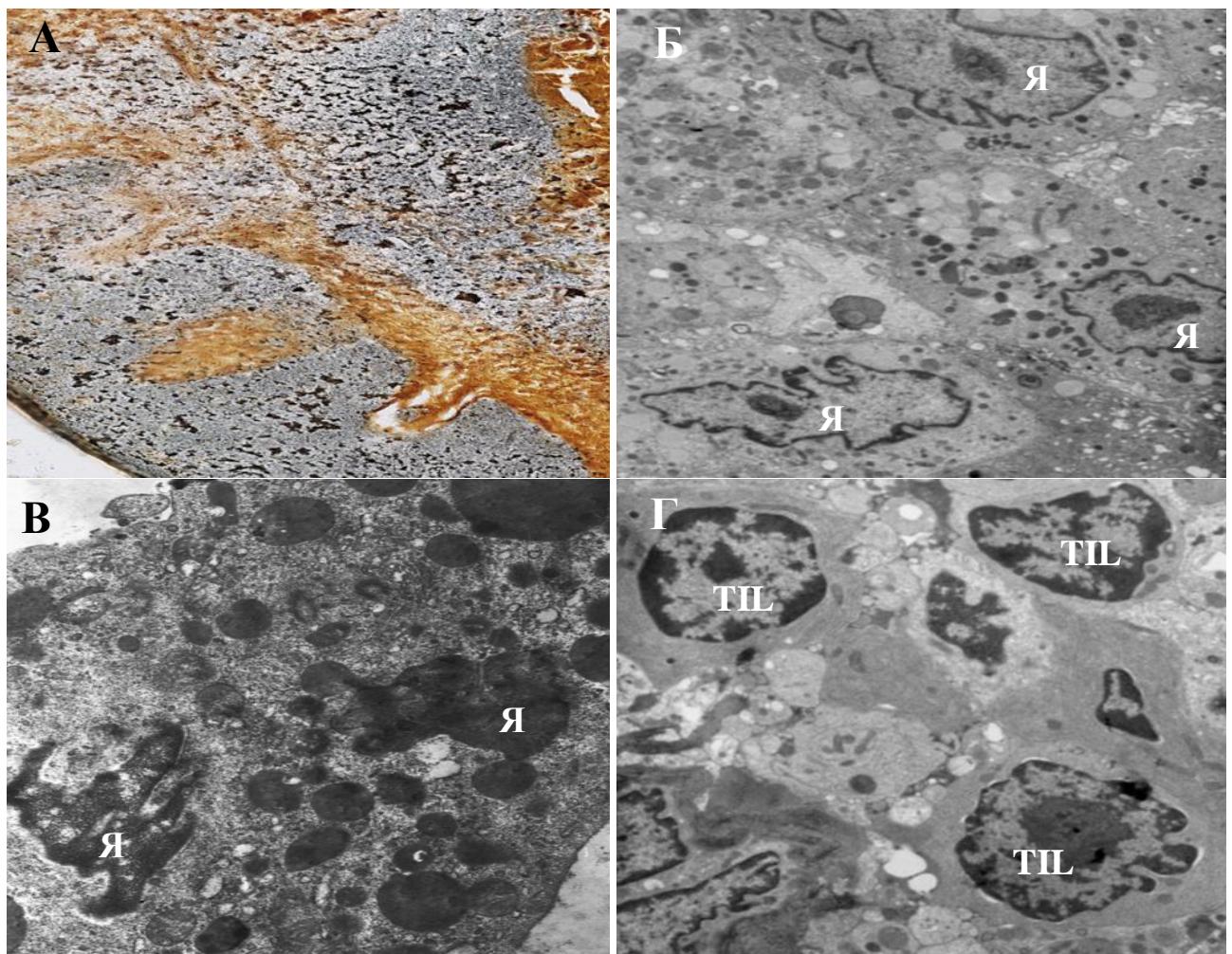
Фаза роста	Категория TILs	Абс.число	% общего числа	% внутри группы
радиальная	Brisk	17	13,3	20,5
радиальная	Nonbrisk	41	32,0	49,4
радиальная	не определяется	25	19,5	30,1
вертикальная	Brisk	11	8,6	24,5
вертикальная	Nonbrisk	31	24,2	68,9
вертикальная	не определяется	3	2,3	6,6

Распространение опухоли в сосочковом слое дермы и выход последней за его пределы в сетчатый слой создавало впечатление значительного повышения содержания меланина как в эпидермисе и дерме, так и единичных атипичных меланоцитах (Рисунок 8А). Вместе с тем, изменение качественного состояния новообразования, обусловленного его переходом из радиальной в вертикальную стадию роста, сопровождалось уменьшением частоты выявления компонентов-аналитов эндогенных пигментаций в наблюдениях, входящих во вторую группу (стадия вертикального роста). Так, по сравнению с первой группой (стадия радиального роста) частота выявления прекурсора меланина тирозина снизилась с 75,9 % до 51,1 %, триптофана с 80,7 % до 44,4 %, фенилаланина с 65,1 % до 33,3 %. Уменьшилась частота выявления каротиноидов, входящих в состав липофусцина и являющихся его своеобразной «визитной карточкой» с 56,6 % до 33,3 %. Что касается представителя гемоглобиногенных пигментов порфирина, то частота его выявления ожидаемо увеличилась с 53,05 % до 68,9 % по причине реализовавшихся

изъязвлений и сопутствующих им кровоизлияний. На ультраструктурном уровне митозы в меланоцитах, входящих в формируемые комплексы и митозы в отдельных, то есть не входящих в опухолевые кластеры меланоцитов, несколько отличались. В первом случае, наряду с вариантами типичного деления клеток (Рисунок 8Б), нередко наблюдали наличие в меланоцитах двух неодинаковых, отличающихся, прежде всего, по площади ядер, но имеющих сходство в части маргинального распределения ядерного хроматина, что является характерными для амитоза признаками. Вместе с тем, мы не располагаем достаточным количеством оснований и доказательств, чтобы отнести данный вид клеточного деления к амитозу, поскольку состояние прочих клеточных компартментов не свидетельствует в пользу свойственного амитозу снижения функциональной активности клеток. В отдельно располагающихся меланоцитах митоз также реализуется на фоне сохраняющейся функциональной активности клеток (Рисунок 8В).

Как в наблюдениях меланом с преобладающей фазой радиального роста, так и в группе с преобладанием вертикальной фазы роста, регистрировали наличие и качественные особенности лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs), и констатировали отсутствие статистически значимых различий в их распределении в зависимости от фазы роста опухоли. Ультраструктурно лимфоциты соседствовали с меланоцитами и свободно лежащими скоплениями электронно плотного пигмента (Рисунок 8Г).

Иммуногистохимическое исследование выполнили во всех 45 случаях поверхностно-распространяющейся меланомы с преобладанием вертикальной фазы роста. Как и в предыдущей группе использовали ту же панель маркеров Melan A, HMB45, S100. Результаты иммуногистохимического исследования также оценивали качественно, и отражали в таблице с признаком «Да» – в случае наличия специфической реакции, проявляющейся в окрашивании образца и признаком «Нет» – при его отсутствии. Применительно к вышеперечисленным маркерам положительный результат был зафиксирован во всех наблюдениях за исключением маркера S100, который был идентифицирован в 80 % случаев.



А – поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи; серебрение по Массон-Фонтана, х 200; Б – разновидность митоза в меланоците, входящем в опухолевый кластер, Я – ядро, ТЭМ х 20000; В – митоз в отдельно расположенным меланоците, Я – ядро, ТЭМ х 15000; Г – полиморфизм лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), ТЭМ х 10000

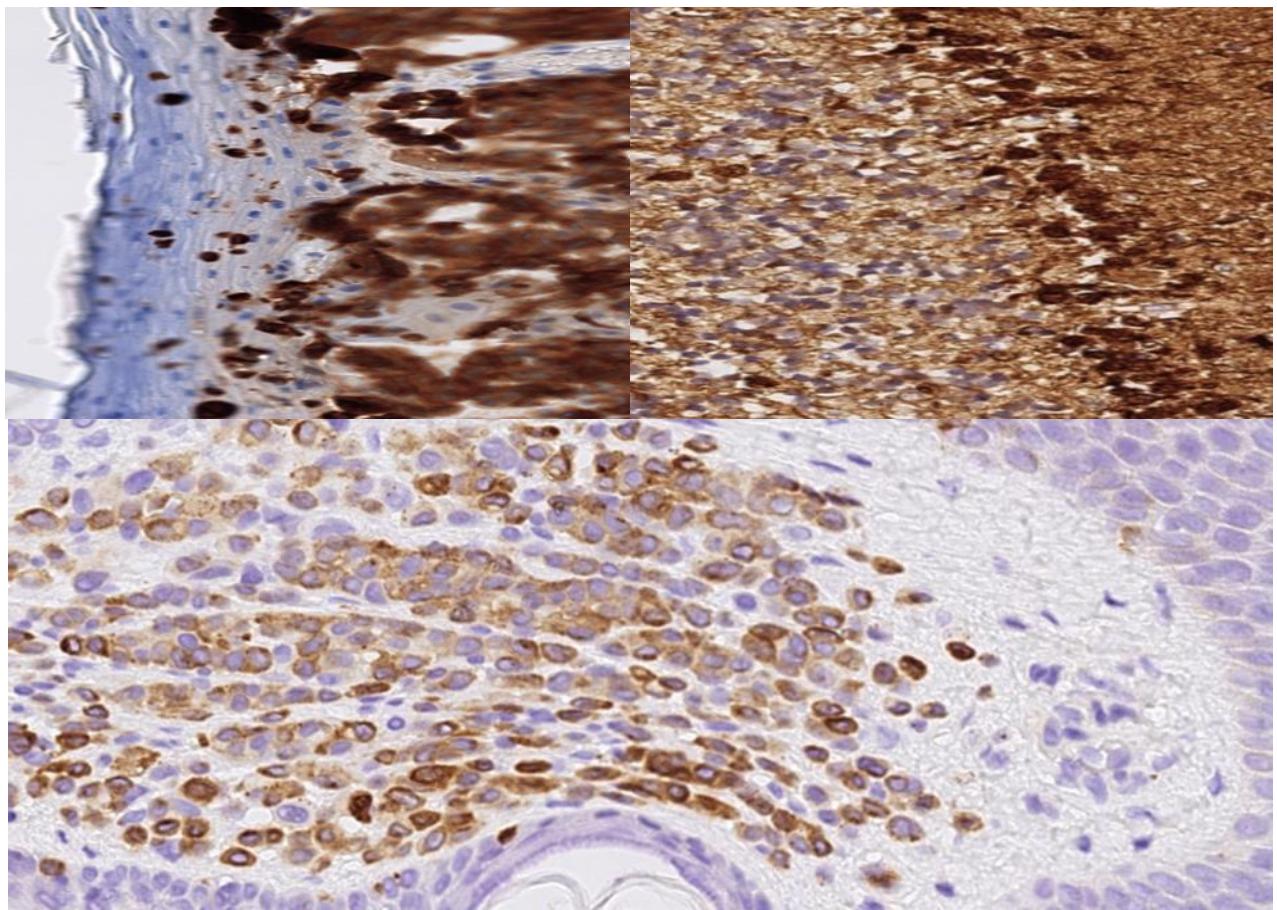
Рисунок 8 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста

Что касается иммуногистохимической идентификации мутированного белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1, то положительный результат был отмечен также в 45 случаях (100 %) (Таблица 12).

Таблица 12 – Частота определения иммуногистохимических маркеров в различные фазы роста опухоли

Фаза роста	Melan A	HMB45	S100	BRAF
радиальная (n = 83)	58 (69,9 %)	48 (57,8 %)	32 (38,6 %)	21 (25,3 %)
вертикальная (n = 45)	45 (100 %)	45 (100 %)	36 (80 %)	45 (100 %)

Результаты иммуногистохимической реакции с антителами к HMB45, S100, а также результат идентификации мутированного белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1 выглядели убедительно (Рисунок 9А; Рисунок 9Б; Рисунок 9В).



Результаты иммуногистохимических реакций с антителами к:  
А – HMB-45, x 100; Б – S-100, x 100; В- BRAF, x 200

Рисунок 9 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи  
в фазу вертикального роста

В отличие от наблюдений, где преобладающей была диагностирована радиальная стадия роста опухоли, в случаях, отнесённых к вертикальной стадии роста новообразования, фенотипические проявления экспрессии антител к вышеупомянутым маркерам отличались большим разнообразием. При использовании НМВ-45 проявления диффузной ядерно-цитоплазматической экспрессии антител наблюдали исключительно в сосочковом и сетчатом слоях дермы. В эпидермисе результат иммуногистохимического исследования свидетельствовал о наличии россыпи атипичных меланоцитов, придающих меланоме педжетоидный вид. В случае применения в качестве маркера S-100 экспрессия антител носила очаговый, а в области дерматоэпидермального соединения – распространенный характер. При иммуногистохимической идентификации мутировавшего белка BRAF экспрессия антител отличалась гетерогенностью и в разных участках одного и того же препарата могла быть ядерной, цитоплазматической либо мембранный. Что касается локации результатов реакции, то она ограничивалась исключительно сетчатым слоем дермы и участками сосочкового слоя, непосредственно прилежащих к сетчатому.

Дальнейшее распространение опухоли в направлении сосочкового и сетчатого слоёв дермы проявлялось скоплениями в них отдельных атипичных меланоцитов и/или формированием опухолевых кластеров. Подобные наблюдения в большинстве случаев складывались в довольно типичную патогистологическую картину (Рисунок 10А) фазы вертикального роста поверхностно распространяющейся, нередко педжетоидной, пигментной меланомы. В базальных отделах сетчатого слоя дермы, реже на границе сосочкового и сетчатого слоёв, были отмечены расстройства кровообращения в виде полнокровия капилляров с диапедезом эритроцитов. Констатация прочих признаков также отличалась большим разнообразием по сравнению с предыдущей фазой роста. Лимфоидная инфильтрация обычно носила очаговый, иногда очагово-распространенный или диффузный характер (Рисунок 10Б). Атипичные меланоциты нередко отличались оптически «пустой» цитоплазмой. Признаки сосудистой инвазии в большинстве случаев отсутствовали и были идентифицированы лишь в 15 случаях (11,7 % от

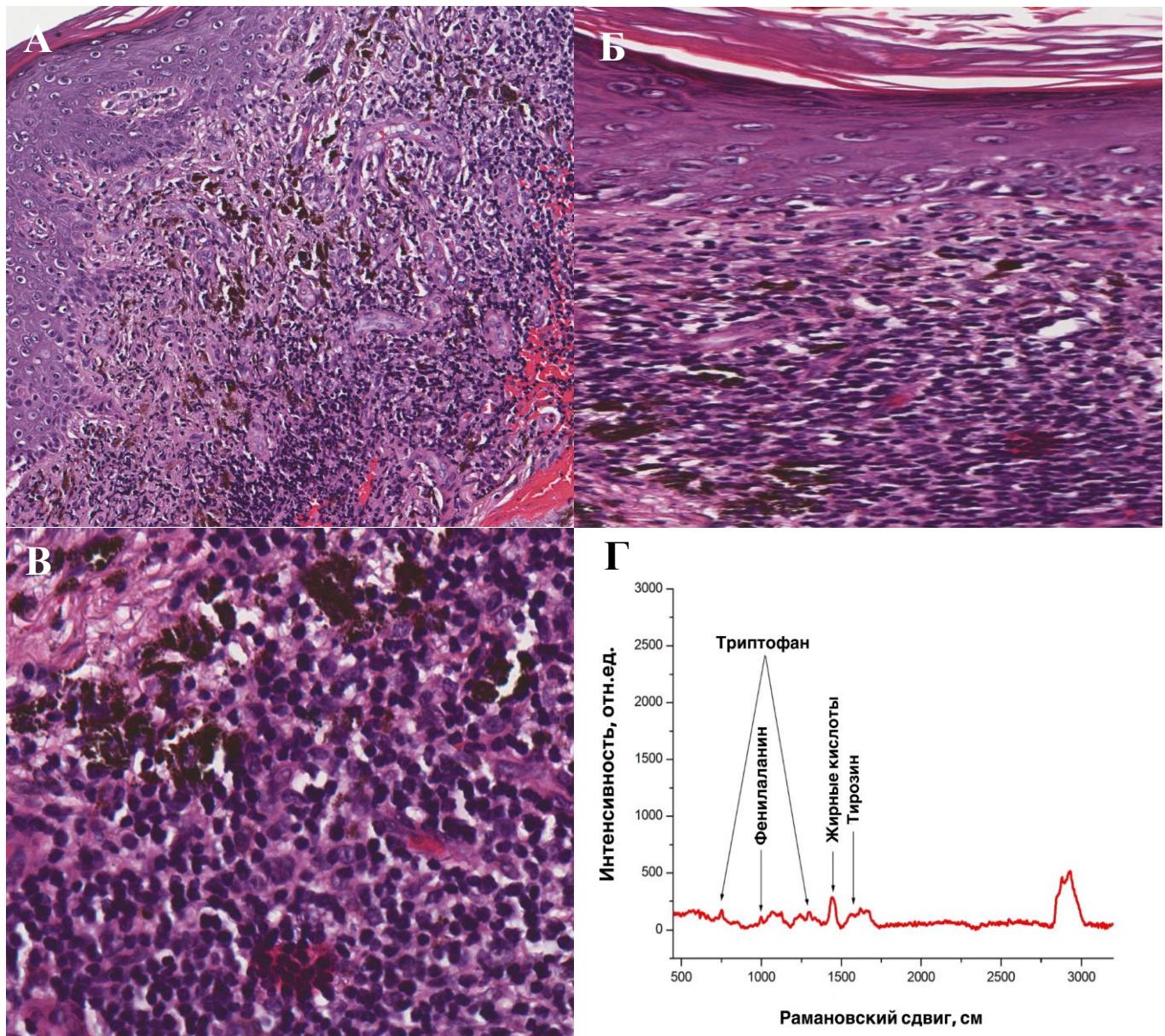
общего числа наблюдений) (Рисунок 10В). Отложения меланина были обнаружены лишь в дерме и большей частью характеризовались внеклеточной локализацией. При доминировании признаков вертикальной фазы роста были отмечены некоторые прерогативы фазы радиального роста. Так, в частности, среди кератиноцитов эпидермиса довольно нередко была выявлена россыпь атипичных меланоцитов педжетоидного типа. Что касается интраэпидермально расположенных кластеров опухолевых клеток, то они идентифицировались нечасто, а по своим размерам и числу значительно уступали соответствующим аналогичным кластерам, расположенным в дерме.

Качественный состав пигментных компонентов-аналитов практически не отличался от обнаруженных на спектрах образцов опухоли, находящейся в фазе радиального роста и представлял собой комплекс прекурсоров тирозин-триптофановых хромопротеидов и эндогенных пигментов других классов хромопротеидов, идентифицируемых на фоне реализации вторичных изменений, наблюдавшихся в опухоли (Таблица 13).

Частота встречаемости всех пигментных компонентов-аналитов радиальной и вертикальной фаз опухоли, выраженная в процентном соотношении была существенно снижена в наблюдениях, отнесённых к вертикальной фазе роста. Исключение составил порфирин, частота выявления которого в вертикальную фазу была увеличена. Спектры исследуемых образцов характеризовались наличием рамановских пиков анализаторов прекурсоров пигментных тирозин-триптофановых хромопротеидов (Рисунок 10Г). При электронномикроскопическом исследовании вертикальная фаза роста опухоли характеризовалась целым рядом особенностей.

Таблица 13 – Выявленные при рамановской спектроскопии компоненты различных фаз роста поверхностно-распространяющихся меланом кожи

№ п.п.	Признак	Количество, %
1	Фазы роста опухоли	128 (100 %)
	• радиальная	83 (64,8 %)
	• вертикальная	45 (35,2 %)
2	Компоненты, выявленные при помощи рамановской спектроскопии	
	• тирозин	86/128 (67,2 %)
	• триптофан	87/128 (68,0 %)
	• фенилаланин	69/128 (53,9 %)
	• порфирин	75/128 (58,6 %)
	• каротиноиды	62/128 (48,4 %)
3	Частота выявления компонентов посредством рамановской спектроскопии в различные фазы роста меланомы	
	а) радиальная фаза	
	• тирозин	63/83 (75,9 %)
	• триптофан	67/83 (80,7 %)
	• фенилаланин	54/83 (65,1 %)
	• порфирин	44/83 (53,0 %)
	• каротиноиды	47/83 (56,6 %)
	б) вертикальная фаза	
	• тирозин	23/45 (51,1 %)
	• триптофан	20/45 (44,4 %)
	• фенилаланин	15/45 (33,3 %)
	• порфирин	31/45 (68,9 %)
	• каротиноиды	15/45 (33,3 %)



А – скопления отдельных атипичных меланоцитов и формирование опухолевых кластеров в дерме; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 40$ ; Б – морфологический субстрат опухоли в сосочковом слое дермы; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ ; В – опухоль инфильтрирующие лимфоциты, свободно лежащие скопления меланина; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ ; Г – спектр образца кожи с опухолью: рамановские пики фенилаланина, тирозина и триптофана, низкие значения инициальной флуоресценции

Рисунок 10 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста

Строма растущей опухоли и по сравнению с предыдущей фазой роста, и по сравнению с неизменённой кожей могла пребывать в двух принципиально отличных друг от друга состояниях. Для удобства описания и использования в дальнейшей работе они получили два рабочих названия. Первое состояние было охарактеризовано как «типичное, компактное», второе – «рыхлое аморфное». В первом варианте, наблюдаемом в большинстве случаев второй группы (стадия вертикального роста), строма имела вид оформленной волокнистой соединительной ткани. В составе клеток преобладали фибробласты и фиброциты. От типичного хрестоматийного описания соединительной ткани строма опухоли отличалась наличием атипичных меланоцитов. В этих наблюдениях патогистологических признаков лимфоваскулярной инвазии выявлено не было. В меньшем числе случаев вертикальной стадии роста опухоли (29,0 %) с наличествовавшими патогистологическими признаками лимфоваскулярной инвазии строма растущей опухоли отличалась выраженной «рыхлостью», фрагментацией, разволокнением и отсутствием упорядоченности в расположении коллагеновых фибрилл. Всё это в сочетании со спавшимися капиллярами дермы было расценено нами в качестве предтечи или инициации вторичных изменений в морфологическом субстрате опухоли.

Атипичные меланоциты располагались по отдельности, отличались выраженным полиморфизмом и гетерогенностью меланосом в них (Рисунок 11А). Как было отмечено ранее, патогистологически в 29,0 % случаев поверхностно распространяющихся меланом с вертикальной фазой роста были выявлены признаки сосудистой инвазии. К сожалению, нам не удалось на ультраструктурном уровне зафиксировать саму картину сосудистой инвазии, но момент «прединвазии» получилось зарегистрировать (Рисунок 11Б). В центре снимка виден спавшийся капилляр дермы, расположенный в рыхлой соединительной ткани строме опухоли и окружённый четырьмя меланоцитами (у четвёртого виден лишь фрагмент цитоплазмы). Зафиксирован момент адгезии цитолеммы меланоцита к наружной оболочке капилляра.

Было осуществлено также молекулярно-генетическое исследование биообъектов, содержащих морфологический субстрат опухоли, с использованием полимеразно-цепной реакции с целью выявления мутации гена BRAF и NRAS. Мутации гена BRAF исследовали на предмет наличия мутации V600. Мутации гена NRAS изучали с целью идентификации 3 мутаций, расположенных в 12 кодоне 2 экзона (Gly12Asp, Gly12Cys, Gly12Ser); 2 мутаций, расположенных в 13 кодоне 2 экзона (Gly13Asp, Gly13Arg); 3 мутаций, расположенных в 61 кодоне 3 экзона (Gln61Lys, Gln61Leu, Gln61Arg). В результате проведенного исследования 38 случаев меланомы<sup>4</sup>, находящейся в вертикальной фазе роста, BRAF V600 мутация была обнаружена в 28 наблюдениях (73,7 %), и не идентифицирована в 10 случаях (26,3 %). Мутации гена NRAS были исследованы также в 38 случаях меланомы<sup>4</sup> с вертикальной фазой роста и в 11 наблюдениях (28,9 %) обнаружены в 12/13 кодоне 2 экзона и 61 кодоне 3 экзона. В 27 случаях (71,1 %) мутации гена NRAS не были идентифицированы (Таблица 14).

Таблица 14 – Частота идентифицированных мутаций в морфологическом субстрате поверхностной меланомы кожи, ассоциированных с фазой роста опухоли

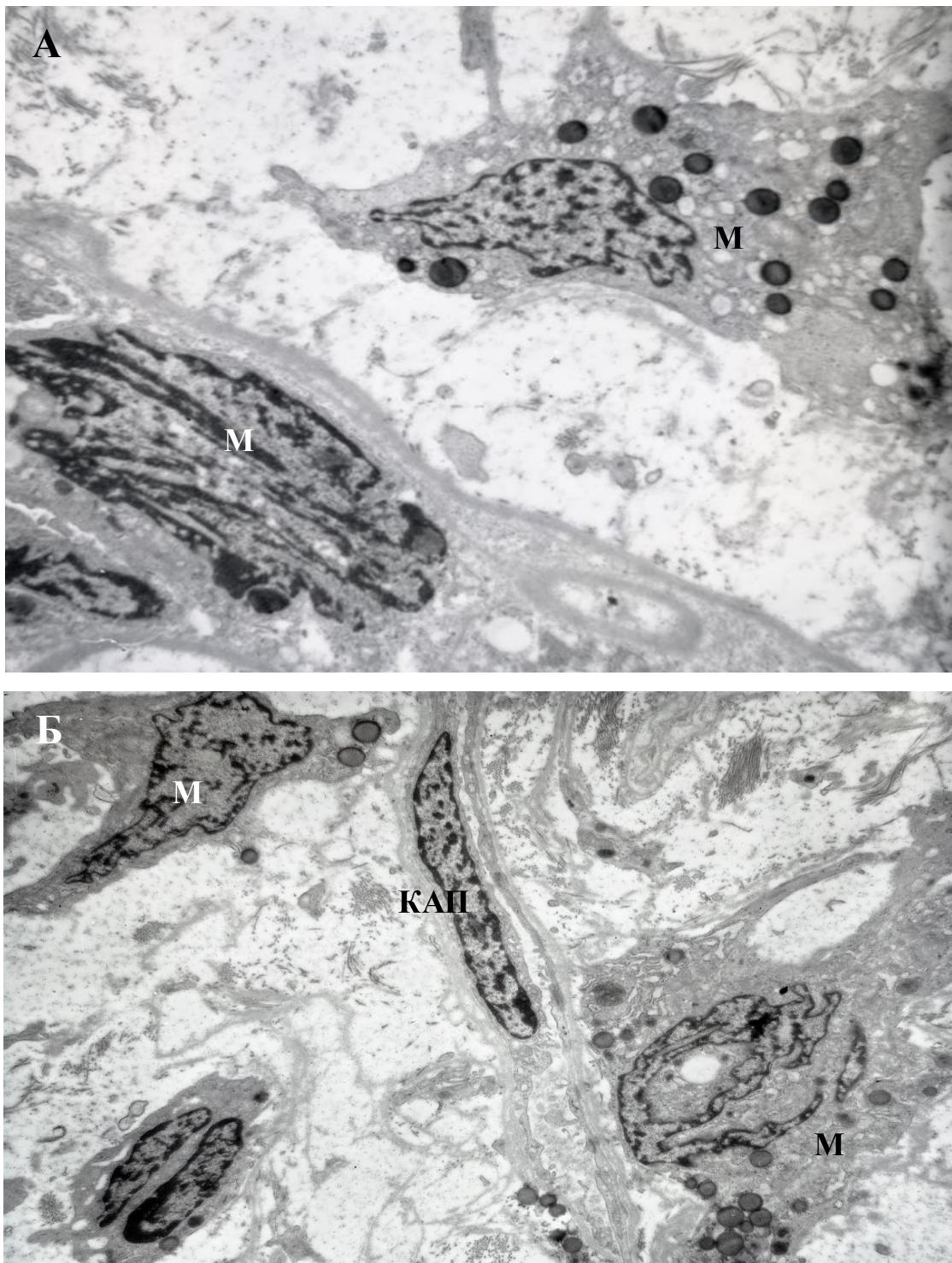
#### BRAF

Фаза роста	Число исследованных случаев	Наличие мутации	% случаев с мутацией	Отсутствие мутации	% случаев с отсутствием мутации
радиальная	63	33	52,4	30	47,6
вертикальная	38	28	73,7	10	26,3

#### NRAS

Фаза роста	Число исследованных случаев	Наличие мутации	% случаев с мутацией	Отсутствие мутации	% случаев с отсутствием мутации
радиальная	62	13	21,0	49	79,0
вертикальная	38	11	28,9	27	71,1

<sup>4</sup> В остальных 7 наблюдениях показания для проведения молекулярно-генетического исследования отсутствовали.



А – атипичные меланоциты (М) с выраженным полиморфизмом и гетерогенностью меланосом, расположенные в строме растущей опухоли; ТЭМ x 15000;  
 Б – адгезия цитолеммы меланоцитов (М) к наружной оболочке капилляра (КАП);  
 ТЭМ x 10000

Рисунок 11 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста

### **3.3. Оценка диагностического и предиктивного значения результатов иммуногистохимического исследования, лимфоваскулярной инвазии, содержания компонентов-аналитов эндогенных пигментаций и их статистической связи с инвазивной компетентностью поверхностных меланом кожи**

Имея в распоряжении результаты, изложенные в подглавах 3.1 и 3.2, было принято решение убедиться в наличии (отсутствии) взаимосвязи между категориальными переменными X и Y и в случае нахождения таковой, осуществить статистический анализ с целью определения возможности использования переменной X для прогнозирования значения Y при помощи регрессионных моделей, которые позволяют выполнить проверку гипотезы о связях между несколькими переменными. В нашем случае в качестве двух категориальных переменных были определены фаза роста (вертикальная/горизонтальная), а также значения результатов либо иммуногистохимического исследования (первая пара), либо компоненты-аналиты опухоли и показатели её лимфоваскулярной инвазии (вторая пара), либо фаза роста опухоли и компоненты-аналиты эндогенных пигментаций в её субстрате (третья пара) в значениях да/нет для всех сформированных пар. Была использована бинарная логистическая регрессия, поскольку зависимая переменная имела два возможных значения: да/нет. Общеизвестно, что компонентами бинарной регрессии являются функция отклика и логит-преобразование, которые позволяют перевести вероятность (обычно выраженную на шкале от 0 до 1) в более широкий диапазон, что делает её пригодной для использования в линейном моделировании. Первый этап направлен на модификацию переменной исхода в вероятность  $p$ , чья метка равна «1» с применением к предикторам функции логистического отклика или обратного логит-преобразования в виде формулы:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q)}}, \quad (1)$$

где  $p$  – вероятность целевого события (если  $p > 0,5$ , то это свидетельствует о вертикальной фазе роста, если меньше – о горизонтальной; выражается в цифрах с целью количественной оценки степени уверенности в предсказании; так,  $p = 0,99$  говорит о большей уверенности, чем  $p = 0,55$ );

$e$  – основание натурального логарифма  $\approx 2,718$  (логарифм нужен, чтобы имеющиеся шансы перевести в непрерывный диапазон  $(-\infty, +\infty)$ , используется для удобства интерпретации коэффициентов, применяется во всех моделях логистической регрессии);

$\beta_0$  – или перехват, или свободный член (коэффициент) в логистической регрессии (это такое значение зависимой переменной, когда все независимые переменные равны нулю, то есть не влияют на исход);

$\beta_1, \beta_2$  – коэффициенты регрессии (наша задача их рассчитать);

$x_1, x_2$  – факторы, все аналиты (предикторы, переменные), объясняющие вероятность события;

$\beta_q, x_q$  – пример, что коэффициентов и показателей может быть много.

Это преобразование гарантирует, что вероятность (обозначенная как  $p$ ) останется в пределах от 0 до 1. Для того чтобы использовать экспоненциальное выражение в знаменателе, мы переходим от вероятностей к шансам, которые представляют собой отношение «успехов» (1) к «неудачам» (0). Функция логарифма шансов, так называемая логит-функция, отображает вероятность  $p$  из интервала (0 – 1) в любое значение из интервала  $(-\infty, +\infty)$ .

В нашем исследовании откликом или зависимой переменной выступает фаза роста опухоли, которая в свою очередь принимает значение 0 при радиальном (горизонтальном) росте или 1 в случае вертикального. В роли факторных (зависимых) переменных выступили: данные иммуногистохимического исследования (первая пара); показатели наличия или отсутствия лимфоваскулярной инвазии в опухоли (вторая пара); и, наконец, аналиты: каротиноиды, порфирин, триптофан, фенилаланин (третья пара).

Проведённое исследование показало, что в фазу вертикального (инвазивного) роста во всех наблюдениях (100 %) были выявлены Melan A, HMB-

45 и аномальный белок BRAF. Частота экспрессии маркера S100 была несколько ниже (80 %).

Коль скоро в нашем исследовании фаза роста опухоли являлась зависимой переменной и могла принимать лишь два возможных значения: радиальная или вертикальная, то логистическая регрессия представлялась наиболее подходящим методом для статистического анализа. Нулевую гипотезу ( $H_0$ ) мы сформулировали таким образом, что экспрессия указанных иммуногистохимических маркеров (Melan A, HMB45, S100 и BRAF) не зависит от фазы роста опухоли. Альтернативную гипотезу ( $H_1$ ) сформулировали, напротив, так, что различия в экспрессии иммуногистохимических маркеров существуют и являются статистически значимыми. Для удобства расчётов, перекодировали зависимую переменную таким образом, чтобы значение 0 соответствовало радиальной фазе роста меланомы, а значение 1 – вертикальной. Факторными переменными или предикторами оставались по-прежнему иммуногистохимические маркеры Melan A, HMB45, S100 и BRAF. Результаты расчета коэффициентов модели логистической регрессии представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Результаты расчёта коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (первая пара)

Коэффициенты	Оценка	Стандартная ошибка	Z значение	Уровень значимости $p$
Перехват	– 68,900	10483,129	– 0,006	0,994
Melan A	23,505	7127,469	0,003	0,997
HMB45	23,100	6057,178	0,003	0,996
S100	23,798	4733,474	0,005	0,995
BRAF	2,0794	1,280	1,624	0,104

Полученные результаты продемонстрировали значительное превышение заданного уровня значимости  $p = 0,05$ . Исходя из вышеизложенного, оказалось, что ни один из предикторов не был существенным в указанной модели, следовательно,

мы не располагали достаточными основаниями для того, чтобы отвергнуть нулевую гипотезу ( $H_0$ ), суть которой заключается в том, что экспрессия указанных иммуногистохимических маркеров (Melan A, HMB45, S100 и BRAF) не зависит от фазы роста опухоли. Основанием для этого явилось отсутствие статистических различий в экспрессии иммуногистохимических маркеров Melan A, S100, HMB45, BRAF в различные фазы роста опухоли. Во второй паре при оценке статистической связи определения анализаторов и лимфоваскулярной инвазии откликом или факторной переменной выступает признак лимфоваскулярной инвазии опухоли, который принимает значение «0» при её отсутствии и «1» в случае обнаружения. Зависимые переменные-аналиты: каротиноиды, порфириин, тирозин, триптофан, фенилаланин. Как и для первой пары, сформулировали две гипотезы: нулевую и альтернативную. Нулевую гипотезу  $H_0$ , обозначили как гипотезу отсутствия связи между определением лимфоваскулярной инвазии и частотой встречаемости каждого из анализаторов. Альтернативная гипотеза  $H_1$ , напротив, содержала интересующее нас утверждение или гипотезу о наличии статистически значимых различий в распределении анализаторов и лимфоваскулярной инвазии. Проверку статистической гипотезы также осуществили путём выполнения регрессионного анализа (Таблица 16).

Таблица 16 – Результаты расчёта коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (вторая пара)

Коэффициенты	Оценка	Ст. ошибка	Z значение	Уровень значимости $p$
перехват	0,9695967	1,5700021	0,6175767	0,5368544
каротиноиды	-0,4362155	0,5943668	-0,7339163	0,4629998
порфириин	-0,7717961	0,6190218	-1,2467995	0,2124710
тироzin	-0,6340850	1,2821327	-0,4945549	0,6209144
триптофан	-1,0393482	0,7014573	-1,4816986	0,1384205
фенилаланин	-1,1137913	0,9232557	-1,2063736	0,2276735

Основываясь на результатах, где  $p\text{-value} > 0,05$ , можно сделать вывод, что статистической связи между наличием лимфоваскулярной инвазии и определяемыми аналитами не обнаружено, и отвергнуть нулевую гипотезу  $H_0$  мы не можем. Для проверки гипотезы о наличии статистической связи между некоторыми переменными, а в третьей паре таковыми являлись фазы-стадии роста опухоли и компоненты-аналиты эндогенных пигментаций в её субстрате, была также использована логистическая регрессия. Поскольку стадия роста поверхностной меланомы ограничивалась двумя возможными вариантами – радиальной (горизонтальной) и вертикальной и на этом основании рассматривалась как бинарная, оптимальным вариантом для статистической оценки связи стадии роста опухоли и выявленных в ней с помощью рамановской спектроскопии компонентов-аналитов эндогенных пигментаций, явилось применение логистической регрессии. В данной модели, зависимой или исследуемой переменной, выступала фаза роста опухоли, а факторными переменными (предикторами) – выявленные в ходе спектроскопии компоненты-аналиты. Были сформулированы две рабочие гипотезы. Первая, обозначенная как  $H_0$ , предполагала отсутствие различий в частотах определения тирозина, триптофана, фенилаланина, порфирина и каротиноидов между радиальной и вертикальной фазами роста опухоли. Альтернативная гипотеза  $H_1$  предусматривала наличие статистических значимых различий между фазами роста опухоли и выявленными компонентами-аналитами.

Полученные результаты продемонстрировали статистическую значимость модели и каждого из предикторов, что указывало на высокую достоверность выявленных зависимостей. В частности, согласно данным, представленным в Таблице 17, значимые предикторы включали каротиноиды ( $p = 0,02257$ ), тирозин ( $p = 0,01554$ ), триптофан ( $p = 0,00769$ ) и фенилаланин ( $p = 0,01753$ ), в то время как порфирин ( $p = 0,09080$ ) не показал статистически значимых результатов.

Таблица 17 – Результаты расчета коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (третья пара)

Коэффициенты	Оценка	Стандартная ошибка	Уровень значимости $p$
intercept (свободный член)	1,3934	0,5923	0,01865*
каротиноиды	– 1,0158	0,4454	0,02257*
порфирин	0,7829	0,4629	0,09080
тироzin	– 1,1103	0,4589	0,01554*
триптофан	– 1,2208	0,4580	0,00769*
фенилаланин	– 1,0596	0,4461	0,01753*

**Примечание:** \*статистически значимые предикторы фазы роста меланомы

Следует отметить, что каждый коэффициент в полученной модели представляет логарифмическое отношение шансов перехода к вертикальной фазе роста при увеличении соответствующего предиктора на единицу и при условии, что остальные переменные остаются постоянными. Каротиноиды, тирозин, триптофан и фенилаланин оказывают отрицательный эффект на вероятность перехода к вертикальной фазе роста поверхностной меланомы кожи, так как величина оценки менее нуля. Это означает, что выявление указанных компонентов-аналитов посредством рамановской спектроскопии значительно повышает вероятность нахождения опухоли в фазе радиального роста и, наоборот, их снижение или отсутствие при уровне значимости  $p < 0,05$  (в нашем исследовании  $p < 0,03$ ) подтверждает статистически значимость различий и свидетельствует об инициации и развитии вертикальной фазы роста меланомы. Использованная нами в расчётах модель и качество бинарной классификации были проверены визуализацией при помощи ROC-кривой (график, который показывает зависимость между чувствительностью и специфичностью), отражающей долю верно классифицированных признаков исходя из выбранных зависимых переменных (Рисунок 12).

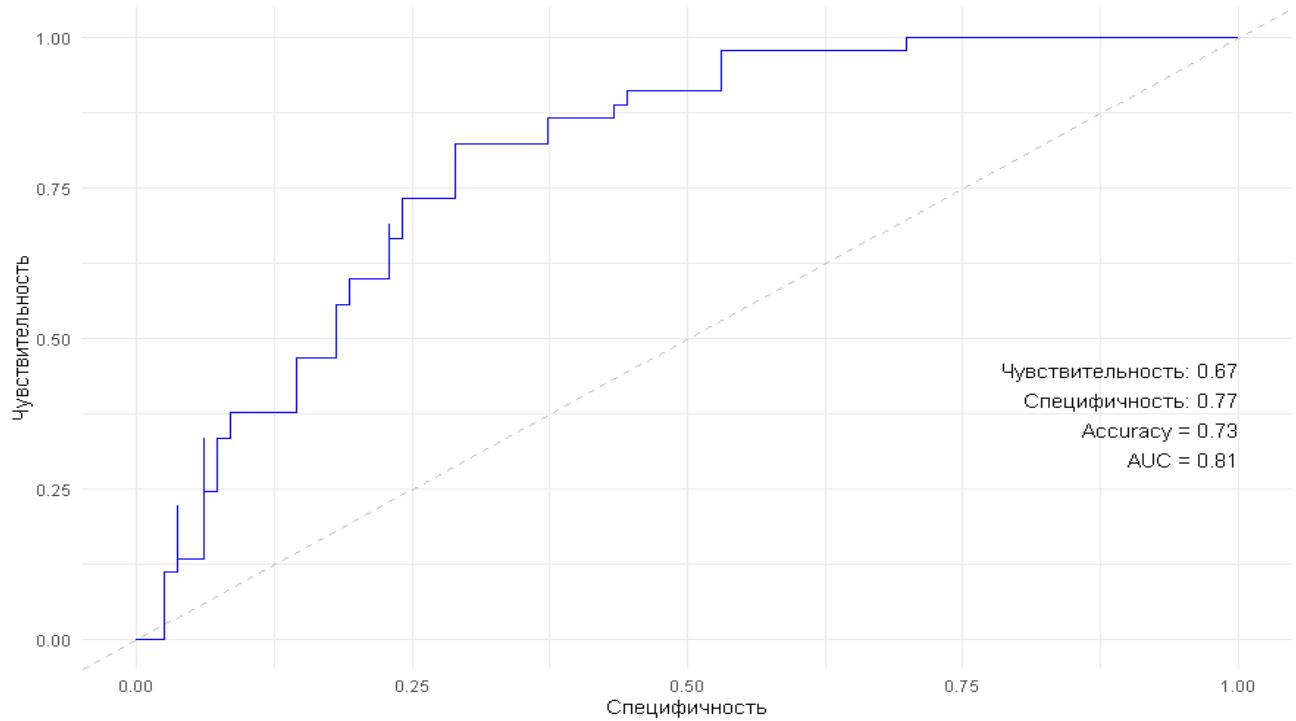


Рисунок 12 – ROC-анализ оценки модели перехода меланомы кожи в вертикальную фазу роста

Иными словами, ROC и AUC – это площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций, показывают вероятность, что мы правильно определили фазу роста меланомы, исходя из статистически связанных аналитов. На практике AUC может принимать значения от 0 до 1. При AUC, равной 0,5 и менее, модель не способна различать отличия между классами лучше, чем случайное угадывание. В случае  $0,5 < AUC < 1$ , модель различает классы лучше, чем случайное угадывание. Чем ближе AUC к 1, тем лучше модель различает классы. При AUC, равной единице, модель считается идеальной, поскольку разделяет классы безошибочно. В нашем исследовании показатель площади под кривой AUC составил 0,81, что указывает на хорошую способность модели различать фазы роста опухоли. Специфичность модели составила 0,77, чувствительность 0,67, а доля правильно классифицированных случаев среди всех примеров (accuracy) достигла 0,73.

С учетом полученных результатов, модель прогнозирования фазы роста поверхностных меланом кожи на основе данных рамановской спектроскопии представлена в виде формулы:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(1,3934 - 1,0158 \times \text{Каротиноиды} + 0,7829 \times \text{Порфирин} - 1,1103 \times \text{Тирозин} - 1,2208 \times \text{Триптофан} - 1,0596 \times \text{Фенилаланин})}} \quad (2)$$

где  $p$  – вероятность того, что меланома находится в фазе роста;

$e$  – основание натурального логарифма  $\approx 2,718$ .

При значении  $p > 0,5$  модель прогнозирует вертикальную фазу роста,  $p < 0,5$  свидетельствует о радиальной фазе роста.

Следует отметить, что, несмотря на то, что полученный уровень значимости для порфирина имеет  $p = 0,09080$  и превышает установленный для данного исследования, мы сочли необходимым включить его в прогностическую модель, несмотря на его недостаточную статистическую значимость. Это решение принято на основании данных, полученных из авторитетных научных источников, указывающих на стабильно высокую концентрацию порфиринов в злокачественных опухолях [112; 158]. Несложная технология наложения спектров выявляет существенные различия между спектральными характеристиками меланом, находящихся в различных фазах роста (Рисунок 13).

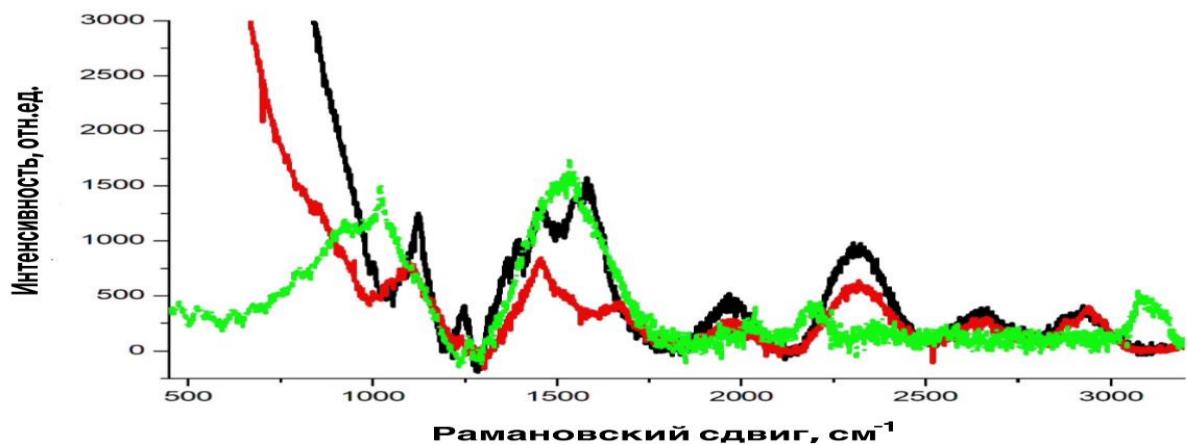


Рисунок 13 – Сравнительная характеристика образцов кожи контрольной группы (красная) и поверхностно-распространяющейся меланомы: фаза радиального роста (чёрная), фаза вертикального роста (зелёная)

Подводя итоги настоящего исследования, осуществлённого с использованием оригинальной методологии и прецизионных методов, мы, с одной стороны, убедились в непреложности соблюдения установленного алгоритма диагностики меланом кожи. С другой стороны, существующая гетерогенность меланом кожи обуславливает необходимость использования в диагностике этого злокачественного новообразования мультиплексного анализа, открывающего перспективы модификации сложившейся диагностической парадигмы меланом кожи и открытия новых диагностических критериев.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Патология, изучению которой посвящена наша работа, относится к злокачественным опухолям, локализующимся преимущественно в коже и развивающимся из пигментных клеток-меланоцитов меланинобразующей ткани. В морфологическом плане речь идет о патологии *sui generis*, когда имеется сочетание двух различных патологических процессов – изменения морфологического субстрата опухоли в динамике (морфогенез, онкогенез, канцерогенез) и реализации эндогенных пигментаций. Именно это сочетание, или комбинация создает такое количество различных, характеризующихся морфологическим изобилием, клинико-морфологических форм меланом, тем самым подтверждая общую закономерность формирования патологических структур, установленную Д.С. Саркисовым [26] и известную под названием закона комбинационных, или рекомбинационных преобразований. Всё это в полной мере относится к меланоме, как опухоли вообще, и к каждой её клинико-морфологической форме, в частности. Осуществляя выполнение данной темы, нам неоднократно пришлось вновь и вновь утверждаться во мнении относительно того, что поверхностно-распространяющаяся меланома является довольно неплохо и всесторонне изученным новообразованием кожи. Чтобы укрепиться окончательно в этом убеждении нам пришлось вновь проштудировать труды классиков по изучению патоморфологии кожи [1; 18; 51; 54; 149] и вновь осмыслить существо их работ, нетронутых временем. В их распоряжении в то время еще не было возможностей использовать для диагностики меланомы прецизионные методы иммуногистохимии, молекулярно-генетическое исследование. Однако эти исследователи создали мощный теоретический и практический фундамент, на котором далее зиждались работы по изучению иммунофенотипа [85; 135], микроокружения [82; 99; 158], микросателлитной нестабильности [81; 93], генных мутаций [27; 96; 103], наблюдаемых в меланомах и существенно расширивших понимание их сути. С другой же стороны, в морфогенезе меланом кожи были и

продолжают оставаться неясными положения, не позволяющие, за исключением типичных хрестоматийных случаев, совершенно чётко без труда отдифференцировать между собой отдельные клинико-морфологические формы меланомы. Даже при поверхностно-распространяющихся меланомах не всегда представляется возможным отделить друг от друга новообразование, находящееся в фазе радиального (горизонтального) роста, от опухоли в фазе вертикального (инвазивного) её роста. На наш взгляд это обусловлено тем, что, с одной стороны, используемые в течение длительного времени методы и технологии диагностики меланом к настоящему времени полностью или частично исчерпали свой моторесурс, а применение других, высокоточных прецизионных методов сдерживается их дороговизной и чёткими показаниями применения, регламентированными Стандартами ведения пациентов с данным видом патологии. В то же время электронномикроскопическое исследование сейчас применяется крайне редко и то в случаях с развитием увеальной меланомы [30].

Все используемые для этого критерии (признаки) следует на наш взгляд раскассировать на типичные и нетипичные (сомнительные), которые, впрочем, зачастую не лишены субъективности. Если узловая меланома характеризуется прежде всего характерной формой новообразования, убедительным распространением не только за пределы дермоэпидермального абриса и сосочкового слоя дермы [41], но и прорастанием ею сетчатого слоя и нередко подкожной жировой клетчатки, то акральная меланома и её разновидность подногтевая имеет характерную локализацию в дистальной части конечностей [67]. Прерогативами лентиго меланомы являются локализация на открытых участках тела, возраст, обычно менее интенсивная окраска новообразования [9; 14]. Что касается поверхностно-распространяющейся меланомы, то она зачастую продолжает оставаться *terra incognita* и представлять значительную трудность для точной диагностики [42; 82; 133]. Этому имеется ряд обстоятельств. Поверхенно-распространяющаяся меланома является самой частой клинико-морфологической формой меланом и встречается примерно в 70–75 % случаев всех меланом кожи [7; 113; 137; 143]. Многие исследователи отмечают связь между предсуществующими

nevusами и поверхностно-распространяющейся меланомой и аргументируют это сходством сигнальных путей и одними и теми же мутациями генов, идентифицируемых в субстратах меланомы и невусов [85; 134; 136]. Существуют, впрочем, мнения о том, что при гипотетическом анализе всех невусов, локализованных на/в теле человека, в одном или нескольких из них обязательно будут обнаружены признаки озлокачествления и/или инвазивного роста [134].

Выполнению настоящей работы предшествовала реализация подготовительного этапа, а полученные результаты были опубликованы [8; 15; 31], но не были включены в окончательный вариант диссертации. Первоначально работа была запланирована, как клинико-экспериментальная, и в ней предусматривался значительный экспериментальный раздел. Так, в частности, было запланировано и осуществлено экспериментальное исследование по моделированию перевиваемой меланомы B16 у животных, в ходе которого были изучены её морфологические особенности, произведён подсчёт микроморфометрических параметров клеток опухоли и у некоторых из них выявлены циркадные ритмы, которые планировалось использовать в дальнейшем при исследовании влияния различных световых режимов на развитие опухоли у экспериментальных животных.

Вместе с тем, результаты, полученные в ходе реализации предварительного этапа исследования поставили перед нами *de facto* задачу выбора дальнейшего вектора исследования из нескольких допустимых, исходящих из этой ситуации, альтернатив. Во-первых, при перевивании меланомы B16, опухоль сразу же приобретала вид узловой формы, а задачей последующего, то есть следующего за экспериментальным, клинического этапа работы предполагалось изучение клинико-морфологических, иммуногистохимических характеристик поверхностных меланом кожи и особенностей реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли. Во-вторых, практически с момента возникновения и на протяжении всего эксперимента вплоть до момента выведения из него подопытных животных, опухоль имела признаки рано реализовавшихся в ней вторичных изменений: пестрый вид, обусловленный чередованиями небольших

фокусов некроза в виде участков черного цвета с белесоватыми вкраплениями и мелкоточечных кровоизлияний. В-третьих, взвесь опухолевой ткани, будучи введенной в дерму или подкожную жировую клетчатку, приводила к преимущественному сосредоточению опухоли именно в этом месте. Далее меланома характеризовалась разнонаправленностью векторов распространения, прорастая диффузно как в направлении эпидермиса, так и в сторону жировой ткани, в большинстве наблюдений инфильтрируя последнюю. Наконец, главным обстоятельством дальнейшего неиспользования данных эксперимента явилось то, что клетки перевиваемой меланомы хотя и содержали сравнительно небольшое количество пигмента, но при осуществлении спектроскопического анализа образцов опухоли прекурсоры меланина идентифицированы либо не были, либо результаты их обнаружения грешили достоверностью. Кроме того, мы вполне отдавали себе отчёт в том, что многие вопросы возникновения, развития, прогрессирования и диагностики меланомы изучены до мельчайших тонкостей, приобрели статус аксиом, постулатов, догм и ни при каких обстоятельствах не могли быть подвергнуты коррекции. К таковым, по нашему мнению, можно отнести наличие предсуществующих доброкачественных опухолей и пороков развития, которые так или иначе могут быть связаны с меланомами, либо являться их потенциальными предшественниками или на определенной стадии быть причиной ложноотрицательных или ложноположительных заключений [3; 14; 152; 155]. Это утверждение не лишено оснований, так как примерно в 30-50 процентах случаев меланомы возникают в сочетании с ранее существовавшим невусом-предшественником [123; 146]. На подготовительном этапе исследования был также всесторонне и тщательно решён вопрос с использованием наиболее оптимального лазера.

Применение рамановского спектрометра с источником лазерного излучения с длиной волны 532 нм для диагностики опухолей вообще и меланомы в частности, обусловлено высоким квантовым выходом кремниевых детекторов в зелено-желтом спектральном диапазоне и большей вероятностью рамановского рассеяния, чем при использовании лазерного излучения ближнего инфракрасного или

инфракрасного диапазонов. При этом мы имели в виду, что чувствительность проводимых исследований при возбуждающем излучении с длиной волны 532 нм могла быть значительно увеличена за счет эффектов резонансной рамановской спектроскопии – возбуждения резонансных рамановских спектральных полос некоторых веществ (каротиноидов, цитохромов, азотистых оснований и некоторых других).

Преимуществами спектрометра, имеющего источник лазерного излучения с длиной волны 638 нм (красный лазер) являются широкий спектральный диапазон прибора (140–4300  $\text{см}^{-1}$ ), покрывающий область молекулярных колебаний органических и неорганических веществ и позволяющий в течение нескольких секунд производить запись рамановского спектра исследуемого объекта, определять спектральное положение и относительные интенсивности рамановских спектральных линий. Высокое спектральное разрешение 4  $\text{см}^{-1}$  позволило спектрально разделять близкие рамановские линии и идентифицировать большее количество анализаторов в морфологическом субстрате опухоли. Стабилизированное узкополосное лазерное излучение обеспечивало при этом отсутствие случайных рамановских сдвигов, зависящих от изменения спектрального положения лазерной линии. Низкочастотное красное лазерное излучения значительно слабее возбуждало фотолюминесценцию флуорохромов тканей, что дало возможность выкопировывать информативный рамановский сигнал с хорошим соотношением «сигнал/шум».

Что касается использования спектрометров с лазером, дающих длину волны 785 нм, низкая чувствительность кремниевых матриц в диапазоне 800-1000 нм не позволяла бы записывать спектры исследуемых тканей с хорошим уровнем сигнал/шум. В процессе исследования наибольшую трудность представляла задача дифференцировки меланом *in situ*, то есть меланом, не распространяющихся за пределы дерматоэпидермального соединения. Особенно это касалось поверхностно-распространяющейся меланомы и лентиго меланомы, поскольку и среди пациентов-мужчин, и среди пациентов-женщин значительную часть исследуемого контингента составляли лица старше 60 лет. Задачу осложняло ещё

и то обстоятельство, что в части наблюдений поверхностно-распространяющейся меланомы ещё до начала реализации фазы вертикального роста с инвазией мы наблюдали распространение атипичных меланоцитов параллельно поверхности кожи по абрису дермоэпителиального соединения, то есть по *лентигиозному типу* [92; 94; 97]. В качестве аргументов, свидетельствующих в пользу поверхностно-распространяющейся меланомы, нами были отнесены локализация меланомы большей частью на закрытых участках кожи, преимущественно радиальное распространение опухоли, в том числе по *педжетоидному типу* [51; 133; 149], и приобретение опухолью признаков педжетоидной меланомы за счёт «встраивания» крупных атипичных меланоцитов, нередко содержащих пигмент, между кератиноцитами вышерасположенных слоёв эпидермиса. Решающим же аргументом в пользу поверхностно-распространяющейся меланомы было идентифицированное чаще иммуногистохимически, нежели патогистологически, формирование вектора вертикальной фазы роста, как в направлении поверхности кожи, так и противоположном, что для лентиго, являющегося разновидностью меланомы *in situ*, не было характерным [149]. Вместе с тем, проведённое нами исследование было запланировано и осуществлено, как комплексное, поэтому, помимо традиционного патогистологического исследования, образцы кожи, содержащие морфологический субстрат меланомы, были исследованы иммуногистохимически, электронномикроскопически, проведено также молекулярно-генетическое и спектроскопическое исследование, использованы методы как описательной, так и аналитической статистики. Это обстоятельство не позволило ни в одном случае установить первый уровень распространения опухоли по Clark, поскольку и при иммуногистохимическом, и при электронномикроскопическом исследовании были выявлены признаки, свидетельствующие о необходимости отнесения новообразования в первом случае к лентиго-меланоме, а во втором – обнаружить на ультраструктурном уровне свидетельства распространения опухоли за пределы дерматоэпидермального соединения в сосочковый слой дермы.

В настоящем исследовании мы хотели убедиться в том, что использование в диагностике поверхностных кожных меланом иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования их морфологического субстрата позволит не только установить иммунофенотип опухоли, но и идентифицировать фазу вертикального (инвазивного) роста новообразования. Иммуногистохимическое исследование выполнили во всех 128 случаях поверхностно-распространяющейся меланомы с преобладанием как радиальной, так и вертикальной фазы роста. Использовали общеупотребимую панель маркеров Melan A, HMB45, S100, результаты иммуногистохимического исследования оценивали качественно, и отражали в таблице с признаком «Да» – в случае наличия специфической реакции, проявляющейся в окрашивании образца и признаком «Нет» – при его отсутствии. Кроме того, иммуногистохимически идентифицировали мутировавший белок BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1. Несмотря на то, что проведённое исследование продемонстрировало стопроцентное выявление Melan A, HMB-45 и аномального белка BRAF, а также мутацию гена BRAFV600E, и чуть меньшее – маркера S100 в фазу вертикального (инвазивного) роста, установить статистические различия не представилось возможным. Основываясь на результатах, где  $p\text{-value} > 0,05$ , мы пришли к выводу об отсутствии статистической связи между фазами роста и результатами иммуногистохимического исследования. Это обстоятельство вероятнее всего обусловлено сравнительно небольшим количеством наблюдений ( $n = 45$ ), aberrантной экспрессией маркеров, усложняющей диагностику кожных меланом [23], либо гетерогенностью их иммунофенотипического профиля, что обуславливает необходимость осуществления мультиплексного анализа в диагностике этого злокачественного новообразования [89].

Вместе с тем, решая задачи, поставленные перед выполнением данной работы, и, оценивая особенности реализации эндогенных пигментаций в ткани опухоли, мы всерьёз задумывались над выработкой и формулировкой так называемых «пигментных» критериев дифференцировки фазы радиального роста

меланомы от её вертикальной фазы. Согласно данным многочисленных исследований [24; 29; 144] реализация вертикальной фазы роста опухоли проявляется инвазией подлежащих дермы и жировой клетчатки [45; 56; 127], появлением в дерме кластеров и отдельных атипичных клеток, превышающих по размерам самые крупные кластеры клеток в эпидермисе [8; 70], прогрессированием тканевого и клеточного атипизма [1; 51], важнейшим проявлением которых является выраженный полиморфизм клеток опухоли и их ядер [51; 54; 149]. Несмотря на отсутствие единого мнения, представляется, что к прерогативам вертикальной фазы роста поверхностно распространяющейся меланомы следует также отнести и увеличение частоты реализации в опухоли вторичных изменений в виде некроза, изъязвлений, кровоизлияний, а также метастазирование [40; 154]. Признавая доминирующее положение и топовое значение меланина в качестве критерия отнесения меланом в группу пигментных новообразований, развивающихся из меланинобразующей ткани, мы наибольшее внимание уделили именно этому пигменту и его прекурсорам, идентифицируемым морфологически и спектроскопически. В фазу радиального роста опухоли включения меланина были обнаружены нами в цитоплазме атипичных меланоцитов, клеток базального и отчасти шиповатого клеточных слоёв эпидермиса, нередко соседствующих с меланоцитами. Вступление опухоли в фазу вертикального роста ознаменовалось исчезновением меланина из кератиноцитов, утратой отростков меланоцитами, локализацией пигмента исключительно в меланоцитах и внеклеточно в виде свободно лежащих аморфных электроннодenseных депозитов нередко неправильной формы. К спектроскопическим критериям фазы вертикального роста относится также доминирование меланина и его прекурсоров тирозина, триптофана, фенилаланина как в части снижения интенсивности флуоресценции, так и регистрации рамановских пиков. Мультиплексный анализ позволил выявить и иные аналиты, имеющие отношение к биосинтезу белка, в частности, других аминокислот (пролин, валин), а также свободные радикалы, свидетельствующие о развитии оксидативного стресса в ткани. При диагностике меланом с пониженным содержанием протеиногенных пигментов (меланин) или вовсе с отсутствием

пигmenta (беспигментные, ахроматические меланомы) резко возрастает значение идентификации представителей других классов хромопротеидов. На основании полученных результатов мультиплексного анализа получили на наш взгляд убедительные основания предполагать важное диагностическое значение липидогенных хромопротеидов. Исследователи, подробно изучавшие существование липофусцина, отмечают несколько важных его особенностей [95]. Главной особенностью является его гетерогенность, обусловленная своеобразием липофусциногенеза, сводящегося к окислению, постепенной и пролонгированной полимеризации ненасыщенных липидов [131], его накопление в условиях повышенной потребности в кислороде [37; 117; 122], наличие белковой и липидной составляющей [114; 118]. Одной из разновидностей липофусцина является цероид с тем отличием, что последний, оставаясь, как и липофусцин, продуктом клеточного синтеза, образуется в макрофагах путём гетерофагии липидов, то есть захвата их макрофагами извне посредством эндоцитоза. Липохромы в эпидермисе встречаются не столь часто и обусловливают оттенки подкожной жировой клетчатки [95]. Как уже отмечалось в обзоре литературы к настоящему исследованию, липофусцин – топовый представитель липидогенных пигментов локализуется в исключительно неделяющихся клетках, которые либо не делятся *a priori*, либо находятся в G<sub>0</sub> периоде клеточного цикла и способность делиться утратили вместе с завершением своей дифференцировки [38]. К таковым относятся клетки щиповатого, зернистого, блестящего и рогового слоёв эпидермиса. Технологии идентификации липофусцина, будучи неплохо известными, в настоящее время применяются эпизодически из-за отсутствия реактивов и квалифицированных кадров лаборантов-гистологов и сводятся к комплексу гистохимических методов (метод Хека, AFIP-метод) [98] и электронномикроскопическому исследованию. В данной работе было отдано предпочтение ультраструктурному анализу и спектроскопическому изучению биологических объектов, содержащих морфологический субстрат меланомы. Полученные результаты продемонстрировали статистическую значимость модели и предикторов, представляющих различные классы хромопротеидов, в том числе и

липидогенные пигменты-каротиноиды, что указывало на высокую достоверность выявленных зависимостей. Согласно результатам исследования, к значимым предикторам были отнесены каротиноиды ( $p = 0,02257$ ), тирозин ( $p = 0,01554$ ), триптофан ( $p = 0,00769$ ) и фенилаланин ( $p = 0,01753$ ), в то время как порфирин ( $p = 0,09080$ ) не показал статистически значимых результатов.

Нами установлено, что начало реализации фазы вертикального роста меланомы сопровождается количественными и качественными сдвигами липидогенных пигментов. При Clark II липофусцин и цероид, идентифицируемые оба в виде электронноплотных образований, обнаружаются в цитоплазме клеток эпидермиса и внутри макрофагов, а также регистрируются на спектрах биообъектов в виде специфических рамановских пиков каротиноидов. В случае инвазии опухоли и её проникновения в сетчатый слой дермы (Clark III) эти хромолипоиды уже не обнаружаются ультраструктурно, а значения интенсивности флуоресценции и высоты рамановских пиков каротиноидов резко снижаются, а затем и вовсе исчезают (Clark IV – V).

Что касается гемоглобиногенных пигментов и роли кожи в их обмене и трансформациях, то в доступной литературе практически отсутствуют сведения о её прямом или косвенном участии в обмене хромопротеидов, относящихся к этой группе пигментов. Образование и дальнейшие трансформации этих хромопротеидов, образующихся при физиологическом распаде эритроцитов и гемоглобина, являются прерогативами ретикулоэндотелиальной системы, а также органов и тканей, имеющих отношение к кроветворению [18]. Единственными представителями гемоглобиногенных пигментов, обнаруживаемых в нормальной коже обычно спектроскопически в очень небольших количествах являются порфирины [28; 141]. В нормальных условиях речь идёт об этиопорфиринах, представителями которых являются гематопорфирины, принимающие участие в процессах фотосинтеза, происходящего в коже, транспорте кислорода и переносе электронов [110]. В литературе есть указания, что гематопорфирины обладают свойством повышать чувствительность кожи к свету [121], являясь *de facto* антагонистами меланина [47]. На этом основании порфирины нашли применение в

фотодинамической терапии онкологических и некоторых других заболеваний [110; 121; 153; 163]. В фазу радиального роста меланомы порфирины в субстрате опухоли были обнаружены электронномикроскопически и спектроскопически в относительно меньших по сравнению с фазой вертикального роста количествах. В отличие от других пигментов, в фазу вертикального роста порфирины идентифицировались гораздо чаще, особенно в тех случаях, когда имели место реализующиеся вторичные изменения: изъязвления, кровоизлияния, некрозы и всегда в сочетании с гемосидерином. Впрочем, следует отметить, что, в отличие от порфиринов, обнаруживаемых спектроскопически, гемосидерин вследствие наличия железа, спектроскопически не идентифицируется, а наилучшим образом выявляется гистохимически при помощи реакции Перлса, либо реакции образования турбулевой сини. Подоплёткой этого обстоятельства, имея в виду обнаружение гемоглобиногенных пигментов, являются особенности ангиоархитектоники опухоли, являющейся составляющей микроокружения меланомы и несовершенный ангиогенез, впрочем, присущий большинству опухолей и обуславливающий в значительной степени дальнейшую реализацию опухолевого потенциала. Этот раздел представлялся нам настолько важным в диагностическом плане, что целая глава настоящей работы была посвящена оценке статистической связи определения аналитов в различных фазах роста опухоли. Используя модель бинарной логистической регрессии, было установлено, что каротиноиды, тирозин, триптофан и фенилаланин имеют статистически значимые различия при смене фаз роста опухоли. Интерпретировав параметры используемой модели мы установили, что в случае перехода опухоли из фазы радиального в фазу вертикального роста снижается вероятность их определения в морфологическом субстрате опухоли. Иными словами при использовании рамановской спектроскопии образцов опухоли определение каротиноидов, тирозина, триптофана и фенилаланина статистически значимо свидетельствует о радиальной фазе роста. Следует также отметить, что интерпретация коэффициентов логистической регрессии подразумевает ассоциацию, а не наличие причинно-следственной связи, то есть, наличие вышенназванных пигментов ассоциировано с

радиальной фазой роста, но не означает, что они являются причиной этой фазы. Иными словами каротиноиды, тирозин, триптофан и фенилаланин могут играть роль так называемых «пигментных» критериев дифференцировки фазы радиального роста меланомы от её вертикальной фазы. К данному выводу мы пришли исключительно благодаря использованию технологии рамановской спектроскопии. К слову сказать, что несколькими годами ранее данная технология была апробирована в Российской Федерации в диагностике некоторых опухолей почек и предстательной железы.

Говоря о рамановской спектроскопии, следует отметить её роль в части появления возможности существенно продвинуться в области метаболомики опухоли, а также её возможности оценивать метаболом раковой клетки. Продемонстрированные [72; 122; 160] результаты свидетельствуют о революции в биологии и являются уже чётко определенным вектором развития по мере реализации которого делается явью и появляется еще один подход к возможности осуществления индивидуальных терапевтических стратегий ведения подобных пациентов. Способы идентификации и маркировки метаболитов методом рамановской спектроскопии позволяют проводить мультиплексный анализ уже единичных отдельных клеток, что резко повышает его диагностические возможности и перспективные области применения, например, в цитологии. Был, в частности, установлен механизм фотозащитного действия  $\beta$ -каротина, обусловленный способностью поглощать свободные радикалы/активные формы кислорода, а его накопление является своеобразным ответом на ультрафиолетовое излучение и коррелирует со стабилизацией пиков амида I на спектрах [74]. Посредством рамановской спектроскопии была также доказана высказанная ранее гипотеза относительно наличия связи между хромопротеидами различных классов, возникающей в ответ на воздействие ультрафиолетового излучения [46; 74; 76; 83]. Результаты, полученные этими авторами, показали, что меланоциты используют  $\beta$ -каротин в качестве протектора, защищающего кожу от воздействия ультрафиолетового излучения, инициирующего перекисное окисление липидов. Авторы также полагают, что реакция меланоцитов на воздействие

ультрафиолетового излучения и появление  $\beta$ -кератина могут быть положены в основу чувствительного скрининга и раннего выявления меланом. Ряд авторов [76; 132], осуществив широкомасштабное рамановское спектроскопическое исследование на большом количестве материала, сделали вывод об отсутствии необходимости осуществления эксцизионного биопсийного исследования, с чем, по нашему мнению, трудно не согласиться, и предположили, что рамановская спектроскопия может в ближайшее время явиться альтернативой традиционному патогистологическому исследованию, что на наш взгляд представляется спорным.

В современных условиях, несмотря на имеющиеся ощутимые локальные достижения в диагностике и лечении меланом, ещё остаются неудовлетворенными запросы практической медицины, регистрирующей отсутствие стабильного успеха в их лечении. Отсюда становится понятной необходимость модификации сложившейся, в основном, после выхода в свет фундаментальной работы Р.Вирхова по онкологии [159] диагностической парадигмы меланом. Впрочем, следует отметить, что периодические попытки её переосмыслиния и оптимизации, обусловленные внедрением в диагностику меланом прецизионных технологий и методов, предпринимались неоднократно [81; 133]. Это обстоятельство, если и не оправдывало, то, по крайней мере, объясняло тщания специалистов «меланомологов» по подмене содержания «золотого стандарта» диагностики меланом [50; 97]. В настоящее время медицинское сообщество, озабоченное поисками существа меланом, всё больше и больше склоняется в сторону так называемых «омических наук», видя в этом ключ к его пониманию [122]. По их мнению, подоплёка меланомы должна обязательно заключаться в особенностях её метаболизма. Определить весь метаболом меланомы использованием одного аналитического метода вряд ли представляется возможным ввиду его исключительной динамичности и большого количества метаболитов. Вместе с тем, некоторые вторичные метаболиты, к коим относятся эндогенные пигменты, а также их реализации в биологических объектах, именуемые эндогенными пигментациями, могут в перспективе стать искомыми диагностическими критериями [106].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования классиков мировой и отечественной патологической анатомии V. McGovern, W. Clark, A.K. Апатенко, З.В. Гольберт, A. Breslow, изучавших морфологию меланоцитарных опухолей, убедительно показали, что большинство кожных меланом возникает из меланоцитов эпидермиса и развивается, проходя через две основные стадии прогрессии. Приведённые ими доказательства того, что меланомы в фазе радиального роста отличаются более благоприятным прогнозом, в то время как диагностированные в фазе вертикального роста характеризуются повышением инвазивной и метастатической компетентности достойно прошли проверку временем и являются актуальными по сей день. Проведённое нами исследование, с одной стороны, упрочило во мнении о необходимости соблюдения установленного для диагностики меланом алгоритма независимо от стадии прогрессии опухоли, количества и особенностей выявляемого в них пигмента. С другой стороны, применение в нашем исследовании для диагностики меланом прецизионных технологий позволило выявить иммунофенотип и характерные для новообразования мутации (BRAF V600, NRAS), а осуществленный на основании использования рамановской спектроскопии образцов опухолей мультиплексный анализ полученных данных, позволил идентифицировать в каждом биологическом объекте меланом одновременно значительное количество молекул различных компонентов-аналитов. При этом выявлено предиктивное значение компонентов-аналитов каротиноидов, тирозина, триптофана, фенилаланина и статистически значимое снижение вероятности их обнаружения при переходе опухоли из фазы радиального в фазу вертикального роста. Проверка данного положения визуализацией выявила высокие показатели чувствительности и специфичности модели, а также её хорошую способность различать фазы роста опухоли. К сожалению, в проведённом исследовании, несмотря на стопроцентное выявление Melan A, HMB-45 и аномального белка BRAF, а также мутацию гена BRAF V600E, и чуть меньшее – маркера S100 в стадию вертикального (инвазивного) роста,

установить статистические различии и их предиктивную роль не представилось возможным. Это обстоятельство, по нашему мнению, было обусловлено сравнительно небольшим количеством наблюдений инвазивных меланом, aberrантной экспрессией маркеров, усложняющей диагностику кожных меланом, либо гетерогенностью их иммунофенотипического профиля, что обуславливает в дальнейшем необходимость осуществления мультиплексного анализа в диагностике этого злокачественного новообразования.

## ВЫВОДЫ

1. Морфологическим проявлениям поверхностно распространяющихся меланом кожи и их специфическим спектроскопическим характеристикам, представляющих собой комбинацию компонентов-аналитов эндогенных пигментаций, присуща сопряжённость, своеобразно реализуемая в зависимости от фазы развития опухоли.

2. Определение иммунофенотипа поверхностно распространяющейся меланомы при помощи панели маркеров Melan A, HMB45, S100 и иммуногистохимическое выявление мутированного белка BRAF V600E с помощью устойчивого к мутации моноклонального антитела VE1, а также молекулярно-генетическая идентификация мутаций генов BRAF и NRAS не выявили статистически значимой связи между фазами роста опухоли и результатами иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования.

3. Морфологическая гетерогенность поверхностно распространяющейся меланомы, обусловленная фазой роста опухоли и сопряжёнными с ней различными соотношениями паренхиматозного и стромального компонентов и степенью реализации вторичных изменений обуславливает непреложность осуществления мультиплексного анализа результатов компонентов-аналитов из различных участков новообразования с целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных заключений.

4. Конъюнкция алгоритмов получения и интерпретации данных мультиплексного анализа морфологического субстрата опухоли выявила предиктивное значение компонентов-аналитов каротиноидов ( $p = 0,02257$ ), тирозина ( $p = 0,01554$ ), триптофана ( $p = 0,00769$ ), фенилаланина ( $p = 0,01753$ ) и статистически значимое снижение вероятности их обнаружения при переходе опухоли из фазы радиального в фазу вертикального роста.

5. Выявление указанных компонентов-аналитов посредством рамановской спектроскопии значительно повышает вероятность нахождения опухоли в фазе радиального роста, а их снижение или отсутствие при уровне значимости  $p < 0,05$  (в нашем исследовании  $p < 0,03$ ) подтверждает статистически значимость различий и свидетельствует об инициации и развитии вертикальной фазы роста меланомы. Проверка данного положения визуализацией при помощи ROC-кривой выявила значение показателя площади под кривой AUC, равное 0,81, что свидетельствует о хорошей способности модели различать фазы роста опухоли. Специфичность модели составила 0,77, чувствительность 0,67, а доля правильно классифицированных случаев среди всех примеров достигла 0,73.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Врачам патологоанатомам, сотрудникам патологоанатомических служб лечебных учреждений, патологоанатомических бюро рекомендуется учитывать выявленную сопряжённость морфологических проявлений поверхностно распространяющихся меланом кожи и их специфических спектроскопических характеристик, представляющих собой комбинацию компонентов-аналитов эндогенных пигментаций, выявленных методом рамановской спектроскопии и реализуемой в зависимости от фазы развития опухоли. Рекомендуется использовать полученные в исследовании данные о предиктивном значении компонентов-аналитов каротиноидов, тирозина, триптофана, фенилаланина в дифференциальной диагностике стадий меланомы.

2. Сотрудникам кафедр патологической анатомии образовательных учреждений высшего и дополнительного профессионального образования рекомендуется использовать полученные в настоящем исследовании результаты на лекциях, практических и семинарских занятиях при изучении вопросов морфогенеза и морфологических проявлений смешанных дистрофий, патологической анатомии опухолей, развивающихся из меланинобразующей ткани, студентам по направлениям подготовки 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 31.05.03 Стоматология, ординаторам, обучающимся по специальности 31.08.07 Патологическая анатомия, слушателям циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В современных условиях, несмотря на имеющиеся ощутимые локальные достижения в диагностике и лечении меланом, ещё остаются неудовлетворенными запросы практической медицины, регистрирующей отсутствие стабильного успеха в их лечении. Отсюда становится понятной перспективность усилий исследователей-патоморфологов и клиницистов по модификации диагностической парадигмы меланом. Прежде всего, перспективным направлением является и будет являться таковым на протяжении обозримого периода времени идентификация новых диагностических и предиктивных маркеров меланом. В первую очередь речь идёт о порфирине, повышенный уровень которого был установлен в данном наблюдении и который, согласно данным, полученным из авторитетных научных источников, демонстрирует стабильно высокую концентрацию в злокачественных опухолях. Перспективными также будут исследования по метаболомике меланом, ставящие своей целью расшифровку её метаболома. В настоящей работе мы использовали лишь один аналитический метод, с помощью которого изучали некоторые эндогенные пигменты, относящиеся к категории вторичных метаболитов меланом, а также их реализации в биологических объектах, именуемые эндогенными пигментациями. В перспективе планируется осуществить исследования по изучению комплекса липидогенных пигментов, в состав которых, помимо липидов, входят белки, каротиноиды и флавины, которые в перспективе могут также стать искомыми диагностическими критериями опухолей меланоцитарного происхождения.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
США	– Соединенные Штаты Америки
ТЭМ	– трансмиссионная электронная микроскопия
AUC	– Area Under Curve (площадь под кривой)
CSD	– cumulative solar damage (совокупное солнечное повреждение)
ROC	– Receiver Operating Characteristic (рабочая характеристическая кривая)
TILs	– Tumor-Infiltrating Lymphocytes (опухоль-инфильтрирующие лимфоциты)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апатенко, А.К. Мезенхимные и нейроэктодермальные опухоли и пороки развития кожи / А.К. Апатенко. – М.: Медицина, 1977. – 208 с.
2. Гольберт, З.В. Состояние вопроса о морфологической классификации и прогностической ценности гистологических критериев доброкачественности меланомы кожи / З.В. Гольберт // В кн.: Меланома кожи. – М.: Медицина, 1972. – С. 41–46.
3. Дерматоскопия (эпилюминесцентная поверхностная микроскопия): in vivo диагностика меланомы кожи / Д.В. Соколов, А.Н. Махсон, Л.В. Демидов [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – №5 (29). – С. 63-67.
4. Интраоперационная срочная цитологическая диагностика в онкологии / Н.Н. Волченко, О.В. Борисова, В.Ю. Мельникова // Новости клинической цитологии России. – 2019. – Т. 23, № 2. – С. 5–11.
5. Использование метода раман-флуоресцентной спектроскопии для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака / Н.С. Александров, С.Т. Авраамова, Ю.А. Кириллов [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – Т. 4 (24). – С. 59–65.
6. Использование чат-ботов с применением искусственного интеллекта как элемента обучения при работе с дерматоскопическими изображениями / К.А. Кошечкин, А.А. Игнатьев, Е.В. Васильева [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2023. – Т. 22(4). – 447–453.
7. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – М., 2023. – 254 с.
8. Клинико-морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика наблюдения беспигментной (ахроматической) меланомы предплечья / И.А. Чернов, В.Э. Родионов, А.М. Авдалян [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2023. – Т. 24, №4 (Ч. 2). – С. 282–286.

9. Малишевская, Н.П. Злокачественное лентиго и лентиго-меланома: трудности дифференциальной диагностики / Н.П. Малишевская, А.В. Соколова, М.М. Кохан М.М. // Клиническая дерматология и венерология. – 2021. – Т. 20 (5). – С. 89–94.
10. Малишевская, Н.П. Ошибки в клинической диагностике злокачественных новообразований кожи // В кн.: Злокачественные новообразования кожи: заболеваемость, ошибки диагностики, организация раннего выявления, профилактика / Н.В. Кунгурев, Н.П. Малишевская, М.М. Кохан, В.А. Игликов – Курган: Зауралье, 2010. – С. 125–149.
11. Малишевская, Н.П. Современное состояние заболеваемости меланомой кожи в Российской Федерации и федеральных округах / Н.П. Малишевская, А.В. Соколова, Л.В. Демидов // Медицинский совет. – 2018. – Т. 10. – С. 161–165.
12. Меланома кожи в 2019 году: особенности клинической и дерматоскопической картины опухоли на современном этапе / Ю.Ю. Сергеев, В.Ю. Сергеев, В.В. Мордовцева [и др.] // Фарматека. – 2020. – Т. 27, № 8. – С. 28–35.
13. Меланома кожи и слизистых оболочек: Клинические рекомендации. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2019. – 121 с.
14. Меланома кожи, выявленная в процессе динамического наблюдения: обзор литературы и случаи из практики / Ю.Ю. Сергеев, Д.С. Бейнусов, В.В. Мордовцева, В.Ю. Сергеев // Фарматека. – 2021. – Т. 28, № 14. – С. 34–41.
15. Морфологические и спектроскопические особенности меланомы / И.А. Чернов, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова [и др.] // Актуальные вопросы патологоанатомической практики: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Челябинск, 2023. – С. 145–149.
16. Мультиплексная флюоресцентная визуализация опухолеассоциированных фибробластов в колоректальном раке / Н.А. Олейникова, О.А. Харлова, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков // Архив патологии. – 2022. – Т. 84 (5). – С. 11–19.

17. Мультиплексный ДОТ-иммуноанализ в диагностике инфекционных заболеваний / А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, П.В. Филатов, Н.Д. Ушканенко. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 225 с.
18. Никифоров, М.Н. Основы патологической анатомии. – Часть 1. Общая патологическая анатомия. Часть 2. Частная патологическая анатомия. – Москва-Петроград: Государственное издательство, 1923. – 322 с., 510 с.
19. Пальцев, М.А. Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала: Руководство / М.А. Пальцев, П.Г. Мальков, Г.А. Франк // Архив патологии. – 2011. – Т. 73. – Приложение. – 114 с.
20. Подбор модели нейронной сети для раннего обнаружения меланомы кожи / К.А. Кошечкин, А.А. Игнатьев, Н.Н. Потекаев [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2023. – Т. 22 (3). – С. 287–295.
21. Потекаев, Н.С. Распознавание болезней кожи / Н.С. Потекаев, Н.Н. Потекаев, А.Н. Львов. – М.: Группа МДВ, 2016. – 110 с.
22. Применение метода сиаскопии для оценки выраженности патологических изменений в коже при развитии меланоцитарных новообразований / М.Б. Аксененко, Т.Г. Рукша, Н.Б. Толстихина, С.Р. Кузнецов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 4. – С. 31–36.
23. Профилирование экспрессии генов в диагностике меланомы: проблемы и перспективы / Н.В. Палкина, Т.Г. Рукша, В.А. Хоржевский [и др.] // Архив патологии. – 2022. – Т. 84 (2). – С. 64–71.
24. Рисс, М.Е. Цифровые технологии диагностики ранних признаков поверхностно-распространяющихся меланом / М.Е. Рисс, А.П. Райкова // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2020. – Т. 15 (2). – С. 790–795.
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова [и др.]. – Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 642–657.

26. Саркисов, Д.С. Рекомбинации как механизм многообразия в явлениях природы / Д.С. Саркисов. – М.: Медицина, 1999. – 249 с.
27. Современный взгляд на диагностику меланомы кожи / М.А. Эберт, Г.И. Гафтон, Г.В. Зиновьев, И.Г. Гафтон // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 65 (5). – С. 638–644.
28. Спектрально-люминесцентные свойства некоторых порфириновых соединений в разных электронных состояниях / Н.С. Савенкова, Р.Т. Кузнецова, И.Н. Лапин [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2005. – Т. 99, № 5. – С. 783–790.
29. Срочная морфологическая диагностика в онкологии / Н.Н. Волченко, О.В. Борисова, В.Ю. Мельникова [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 5–13.
30. Ультраструктурная организация клеток стромы увеальной меланомы / Н.П. Бгатова, В.В. Макарова, Ю.С. Таскаева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 8. – С. 243–249.
31. Циркадные ритмы и некоторые морфометрические показатели меланомы B16 / Ю.А. Кириллов, М.А. Козлова, Л.А. Макарцева [и др.] // Учёные записки СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. – 2022. – Т.29, № 2. – С. 68-76.
32. Червонная, Л.В. Пигментные опухоли кожи / Л.В. Червонная. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 224 с.
33. Шахзадова, А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / А.О. Шахзадова, В.В. Старинский, И.В. Лисичникова // Сибирский онкологический журнал. – 2023. – Т. 22 (5). – С. 5–13.
34. A Narrative Review of Current Knowledge on Cutaneous Melanoma / B.M. Caraban, M. Aschie, M. Deacu [et al.] // Clin. Pract. – 2024. – Vol. 14 (1). – P. 214–241.
35. A prognostic nomogram for the cancer-specific survival of white patients with invasive melanoma at BANS sites based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database [Electronic resource] / J.N. Huang, H. Yu, Y. Wan [et al.] // Front Med (Lausanne). – 2023. – Vol. 10. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37497274/>

36. A quantitative comparison between SOX10 and MART-1 immunostaining to detect melanocytic hyperplasia in chronically sun-damaged skin / S. Muzumdar, M. Argraves, A. Kristjansson [et al.] // *J. Cutan. Pathol.* – 2018. – Vol. 45. – P. 263–268.
37. A red-light-activated sulfonamide porphycene for highly efficient photodynamic therapy against hypoxic tumor [Electronic resource] / Y. Wang, Z. Pan, X.L. Cheng [et al.] // *Eur J Med Chem.* – 2021. – Vol. 209. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33010634/>
38. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma / W.H. Jr. Clark, D.E. Elder, D. Guerry 4th [et al.] // *Hum. Pathol.* – 1984. – Vol. 15 (12). – P. 1147–1165.
39. ABCDE - an evolving concept in the early detection of melanoma / D.S. Rigel, R.J. Friedman, A.W. Kopf [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2005. – Vol. 141 (8). – P. 1032–1034.
40. Acral lentiginous melanoma: basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease / P. Basurto-Lozada, C. Molina-Aguilar, C. Castaneda-Garcia [et al.] // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2021. – Vol. 34. – P. 59–71.
41. Advances in Prevention and Surveillance of Cutaneous Malignancies / M.H. Trager, D. Queen, F.H. Samie [et al.] // *Am. J. Med.* – 2020. – Vol. 133 (4). – P. 417–423.
42. Alsaade, F.W. Developing a Recognition System for Diagnosing Melanoma Skin Lesions Using Artificial Intelligence Algorithms [Electronic resource] / F.W. Alsaade, T.H. Aldhyani, M.H. Al-Adhaileh // *Comput. Math. Methods Med.* – 2021. – May 15. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34055044/>
43. Amelanotic Malignant Melanoma with a BRAF V600E Mutation Mimicking Primary Lung Cancer / R. Matsuzawa, M. Morise, I. Tanaka [et al.] // *Intern. Med.* – 2022. – Vol. 61 (5). – P. 703–708.
44. Amelanotic nodular melanoma misdiagnosed as a benign skin lesion: A rare case report from Syria. [Electronic resource] / M.M. Alshaghel, L. Almahairi, R. Arian

[et al.] // Ann Med Surg (Lond). – 2022. – Vol. 74. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35145679/>

45. Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermatoscopic features / M.A. Pizzichetta, R. Talamini, I. Stanganelli [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 150 (6). – P. 1117–1124.

46. Assessment of Raman Spectroscopy for Reducing Unnecessary Biopsies for Melanoma Screening [Electronic resource] / Y. Zhang, A.J. Moy, X. Feng [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32575717/>

47. Berberine-photodynamic therapy sensitizes melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis through ROS-mediated P38 MAPK pathways [Electronic resource] / X. Wang, Q. Gong, C. Song [et al] // J. Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2021. – Vol. 418. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33716044/>

48. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma / P.A. Gimotty, B.P. Van, D.E. Elder [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23 (31). – P. 8048–8056.

49. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis / J.A. Carlson, A. Slominski, G.P. Linette [et al.] // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2003. – Vol. 3 (2). – P. 163–184.

50. Bobos, M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update. / M. Bobos // Ital. J. Dermatol. Venerol. – 2021. – Vol. 156 (3). – P. 300–321.

51. Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma / A. Breslow // Ann. Surg. – 1970. – Vol. 172 (5). – P. 902–908.

52. Causal relationship between the gut microbiome and basal cell carcinoma, melanoma skin cancer, ease of skin tanning: evidence from three two-sample mendelian randomisation studies [Electronic resource] / J. Lou, S. Cui, J. Li [et al.] // Front Immunol. – 2024. – Vol. 15. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38304424/>

53. Clark, W.H.J. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior / W.H.J. Clark // In: Advances in the Biology of the Skin / W. Montagna, F. Hu, eds. – New York: Pergamon Press, 1967. – Vol. VIII. – P. 621–647.
54. Clark, W.H.J. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression / W.H.J. Clark, D.E. Elder, D.I. Guerry // J. Natl. Cancer Inst. – 1989. – Vol. 81. – P. 1893–1904.
55. Classification of cutaneous malignant melanoma. A reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types / W. Weyers, M. Euler, C. Diaz-Cascajo [et al.] // Cancer. – 1999. – Vol. 86. – P. 288–299.
56. Clinical features and outcomes of spitzoid proliferations in children and adolescents / D.W. Bartenstein, J.M. Fisher, C. Stamoulis [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2019. – Vol. 181. – P. 366–372.
57. Clinico-pathological Spectrum of Primary Skin Malignancies in an Indian Tertiary Care Hospital / P. Sharma, P. Aggarwal, R.S. Punia [et al.] // Indian J. Dermatol. – 2023. – Vol. 68 (6). – P. 723.
58. Comparison of SOX-10, HMB-45, and Melan-A in Benign Melanocytic Lesions / S.E. Dass, T. Huizenga, M. Farshchian, D.R. Mehregan // Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. – 2021. – Vol. 14. – P. 1419–1425.
59. Confocal Assessment of Pigmented-Mucosal Lesions: A Monocentric, Retrospective Evaluation of Lip and Genital Area [Electronic resource] / V. Coco, S. Cappilli, A. Di Stefani [et al.] // Dermatol. Pract. Concept. – 2024. – Vol. 14 (1) – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38364417/>
60. Correlation Analyses between Histological Staging and Molecular Alterations in Tumor-Derived and Cell-Free DNA of Early-Stage Primary Cutaneous Melanoma [Electronic resource] / S.L. Csoma, K. Madarász, Y.C. Chang [et al.] // Cancers (Basel). – 2023. – Vol. 15 (21). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37958315/>
61. Cutaneous melanoma / G.V. Long, S.M. Swetter, A.M. Menzies [et al.] // Lancet. – 2023. – Vol. 402 (10400). – P. 485–502.

62. Dermoscopy as a Tool for Identifying Potentially Metastatic Thin Melanoma: A Clinical-Dermoscopic and Histopathological Case-Control Study / V. De Giorgi, F. Silvestri, G. Cecchi [et al.] // Cancers (Basel). – 2024. – Vol. 16 (7). – P. 1394.
63. Desmoplastic melanoma: A rare variant with challenging diagnosis / P.C. Marques, L.M. Diniz, K. Spelta, P.S.E. Nogueira // An. Bras. Dermatol. – 2019. – Vol. 94. – P. 82–85.
64. Diagnosis of Skin Cancer: From the Researcher Bench to the Patient's Bedside / P. Holló, Z. Lengyel, A. Bánvölgyi [et al.] // J. Clin. Med. – 2024. – Vol. 13 (6). – P. 1523.
65. Differences in tumor thickness between hematoxylin and eosin and Melan-A immunohistochemically stained primary cutaneous melanomas / M. Drabeni, L. Lopez-Vilaró, C. Barranco [et al.] // Am. J. Dermatopathol. – 2013. – Vol. 35. – P. 56–63.
66. Dzwierzynski, W.W. Melanoma Risk Factors and Prevention / W.W. Dzwierzynski // Clin. Plast. Surg. – 2021. – Vol. 48 (4). – P. 543–550.
67. Early detection of acral melanoma: A review of clinical, dermoscopic, histopathologic, and molecular characteristics / C.C. Darmawan, G. Jo, S.E. Montenegro [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2019. – Vol. 81 (3). – P. 805–812.
68. Early diagnosis of multiple primary amelanotichypomelanotic melanoma using dermoscopy / D. Zell, N. Kim, M. Olivero, G. Elgart // Dermatol. Surg. – 2008. – Vol. 34. – P. 1254–1257.
69. Evaluation of DNA ploidy and degree of DNA abnormality in benign and malignant melanocytic lesions of the skin using video imaging / H. Pilch, S. Günzel, U. Schäffer [et al.] // Cancer. – 2000. – Vol. 88 (6). – P. 1370–1377.
70. Evaluation of the correlation between porphyrin accumulation in cancer cells and functional positions for application as a drug carrier [Electronic resource] / K. Nishida, T. Tojo, T. Kondo, M. Yuasa // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11 (1). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33479459/>
71. Eyden, B. Malignant melanoma with neuroendocrine differentiation: clinical, histological, immunohistochemical and ultrastructural features of three cases / B. Eyden, D. Pandit, S.S. Banerjee // Histopathology. – 2005. – Vol. 47 (4). – P. 402–409.

72. Farah, C. Metabolic Profiling to Assess Response to Targeted and Immune Therapy in Melanoma / C. Farah, L. Mignion, B.F. Jordan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25 (3). – P. 1725.
73. Ferris, L.K. Early Detection of Melanoma: Rethinking the Outcomes That Matter. Ferris LK // *JAMA Dermatol.* – 2021. – Vol. 157 (5). – P. 511–513.
74. Fingerprinting of skin cells by live cell Raman spectroscopy reveals melanoma cell heterogeneity and cell-type specific responses to UVR Experimental / E.L. Wilkinson, L. Ashton, J.G. Kerns [et al.] // *Dermatology.* – 2022. – Vol. 31. – P. 1543–1553.
75. Friedman, R.J. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin / R.J. Friedman, D.S. Rigel, A.W. Kopf // *Cancer J. Clin.* – 1985. – Vol. 35. – P. 130–151.
76. From Vibrations to Visions: Raman Spectroscopy's Impact on Skin Cancer Diagnostics / C. Delrue, R. Speeckaert, M. Oyaert [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2023. – Vol. 12 (23). – P. 7428.
77. Gibson, L.E. Amelanotic melanoma: cases studied by Fontana stain, S-100 immunostain, and ultrastructural examination / L.E. Gibson, J.R. Goellner // *Mayo Clin Proc.* – 1988. – Vol. 63 (8). – P. 777–782.
78. Global cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M.M. Center [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – Vol. 61 (2). – P. 69–90.
79. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71 (3). – P. 209–249.
80. Haass, N.K. Melanoma biomarkers: current status and utility in diagnosis, prognosis, and response to therapy / N.K. Haass, K.S. Smalley // *Mol. Diagn. Ther.* – 2009. – Vol. 13 (5). – P. 283–296.
81. Hartman R.I., Lin J.Y. Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management. Hartman R.I., Lin J.Y. // *Hematol. Oncol. Clin. NA.* – 2019. – Vol. 33 (1). – P. 25–38.

82. Hedgehog Pathway Inhibition by Novel Small Molecules Impairs Melanoma Cell Migration and Invasion under Hypoxia / A. Falsini, G. Giuntini, M. Mori [et al.] // Pharmaceuticals (Basel). – 2024. – Vol. 17 (2). – P. 227.
83. Heterogeneity of Metastatic Melanoma: Correlation of MITF With Its Transcriptional Targets MLSN1, PEDF, HMB-45, and MART-1 / S. Zand, E. Buzney, L.M. Duncan [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2016. – Vol. 146. – P. 353–360.
84. Huang, C. Diagnosing Cutaneous Melanocytic Tumors in the Molecular Era: Updates and Review of Literature / C. Huang, T.W. Lau, B.R. Smoller // Dermatopathology (Basel). – 2024. – Vol. 11 (1). – P. 26–51.
85. Immune-phenotypical markers for the differential diagnosis of melanocytic lesions / G. Botti, L. Marra, A. Anniciello [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – Vol. 8 (9). – P. 9742–9751.
86. Immunohistochemistry utilization in the diagnosis of melanoma / M.S. Dinehart, S.M. Dinehart, S. Sukpraprut-Braaten, W.A. High // J. Cutan. Pathol. – 2020. – Vol. 47 (5). – P. 446–450.
87. Immunotherapy in Acral and Mucosal Melanoma: Current Status and Future Directions [Electronic resource] / L. Mao, Z. Qi, L. Zhang [et al.] // Front. Immunol. – 2021. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34149718/>
88. Impact of NRAS mutation on the tumor microenvironment in colorectal cancer and melanoms / Y. Zhou, Y. Kuang, C. Wang [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2024. – Vol. 20 (5). – P. 1947–1964.
89. Impact of Shave Biopsy on Diagnosis and Management of Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis / O. Ahmadi, M. Das, B. Hajarizadeh, J.A. Mathy // Ann. Surg. Oncol. – 2021. – Vol. 28. – P. 6168–6176.
90. Infrared and Raman Spectroscopic Studies of Molecular Disorders in Skin Cancer / J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, E. Malesiou [et al.] // In Vivo. – 2019. – Vol. 33 (2). – P. 567–572.
91. Is obesity a risk factor for melanoma? Y. Arbel, Y. Arbel, A. Kerner, M. Kerner // BMC Cancer. – 2023. – Vol. 23 (1). – P. 178.

92. Jaimes, N. The morphologic universe of melanoma / N. Jaimes, A.A. Marghoob // *Dermatol. Clin.* – 2013. – Vol. 31 (4). – P. 599–613.
93. Kim, H.J. Molecular Frontiers in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutic Advances [Electronic resource] / H.J. Kim, Y.H. Kim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25 (5). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38474231/>
94. Levoska, M.A. Upstaging of melanoma *in situ* and *lentigo maligna* treated with Mohs micrographic surgery rarely results in additional surgical management / M.A. Levoska, C.D. Schmults, A.H. Waldman // *Arch. Dermatol. Res.* – 2020. – Vol. 312 (10). – P. 753–756.
95. Lipofuscin in keratinocytes: Production, properties, and consequences of the photosensitization with visible light / P.N. Tonolli, W.K. Martins, H.C. Junqueira [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 2020. – Vol. 160 (11). – P. 277–292.
96. Malignant melanoma / G. Lodde, L. Zimmer, E. Livingstone [et al.] // *Pathologe.* – 2020. – Vol. 41 (3). – P. 281–292.
97. Malignant Melanoma: Beyond the Basics / S.N. Pavri, J. Clune, S. Ariyan, D. Narayan // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. – Vol. 138 (2). – P. 330e–340e.
98. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology / In: The Blakiston Division / G.L. Lee (edit). – New York, Toronto, London, Sydney: McGRAW-HILL BOOK COMPANY, 1968. – 258 p.
99. Marrapodi, R. The Keratinocyte in the Picture Cutaneous Melanoma Microenvironment / R. Marrapodi, B. Bellei // *Cancers (Basel).* – 2024. – Vol. 16 (5). – P. 913.
100. Massi, G. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma* Springer / G. Massi., P.E. Leboit. – Berlin: Springer, 2004. – 750 p.
101. McGovern, V.J. The classification of melanoma / V.J. McGovern // *Minn. Med.* – 1971. – Vol. 54. – P. 426–428.
102. McGovern, V.J. The classification of melanoma and its relationship with prognosis / V.J. McGovern // *Pathology.* – 1970. – Vol. 2. – P. 85–98.

103. MDM2, MDM4 and EGFR Amplifications and Hyperprogression in Metastatic Acral and Mucosal Melanoma / A. Forschner, F.J. Hilke, I. Bonzheim [et al.] // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12. – P. 540.
104. Medical image analysis using deep learning algorithms [Electronic resource] / M. Li, Y. Jiang, Y. Zhang Y, H. Zhu // Front Public Health. – 2023. – Vol. 11. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38026291/>
105. Melanocytic tumour classification and the pathway concept of melanoma pathogenesis / D.E. Elder, R.L. Barnhill, B.C. Bastian [et al.] // In: WHO Classification of Skin Tumours / D.E. Elder, D. Massi, R.A. Scolyer, R. Willemze eds. – 4th ed. – Lyon, France: IARC, 2018. – Vol. 11. – P. 66–71.
106. Melanoma and microbiota: Current understanding and future directions / B. Routy, T. Jackson, L. Mählmann [et al.] // Cancer Cell. – 2024. – Vol. 42 (1). – P. 16–34.
107. Melanoma clinical, dermatoscopical, and histopathological morphological characteristics / M. Situm, M. Buljan, M. Kolić, M. Vučić // Acta Dermatovenerol. Croat. – 2014. – Vol. 22 (1). – P. 1–12.
108. Melanoma Early Detection: Big Data, Bigger Picture / T. Petrie, R. Samatham, A.M. Witkowski [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2019. – Vol. 139 (1). – P. 25–30.
109. Melanoma masquerading as nonmelanocytic lesion / A. Detrixhe, F. Libon, M. Mansuy [et al.] // Melanoma Res. – 2016. – Vol. 26 (6). – P. 631–634.
110. Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights / Y.Y. Huang, D. Vecchio, P. Avci [et al.] // Biol. Chem. – 2013. – Vol. 394 (2). – P. 239–250.
111. Melanoma staging: evidence based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual / J.E. Gershenwald, R.A. Scolyer, K.P. Hess [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2017. – Vol. 67 (6). – P. 472–492.
112. Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles / G.J. Kaunitz, T.R. Cottrell, M. Lilo [et al.] // Lab. Invest. – 2017. – Vol. 97 (9). – P. 1063–1071.

113. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification / M. Rastrelli, S. Tropea, C.R. Rossi, M. Alaibac // *In Vivo*. – 2014. – Vol. 28 (6). – P. 1005–1011.
114. Metastatic small cell malignant melanoma: a case requiring immunoelectronmicroscopy for the demonstration of lattice-deficient melanosomes. / B. Eyden, J. Moss, I. Shore, S.S. Banerjee // *Ultrastruct. Pathol.* – 2005. – Vol. 29 (1). – P. 71–78.
115. Molecular Markers and Targets in Melanoma / C. Teixido, P. Castillo, C. Martinez-Vila [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10 (9). – P. 2320.
116. Molecular Profiling of Noncoding Mutations Distinguishes Nevoid Melanomas From Mitotically Active Nevi in Pregnancy / L.A. Jackett, A.J. Colebatch, R.V. Rawson [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2020. – Vol. 44. – P. 357–367.
117. Mucosal Melanoma: Epidemiology, Clinical Features, and Treatment / M.C. Sergi, E. Filoni, G. Triggiano [et al.] // *Curr. Oncol. Rep.* – 2023. Vol. 25 (11). – P. 1247–1258.
118. Multiple combinations of melanocytic and vascular endothelial markers enhance the detection rate of lymphovascular invasion in cutaneous melanoma / A. Bayram, S. Ozturk Sari, Y. Ozluk [et al.] // *J. Cutan. Pathol.* – 2021. – Vol. 48. – P. 472–478.
119. Namikawa, K. Targeted Therapy and Immunotherapy for Melanoma in Japan / K. Namikawa, N. Yamazaki // *Curr. Treat. Options in Oncol.* – 2019. – Vol. 20. – P. 7.
120. NF1-mutated melanomas reveal distinct clinical characteristics depending on tumour origin and respond favourably to immune checkpoint inhibitors / C.M. Thielmann, E. Chorti, J. Matull [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 2021. – Vol. 159. – P. 113–124.
121. Novel sulfonamide porphyrin TBPOs-2OH used in photodynamic therapy for malignant melanoma [Electronic resource] / Z. Pan, J. Fan, Q. Xie [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol. 133. – – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33378950/>

122. Omics sciences and precision medicine in melanoma / M.C. Medori, K. Donato, K. Dhuli [et al.] // Clinica terapeutica. – 2023. – Bd. 174 (Suppl. 2) 6). – S. 29–36.
123. Ostrowski, S.M. Biology of Melanoma / S.M. Ostrowski, D.E. Fisher // Hematol. Oncol. Clin. North Am. – 2021. – Vol. 35 (1). – P. 29–56.
124. Panse, G. Lichenoid dermatoses with pseudomelanocytic nests vs inflamed melanoma in situ: A comparative study / G. Panse, J.M. McNiff // J. Cutan. Pathol. – 2021. – Vol. 48. – P. 745–749.
125. Papachristou, I. Improving the prevention and diagnosis of melanoma on a national scale: A comparative study of performance in the United Kingdom and Australia / I. Papachristou, N. Bosanquet // J. Public Health Policy. – 2020. – Vol. 41 (1). – P. 28–38.
126. Pathologist-level classification of histopathological melanoma images with deep neural networks / A. Hekler, J.S. Utikal, A.H. Enk [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2019. – Vol. 115. – P. 79–83.
127. PRAME Expression in Melanocytic Tumors / C. Lezcano, A.A. Jungbluth, K.S. Nehal // Am. J. Surg. Pathol. – 2018. – Vol. 42 (11). – P. 1456–1465.
128. Principles, applications, and future of artificial intelligence in dermatology [Electronic resource] / J.A. Omiye, H. Gui, R. Daneshjou [et al.] // Front. Med. (Lausanne). – 2023. – Vol. 10. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37901399/>
129. Pro-Apoptotic Activity of MCL-1 Inhibitor in Trametinib-Resistant Melanoma Cells Depends on Their Phenotypes and Is Modulated by Reversible Alterations Induced by Trametinib Withdrawal [Electronic resource] / M.L. Hartman, P. Koziej, K. Kluszczyńska, M. Czyz. // Cancers (Basel). – 2023. – Vol. 15 (19). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37835493/>
130. Quantitative imaging biomarkers of immune-related adverse events in immune-checkpoint blockade-treated metastatic melanoma patients: A pilot study / N. Hribernik, D.T. Huff, A. Studen [et al.] // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2022. – Vol. 49. – P. 1857–1869.

131. Quantitative melanoma diagnosis using spectral phasor analysis of hyperspectral imaging from label-free slices / B. Schuty, S. Martínez, A. Guerra [et al.] // Front Oncol. – 2023. – Vol. 13. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38162497/>
132. Raman-guided subcellular pharmaco-metabolomics for metastatic melanoma cells [Electronic resource] / J. Du, Y. Su, C. Qian [et al.] // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32973134/>
133. Rashid, S. Melanoma classification and management in the era of molecular medicine / S. Rashid, M. Shaughnessy, H. Tsao // Dermatol. Clin. – 2023. – Vol. 41 (1). – P. 49–63.
134. Role of hippo pathway and cuproptosis-related genes in immune infiltration and prognosis of skin cutaneous melanoma [Electronic resource] / H. Lv, L. Liu, Y. He [et al.] // Front Pharmacol. – 2024. – Vol. 15. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38515849/>
135. Saleem, A. Immunohistochemistry in melanocytic lesions: Updates with a practical review for pathologists / A. Saleem, S. Narala, S.S. Raghavan // Semin. Diagn. Pathol. – 2022. – Vol. 39. – P. 239–247.
136. Shreberk-Hassidim, R. The Complex Interplay between Nevi and Melanoma: Risk Factors and Precursors / R. Shreberk-Hassidim, S.M. Ostrowski, D.E. Fisher // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24 (4). – P. 3541.
137. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2020 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // Cancer J. Clin. – 2020. – Vol. 70. – P. 7–30.
138. Simard, J.L. Pseudoprogression of Melanoma Brain Metastases / J.L. Simard, M. Smith, S. Chandra // Curr Oncol Rep. – 2018. – Vol. 20 (11). – P. 91.
139. Skin Cancer Detection and Classification Using Neural Network Algorithms: A Systematic Review / P. Hermosilla, R. Soto, E. Vega [et al.] // J. Diagnostics (Basel). – 2024. – Vol. 14 (4). – P. 454.
140. Spitz melanoma is a distinct subset of spitzoid melanoma /S.S. Raghavan, S. Peter Nel, T.W. Mully [et al.] // Mod. Pathol. – 2020. – Vol. 33. – P. 1122–1134.

141. Spotlight on porphyrins: Classifications, mechanisms and medical applications [Electronic resource] / F. Yang, M. Xu, X. Chen, Y. Luo // *Biomed. Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 164. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37236030/>
142. Stojkovic-Filipovic, J. Dermatoskopy of amelanotic and hypomelanotic melanoma / J. Stojkovic-Filipovic, H. Kittler // *J. German Society Dermatol.* – 2014. – Vol. 12 (6). – P. 467–472.
143. Strashilov, S. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances / S. Strashilov, A. Yordanov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22 (12). – P. 6395.
144. Survival after checkpoint inhibitors for metastatic acral, mucosal and uveal melanoma [Electronic resource] / N.D. Klemen, M. Wang, J.C. Rubinstein [et al.] // *J. Immunother. Cancer*. – 2020. – Vol. 8 (1). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32209601/>
145. Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma / I. Yeh, E. Jorgenson, L. Shen [et al.] // *Natl Cancer Inst.* – 2019. – Vol. 111 (10). – P. 1068–1077.
146. Tchernev, G. Preputial melanoma / G. Tchernev, I. Temelkova // *Wien Med. Wochenschr.* – 2021. – Bd. 171 (1–2). – S. 41–42.
147. Terminology in surface microscopy / F.A. Bahmer, P. Fritsch, J. Kreusch [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1990. – Vol. 23. – P. 1159–1162.
148. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway / D.E. Elder, B.C. Bastian, I.A. Cree [et al.] // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2020. – Vol. 144. – P. 500–522.
149. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin / W.H.J. Clark, L. From, E.A. Bernardino, M.C.J. Mihm // *Cancer Res.* – 1969. – Vol. 29. – P. 705–727.
150. The Impact of Clinical and Histopathological Factors on Disease Progression and Survival in Thick Cutaneous Melanomas [Electronic resource] / D.A. Tapoi, D.

Derewicz, A.-A. Gheorghisan-Galateanu [et al.] // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37596798/>

151. The Importance of Immunohistochemistry in the Evaluation of Tumor Depth of Primary Cutaneous Melanoma / A.M. Pop, M. Monea, P. Olah [et al.] // Diagnostics. – 2023. – Vol. 13. – P. 1020.

152. The Relationship Between Epidermal Mitotic Density, Atypical Mitotic Figure Density, Breslow Depth, Ulceration, and Dermal Mitotic Rate in Cutaneous Melanoma: A Retrospective Cohort Study / A.F. Marsch, R.M. McKee, T. Werbel [et al.] // Int. J. Surg. Pathol. – 2021. – Vol. 29 (6). – P. 592–599.

153. Tsolekile, N. Porphyrin as Diagnostic and Therapeutic Agent [Electronic resource] / N. Tsolekile, S. Nelana, O.S. Oluwafemi // Molecules. – 2019. – Vol. 24 (14). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31340553/>

154. Tumoral inflammatory infiltrate does not predict metastases in thin primary cutaneous melanomas / M. Bevilaqua, M.C.W. Rey, G.C.A. Cappellini [et al] // An. Bras. Dermatol. – 2023. – Vol. 98 (6). – P. 793–798.

155. Uncommon Subtypes of Malignant Melanomas: A Review Based on Clinical and Molecular Perspectives [Electronic resource] / M. Chacón, Y. Pfluger, M. Angel // Cancers (Basel). 2020. – Vol. 12. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825562/>

156. Update on eighth edition American Joint Committee on Cancer classification for cutaneous melanoma and overview of potential pitfalls in histological examination of staging parameters / C.M. Trinidad, C.A. Torres-Cabala, J.L. Curry [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2019. – Vol. 72. – P. 265–270.

157. Urso, C. Spitz Tumors and Melanoma in the Genomic Age: A Retrospective Look at Ackerman's Conundrum [Electronic resource] / C. Urso // Cancers (Basel). – 2023. – Vol. 15 (24). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38136379/>

158. Villanueva, J. Melanoma and the tumor microenvironment / J. Villanueva, M. Herlyn // Current Oncology Reports. – 2008. – Vol. 10 (5). – P. 439–446.

159. Virchow, R. Die krankheiten Geschwülste / R. Virchow. – Berlin, 1863. – Bd. 24. – S. 369–434.

160. Wang, L. Nanoparticles for multiplex diagnostics and imaging / L. Wang // Nanomedicine. – 2006. – Vol. 1 (4). – P. 413–426.
161. Waseh, S. Advances in melanoma: epidemiology, diagnosis, and prognosis. [Electronic resource] / S. Waseh, J.B. Lee // Front Med (Lausanne). – 2023. – Vol. 10. – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38076247/>
162. Weyers, W. The Emperor's New Clothes: A Critique of the Current WHO Classification of Malignant Melanoma / W. Weyers // Am. J. Dermatopathol. – 2020. – Vol. 42 (12). – P. 989–1002.
163. Woźniak, M. Hypericin-Based Photodynamic Therapy Displays Higher Selectivity and Phototoxicity towards Melanoma and Squamous Cell Cancer Compared to Normal Keratinocytes In Vitro [Electronic resource] / M. Woźniak, M. Nowak-Perlak // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24 (23). – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38069219/>
164. Yeh, I. New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas / I. Yeh // Mod. Pathol. – 2020. – Vol. 33(Suppl. 1). – P. 1–14.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

### Таблицы

Таблица 1 – Распределение пациентов с поверхностно-распространяющейся меланомой по возрасту .....	39
Таблица 2 – Распределение пациентов с поверхностно-распространяющейся меланомой по полу .....	39
Таблица 3 – Распределение опухоли по локализации (клинические данные) .....	40
Таблица 4 – Распределение клинического материала по Международной классификации стадий злокачественных новообразований (Tumor, Nodus, Metastasis) .....	40
Таблица 5 – Распределение опухоли в зависимости от макроскопических размеров (измерение наибольшего диаметра новообразования) .....	60
Таблица 6 – Совокупная частота изъязвлений поверхности опухоли по данным макро- и микроскопического исследования .....	60
Таблица 7 – Распределение наблюдений в зависимости от уровня инвазии .....	61
Таблица 8 – Характеристика митотической активности на 1 мм <sup>2</sup> опухоли .....	62
Таблица 9 – Распределение наблюдений в зависимости от глубины проникновения (инвазии). Толщина опухоли по Breslow (мм) .....	63
Таблица 10 – Распределение наблюдений в зависимости от наличия или отсутствия патогистологических признаков лимфоваскулярной инвазии .....	63
Таблица 11 – Характеристика лимфоцитарного (иммунного) инфильтрата в зависимости от категориальности лимфоцитов .....	64
Таблица 12 – Частота определения иммуногистохимических маркеров в различные фазы роста опухоли .....	67

Таблица 13 – Выявленные при рамановской спектроскопии компоненты различных фаз роста поверхностно-распространяющихся меланом кожи	70
Таблица 14 – Частота идентифицированных мутаций в морфологическом субстрате поверхностной меланомы кожи, ассоциированных с фазой роста опухоли .....	73
Таблица 15 – Результаты расчёта коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (первая пара) .....	78
Таблица 16 – Результаты расчёта коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (вторая пара) .....	79
Таблица 17 – Результаты расчета коэффициентов, включенных в модель бинарной логистической регрессии (третья пара) .....	80

## Рисунки

Рисунок 1 – Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи туловища .....	49
Рисунок 2 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи в фазу радиального (горизонтального) роста	51
Рисунок 3 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи в фазу радиального (горизонтального) роста .....	52
Рисунок 4 – Поверхностно-распространяющаяся педжетоидная пигментная меланома кожи .....	55
Рисунок 5 – Сравнительная характеристика образцов кожи контрольной группы и поверхностно-распространяющейся меланомы (фаза радиального роста) .....	57
Рисунок 6 – Морфологическая и спектроскопическая идентификация каротиноидов и порфиринов в образце кожи поверхностно-распространяющейся меланомы (фаза радиального роста) .....	58

Рисунок 7 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи в фазу вертикального роста .....	62
Рисунок 8 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста .....	66
Рисунок 9 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи в фазу вертикального роста .....	67
Рисунок 10 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста .....	71
Рисунок 11 – Поверхностно-распространяющаяся пигментная меланома кожи с преобладанием фазы вертикального роста .....	74
Рисунок 12 – ROC-анализ оценки модели перехода меланомы кожи в вертикальную фазу роста .....	81
Рисунок 13 – Сравнительная характеристика образцов кожи контрольной группы и поверхностно-распространяющейся меланомы .....	83