

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО–ЯСЕНЕЦКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи



ЕРЕМИНА ЕКАТЕРИНА НИКОЛАЕВНА

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ПРЕДИКТОРЫ ТЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Зуков Руслан Александрович

Красноярск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Современные аспекты эпидемиологии, диагностики и лечения меланомы кожи	16
1.2. Факторы прогноза течения и исхода заболевания.....	27
1.2.1 Клинические факторы возникновения и прогноза течения.....	27
меланомы кожи.....	27
1.2.2 Морфологические факторы прогноза течения заболевания.....	31
1.2.3 Молекулярно–генетические факторы прогноза течения заболевания .	36
1.2.4 Интегративные факторы и системы прогноза.....	40
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Общая характеристика объекта исследования.....	43
2.2 Клинические, анамнестические и морфологические методы обследования.....	51
2.2.1 Анкетирование	51
2.2.2 Подготовка гистологических препаратов.....	52
2.2.3 Оценка лимфоидной инфильтрации опухоли	53
2.2.4 Подготовка ИГХ препаратов	55
2.2.5 Генетические исследования мутации <i>V600E</i> гена <i>BRAF</i>	57
2.2.6 Генетические исследования мутации гена <i>MC1R</i>	58
2.3 Методы статистической обработки.....	60
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Характеристика и частота полиморфных вариантов гена <i>MC1R</i> у пациентов с меланомой кожи в Красноярском крае	62
3.1.1 Ассоциация полиморфизмов гена <i>MC1R</i> с клинико–морфологическими характеристиками, риском метастазирования у пациентов при МК.....	65
3.1.2 Выживаемость больных МК в зависимости от наличия полиморфизма гена рецептора меланокортина–1 (<i>MC1R</i>).....	76
3.2 Количественная и качественная оценка лимфоцитарной инфильтрации опухоли при меланоме кожи	81

3.2.1 Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов в перитуморальном инфильтрате при меланоме кожи	85
3.2.2 Взаимосвязь уровня лимфоидной инфильтрации с прогностическими факторами и выживаемостью при меланоме кожи	94
3.3 Разработка и валидация прогностической модели риска летального исхода у больных меланомой кожи после радикального лечения на основе регрессии Кокса.....	98
3.3.1 Отбор прогностически значимых переменных на основе комплексного анализа изученных клинико–морфологических и молекулярно–генетических параметров	98
3.3.2 Многофакторный анализ выживаемости больных меланомой кожи .	107
3.3.3 Построение интегральных прогностических моделей на основе логистической регрессии для стратификации риска прогрессирования и летального исхода при меланоме кожи	112
3.4 Разработка персонализированного алгоритма динамического наблюдения пациентов с меланомой кожи с учётом генетического и фенотипического профиля	120
3.4.1 Оценка непосредственных и отдаленных результатов комбинированного лечения больных меланомой кожи.....	120
3.4.2 Стратификация пациентов на группы риска с учетом их генетического и фенотипического профиля, оценка риска прогрессирования МК после радикального лечения.....	122
3.4.3 Разработка персонализированных алгоритмов динамического наблюдения	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	134
ВЫВОДЫ.....	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Меланома кожи (МК) – злокачественная опухоль, развивающаяся из аномальной пролиферации меланоцитов, характеризующаяся высокой смертностью и склонностью к метастазированию. При изучении глобальной статистики, меланома занимает 17-е место среди всех видов злокачественных опухолей [129]. За последние годы число новых случаев увеличилось до 324635, а количество смертей – до 57043. Развитие иммунотерапии, основной тренд современной науки [130, 131], но МК остаётся одной из опухолей с наиболее быстрым распространением метастазов, что делает исследование факторов риска критически важным для персонализированного подхода к лечению. Прогноз заболевания напрямую зависит от стадии: пятилетняя выживаемость при ранней (I стадии) составляет около 97 %, тогда как при запущенной (IV стадии) – лишь около 10 % [132]. Поэтому ранняя диагностика и эффективное лечение остаются основными стратегиями повышения шансов на выздоровление [134].

Меланома развивается из сложного взаимодействия генетической предрасположенности и факторов окружающей среды [133]. Выявление лиц с высоким риском имеет ключевое значение для скрининга и ранней диагностики. Многочисленные модели прогнозирования риска учитывают возраст, семейный анамнез, солнечное воздействие, количество невусов и особенности пигментации кожи [135-138]. Эти фенотипические признаки имеют четкую генетическую основу. В частности, полиморфные варианты гена рецептора меланокортина-1 (*MC1R*) являются ключевыми детерминантами светочувствительности и определяют формирование фенотипа высокого риска (I-II фототип, рыжие волосы, веснушки) [140-143].

Меланома кожи традиционно относится к иммуногенным типам опухолей, что проявляется характерным лимфоидным инфильтратом и

возможностью спонтанной регрессии, обусловленной противоопухолевым иммунным ответом. Высокая мутационная нагрузка, вызванная воздействием ультрафиолета, дополнительно формирует уникальный иммунологический профиль этого заболевания [147].

Однако ключевой нерешённой задачей в терапии МК является отсутствие персонализированных инструментов для стратификации риска прогрессирования и летального исхода на этапе первичной диагностики, а также соответствующих алгоритмов динамического наблюдения. Биологическим основанием для создания таких инструментов служит взаимодействие фенотипических особенностей, во многом обусловленных генетическим полиморфизмом *MC1R*, и локального противоопухолевого иммунитета (характеризуемого опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами, TILs). Несмотря на признанную роль каждого из этих факторов в отдельности, их совокупный прогностический вклад, а также характер взаимосвязи в рамках конкретных региональных популяций, остаются малоизученными [148]. Такой подход позволит перейти к персонализированной тактике ведения пациентов с меланомой кожи, оптимизируя использование ресурсов здравоохранения и способствуя улучшению онкологических исходов.

Вышесказанное явилось основанием для проведения настоящей работы.

Степень разработанности темы исследования

Прогнозирование течения меланомы кожи является важнейшей задачей, определяющей тактику лечения и последующего наблюдения. На сегодняшний день разработан ряд прогностических моделей и инструментов, основанных преимущественно на клинико-морфологических параметрах. Наиболее широко используется система стадирования AJCC (8-е издание, 2017), интегрирующая толщину опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по

Кларку, наличие изъязвления и микросателлитов [118]. Существуют также специализированные онлайн-калькуляторы (например, на основе данных Sunbelt Melanoma Trial), позволяющие оценить риск метастазирования [119–121].

Однако анализ литературы, включая обзор Borsika A. Rabin и соавт. показывает, что существующие модели имеют ряд ограничений. Во-первых, они часто созданы для конкретных подгрупп пациентов (например, с локализованной или узловой меланомой) и могут быть менее применимы к неоднородной популяции в реальной клинической практике [122]. Во-вторых, они, как правило, фокусируются на узком наборе параметров, не проводя сравнительного анализа прогностической ценности расширенного спектра факторов (клинико-морфологических, иммунологических, генетических) для решения различных задач: прогноза исхода и планирования наблюдения.

Отдельные аспекты прогноза изучены достаточно глубоко. Установлена роль полиморфизмов гена *MC1R* не только как фактора риска развития меланомы, но и как возможного модулятора её агрессивности [142, 144]. Параллельно накоплены убедительные данные о независимом прогностическом значении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) как маркера противоопухолевого иммунного ответа [145, 146].

Критическим недостатком является отсутствие комплексных исследований, которые на одной когорте оценили бы, какие именно комбинации из этого широкого пула параметров наиболее значимы для разных этапов клинического принятия решений. Неясно, одни и те же ли факторы оптимальны для математического прогнозирования отдаленного летального исхода и для стратификации пациентов по интенсивности ближайшего наблюдения, особенно в условиях специфики региональной популяции.

Таким образом, актуальной задачей является проведение исследования, которое: 1) на основе всестороннего анализа определит ключевые

предикторы для построения высокоточной модели оценки индивидуального риска смерти, и 2) независимо оценит значимость тех же и дополнительных (например, фенотипических) параметров для создания более совершенного алгоритма динамического наблюдения. Такой подход позволит получить не единую упрощенную схему, а дифференцированные рекомендации, основанные на конкретной цели прогнозирования, что соответствует принципам персонализированной медицины.

Цель исследования

Изучение прогностической роли клинико–морфологических и молекулярно–генетических параметров для оптимизации алгоритмов диагностики и динамического наблюдения у больных меланомой кожи.

Задачи исследования

1. Изучить характеристику и частоту встречаемости полиморфных вариантов гена *MC1R* в Красноярском крае среди пациентов с меланомой кожи.
2. Провести комплексный анализ особенностей иммунного микроокружения опухоли у больных меланомой кожи.
3. Определить сопряженность выявленных полиморфных вариантов гена *MC1R* и параметров опухолевого микроокружения с клинико–морфологическими и молекулярно–генетическими параметрами.
4. На основе сравнительного многофакторного анализа выявить ключевые независимые предикторы и разработать прогностическую модель оценки индивидуального риска летального исхода у больных меланомой кожи.

5. Разработать персонализированный алгоритм динамического наблюдения у больных меланомой кожи после окончания специализированного лечения.

Научная новизна

1. Впервые для больных меланомой кожи Красноярского края охарактеризована частота встречаемости полиморфных вариантов гена *MC1R* (*R151C*, *R160W*, *D294H*, *R163Q*, *I155T*), ассоциированных с высоким риском агрессивного течения. Впервые выявлены ассоциации данных вариантов с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Показано, что наиболее распространённым вариантом является *R160W* (суммарная частота носительства 21,1 %), а гомозиготное носительство *I155T* в данной популяции не зарегистрировано.

2. Впервые в региональной когорте с применением многофакторного анализа установлено, что носительство минорных аллелей С (полиморфизм *D294H*, rs1805009) и С (полиморфизм *I155T*, rs1110400) гена *MC1R* ассоциировано с повышенным риском летального исхода ($HR > 4,0$; $p < 0,05$).

3. Установлено, что прогностическая значимость иммунного микроокружения меланомы определяется не фенотипическим профилем инфильтрирующих клеток, а количественной плотностью и структурной организацией TILs: наиболее благоприятный прогноз ассоциирован с формированием третичных лимфоидных структур (ТЛС) – 5-летняя выживаемость в этой группе составила 96,2 %, тогда как при скудной лимфоидной инфильтрации она снижается до 67,7 % ($p < 0,05$).

4. Впервые на основе комплексного сравнительного анализа разработана высокоточная логистическая регрессионная модель оценки индивидуального 5-летнего риска смерти ($AUC = 0,927$, общая точность

83,9 %), интегрирующая ключевые клинико-морфологические и иммунологические предикторы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о патогенетических механизмах развития и прогрессирования меланомы кожи. Впервые для региональной популяции Красноярского края систематизированы данные о полиморфизмах гена *MC1R* и их связи с клинико-морфологическими особенностями течения опухолевого процесса, что вносит вклад в понимание генетической архитектуры заболевания в России. Многофакторный анализ подтвердил независимую прогностическую роль опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) и продемонстрировал ассоциацию носительства аллелей *D294H* и *I155T* гена *MC1R* с повышенным риском летального исхода, углубляя понимание генетических факторов и иммунного ответа в определении агрессивности течения меланомы.

Практическая значимость работы определяется созданием внедряемых в клиническую практику инструментов:

1. Разработана и зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности программа для ЭВМ (№ 2023668706 от 31.08.2023), реализующая математическую модель оценки 5-летнего риска летального исхода. Модель, основанная на ключевых независимых предикторах (отягощенный онкоанамнез, уровень инвазии по Кларку, наличие сосудистой инвазии, степень лимфоидной инфильтрации, наличие и количество метастазов), обладает диагностической точностью 83,9 % ($AUC = 0,927$) и предоставляет врачу количественную оценку индивидуального риска.

2. Предложен клинический алгоритм динамического наблюдения, который позволяет дифференцировать периодичность и объём обследований на основе интегральной оценки генетического профиля (*MC1R*) и

стандартных прогностических факторов. Это способствует переходу от унифицированного подхода к персонализированному, оптимизируя схему динамического наблюдения пациентов и нагрузку на систему здравоохранения.

3. Выявленные клинико-фенотипические характеристики, ассоциированные с носительством полиморфизмов *MC1R*, могут служить ориентиром для клинициста при идентификации пациентов с потенциально высоким риском агрессивного течения заболевания на этапе первичной диагностики.

Методология и методы исследования

В основу методологии настоящей диссертационной работы положены современные теоретические и практические основы отечественной и зарубежной онкологии, дерматоонкологии и молекулярной генетики. Диссертация выполнена в соответствии с дизайном исследования.

У группы пациентов ($n = 213$) были изучены клинико-морфологические и молекулярно-генетические характеристики меланомы кожи, оценена их прогностическая значимость в зависимости от основных параметров заболевания (стадия, толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, наличие изъязвления, сосудистой инвазии и метастазов). Также был проведен комплексный анализ иммунного микроокружения опухоли (опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, TILs) с оценкой их субпопуляционного состава ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, $CD56^+$) с помощью иммуногистохимического метода, а также исследованы ассоциации полиморфных вариантов гена рецептора меланокортина-1 (*MC1R*: *R151C*, *R160W*, *D294H*, *R163Q*, *I155T*) с клиническим течением заболевания и показателями выживаемости. В качестве предикторов неблагоприятного исхода были проанализированы: носительство минорных аллелей *MC1R*,

степень лимфоидной инфильтрации, наличие мутации *BRAF V600E*, а также комплекс стандартных морфологических критериев агрессивности опухоли.

Полученные результаты были проанализированы и обработаны корректными методами статистического анализа с применением многофакторных регрессионных моделей (логистическая регрессия и регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса), что позволило разработать высокоточную прогностическую модель индивидуального 5-летнего риска летального исхода ($AUC = 0,927$) и персонализированный алгоритм динамического наблюдения.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлены ассоциации полиморфных вариантов гена *MC1R* (*R151C*, *R160W*, *D294H*, *R163Q*, *I155T*) с клинико–морфологическими и молекулярно–генетическими параметрами агрессивного течения заболевания у больных меланомой кожи в Красноярском крае.

2. У больных меланомой кожи прогностическая значимость иммунного микроокружения меланомы определяется не фенотипическим профилем инфильтрирующих клеток, а количественной плотностью и структурной организацией TILs.

3. На основе комплексного сравнительного анализа разработана логистическая регрессионная модель оценки индивидуального 5-летнего риска летального исхода. Модель обладает высокой дискриминационной способностью ($AUC = 0,927$) и диагностической точностью 83,9 % (чувствительность 71,9 %, специфичность 89,1 %).

4. Разработан персонализированный алгоритм динамического наблюдения у больных меланомой кожи после специализированного лечения, который определяет объем и периодичность обследования на основе интегральной оценки генетического профиля (носительство аллелей *MC1R*) и стандартных клинико-морфологических параметров.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия по направлениям исследований: п.2. «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)»; п.3. «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний»; п.4 «Совершенствование методов прогнозирования течения заболевания, оценки эффективности лечения и индивидуального риска развития злокачественных новообразований».

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинического материала, высоким методологическим уровнем работы с использованием современных информативных методов. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала и использованием методов математического моделирования.

Личный вклад автора

Личный вклад автора включает в себя анализ литературных источников, составления дизайна работы, подготовку научных публикаций и докладов. Соискатель непосредственно осуществлял сбор эмпирических данных, выполнял интерпретацию результатов и статистическую обработку полученного материала, формирование специализированной электронной базы.

Апробация материалов диссертации

Результаты диссертационного исследования доложены на II конференции лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий "Цифровые лекарства на стыке наук" (Красноярск, 2016), региональной конференции дерматовенерологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии и косметологии» (Красноярск, 2016), региональной конференции "Актуальные вопросы дерматовенерологии, косметологии и репродуктивного здоровья" (Красноярск, 2017), научно–практической конференции "Новые технологии в онкологии" (Красноярск, 2018), III Съезде врачей общей практики СФО "На передовой в белых халатах" (Красноярск, 2018), XIX Всероссийском симпозиуме с международным участием "Сложные системы в экстремальных условиях" (Красноярск, 2018), Всероссийской научно–практической конференции "Современные достижения онкологии в клинической практике" (Красноярск, 2018), школе–семинаре "Современные стандарты диагностики и лечения меланомы кожи" (Москва, 2018), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием "Современные достижения онкологии в клинической практике" (Красноярск, 2019), региональной научно–практической конференции дерматовенерологов (Красноярск, 2019), на Втором Байкальско–Енисейском онкологическом форуме (Красноярск, 2020), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием "Современные достижения онкологии в клинической практике" (Красноярск, 2021), региональной конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии, косметологии и репродуктивного здоровья» (Красноярск, 2022), III Весенний онкологический онлайн–марафон Онлайн весна (Москва, 2022), региональной конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии, косметологии и репродуктивного здоровья» (Красноярск, 2023), IV Онкологический онлайн–марафон Онлайн осень (Москва, 2023), региональной конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии, косметологии и репродуктивного здоровья»

(Красноярск, 2024), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием "Современные достижения онкологии в клинической практике" (Красноярск, 2024), V Онкологический онлайн–марафон Онлайн осень (Москва, 2024), Форум онкологов Сибири и Дальнего Востока (Новокузнецк, 2025), Всероссийской научно–практической конференции с международным участием "Современные достижения онкологии в клинической практике" (Красноярск, 2025), региональной конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии, косметологии и репродуктивного здоровья» (Красноярск, 2025).

Работа отмечена дипломом 1 степени на конкурсе молодых ученых имени Е.А. Шкаповой «Лучшая работа в области экспериментальной и клинической онкологии» (Красноярск, 2021) и дипломом за лучшие тезисы на конференции «Меланома и опухоли кожи – 2022» (Москва, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, одна статья МБЦ (SCOPUS Q1), одна программа для ЭВМ.

Внедрение результатов исследования

Полученные данные интегрированы в лечебно-диагностический процесс КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского».

Основные научные выводы также используются в педагогической деятельности на кафедре онкологии и лучевой терапии ФГБОУ ВО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.

Войно-Ясенецкого в рамках подготовки ординаторов и специалистов по программам ДПО.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 41 таблицей. Библиография включает 201 источников, из которых 52 отечественных и 166 иностранных.

Работа выполнена при поддержке внутривузовского гранта ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно–Ясенецкого Минздрава России (договор №2.4 от 26.03.2019).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные аспекты эпидемиологии, диагностики и лечения меланомы кожи

Меланома (от древнегреческого «μέλαις», что означает «черный») является злокачественным новообразованием нейроэктодермального происхождения. В большинстве случаев она возникает из меланоцитов – пигментных клеток кожи, основной функцией которых является синтез меланина [1, 59]. Это одна из наиболее опасных и непредсказуемых опухолей, которая часто метастазирует как лимфогенным, так и гематогенным путем, чувствительна к лекарственной таргетной и иммунотерапии [2, 11]. Несмотря на прогресс в терапии, ключевыми факторами, определяющими выживаемость, остаются ранняя диагностика и своевременное начало адекватного лечения, что актуализирует поиск новых диагностических и прогностических маркеров.

Учитывая то, что меланоциты встречаются в различных тканях (в том числе слизистых оболочках желудочно–кишечного тракта (ЖКТ), бронхов, сосудистой оболочке глаза и пр.) первичная опухоль может возникнуть в любом органе, но чаще всего она поражает кожу. Как отмечает А.Д. Каприн с соавторами 90 % всех злокачественных меланом приходится именно на кожные покровы, около 7 % на глаз, около 3 % на наружные половые органы и менее 1 % на нижеампулярный отдел прямой кишки [7].

В последние десятилетия во всем мире по данным International Agency for Research on Cancer (GLOBOCAN) отмечается неуклонный рост заболеваемости меланомой кожи [3]. В мировой онкоэпидемиологии меланома кожи характеризуется вторым по величине абсолютным приростом заболеваемости среди всех злокачественных новообразований (сразу после рака трахеи, бронхов и лёгкого) [4]. Глобальная статистика 2022 года фиксирует 331 тысячу первичных диагнозов и приблизительно 58 тысяч

смертей, причиной которых стала меланома. При этом уровень заболеваемости крайне неоднороден в разных странах. Лидерами по абсолютному числу новых случаев являются США (101388) и Германия (21976). К 2040 г. в США прогнозируемая заболеваемость составит 129 000 человек в год, а прогнозируемое число смертей – 10700 [5]. По данным национального Института рака США, несмотря на профилактические мероприятия, меланома занимает 9-е место среди онкологических заболеваний, 6-е место среди всех злокачественных опухолей у женщин (3,2 %) и 8-е место – у мужчин (2,3 %) [5,149].

В 2022 году на территории Российской Федерации было зарегистрировано 8995 новых случаев заболевания меланомой кожи [7]. Согласно статистическим данным, общий (грубый) показатель заболеваемости для населения составил 8,15 случаев на 100 тыс. человек, а стандартизированный показатель равнялся 4,89 на 100 тыс. (среди мужчин и женщин – 4,86 и 5,06 соответственно). Доля меланомы кожи в общей структуре онкологической заболеваемости в 2022 году достигла 1,7 % для мужчин и 2,1 % для женщин. Анализ динамики за десятилетний период показал, что среднегодовой темп прироста заболеваемости среди мужского населения составил 4,25 %, а среди женского – 3,30 %. Средний возраст пациентов на момент установления диагноза равнялся 61,9 года [8].

Наибольшие показатели заболеваемости меланомой кожи среди населения РФ занимает республика Марий Эл – 9,77 на 100 тыс. населения, последующие места заняли Севастополь – 8,58 на 100 тыс. населения, Рязанская область – 7,42 на 100 тыс. населения и Калужская область – 7,16 на 100 тыс. населения. Минимальный уровень заболеваемости установлен для Чеченской республики, Ингушетии, Калмыкии и республики Тыва – менее 2,0 на 100 тыс. населения [6].

В целом, злокачественные новообразования кожи наиболее распространены среди чувствительных к солнечной инсоляции групп населения (светлый фототип кожи), у которых уровень заболеваемости

меланомой примерно в 25 раз выше по сравнению с чернокожими людьми и примерно в 6 раз выше, чем у латиноамериканцев [10].

В 2022 году от меланомы кожи в РФ умерли 1684 мужчин и 1910 женщин, грубый показатель смертности (на оба пола) – 2,45 на 100 тыс. населения, стандартизированный – 1,37 на 100 тыс. населения (1,66 у мужчин и 1,19 у женщин) [7]. В мире смертность от злокачественных новообразований кожи имеет тенденцию к снижению, в РФ среднегодовой темп прироста смертности составил 8,88 % [10]. Такой высокий уровень смертности обусловлен высоким метастатическим потенциалом опухоли, а снижение данного показателя связано с введением в клиническую практику новых таргетных и иммунологических препаратов, а также высоким ответом опухоли на системную терапию.

По данным на 2022 год в РФ в 19,6 % случаев устанавливается на запущенных (III и IV) стадиях, что объясняет в целом неблагоприятный прогноз данного заболевания и низкую выживаемость больных [7]. В соответствии со статистикой American Joint Committee of Cancer (AJCC), совокупная пятилетняя выживаемость пациентов достигает 97 % на стадии IA и 92 % на стадии IB [11]. Для сравнения, при диагностировании IV стадии болезни аналогичный показатель не превышает 15-20 %.

Исторически для ранней диагностики меланомы предлагались многочисленные методики, диапазон которых простирался от спектрофотометрического анализа пигментных образований (невусов, или «родинки») до выявления молекулярно – генетических и белковых маркеров. Тем не менее, ключевая проблема остаётся нерешённой: в настоящее время отсутствуют достоверные способы, позволяющие диагностировать меланому или оценить предрасположенность к её развитию на уровне эпителиального пласта. Данный факт контрастирует с высокой социальной значимостью заболевания и очевидной потребностью в своевременной диагностике, что подчёркивается в научных источниках [20].

Наиболее эффективный путь для ранней диагностики и профилактики меланомы – это применение интегрированной методики, основанной на одновременном учёте нескольких групп показателей. К ним относятся биометрические данные пациента, клиническая картина состояния кожных покровов, а также лабораторные маркеры: молекулярно–генетические (ДНК/РНК из крови, плазмы, тканей) и иммуногистохимические (ИГХ). Данная ситуация создаёт необходимость в создании и клиническом внедрении инновационных диагностических методов [14].

Современная диагностика меланомы базируется на ряде технологических методов. Диагностический арсенал при меланоме включает как рутинные, так и высокоточные методы. К первым относят дерматоскопию, тест с радиоактивным фосфором, термодифференциальный и гистологический анализы. Ко вторым – иммуногистохимию, FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) и ПЦР [14].

Дерматоскопия – широко применяемый неинвазивный метод диагностики меланомы. Для её проведения используют ручной оптический прибор (дерматоскоп), оснащённый системой, которая подавляет отражённый свет от кожи. Это реализуется посредством иммерсионной жидкости или поляризованного поперечного освещения [15]. Начиная с 1970-х годов, данный подход получил широкое признание в медицинской практике благодаря своей высокой эффективности в дифференциации пигментных новообразований кожных покровов [16]. Принцип метода заключается в анализе характера пигментации и идентификации специфических изменений в меланоцитах, таких как формирование сетей, глобул и точек. Выявление этих паттернов позволяет классифицировать тип поражения в соответствии с установленными диагностическими алгоритмами [18]. В 1987 году в научной литературе был впервые описан алгоритм, целью которого стало различение злокачественных и доброкачественных опухолей кожных покровов [16, 18].

В последние годы метод эволюционировал в сторону цифровизации. Цифровая дерматоскопия с последующим картированием всего тела (total body photography) стала стандартом мониторинга пациентов из групп высокого риска. Наиболее революционным трендом является интеграция систем на основе искусственного интеллекта (ИИ), способных анализировать изображения по алгоритмам, превосходящим по чувствительности и специфичности традиционный визуальный анализ, что открывает путь к созданию масштабируемых решений для ранней диагностики [123].

Дифференциация меланомы от доброкачественных опухолей в клинике сегодня опирается на несколько широко признанных алгоритмов, таких как структурный анализ, правило семи признаков, подход Мензи (11 дерматоскопических признаков), CASH-метод (цвет, архитектура, симметрия, однородность) и ABCD-метод [16, 18]. Наибольшее распространение получил именно ABCD-метод. Его суть заключается в последовательной оценке четырёх критериев: А – асимметрия формы новообразования, В – неровность его границ, С – полихромия (разнообразие цвета) и D – диаметр. После анализа все выявленные изменения суммируются в итоговый балл, который затем сопоставляется с референсными значениями для постановки диагноза [20].

Гистологический анализ опухолевой ткани служит золотым стандартом в диагностике меланомы кожи. Морфологическое исследование меланомы предусматривает детальную оценку множества параметров. К ним относятся характеристики самой опухоли (форма роста, цитологический состав, пигментация, толщина по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление, митотическая активность), а также признаки, отражающие её поведение и взаимодействие с организмом: сосудистая (ангиолимфатическая) инвазия, интенсивность лимфоидной инфильтрации, фокусы спонтанной регрессии. Отдельно анализируются наличие сателлитов или транзитных метастазов, связь с невусом-предшественником и адекватность хирургических краёв резекции [21]. Данная процедура носит комбинированный лечебно–

диагностический характер, поскольку удаление новообразования (методом эксцизионной биопсии) производится в границах неизменённых тканей. Практически стопроцентная точность результатов делает этот метод неотъемлемым и обязательным компонентом клинической практики при верификации меланомы [20,128].

В клинической практике широкое распространение получил метод иммуногистохимии, родоначальником которого считается Альберт Х. Кунс. В 1941 году была разработана базовая техника флуоресцентного мечения антител, которую спустя более трёх десятилетий (в 1974 г.) Taylor успешно модифицировал для проведения иммуногистохимического анализа на парафиновых блоках [23, 24]. Современная диагностика немыслима без ИГХ, выполняющей несколько ключевых функций. Во-первых, это прямое выявление онкобелков, участвующих в процессе канцерогенеза. Во-вторых, метод служит инструментом для открытия и валидации новых белковых маркеров с прогностическим или диагностическим потенциалом [25, 26]. Отдельное клиническое значение приобрело ИГХ-тестирование мутаций в генах *BRAF* и *NRAS*, результаты которого напрямую влияют на выбор тактики таргетного лечения [27, 28]. Таким образом, гистологическое и иммуногистохимическое исследование является не только диагностическим, но и прогностическим и предиктивным инструментом, так как выявление мутаций (например, в *BRAF*) и маркеров (PD-L1) напрямую определяет выбор между таргетной и иммунотерапией.

Возможности лечения метастатической МК были значительно расширены благодаря появлению двух новых классов препаратов. К ним относятся ингибиторы *BRAF* и *MEK*, составляющие основу таргетной терапии, а также моноклональные антитела против CTLA4, PD1 и PDL1, используемые в иммуноонкологии. Применение этих средств позволяет достичь существенного улучшения ключевых прогностических показателей – общей (ОВ) и бессобытийной (ВСБ) выживаемости пациентов [29].

Персонализированный подход к лечению меланомы стал возможен после революционного открытия мутаций гена *BRAF*, лежащих в основе более 45 % случаев болезни [30]. Этот ген кодирует белки сигнального пути, регулирующие деление клеток; его поломка приводит к их бесконтрольной пролиферации [30]. Наиболее распространённой (до 75 %) является мутация *V600E* [31]. Против неё и были направлены первые селективные *BRAF*-ингибиторы – низкомолекулярные соединения, показавшие в начальных клинических исследованиях частоту объективных ответов до 80 %, значительно превосходящую таковую при химиотерапии дакарбазином [199].

Важнейшим направлением в лечении метастатической меланомы стала иммунотерапия, в частности стратегия с использованием моноклональных антител (МКА) считается перспективной в силу возможности получать высокоспецифичные биологические агенты, удобные для стандартизации [33, 35, 36]. Внутри этого класса прорывными стали препараты, блокирующие иммунные контрольные точки, главными мишенями которых являются ингибиторные рецепторы CTLA-4 и PD-1. Их физиологическая роль – негативная регуляция иммунного ответа в разных компартментах и на разных этапах: CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит–ассоциированный белок 4) действует на ранней фазе в лимфоидных органах, а PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели –1) – на поздней фазе в периферических тканях [38, 40]. Подавляя активацию и клональную экспансию лимфоцитов, эти молекулы формируют механизм, позволяющий опухоли избегать распознавания.

Интенсивное изучение пути PD-1 / программируемый лиганд смерти–1 (PD-L1) в последние годы обусловлено его выраженной клинической эффективностью, способностью обеспечивать длительный терапевтический ответ и сравнительно низким профилем токсичности [43]. Целью иммунотерапии рака, которая нацелена на передачу сигналов PD-1 / PD-L1, является нормализация иммунной системы, а не просто усиление функции иммунных клеток в опухоли [38]. PD-L1 (B7-H1, CD274) и его аналог PD-L2

(B7-DC, CD273) относятся к семейству белков B7 и являются основными лигандами рецептора PD-1 [40]. Взаимодействие рецептора PD-1 с его лигандом PD-L1 осуществляется непосредственно в опухолевом микроокружении. Основными носителями высокоуровневой экспрессии рецептора PD-1 являются активированные Т-лимфоциты. Его лиганд, молекула PD-L1, в свою очередь, обнаруживается на плазматической мембране некоторых опухолевых клеток, а также клеток, презентующих антиген (APC) [41].

В норме сигнальный путь PD-1/PD-L1 ответственен за индукцию и поддержание периферической иммунной толерантности, положительно влияя на предотвращение тканевого воспаления и аутоиммунных заболеваний. Иммуносупрессивный эффект оси PD-1/PD-L1 в опухоли проявляется комплексно: он подавляет активацию и вызывает гибель опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (TILs), снижает выработку перфорина и ферментов CTL, смещает цитокиновый баланс (снижая IFN- γ , IL-2, TNF- α и повышая IL-10), останавливает клеточный цикл Т-клеток в G0/G1 и способствует ЕМТ, инфильтрации и метастазированию опухолевых клеток [42].

Первыми ингибиторами PD-1, совершившими прорыв в лечении меланомы, стали ниволумаб и пембролизумаб, одобренные FDA в 2014 году [35, 43, 45, 47]. Ниволумаб представляет собой гуманизированное антитело IgG4, блокирующее взаимодействие PD-1 с PD-L1 [44]. Пембролизумаб, также гуманизированное антитело IgG4, в клинических исследованиях продемонстрировал эффективность и приемлемую безопасность, показав частоту объективного ответа около 33 % у пациентов с прогрессирующей меланомой и превосходство над ипилимумабом [45, 50].

В контексте развития отечественной фармакотерапии значительный интерес представляет российский препарат пролголимаб (ранее BCD-100). По своей структуре это моноклональное антитело класса IgG1, нацеленное на PD-1. Его ключевой конструктивной особенностью является наличие

«молчащей» (LALA) мутации в Fc-фрагменте. Данная модификация препятствует связыванию антитела с Fc-гамма-рецепторами (FcγR) на иммунных клетках, что теоретически сводит к минимуму нежелательные эффекторные функции и может способствовать более избирательному иммуностимулирующему действию [50]. В исследовании I фазы, включавшем пациентов с распространенными солидными опухолями (в том числе меланомой), ранее получавших лечение, пролголимаб подтвердил управляемый профиль безопасности и продемонстрировал признаки противоопухолевой активности [50, 51]. Эффективность препарата при меланоме была детально изучена в первом в мире исследовании II фазы (MIRACULUM), посвященном ингибитору PD-1 класса IgG1 с молчащей Fc-областью. По данным годичного наблюдения, среди 126 пациентов с распространенной меланомой, получавших монотерапию пролголимабом, объективный ответ был достигнут у 42 пациентов, что подтвердило его клиническую значимость и легло в основу регистрации препарата в РФ.

В настоящее время все большее число исследователей понимают, что ответы на лечение антителами к PD-1/PD-L1 зависят от опухолевой микросреды (tumor microenvironment, TME), который можно отличить как иммунологически «горячий» (inflamed) TME или «холодный» (non-inflamed) фенотип опухолевой микросреды [51]. Большое количество TILS и цитокинов и высокая экспрессия PD-L1 встречаются в горячих опухолях, тогда как холодные опухоли почти не показывают экспрессии PD-L1 и инфильтрации Т-клеток [48,51]. В научной литературе выдвинуты гипотезы, объясняющие потенциальное преимущество комбинированной терапии с анти-PD-1/PD-L1 препаратами [51]. Во-первых, такая комбинация может способствовать формированию иммунологически inflamed TME через увеличение экспрессии PD-L1 или инфильтрации TIL, усиливая иммунный ответ. Во-вторых, она может воздействовать на другие супрессорные клетки в TME, такие как миелоидные супрессорные клетки (MDSC), обеспечивая аддитивный эффект. В-третьих, комбинация может позволить снизить дозу

или сроки лечения, минимизируя тем самым побочные эффекты, характерные для монотерапии. В целом, существует множество видов комбинированной терапии, и они имеют синергетические эффекты, которые могут повысить эффективность терапии при меланоме кожи [54].

Первый пациент, использовавший комбинацию иммунных контрольных точек, лечился антителами против PD-1 и CTLA-4 в 2009 году [40, 46]. Согласно данным клинических исследований II и III фаз, комбинация ингибиторов контрольных точек PD-1 и CTLA-4 демонстрирует более высокую эффективность у пациентов с метастатической меланомой по сравнению с монотерапией анти-PD-1 антителами. Частота объективного ответа при комбинированном режиме достигала приблизительно 60 % [55]. Примечательно, что наблюдалась несколько более высокая 3-летняя выживаемость, но также была обнаружена более высокая частота токсичности [41, 42].

Логичным развитием персонализированного подхода стала концепция комбинации таргетной и иммунотерапии для пациентов с *BRAF*-мутантной меланомой. Её основу составляет доказанное влияние ингибирования пути BRAF/MEK на TME. Исследования *in vitro* и на моделях показали, что такое ингибирование увеличивает экспрессию MDA и молекулы PD-L1 на опухолевых клетках, способствует инфильтрации опухоли CD8⁺ Т-лимфоцитами и снижает уровень иммуносупрессивных цитокинов, таких как IL-6 и IL-8 [33, 51]. Эти изменения переводят TME из «холодного» в более иммуногенный, «горячий» фенотип, теоретически повышая её уязвимость для действия ингибиторов иммунных контрольных точек. Пилотные клинические исследования подтвердили реализуемость и эффективность такого подхода. В исследовании KEYNOTE-022 (фазы I/II) изучалась тройная комбинация дабрафениба (ингибитор BRAF), траметиниба (ингибитор MEK) и пембролизумаба (анти-PD-1). На этапе эскалации дозы у 73 % пациентов был зафиксирован объективный ответ, что подтвердило высокую противоопухолевую активность [51]. Рандомизированный этап II фазы

исследования ($n = 120$) показал, что добавление пембролизумаба к дублету таргетных препаратов увеличивало медиану продолжительности ответа (18,7 vs. 12,5 месяцев) и улучшало 2-летнюю беспрогрессивную выживаемость (ВБП) – 41 % против 16 % (HR 0,53) [54]. Приведенные мной в обзоре исследования, доказали принципиальную возможность и преимущество комбинации, несмотря на ожидаемое увеличение частоты токсических явлений. Тройная терапия получила подтверждение в крупном рандомизированном двойном слепом исследовании III фазы IMspire150. В нём сравнивалась эффективность комбинации атезолизумаба (анти-PD-L1) с вемурафенибом и кобиметинибом против плацебо с таргетными препаратами. Была продемонстрировано статистически значимое увеличение ВБП в группе тройной терапии, что стало веским аргументом для включения такого режима в клинические рекомендации [201]. И с момента опубликования данных исследований, комбинированное применение ингибиторов BRAF/MEK и иммунотерапии, представляет собой новый стандарт лечения для лимитированной группы пациентов с метастатической BRAF-мутантной меланомой, позволяя достичь более глубоких и длительных ответов.

Таким образом, современная стратегия борьбы с меланомой кожи представляет собой комплекс, основанный на раннем выявлении с помощью дерматоскопии, обязательной морфологической верификации и персонализированном системном лечении на поздних стадиях. Однако поиск надежных прогностических и предиктивных биомаркеров, позволяющих точно стратифицировать пациентов для комбинированной терапии, а также преодоление резистентности к лечению остаются актуальными задачами современной онкологии.

1.2 Факторы прогноза течения и исхода заболевания

1.2.1 Клинические факторы возникновения и прогноза течения меланомы кожи

В процессе сбора анамнеза при подозрении на меланому необходимо получить от пациента следующую информацию: давность возникновения новообразования, наличие семейной истории кожных опухолей, факты использования солярия или регулярного пребывания под прямыми солнечными лучами, а также эпизоды солнечных ожогов, перенесённых в детском или подростковом возрасте [56, 57]. Визуальный осмотр позволяет выявить фенотипические маркеры повышенного риска развития меланомы. К ним относятся первый или второй фототип кожи, множественные невусы и наличие на кожных покровах атипичных (диспластических) невусов [56, 150].

Ультрафиолетовое (УФ) излучение признано основным этиологическим фактором возникновения меланомы кожи. Наибольшим канцерогенным потенциалом обладает спектр волн длиной от 280 до 315 нм. Согласно общепринятой модели, УФ-воздействие индуцирует характерные для меланомы мутации, например, C→T переходы в генах *BRAF* и *NRAS* (стадия инициации), что впоследствии может приводить к злокачественной трансформации клеток (стадия промоции), также способной запускаться под влиянием ультрафиолета. Согласно оценкам, до 65 % случаев меланомы этиологически связаны с УФ-излучением [58, 67]. Географическая широта и высота над уровнем моря служат косвенными индикаторами интенсивности солнечного излучения, достигающего поверхности Земли. Это подтверждается ростом заболеваемости всеми типами рака кожи по мере приближения к экватору (снижения широты) и увеличения высоты местности [67-70].

Роль гормональных факторов в развитии МК продолжает изучаться. Косвенным свидетельством их возможного влияния может служить более высокая заболеваемость среди женщин [67,71]. По данным литературы беременность оказывает стимулирующее действие на малигнизацию уже присутствующих пигментных невусов [67,136].

Согласно данным исследований, повышенная вероятность развития меланомы связана с эпизодами солнечных ожогов в анамнезе, а также с нерегулярным, но интенсивным воздействием УФ-лучей [67]. При этом частые случаи ожогов (как в детском, так и во взрослом возрасте, после 18 лет) более чем вдвое увеличивают этот риск. Группа лиц, подвергающаяся максимальному прерывистому облучению, демонстрирует на 60 % более высокую вероятность возникновения меланомы по сравнению с теми, кто получает минимальные дозы такого воздействия [69-71]. Использование соляриев признано независимым и мощным фактором риска. Мета-анализ 2014 года подтвердил, что однократный сеанс повышает относительный шанс развития меланомы ($OR = 1,15$; ДИ 1,05-1,28), а начало посещений до 35 лет увеличивает OR до 1,59; ДИ 1,36-1,85 [67, 73]. Как показал систематический обзор, выполненный Wehner M.R. и соавт. ежегодное количество случаев рака кожи, ассоциированного с искусственным ультрафиолетовым излучением в США, Европе и Австралии, достигает 450 тыс., из которых 10 тыс. приходится на меланому [61].

Индивидуальная чувствительность к УФ-излучению определяется фототипом кожи. Наиболее распространённой классификацией является шкала Фитцпатрика (Fitzpatrick) [74], которая выделяет шесть типов:

- Тип I. Обладатели очень светлой (бледной) кожи, голубых или зелёных глаз, часто с веснушками. Кожа склонна к шелушению, практически всегда обгорает и почти не загорает.
- Тип II. Люди со светлой кожей, голубыми или карими глазами, волосами от рыжего до каштанового оттенка. Легко получают солнечные ожоги, возможен слабый загар.

- Тип III. Индивиды со светлой кожей, но тёмными волосами и карими глазами. Обгорание возможно, однако загар формируется хорошо.
- Тип IV. Для этого типа характерна смуглая (оливковая) кожа. Обгорание происходит редко, загар интенсивный и устойчивый.
- Тип V. Кожа коричневого оттенка. Практически отсутствует склонность к обгоранию, загар всегда выражен.
- Тип VI. Кожные покровы тёмно-коричневого или чёрного цвета. Полностью устойчивы к солнечным ожогам, загар выраженный.

Наибольшая предрасположенность к развитию меланомы наблюдается у лиц с первым и вторым фототипами кожи [62, 74, 75]. Согласно исследованиям, относительный риск для данных фототипов (в сравнении с более тёмными) составляет 2,09 (при 95 % доверительном интервале 1,67-2,58) [101].

Генетической основой описанных фенотипических особенностей (I-II фототип, рыжие волосы, веснушки, склонность к солнечным ожогам) являются полиморфные варианты гена меланокортинового рецептора 1 (MC1R). Данный ген и его роль в предрасположенности к меланоме подробно рассмотрены в разделе 1.2.3.

Хотя множественные невусы считаются фактором риска меланомы кожи, большинство злокачественных опухолей формируются на фоне неизменённой кожи (*de novo*). Согласно метаанализу 2017 года, обобщившему данные 38 исследований с участием более 20 тыс. пациентов, лишь 29 % случаев меланомы были связаны с малигнизацией существовавших ранее родинок [70]. Тем не менее, само по себе наличие определённых типов невусов служит важным маркером индивидуального риска. В первую очередь, это касается атипичных (диспластических) невусов, характеризующихся нечёткими границами, возвышением над кожей, крупными размерами или неравномерной окраской; их присутствие повышает вероятность развития меланомы в 4-10 раз [67, 70]. Количественный фактор также играет значимую роль: наличие более 100

родинок увеличивает риск в семь раз по сравнению с наличием 15 и менее невусов. При этом каждая дополнительная родинка статистически повышает вероятность заболевания на 2 % [56, 101].

Отягощённый семейный анамнез по меланоме кожи почти вдвое повышает вероятность её развития у родственников (относительный риск, $OR = 1,74$; 95 % доверительный интервал: 1,41-2,14) [77, 79]. На долю наследственного фактора, по оценкам, приходится около 10 % этиологии этого заболевания [76]. В клинической практике различают спорадическую и наследственную (семейную) формы МК. Спорадическая форма, на которую приходится порядка 90 % всех случаев, диагностируется при отсутствии в семье пациента указаний на данную патологию. Наследственная, или семейная, форма (5-14 % случаев) характеризуется накоплением заболевания в рамках одной семьи и обусловлена герминальными мутациями в генах предрасположенности, которые могут передаваться последующим поколениям в соответствии с менделевским типом наследования [77]. Наличие семейной истории МК достоверно увеличивает риск для здоровых членов семьи. Согласно литературным данным, частота заболевания у близких родственников пациентов колеблется от 8 до 14 % [76, 77]. Географические регионы с высокой заболеваемостью МК также демонстрируют семейное накопление случаев в 5-10 % наблюдений [76].

Для наследственной МК характерна определённая клиническая картина, отличающая её от спорадической формы:

1. Более ранний возраст манифестации. При семейной МК медиана возраста составляет 36 лет у мужчин и 29 лет у женщин. Для спорадической формы эти значения существенно выше – 57 и 59 лет соответственно. Кроме того, ранняя манифестация (до 20 лет) характерна для 10 % случаев семейной МК, тогда как в спорадической группе она встречается лишь в 2 % наблюдений [77].
2. Наличие множественных пигментных невусов (часто атипичного строения).

3. Высокая частота первично–множественных опухолей. При наследственной МК множественные первичные очаги встречаются в 30 % случаев, в сравнении с лишь 4 % при спорадической форме [76, 78].

Помимо основных факторов, повышенный риск ассоциирован с рядом клинических состояний, таких как наличие гигантского врожденного невуса, синдрома диспластических невусов (FAMMM), использование Р-UVA терапии (при лечении псориаза), пигментная ксеродерма в анамнезе [67, 70, 74, 99].

1.2.2 Морфологические факторы прогноза течения заболевания

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предлагает морфологическую классификацию первичной меланомы кожи, выделяя ряд гистологических вариантов этого заболевания [79]. К числу основных типов принадлежат поверхностно-распространяющаяся, узловая и меланома типа злокачественного лентиго. Также различают акрально–лентигинозную, невоидную, детскую, десмопластическую меланому. Отдельно рассматриваются формы, развивающиеся из специфических предшественников: гигантского врождённого невуса и голубого невуса.

До 85 % всех случаев МК представлено двумя гистологическими вариантами: поверхностно распространяющейся и узловой формами. Прогноз при этих формах в первую очередь определяется не типом, а толщиной опухоли по Бреслоу, которая закономерно выше у узловой меланомы, что объясняет её более позднюю диагностику [80, 146]. Прогноз для меланомы типа злокачественного лентиго, при стратификации по толщине, не отличается от прогноза других гистологических типов [81]. Особого внимания, среди других вариантов, заслуживают десмопластическая меланома, характеризующаяся уникальной морфологией, периневральной инвазией и высоким риском локальных рецидивов; акральная меланома (около 3 % случаев), чаще выявляемая у людей с тёмной кожей; её

традиционно худший прогноз связывают с запоздалой диагностикой [82,183]; а также лентиго–меланомы, развивающаяся на хронически облучаемых солнцем участках у пациентов пожилого возраста [80].

В развитии меланомы выделяют две фазы. Радиальная фаза может быть неинвазивной (*in situ*) или с минимальной микроинвазией. Ключевым событием является переход к вертикальной фазе, для которого характерны: инвазия не ниже уровня Кларка III, доминирование дермальных гнёзд над эпидермальными, потеря клеточного «созревания», снижение лимфоцитарной инфильтрации и пигментации, а также усиление атипизма. Именно эта фаза, всегда сопровождающаяся инвазией, несёт в себе высокий риск метастазирования [80, 81, 145].

Толщина опухоли по Бреслоу, предложенная в качестве прогностического критерия Александром Бреслоу в 1970 году, в дальнейшем была многократно подтверждена в различных исследованиях [83]. Рост этого показателя прямо коррелирует с увеличением вероятности метастазирования и снижением общей выживаемости пациентов. Так, с возрастанием толщины опухоли статистически значимо уменьшаются показатели пяти– и десятилетней выживаемости [80, 83]. Гистологическое измерение толщины меланомы по Бреслоу проводят микрометром. Отправной точкой служит либо гранулярный слой эпидермиса, либо дно изъязвления. От неё замеряют расстояние до наиболее глубоко расположенных опухолевых клеток. При этом не учитывают инвазию по кожным придаткам, зоны регрессии и сателлиты [85], что является краеугольным камнем современного стадирования.

Помимо толщины, вторым критическим прогностическим фактором в TNM-классификации является изъязвление, наличие которого переводит опухоль в Т-подкатегорию «б» [81, 96]. С гистологической точки зрения, изъязвление характеризуется полной утратой эпидермиса с реактивным фибрином и воспалением, при условии исключения ятрогенных повреждений [98]. Прогностическая ценность признака возрастает при его количественной

оценке: пятилетняя выживаемость падает с 44 % до 5 % при увеличении диаметра язвы более 6 мм, как показывают работы Valch и коллег [87].

Митотический индекс, отражающий пролиферативную активность опухоли, является независимым фактором неблагоприятного прогноза и включен в 8-е издание классификации TNM. Прогностически значимым порогом считается наличие ≥ 1 митоза на 1 мм². Данные многофакторного анализа более чем 10 тыс. пациентов показывают, что этот параметр по своей значимости уступает только толщине по Бреслоу [81, 87, 145].

Стратификация тонких меланом (T1, ≤ 1.0 мм) требует особого внимания, так как их прогноз варьирует от исключительно благоприятного до относительно высокого риска. Ключевыми факторами, определяющими исход в этой группе, являются толщина, митотический индекс и наличие изъязвления [80, 87]. При отсутствии изъязвления митотический индекс становится решающим критерием для отнесения опухоли к подстадии T1b. Когда оценить митотическую активность невозможно, для установления подстадии T1b используется критерий – инвазия на уровень IV или V по шкале Кларка, которая отражает глубину проникновения опухоли в слои кожи [87].

Важно различать сателлитные и транзитные метастазы для грамотной классификации стадии меланомы. Оба показателя представляют собой микрометастазы в лимфатических сосудах (размером $> 0,05$ мм), отделённые от основного узла слоем здоровой ткани. Разница заключается в локализации от первичной опухоли: если очаг находится в пределах 2 см – это сателлит, если дальше 2 см, но до лимфоузлов – транзитный метастаз. Их обнаружение – независимый фактор худшего прогноза и основание для установления стадии N2c или N3. Все прочие кожные метастазы, не соответствующие данным критериям (например, за пределами зоны регионарного лимфооттока), расцениваются как отдалённые (стадия M1). Согласно рекомендациям AJCC, все перечисленные прогностические параметры

подлежат обязательному отражению в заключении патоморфологического исследования [80, 81, 98].

Наличие лимфоваскулярной инвазии – проникновения клеток меланомы в сосудистые структуры – ассоциировано с неблагоприятными исходами. Многие авторы отмечают её связь с высоким риском развития метастазов в лимфоузлах, а также сателлитных и транзитных метастазов [80, 81]. Это подтверждается, например, исследованием F. Tas и K. Erturk (n = 705), где ЛВИ оказала значимое влияние на показатели выживаемости [81, 89, 185]. Однако данная корреляция признаётся не всеми исследовательскими группами.

Нейротропизм, который морфологически проявляется в виде периневральной (опухолевые клетки вокруг нерва) или интраневральной (внутри нерва) инвазии, является фактором неблагоприятного прогноза. Его наличие, в особенности периневральный компонент, статистически значимо ассоциировано с повышенным риском развития локальных рецидивов заболевания [98].

Особое место среди морфологических прогностических факторов занимает характеристика опухолево–инфильтрирующих лимфоцитов (TILs). Интенсивность лимфоцитарной инфильтрации стромы опухоли признана важным прогностическим и предиктивным фактором. Данные масштабных исследований демонстрируют положительную корреляцию между выраженностью TILs–инфильтрата и улучшением клинических исходов, включая снижение частоты метастазирования в регионарные лимфоузлы и увеличение общей выживаемости [88, 124, 174]. Кроме того, характеристика TILs приобретает ключевое значение в эпоху иммуноонкологии, так как служит предиктором ответа на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек [89].

С морфологической точки зрения иммунный инфильтрат может локализоваться несколькими способами: внутриопухолевым (непосредственно внутри гнёзд опухолевых клеток), стромальным (в

соединительнотканном компоненте опухоли) или перитуморальным (по краю новообразования). Для стандартизированной оценки TILs на рутинных гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (H&E), в клинической практике применяются несколько систем [88].

Для стандартизированной оценки TILs в клинической практике применяются две основные системы. Наиболее распространённой является система, предложенная Кларком и коллегами (1989 г.) [89]. Она подразделяет лимфоцитарную инфильтрацию на три категории:

- brisk – TILs диффузно и равномерно инфильтрируют опухолевую паренхиму, разбивая опухоль на отдельные группы клеток; инфильтрация по всему периферическому краю является непрерывной;
- non-brisk – инфильтрация носит очаговый, прерывистый характер и не распространяется на всю опухоль;
- absent – лимфоциты могут присутствовать в строме, но не проникают непосредственно в опухолевые гнезда [89].

Альтернативный подход – алгоритм иммунного градирования (Immune-grading Algorithm), разработанный Институтом меланомы Австралии (MIA). Он основан на полуколичественной оценке двух параметров: плотности инфильтрата (слабая, умеренная, выраженная) и его распределения в дерме (очаговое, мультифокальное, диффузное). Комбинация этих критериев позволяет присвоить опухоли порядковый балл от 0 (инфильтрат отсутствует) до 3 (умеренный или выраженный диффузный инфильтрат) [89].

Таким образом, несмотря на отсутствие универсального стандарта оценки, анализ TILs остаётся высокоинформативным компонентом патоморфологического исследования меланомы. Простота и прогностическая сила системы Кларка обеспечили ей прочное место в рутинной практике, в то время как более детализированные методы, такие как алгоритм MIA, могут предоставить дополнительную информацию в исследовательском контексте.

1.2.3 Молекулярно-генетические факторы прогноза течения заболевания

Меланома кожи характеризуется значительной биологической неоднородностью, которая формируется в результате молекулярно-генетических изменений в процессе её развития [90]. Эта гетерогенность лежит в основе разнообразия клинического течения и объясняет необходимость персонализированных терапевтических стратегий. Современные методы позволили выявить две основные группы генетических изменений: гены наследственной предрасположенности (такие как *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*) и соматические драйверные мутации, возникающие в опухолевой ткани (например, в *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *KIT*) [64, 83, 90]. В контексте наследственного риска эти гены принято классифицировать по силе эффекта (пенетрантности) на две категории: с высокой и с низкой пенетрантностью.

Ген *CDKN2A*, локализованный на хромосоме 9p21, обладает уникальной особенностью: он кодирует два разных регуляторных белка – p16 и p14ARF, каждый из которых играет важную роль в контроле клеточного цикла [77, 91]. Мутации в этом гене выявляются примерно у 20 % семей с наследственной предрасположенностью к меланоме. Распространённость таких мутаций колеблется от 5 % до 72 % в зависимости от географического региона и строгости клинических критериев отбора семей [79, 93]. Исследование Bishop et al. продемонстрировало, что к 50 годам риск развития меланомы у носителей в Европе составлял 13 %, в США – 50 %, а в Австралии – 32 %. К 80 годам эти показатели возрастали до 58 % в Европе, 76 % в США и 91 % в Австралии соответственно [79, 94].

Ген *CDK4* был идентифицирован как второй ключевой ген, ассоциированный с высоким риском наследственной предрасположенности к меланоме [91, 96]. Он функционирует как онкоген, расположенный на хромосоме 12q14, и кодирует белок, контролирующий прохождение клеткой G1-фазы цикла. Патогенные мутации в *CDK4* редки и описаны лишь в

нескольких десятках семейств. Характерно, что они, как правило, затрагивают конкретный аминокислотный остаток (аргинин-42) в домене связывания белка p16INK4A, что приводит к потере ингибирующего контроля над *CDK4* и неконтролируемому делению клеток [91, 96].

Ген *MC1R* (рецептор меланокортина-1) локализован на хромосоме 16 (локус 16q24.3). Его полиморфные аллели статистически значимо чаще обнаруживаются у пациентов с меланомой, чем в контрольной популяции [91, 97]. Носительство одного вариантного аллеля повышает относительный риск развития меланомы в 2,2-3,9 раза, а двух аллелей – в 4,1-4,8 раза [98]. К распространённым полиморфным вариантам *MC1R*, ассоциированным с повышенным риском развития меланомы, относят *V60L*, *R151C*, *R163Q*, *D84E* и *R160W* [97, 98]. Согласно базе, данных ClinVar, данные варианты классифицируются как доброкачественные (benign), что соответствует их статусу низкопенетрантных факторов предрасположенности, а не высокопенетрантных патогенных мутаций. Помимо перечисленных, в ряде исследований показана прогностическая значимость полиморфизмов *D294H* и *I155T*, ассоциированных с агрессивным течением заболевания. В настоящем исследовании проведён анализ частоты и прогностической роли указанных полиморфизмов у больных меланомой кожи в Красноярском крае. Основное влияние *MC1R* на риск возникновения МК опосредовано его связью с рыжим цветом волос. Так, исследование пациентов в Великобритании и Ирландии выявило, что среди рыжеволосых носителей хотя бы одного вариантного аллеля были 53 %, а двух – 29 %, причём гомозиготность (два аллеля) встречалась исключительно в этой группе. У блондинов, шатенов и брюнетов частота носительства не превышала 33 % [99]. Более того, полиморфные варианты *MC1R* способны модулировать риск, связанный с другими генами, например, повышая пенетрантность мутаций в *CDKN2A* с 50 % до 84 % и снижая средний возраст манифестации меланомы до 20 лет [98].

Помимо генов наследственной предрасположенности, решающую роль в биологии спорадических форм меланомы играют соматические мутации. Наиболее фундаментальная классификация молекулярных подтипов МК была разработана в рамках проекта Cancer Genome Atlas (TCGA) [100, 166]. Комплексный полногеномный анализ, охвативший ДНК, РНК, микроРНК и протеом 333 образцов меланомы от 331 пациента, позволил выделить четыре молекулярных подтипа. Эти подтипы определяются ведущими генетическими изменениями: мутациями в генах *BRAF*, *RAS* и *NF1*, а также тройной негативный вариант (triple–wild–type), где эти специфические мутации отсутствуют [52, 101].

- *BRAF*–мутантный подтип, на долю которого приходится более половины случаев (52 %), характеризуется специфическими точковыми мутациями в гене *BRAF* (*V600E*, *V600K*, *V600R*, *K601*) и ассоциирован с более молодым возрастом пациентов на момент постановки диагноза [53].
- *RAS*–мутантный подтип встречается в 28 % случаев и определяется hotspot–мутациями в генах семейства *RAS* (*Q61*, *G12*, *G13*), а также гиперэкспрессией сигнального пути АКТ3.
- *NF1*–мутантный подтип, составляющий примерно 14 % меланом, характеризуется мутациями в гене *NF1*, часто в сочетании с нетипичными (не–hotspot) мутациями в гене *BRAF*.
- Тройной негативный (triple–wild–type) подтип меланомы встречается реже всего – примерно в 6 % случаев. Его развитие обусловлено мутациями и/или амплификациями ряда генов, включая *KIT*, *PDGFR α* , *VEGFR1*, *GNA11* и *GNAQ*. Отличительными чертами данной формы являются низкий уровень генетических маркеров, указывающих на повреждение ультрафиолетом (30 % против 90 % у других подтипов), а также повышенная частота сложных структурных хромосомных аномалий.

Следует подчеркнуть, что благоприятный прогноз, связанный с выраженным иммунным ответом (гиперэкспрессия иммунных сигнатур,

лимфоидная инфильтрация), наблюдается во всех молекулярных подтипах, что указывает на его независимый характер [102].

В клинической практике центральное значение приобрели случаи меланомы кожи с активирующими мутациями в гене *BRAF*. Это наиболее частый тип драйверных мутаций при МК (> 50 %), обнаруживаемый как в первичных опухолях, так и в метастазах [106]. Ген *BRAF* (локус 7q34) кодирует серин–треониновую киназу — критический компонент сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK), регулирующего рост клеток. Мутация приводит к его конститутивной активации, стимулируя опухолевую прогрессию и делая *BRAF* ключевой мишенью для таргетной терапии [104]. Частота выявления мутаций *BRAF* зависит от локализации опухоли и характера УФ-облучения [88, 122]. По данным Российской скрининговой программы, мутации *BRAF* выявлены в 60,6 % случаев (627/1035), причём значимо чаще у пациентов моложе 50 лет (72,9 % vs 57,1 %, $p = 0,00003$) [107], достигая пика в 81 % в возрастной группе 30-39 лет [106, 108].

В абсолютном большинстве случаев (около 80-90 %) выявляется мутация *V600E*, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту [102, 108]. С частотой до 20 % встречается мутация *V600K* [101, 131]. Поскольку мутации *V600E* и *V600K* вызывают аналогичные структурные изменения в белке *BRAF* и активируют идентичный сигнальный каскад, диагностика и терапевтическая стратегия для них унифицированы. Сопоставимая клиническая эффективность таргетных ингибиторов *BRAF* при обеих мутациях была подтверждена данными исследования BRIM3 [28, 29, 123].

Таким образом, молекулярно-генетическое профилирование меланомы кожи перестало быть сугубо исследовательским инструментом и прочно вошло в рутинную клиническую практику. Выявление ключевых драйверных мутаций (в первую очередь, в гене *BRAF*) является обязательным этапом, определяющим выбор между иммунотерапией и таргетным лечением, а также позволяющим прогнозировать ответ на терапию [93]. Дальнейшая стратификация на подтипы в соответствии с классификацией TCGA

открывает перспективы для разработки новых прецизионных терапевтических подходов.

1.2.4 Интегративные факторы и системы прогноза

Точная оценка индивидуального прогноза при МК является основой для стратификации онкологических пациентов по группам риска, планирования лечебной тактики и последующего наблюдения. В настоящее время разработано множество прогностических инструментов, среди которых особое место занимают интегративные математические модели (нормограммы), учитывающие комплекс клинических и морфологических параметров [70, 140]. Масштаб разработки таких инструментов иллюстрирует исследование Rabin В. А. и соавт. согласно которому существует 107 интерактивных онлайн-моделей для оценки прогноза при 89 типах рака, включая меланому кожи ($n = 17$) [70, 111, 112, 118]. В первую очередь они ориентированы на рак предстательной железы ($n = 39$), колоректальный рак ($n = 30$), рак молочной железы ($n = 21$) и меланому кожи ($n = 17$) [112, 119, 127]. Входные переменные, включенные в систему, учитывали характеристики опухоли ($n = 52$), характеристики пациентов ($n = 41$) и сопутствующие заболевания ($n = 9$). Влияние терапии на прогноз было включено в 15 сервисов. Наиболее частым прогнозируемым результатом был риск смерти ($n = 27$), за которым следовали общая выживаемость (OS) / выживаемость без прогрессирования (PFS) ($n = 16$) [100, 113].

Исторически прогноз при МК определялся преимущественно анатомической стадией по системе TNM/AJCC. Однако для прогнозирования исхода у конкретного пациента анатомической стадии оказалось недостаточно. Это привело к включению в последние редакции классификации AJCC дополнительных независимых прогностических факторов, таких как толщина опухоли по Бреслоу, наличие изъязвления и

митотический индекс [96, 116, 117, 141]. Этот шаг ознаменовал переход от чисто анатомического к клинико-патологическому прогнозированию. Логическим продолжением этой тенденции стало создание мультифакторных прогностических моделей (номограмм), которые не просто категоризируют пациентов, а рассчитывают индивидуальную вероятность того или иного исхода на основе заданного набора переменных.

Систематические обзоры подтверждают существование десятков таких моделей, часть из которых благодаря своей валидности и удобству переведена в формат общедоступных онлайн-калькуляторов [118, 119]. Наиболее значимые из них существенно различаются по методологии, целевой популяции и прогнозируемым исходам, что определяет сферу их применения:

- Модель AJCC (melanomaprognosis.net): Основана на данных реестра AJCC, что обеспечивает широкую репрезентативность. Использует регрессию Кокса, стратифицированную по толщине опухоли, для прогнозирования 5- и 10-летней смертности (с-индекс 0,90-0,93) [120].
- Модель Sunbelt (MelanomaCalculator.com): Применима к пациентам 18-70 лет с толщиной опухоли ≥ 1 мм, которым выполнена биопсия сторожевого лимфоузла (БСЛУ). Прогнозирует общую (ОВ), безрецидивную (БРВ) выживаемость и выживаемость до местного рецидива с высокой точностью (с-индекс для 5-летней ОВ = 0,98) [103].
- Модель MGH (lifemath.net): Использует «двоично-биологическую модель метастазирования», постулирующая кумулятивное увеличение риска смерти с каждой опухолевой клеткой. Генерирует прогнозы 15-летней смертности (с-индекс 0,96) и ожидаемой продолжительности жизни [118].
- Модель MSI (Peter D. Baade et al.): Разработана на популяционных данных Квинслендского онкологического регистра (Австралия) за 1995-2008 гг., включавшие всех пациентов с инвазивной МК. Переменные: толщина по Бреслоу, анатомическая локализация, наличие метастазов, результат БСЛУ,

изъявление, возраст. Показала хорошую дискриминационную способность ($RD^2 = 0,47$) [124, 125].

Несмотря на прогресс, ключевым недостатком большинства представленных моделей является их ограниченная обобщаемость (external validity). Они созданы и валидированы на специфических когортах: пациенты крупных исследовательских центров (Sunbelt, MGH) или с определёнными стадиями заболевания (Sunbelt) [121-123]. Даже популяционная модель MSI, обладая широтой охвата, не включает современные молекулярно-генетические маркеры, играющие решающую роль в выборе терапии.

Современный этап прогнозирования при меланоме кожи характеризуется сосуществованием устоявшейся, но недостаточно индивидуализированной системы AJCC и ряда высокоточных, но узкоспециализированных математических моделей. Их анализ выявляет настоятельную необходимость разработки интегративных прогностических платформ нового поколения. Идеальная модель должна сочетать силу популяционных данных (как у MSI), клинико-патологическую детализацию (как у AJCC и Sunbelt) и, что наиболее важно, включать молекулярно-генетические факторы. Разработка и валидация таких моделей на репрезентативных популяционных данных остаются актуальной задачей, решение которой позволит существенно улучшить персонализацию лечения и наблюдения пациентов с меланомой кожи. Таким образом, поиск новых предикторов и их интеграция в усовершенствованные прогностические алгоритмы, сочетающие клинико-морфологические и молекулярно-генетические данные, определяют актуальное направление исследований. Решение этой задачи позволит перейти от рискадаптированного к истинно персонализированному прогнозу при меланоме кожи.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика объекта исследования

Место, время и дизайн исследования. Исследование было выполнено на базе кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно–Ясенецкого (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор Р. А. Зуков; ректор – д.м.н., профессор Д. В. Черданцев). Сбор клинического материала осуществлялся в период с 2017 по 2024 год на клинической базе Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А. И. Крыжановского (КГБУЗ КККОД).

Критерии формирования когорты. Объектом настоящего исследования выступила ретроспективная когорта из 213 пациентов с морфологически верифицированной пигментной меланомой кожи, получивших комбинированное лечение. Все 213 пациентов были оперированы на первом этапе лечения, 191 пациент (89,67 %) прооперирован в радикальном объеме: расширенное иссечение новообразования с необходимым отступом от края опухоли; 22 пациента изначально были оперированы не радикально, что составило 10,33 %. Адьювантная терапия проводилась всем пациентам с высоким риском рецидива в соответствии с клиническими рекомендациями, действовавшими на момент лечения, и включала таргетную (ингибиторы BRAF/MEK при наличии мутации *BRAF V600E*) и/или иммунотерапию (ингибиторы PD-1/CTLA-4).

Критерии включения:

1. Возраст 18-85 лет;
2. Верифицированная пигментная меланома кожи;
3. Наличие доступного морфологического материала (парафинового блока);
4. Подписанное информированное согласие.

Критерии исключения:

1. Особые гистологические типы (меланома слизистых, увеальная, беспигментная);
2. Метастазы меланомы без первично выявленного очага;
3. Отказ пациента от участия.

Схематичное изображение дизайна исследования представлено на рисунке 1.

Методы сбора данных. Анализ проводился на основе данных стационарных и амбулаторных карт пациентов, протоколов патогистологического и иммуногистохимического исследований операционного материала, а также стандартизированного анкетирования.

Характеристика пациентов. В исследуемой выборке медиана возраста больных была равна 56,38 (Q1-Q3: 45,0-67,0) лет. Отмечалось преобладание пациентов женского пола (132 человека; 61,97 %) над мужским (81 случай; 38,03 %). Большинство пациентов (158 человек, 74,2 %) являлись жителями города.

Детальный половозрастной состав когорты представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Половозрастной состав наблюдаемых больных меланомой кожи

Возрастной промежуток	Мужчины		Женщины	
	п	%	п	%
18-29	3	3,72	5	3,79
30-39	9	11,14	15	11,36
40-49	7	8,64	16	12,13
50-59	27	33,32	34	25,75
60-69	24	29,63	36	27,28
Старше 70	11	13,55	26	19,69
Всего	81	100,00	132	100,00



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Клинико-анамнестические данные. Из сопутствующей дерматологической патологии наиболее часто встречались атипичные невусы (33; 15,49 %) и атипичный дерматит/себорейный кератоз (24; 11,26 %); базальноклеточный рак кожи (13; 6,10 %); псориаз (3; 1,41 %); пигментная ксеродерма (5; 2,34 %).

Отягощенный онкологический анамнез выявлен у 26 пациентов (12,20 %): меланома кожи – 7 случаев (3,28 %); рак поджелудочной железы – 4 (1,87 %); глиобластома головного мозга – 1 случай (0,46 %); другие виды ЗНО обнаружены в 14 случаях (6,57 %). Первично–множественные опухоли кожи: наблюдались у 8 (3,75 %) пациентов – 7 мужчин (3,28 %) и 1 женщина (0,47 %).

По восприимчивости к воздействию ультрафиолетового (УФ) излучения (фототипы кожи по Fitzpatrick) среди респондентов имелись: I тип – 21 (9,86 %); II тип – 80 (37,55 %); III тип – 95 (44,60 %); IV тип – 17 (8,00 %) соответственно. Рыжие волосы наблюдались у 22 обследуемых (10,33 %); веснушки у 94 (44,13 %).

При оценке состояния кожных покровов у 81 пациента (38,03 %) наблюдались врожденные пигментные невусы: до пяти штук у 66 больных (30,99 %); более пяти – у 15 пациентов (7,04 %).

Атипичные невусы: до пяти штук у 27 больных (12,7 %); более пяти – у 4 пациентов (1,88 %). Пограничные невусы встречались у 152 человек (71,36 %): в количестве до 50 штук – 99 (46,48 %); до 100 штук – 51 (23,94 %); более 100 – 2 (0,94 %). Диаметр этих пограничных невусов: до 5 мм в диаметре – 78 (36,6 %); более 5 мм в диаметре – 33 (15,5 %).

При анализе воздействия средовых факторов жизни повышенный уровень инсоляции отмечали 140 пациентов (65,73 %), из них пользование источниками искусственного УФ – излучения (соляриями) отметили 32 (15,02 %) пациента. В анамнезе наличие солнечных ожогов отметило 122 больных (57,27 %). Из них в детском возрасте эпизоды солнечных ожогов отмечали 119 человек (55,86 %): до 3-х эпизодов у 65 (30,51 %); более 3-х

случаев у 54 (25,35 %). Во взрослом возрасте эпизоды солнечных ожогов отмечали 122 больных, что составило 57,27 %: до 3-х эпизодов у 66 (30,98 %); более 3-х случаев у 56 (26,29 %). При этом использование солнцезащитных SPF-средств отметил только 51 пациент (23,94 %).

Характеристика первичной опухоли. Бессимптомное течение заболевания на момент диагностики отмечено у 125 (58,68 %) пациентов и только у 88 пациентов (41,32 %) процесс протекал с наличием клинической симптоматикой (зуд, кровотечение из новообразования). У 12 больных (5,63 %) длительность течения заболевания до момента обращения за медицинской помощью составила менее 3 месяцев, у 59 (27,7 %) человек – менее 1 года, а у 103 (48,3 %) человек – более 1 года. В 25 случаях (11,73 %) начало развития заболевания у пациентов ассоциировалось с травмированным невусом.

Наиболее частым клиническим признаком меланомы было изменение диаметра (критерий «D» по системе ABCD), отмеченное у 81,2 % больных (таблица 2). Средний диаметр удаленного образования составил 14,75 мм (Q1-Q3: 8,0-18,0).

Таблица 2 – Частота клинических признаков меланомы по системе ABCD

Критерий	Общее количество		Мужчины		Женщины	
	п	%	п	%	п	%
Асимметрия	131	61,5	48	22,54	83	38,97
Неровность	130	61,03	51	23,94	79	37,08
Цвет	132	61,97	50	23,47	82	38,49
Диаметр	173	81,22	68	31,92	105	49,29

По локализации опухоли в основном располагались на коже туловища, в меньшем количестве – в области конечностей; в остальных случаях определялся акральный рост опухоли – у 8 (3,75 %) мужчин и у 3 (1,40 %) женщин (таблица 3).

Морфологические характеристики и стадирование. Распределение гистологических вариантов меланомы было следующим: поверхностно–распространяющаяся (76 случаев, 35,68 %), узловая (92 случая, 43,19 %), лентиго–меланома (33 случая, 15,49 %), лентигинозная (9 случаев, 4,22 %), десмопластическая (1 случай, 0,46 %) и невоидная (2 случая, 0,93 %).

Таблица 3 – Локализация первичной опухоли

Возрастной промежуток	Мужчины		Женщины	
	п	%	п	%
Туловище	43	20,18	51	23,94
Область ОГШ	13	6,10	21	9,85
Верхняя конечность	11	5,16	31	14,55
Нижняя конечность	6	2,81	26	12,20

При стадировании по системе AJCC 8-го издания более половины пациентов (54,9 %) были отнесены к группе низкого риска (стадии I–IIA). Распределение по стадиям представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Распределение пациентов по стадиям заболевания (AJCC, 8-е издание)

Группа риска	Стадия	п	%
Низкий риск (n = 117; 54,9 %)	I A	50	23,5
	I B	28	13,1
Промежуточный (n = 62; 29,1 %)	II A	38	17,8
	II B	27	12,7
	II C	33	15,5
Высокий (n = 33; 15,5 %)	III A	6	2,8
	III B	10	4,7
	III C	10	4,7
	III D	3	1,4
	IV	8	3,8

Глубина инвазии по Бреслоу и уровни инвазии по Кларку детализированы в таблице 5.

Таблица 5 – Уровень инвазии опухоли

Критерии	Уровень	n	%
Breslow	I	37	17,37
	II	38	17,84
	III	32	15,02
	IV	30	14,08
	V	76	35,68
Clark	1	30	14,08
	2	57	26,76
	3	69	32,39
	4	31	14,55
	5	28	13,14

При оценке морфологических показателей меланомы кожи: наличие изъязвления выявлено в 92 случаях (43,2 %); радиальная фаза роста отмечалась в 76 случаях (35,7 %), а вертикальная фаза роста в 137 (64,3 %). Сосудистая инвазия обнаружена в 33 (15,5 %), при этом нейротропизм всего лишь в 7 случаях (3,3 %). Очаги отсева опухоли (микросателлиты) выявлены в 19 (8,9 %). Связь меланомы с предшествующим пигментным невусом наблюдалась в 55 случаях (25,8 %). Митотический индекс (Mi), в соответствии с клиническими рекомендациями NCCN 2021 года [126], определялся для разграничения IA и IB стадии, у 78 пациентов (36,61 %); при этом высокий показатель наблюдался в 24 случаях (11,3 %).

Исходы и формирование групп для сравнительного анализа. После окончания курса комбинированного лечения за всеми больными осуществлялось динамическое наблюдение в течение пяти лет. Для контроля использовались стандартные диагностические методики. На момент

подведения итогов исследования у 98 пациентов (46,0 %), 65 из которых (30,5 % от всей когорты) скончались от прогрессирования меланомы.

Для целей настоящего анализа все пациенты были разделены на две группы в зависимости от характера течения заболевания:

1. Группа 1 (благоприятное течение): 119 пациентов (55,9 %) без признаков прогрессирования в течение периода наблюдения.
2. Группа 2 (прогрессирующее течение): 94 пациентов (44,1 %) с зарегистрированным прогрессированием.

В группе прогрессирования – у 27 (12,7 %) пациентов наблюдались отдаленные метастазы в паренхиматозные органы; рецидив меланомы кожи в области послеоперационного рубца и мягких тканей был у 38 больных (17,8 %), из них в кожу и мягкие ткани – у 21 (9,9 %); смешанный вариант метастатического поражения диагностирован у 33 пациентов (15,5 %). Метастатическое поражение паренхимы легких наблюдалось в 18 случаях (8,5 %); печени – в 19 случаях (8,9 %); головного мозга – в 17 (8,0 %); костей скелета – в 4 (1,9 %); смешанное поражение выявлено в 9 случаях (4,2 %). При этом олигометастатическое поражение наблюдалось в 22 случаях (10,3 %), множественное поражение – в 75 случаях (35,2 %).

У всех пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания выполнено исследование мутации *BRAFV600E* – в 94 случаях, с положительным результатом в 34 случаях (36,2 % от протестированных). Не все пациенты с мутацией *BRAF* получали адъювантную таргетную терапию. Выбор между таргетной и иммунотерапией определялся годом лечения (актуальность рекомендаций), наличием противопоказаний, решением врачебной комиссии и, в ряде случаев, предпочтением пациента. Однако в нашей когорте все *BRAF*-положительные пациенты с высоким риском рецидива (стадия IIС-III) получили адъювантную терапию – либо таргетную, либо иммунотерапию, в соответствии со стандартами на момент лечения.

2.2 Клинические, анамнестические и морфологические методы обследования

2.2.1 Анкетирование

Для сбора стандартизированных данных о демографических характеристиках, фенотипических признаках, анамнезе и клинической картине заболевания было проведено анкетирование пациентов. Использовалась специально разработанная анкета, включавшая следующие блоки вопросов:

1. Демографические данные: пол, возраст на момент постановки диагноза, место жительства (город/село).
2. Фенотипические признаки:
 - Фототип кожи по классификации Фитцпатрика на основании субъективного описания склонности к ожогам или загару. Тип кожи измерялся по шестибалльной категориальной шкале в соответствии с ответом пациента на вопрос: «Как кожа реагирует, если Вы выходите на улицу без солнцезащитного крема?». Варианты ответа: 1 – неизменно быстрое обгорание без последующего загара, 2 – постоянное лёгкое обгорание со слабым загаром, 3 – умеренное обгорание и постепенное загорание, 4 – минимальное обгорание и стабильно хороший загар, 5 – редкие случаи обгорания и интенсивный загар, 6 – никогда не обгорает.
 - Цвет волос (черный, каштановый, русый/светлый, рыжий).
 - Цвет глаз (карий, ореховый, голубой/серый, зеленый).
 - Наличие веснушек (да/нет).
3. Анамнестические данные:
 - Наличие и количество различных типов невусов (врожденные, атипические, пограничные).
 - Семейный онкологический анамнез, в частности случаи меланомы и других злокачественных новообразований кожи у родственников.

- Сопутствующие дерматологические заболевания.
- Данные о привычной инсоляции: проживание/работа в условиях повышенной инсоляции, использование соляриев, частота солнечных ожогов в детском и взрослом возрасте, применение солнцезащитных средств.

Анкетирование проводилось в ходе очной беседы с пациентом исследователем, что позволяло уточнять вопросы и минимизировать количество пропущенных ответов.

2.2.2 Подготовка гистологических препаратов

Материалом для гистологического исследования служили образцы первичной опухоли меланомы объёмом до 1 см³, отобранные из операционного материала, полученного в ходе хирургического лечения пациентов. Образцы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в соотношении 1:10 (объём ткани / объём фиксатора) в течение 18-24 часов для обеспечения адекватной сохранности антигенной структуры, необходимой для последующего анализа.

После фиксации проводилась стандартная проводка тканей с обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации, очисткой в ксилоле и пропитыванием в гистологическом парафине при температуре 56-58°C, используя стандартный гистологический процессор.

Парафиновые блоки формировали с обязательной правильной пространственной ориентацией образца, позволяющей в дальнейшем оценить всю глубину инвазии опухоли и состояние краёв резекции. С блоков на ротационном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 3-4 мкм, которые размещали на предметных стеклах, адгезированных поли-L-лизином или APES (3-аминопропилтриэтоксисиланом) для предотвращения отслоения срезов в ходе окрашивания.

Полученные срезы депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) по стандартной методике для проведения первичного морфологического анализа.

Оценку окрашенных гематоксилином и эозином препаратов проводили светооптически с использованием микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия) при увеличениях $\times 200$, $\times 400$. Анализ выполнялся независимо двумя специалистами–патологоанатомами, при расхождении в оценке проводили совместный пересмотр с привлечением третьего эксперта.

Оценивали следующие ключевые морфологические прогностические параметры меланомы: гистологический тип опухоли в соответствии с классификацией ВОЗ (2020); толщина опухоли по Breslow (в миллиметрах); уровень инвазии по Clark; митотический индекс – количество митозов на 1 мм² в области наибольшей митотической активности, определяемый в соответствии с рекомендациями AJCC (8-е издание); наличие/отсутствие изъязвления; инфильтрация опухоли лимфоцитами и наличие регрессии; радиальная/вертикальная фазы роста; наличие сосудистой инвазии, нейротропизма, микроскопических сателлитов; связь с предшествующим меланоцитарным невусом; оценка края резекции (свободные/инфильтрированные).

2.2.3 Оценка лимфоидной инфильтрации опухоли

Для оценки иммунного микроокружения опухоли проводили анализ лимфоидной инфильтрации в первичной меланоме. Оценку опухоли–инфильтрирующих лимфоцитов (Tumor–Infiltrating Lymphocytes, TILs) выполняли на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, в соответствии с адаптированными для меланомы критериями, основанными на принципах, предложенных Международной рабочей группой по иммуно–онкологическим биомаркерам (International Immuno–Oncology Biomarker Working Group) [127].

Стромальные опухоле–инфильтрирующие лимфоциты (sTILs): определялись как моноклеарные иммунные клетки (лимфоциты и плазмоциты), расположенные в интратуморальной строме, то есть внутри границ инвазивного компонента опухоли, но не находящиеся в непосредственном контакте с опухолевыми клетками.

Интратуморальные лимфоциты (iTILs): определялись как лимфоциты, непосредственно контактирующие с опухолевыми клетками или расположенные внутри их гнезд (по определению W.H. Clark).

Анализ выполняли светооптически при увеличениях *40-*400. Для каждого случая выбирали наиболее репрезентативный срез опухоли, демонстрирующий инвазивный компонент. Оценку проводили по всей площади внутриопухолевой стромы, избегая целенаправленного поиска «горячих точек» (областей с максимальной инфильтрацией). Оценку не проводили в зонах некроза, на краях срезов, в областях с артефактами сдавления, а также в перитуморальных лимфоидных скоплениях за пределами инвазивного фронта опухоли.

Количественную оценку процентного содержания sTILs проводили визуально как долю площади стромы, занимаемую лимфоидными клетками, от общей площади внутриопухолевой стромы в поле зрения. Подсчет вели не менее чем в 10 полях зрения при увеличении $\times 200$, после чего выводили среднее значение. На основании полученных данных пациенты были разделены на две группы: с низким уровнем sTILs ($\leq 10\%$) и с высоким уровнем sTILs ($> 10\%$).

Дополнительно характер инфильтрации оценивали по адаптированной системе, предложенной Австралийским институтом меланомы (Melanoma Institute Australia, MIA), которая учитывает два параметра: плотности опухолевой инфильтрации (отсутствует – 0, слабая – 1, умеренная – 2, выраженная – 3) и ее распространенности (отсутствует – 0, очаговая – 1 ($< 25\%$ площади опухоли), мультифокальная – 2 (25-75 %), диффузная – 3 ($> 75\%$)). На основе комбинации этих параметров выводили итоговую

градацию: G0 (отсутствует), G1 (слабая/умеренная очаговая или слабо–мультифокальная инфильтрация), G2 (выраженная очаговая или умеренно выраженная мультифокальная, или слабая диффузная), G3 (умеренно выраженная диффузная).

Все препараты оценивались независимо двумя исследователями, знакомыми с методикой. В случае расхождения в оценке более чем на 10 % (для процентного содержания sTILs) или на одну градацию (для TILs по MIA) проводился совместный пересмотр препарата с привлечением третьего эксперта (старшего патологоанатома) для выработки итогового заключения.

Для последующего статистического анализа и построения прогностических моделей использовалась градационная шкала MIA (G0-G3), как более детализированная. Бинарная шкала sTILs ($\leq 10\%$ / $> 10\%$) применялась для описательных целей и проверки чувствительности результатов.

2.2.4 Подготовка ИГХ препаратов

Для иммунофенотипической характеристики лимфоидного инфильтрата и оценки экспрессии дифференцировочных антигенов в ткани первичной меланомы кожи проведено иммуногистохимическое исследование серийных парафиновых срезов толщиной 3-4 мкм, изготовленных из операционного материала. Окрашивание выполняли на полностью автоматизированном иммуностейнере BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc., США) с использованием стандартных протоколов производителя, включающих автоматическую депарафинизацию и регидратацию срезов, термическую демаскировку антигенов в цитратном буфере CC1 (Ventana) при 95-100°C в течение 36-64 минут в зависимости от исследуемого маркера, блокирование эндогенной пероксидазы 3 % раствором H₂O₂ и инкубацию с первичными антителами.

В работе использованы следующие моноклональные антитела: к CD3 (клон 2GV6, CONFIRM, Ventana Medical Systems, США, готовое к употреблению RTU), к CD4 (клон SP35, CONFIRM, Ventana Medical Systems, США, RTU), к CD8 (клон SP57, CONFIRM, Ventana Medical Systems, США, RTU), к CD20 (клон L26, CONFIRM, Ventana Medical Systems, США, RTU), а также к CD56 (клон MRQ-42, Cell Marque, Sigma–Aldrich/Merck, США, концентрат, разведение 1:50). Все антитела CONFIRM применялись без дополнительного разведения в строгом соответствии с инструкциями производителя, инкубация проводилась в течение 28-32 минут при 37°C. Антитела к CD56 использовали в рекомендованном производителем разведении 1:50 с аналогичными условиями инкубации.

Для визуализации реакции применяли полимерную систему детекции UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, США), содержащую вторичные антитела, конъюгированные с полимерным комплексом, нагруженным молекулами пероксидазы хрена. В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин, формирующий нерастворимый коричневый преципитат в месте связывания антител. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера (Ventana). В каждом цикле окрашивания использовали внутренний положительный контроль – лимфоидную ткань (неизмененные лимфатические узлы или миндалина), присутствующую в том же срезе либо включенную в качестве отдельного блока-свидетеля, а также отрицательный контроль – замену первичного антитела на изотипический контрольный иммуноглобулин (Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, Ventana) или буферный раствор.

Оценку иммуногистохимического окрашивания проводили методом световой микроскопии (микроскоп Nikon Eclipse Ci, Япония) при увеличениях $\times 100$ - $\times 400$. Для каждого маркера оценивали наличие и распределение позитивно окрашенных клеток (диффузное, очаговое, мультифокальное), плотность инфильтрации определяли полуколичественно по 4-балльной шкале: 0 – отсутствие, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 –

выраженная инфильтрация; для части образцов проводили количественный подсчет клеток на 1 мм² стромы с использованием окулярной сетки. Локализацию клеток оценивали, как интратуморальная строма, непосредственный контакт с опухолевыми клетками или перитуморальная зона. Для маркеров CD3, CD4, CD8, CD20 и CD56 дополнительно оценивали процент позитивных клеток относительно общего числа лимфоидных клеток в строме для дифференциальной характеристики субпопуляционного состава инфильтрата. Все препараты оценивали независимо два исследователя – врача-патологоанатома, прошедшие предварительное согласование по критериям оценки. В случае расхождения результатов более чем на 10 % при количественной оценке или на одну градацию при полуколичественной оценке проводили совместный пересмотр препарата с участием третьего эксперта – старшего патологоанатома – до достижения консенсуса.

2.2.5 Генетические исследования мутации *V600E* гена *BRAF*

Для выявления мутации *V600E* в экзоне 15 гена *BRAF* использовали срезы парафиновых блоков (FFPE) толщиной 3 мкм с долей опухолевых клеток не менее 20 %, что обусловлено ограниченной чувствительностью метода секвенирования по Сэнгеру (порог детекции 15-20 % мутантных аллелей). Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) согласно протоколу производителя: образцы депарафинизировали в ксилоле, подвергали лизису в 2 % SDS-буфере с протеиназой К, после чего очищали на колонках. Концентрацию и чистоту ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, США) и флуориметре Qubit (Invitrogen, США); приемлемыми считали показатели A260/A280 в диапазоне 1,8-2,0. Конечную концентрацию ДНК доводили до 2 нг/мкл.

Полимеразную цепную реакцию для экзона 15 гена *BRAF* проводили с использованием праймеров: прямой – 5'-tca taa tgc ttg ctc tga tag ga-3',

обратный – 5'-ggc caa aaa ttt aat cag tgg a-3'. Амплификацию выполняли на термоциклере Maxy Gene Gradient (Ахуген, США) по следующей программе: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 40 циклов: 95°C – 15 с, 56°C – 15 с, 72°C – 20 с; финальная элонгация при 72°C – 7 мин.

Секвенирование продуктов ПЦР проводили с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на том же термоциклере по протоколу: 96°C – 1 мин; 30 циклов: 96°C – 10 с, 50°C – 5 с, 60°C – 4 мин. Очистку продуктов секвенирующей реакции осуществляли методом этанолового преципитирования. Электрофоретическое разделение и детекцию выполняли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500 (Life Technologies, США). Анализ хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems, США). Мутацию V600E (с.1799T > A) идентифицировали по наличию двойного пика в позиции 1799. В каждой серии экспериментов использовали положительный контроль (образец ДНК с верифицированной мутацией *BRAF* V600E) и отрицательный контроль (образец без ДНК). Все образцы анализировали независимо два исследователя; при расхождении заключений проводили повторное секвенирование.

2.2.6 Генетические исследования мутации гена *MC1R*

Для анализа частоты аллельных вариантов гена *MC1R* проведено генотипирование образцов ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови всех 213 пациентов, включённых в исследование.

Выделение ДНК. Лейкоцитарную фракцию выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина. ДНК экстрагировали с использованием набора «Ампли-Прайм ДНК-сорб-В» («Некст-Био», Россия) согласно протоколу производителя.

Амплификация фрагмента гена MC1R. ПЦР-амплификацию фрагмента гена *MC1R* (референс NCBI: NG_012026.1, длина 954 п.н.) проводили с использованием геномной ДНК в качестве матрицы. Реакционная смесь объёмом 50 мкл содержала: 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, по 0,2 мкМ праймеров MC1RUp и MC1RDn (синтез – «Биосан», РФ), 15-50 нг геномной ДНК и 2,5 ед. ДНК-полимеразы Hot Start Taq («Евроген», РФ). Последовательности праймеров:

- прямой праймер (MC1RUp): 5'-TGGACC*TCGAGATGGCTGTGCAGGGATCCCA-3' (содержит сайт рестрикции XhoI);
- обратный праймер (MC1RDn): 5'-TCGTGGC*GGCCGCTCACCAGGAGCATGTCAG-3' (содержит сайт рестрикции NotI).

Термоциклирование проводили по следующей программе: 95°C – 5 мин; 30 циклов: 95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 40 с; финальная элонгация – 72°C в течение 10 мин.

Секвенирование. Генотипирование полиморфных вариантов *R151C*, *R160W*, *D294H*, *R163Q*, *I155T* проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Очистку продуктов ПЦР осуществляли с использованием экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (Thermo Scientific, США). Секвенирующую реакцию выполняли с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на термоциклере. Электрофоретическое разделение и детекцию проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500 (Life Technologies, США) в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия). Анализ хроматограмм выполняли с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems, США).

Контрольные образцы. В каждой серии экспериментов использовали отрицательный контроль (образец без ДНК). Все образцы анализировали

независимо два исследователя; при расхождении заключений проводили повторное секвенирование.

2.3 Методы статистической обработки

Статистический анализ данных выполнен с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics (версия 22.0). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Описательная статистика. Для количественных переменных с нормальным распределением (проверка по критерию Шапиро-Уилка) рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ); при распределении, отличном от нормального, – медиану (Me) и межквартильный размах ($Q_1; Q_3$). Качественные признаки описывали абсолютными и относительными частотами (%).

Сравнение групп. Межгрупповые различия для количественных переменных оценивали с помощью t -критерия Стьюдента (при нормальном распределении) или U -критерия Манна-Уитни (при отсутствии нормальности). Для анализа таблиц сопряжённости использовали критерий χ^2 Пирсона (при ожидаемых частотах ≥ 5) или точный критерий Фишера (для таблиц 2×2 с частотами < 5). Силу связи между категориальными переменными определяли с помощью коэффициента V Крамера.

Корреляционный анализ. Взаимосвязь между признаками оценивали с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Контроль множественных сравнений. Для коррекции уровня значимости при множественном тестировании гипотез применяли поправку Бенджамини – Хохберга (False Discovery Rate, FDR) с пороговым значением $q = 0,05$. Поправку проводили отдельно для каждого типа анализа в пределах

каждого полиморфизма. Результаты считали статистически значимыми, если скорректированное значение p (q -value) было менее 0,05.

Анализ выживаемости. Оценку общей и безрецидивной выживаемости проводили методом Каплана-Мейера. Сравнение кривых выживаемости в подгруппах выполняли с помощью лог-рангового теста (Мантела-Кокса) и критерия Бреслоу. Для выявления независимых факторов, ассоциированных с риском прогрессирования и смерти, применяли регрессионную модель пропорциональных рисков Кокса. Отбор предикторов осуществляли пошаговым методом. Результаты представляли в виде отношения рисков (HR) и 95 % доверительного интервала.

Логистическая регрессия. Для прогнозирования бинарных исходов (прогрессирование/отсутствие прогрессирования, летальный исход/выживание) использовали метод множественной бинарной логистической регрессии. Пошаговый отбор предикторов проводили на основе минимизации информационного критерия. Качество моделей оценивали с помощью:

- критерия согласия Хосмера-Лемешоу (приемлемый уровень $p > 0,05$);
- коэффициента детерминации Найджелкерка (R^2);
- ROC-анализа с расчётом площади под кривой (AUC).

Результаты логистической регрессии представляли в виде отношения шансов (OR) и 95 % доверительного интервала.

Дополнительные методы. Для выявления нелинейных взаимосвязей и многофакторных взаимодействий применяли метод деревьев решений (алгоритм CHAID). Качество разбиения оценивали по критерию χ^2 .

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика и частота полиморфных вариантов гена *MC1R* у пациентов с меланомой кожи в Красноярском крае

Для исследования особенностей распределения полиморфных вариантов гена *MC1R* среди населения Красноярского края была сформирована основная группа, включившая 213 пациентов с верифицированным диагнозом меланома кожи. На основе проведенного секвенирования гена рецептора меланокортина-1 среди всей выборки пациентов были выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) – *R160W* (rs1805008), *R151C* (rs1805007), *D294H* (rs1805009), *R163Q* (rs885479), *I155T* (rs1110400), представленные в таблице 6.

Таблица 6 – Распределение генотипов по полиморфным локусам гена *MC1R*

SNP	<i>R160W</i> (rs1805008) C>T		<i>R151C</i> (rs1805007) C>T		<i>D294H</i> (rs1805009) G>C		<i>R163Q</i> (rs885479) G>A		<i>I155T</i> (rs1110400) T>C	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
Дикий тип (основная аллель)	168	78,9	174	81,7	201	94,4	181	85,0	201	94,4
Гетерозигота (основная/минорная)	42	19,7	35	16,4	11	5,2	30	14,1	12	5,6
Гомозигота по минорной аллели	3	1,4	4	1,9	1	0,5	2	0,9	0	0
Примечание – SNP полиморфизм, в скобках указаны rs-номера полиморфизмов по базе dbSNP										

Варианты *I155T* и *D294H* в изученной выборке встречались редко: частота гетерозиготного носительства составила 5,6 % и 5,2 % соответственно, мутантные гомозиготы по *I155T* не зарегистрированы. Наиболее часто минорный аллель Т (*R160W*) встречался в гетеро– и

гомозиготном состоянии – у 21,1 % пациентов. Аллельная частота данного варианта составила 11,3 % (таблица 7).

Таблица 7 – Частоты аллелей изученных полиморфных вариантов гена *MC1R* в группе больных меланомой кожи

Варианты <i>MC1R</i>	rs-номера	Аллели	Случаи (n = 213), %	χ^2
<i>R151C</i> C > T	rs1805007	C (основная) T (минорная)	90,1 9,9	4,4
<i>I155T</i> T > C	rs1110400	T (основная) C (минорная)	97,2 2,8	1,31
<i>R160W</i> C > T	rs1805008	C (основная) T (минорная)	88,7 11,3	5,58
<i>R163Q</i> G > A	rs885479	G (основная) A (минорная)	92,0 8,0	5,74
<i>D294H</i> G > C	rs1805009	G (основная) C (минорная)	96,9 3,1	0,01
Примечания:				
1 χ^2 критерий согласия Пирсона, рассчитан по сравнению с популяцией Europeans (1000 Genomes);				
2 приведены наблюдаемые аллельные частоты, для всех локусов $p > 0,05$				

Для оценки региональных особенностей распределения изученных полиморфных вариантов проведён сравнительный анализ частот минорных аллелей в исследуемой выборке с данными международных популяционных баз (1000 Genomes European, GnomAD, TOPMED, ALFA) и европейских популяций (Северная Швеция, Финляндия, Эстония, Нидерланды, Великобритания). Установлено, что частоты минорных аллелей *R160W* (11,3 %) и *R151C* (9,9 %) в выборке Красноярского края сопоставимы с таковыми в североευропейских популяциях (Великобритания, Швеция) и значительно выше усреднённых данных 1000 Genomes European (1,5 % и 1,9 % соответственно), что обусловлено методологическими особенностями данной базы. Частота минорного аллеля *R163Q* (8,0 %) полностью

соответствует европейскому диапазону (7-10 %). В то же время для редких аллелей *D294H* и *I155T* выявлены выраженные отличия: частота минорного аллеля *D294H* (C) в исследуемой выборке составила 3,1%, что в 2-3 раза превышает средние европейские показатели (0,3-1,2 %); частота минорного аллеля *I155T* (C) составила 2,8 %, что в 3-5 раз выше, чем в европейских популяциях (0,3-1,0 %). Данные по подвыборке «Siberian» из базы dbSNP ($n = 2-8$) демонстрируют частоту минорных аллелей 50 % для полиморфизмов *R151C*, *R160W*, *D294H* и *R163Q*, что кратно превышает среднемировые показатели, однако малочисленность выборки ($n \leq 10$) требует осторожной интерпретации.

В соответствии с функциональной классификацией все идентифицированные варианты были разделены на две группы:

- R-варианты (функционально более значимые, ассоциированные с выраженным снижением функции рецептора): *R151C*, *R160W*, *D294H*;
- R-варианты (функционально менее значимые, умеренно снижающие функцию): *I155T*, *R163Q*.

Сравнительная характеристика частот минорных аллелей изученных полиморфизмов представлена в таблице 8. Сочетания трёх и более вариантов в выборке не зарегистрированы.

Таблица 8 – Связь между количеством функциональных вариантов *MC1R*

Количество вариантов	Случаи ($n = 213$), %	p
0	109 (51,15)	0
1	74 (36,78)	0,304
2	30 (12,07)	0,01
3	0	0
Примечание – p – статистическая значимость отклонения наблюдаемого распределения сочетаний аллелей от ожидаемого при случайном сочетании (рассчитано с использованием критерия χ^2 Пирсона). В качестве ожидаемых частот использовано распределение, рассчитанное на основе частот аллелей в исследуемой выборке (закон Харди-Вайнберга для множественных локусов)		

Таким образом, в исследуемой выборке больных меланомой кожи Красноярского края были выявлены характерные частоты полиморфных вариантов гена *MC1R*. Наиболее распространёнными вариантами, ассоциированными с фенотипом высокого риска (риск развития меланомы, OR = 1,15), оказались минорная аллель Т полиморфизма *R160W* (суммарная частота носительства 21,1 %) и минорная аллель Т полиморфизма *R151C* (18,3 %). Выявлено выраженное накопление редких аллелей *D294H* и *I155T* по сравнению с европейскими популяциями, что указывает на региональные особенности сибирской популяции. Отсутствие репрезентативных данных по сибирской популяции в мировых базах (единичные наблюдения, $n \leq 10$) подчёркивает научную новизну настоящего исследования. Полученные данные служат основой для дальнейшего анализа ассоциаций полиморфизмов *MC1R* с клинико-морфологическими параметрами и являются важной региональной популяционной характеристикой. Полученные частотные характеристики служат основой для дальнейшего анализа ассоциаций гена *MC1R* с клинико-морфологическими и фенотипическими параметрами, который представлен в разделе 3.2.

3.1.1 Ассоциация полиморфизмов гена *MC1R* с клинико-морфологическими характеристиками, риском метастазирования у пациентов при МК

Проведено сравнительное исследование пациентов с МК, разделенных на две подгруппы: первая объединила пациентов без признаков прогрессирования заболевания ($n = 119$), вторая – пациентов с диагностированными метастазами ($n = 94$). Анализ полиморфных вариантов гена *MC1R* (*R151C*, *D294H*, *R160W*, *R163Q*, *I155T*) проводился с разделением генотипов на нормозигот, гетерозигот и гомозигот по мутантному аллелю.

Ассоциации минорной аллели Т полиморфизма R151C (rs1805007).
Носительство минорной (вариантной) аллели Т выявлено у 39 пациентов

(18,3 %): 35 гетерозигот (генотип СТ), 4 гомозиготы (генотип ТТ). Анализ генотипов выявил ассоциации с веснушками ($OR = 3,12$; 95 % ДИ: 1,50-6,48; $p = 0,002$), солнечными ожогами ($p < 0,001$), I–II фототипом ($p = 0,008$), множественными меланомами ($p < 0,001$) и местными метастазами ($p = 0,025$), которые сохранили значимость после поправки FDR. Наибольшая доля носителей минорной аллели Т отмечена среди пациентов с I фототипом (42,9 %), множественными меланомами (37,5 %), тремя и более солнечными ожогами (33,3 %) и веснушками (27,7 %). Ассоциации с рыжими волосами ($p = 0,021$) и мужским полом ($p = 0,028$) утратили значимость после поправки. При анализе распределения генотипов выявлены значимые различия по солнечным ожогам ($\chi^2 = 21,672$; $p < 0,001$), фототипу ($\chi^2 = 17,276$; $p = 0,008$), веснушкам ($\chi^2 = 10,336$; $p = 0,006$), множественным меланомам ($\chi^2 = 57,907$; $p < 0,001$), местным метастазами ($\chi^2 = 7,342$; $p = 0,025$) и ответу на иммунотерапию ($\chi^2 = 20,934$; $p = 0,007$). У гомозигот по минорной аллели Т ($n = 4$) отмечены максимальные значения по большинству признаков, гетерозиготы демонстрировали промежуточные показатели. Корреляционный анализ подтвердил дозозависимые связи с частотой солнечных ожогов в детстве ($r = 0,319$; $p < 0,001$), категорией Т ($r = 0,280$; $p < 0,001$), множественными меланомами ($r = 0,521$; $p < 0,001$) и местными метастазами ($r = 0,186$; $p = 0,025$). У носителей минорной аллели Т отмечены большая толщина опухоли по Бреслоу (медиана 2,3 мм против 1,2 мм; $p < 0,001$) и более высокая категория Т ($p < 0,001$). При анализе ответа на иммунотерапию наблюдалась тенденция к накоплению гомозигот по минорной аллели Т в группе с полным регрессом ($p = 0,007$), однако малочисленность подгрупп требует осторожной интерпретации. Отсутствие связи с мутацией *BRAF* отличает данный полиморфизм от *R160W*. Детальный анализ распределения признаков представлен в таблице 9.

Ассоциации минорной аллели С полиморфизма D294H (rs1805009).

Носительство минорной (вариантной) аллели С выявлено у 12 пациентов (5,6 %), все гетерозиготы (генотип GC). Анализ генотипов выявил

ассоциации с мужским полом ($OR = 5,375$; 95 % ДИ: 1,410-20,488; $p = 0,011$), вертикальной фазой роста ($p = 0,005$), наличием местных метастазов ($OR = 3,743$; 95 % ДИ: 1,089-12,867; $p = 0,033$), отсутствием связи с невусом ($p = 0,039$) и мутацией *BRAF* ($p = 0,025$), которые сохранили значимость после поправки FDR. Наибольшая доля носителей минорной аллели С наблюдалась у мужчин (11,1 % против 2,3% у женщин), в вертикальной фазе роста (8,8 % против 0 % в радиальной), при наличии местных метастазов (10,3 % против 3,0 %) и в группе без связи с невусом (7,6 % против 0 %). Поражение головного мозга ($OR = 4,452$; $p = 0,059$) продемонстрировало тенденцию. Связь с рыжими волосами отсутствовала. Отсутствие ассоциации с фенотипическими маркерами рыжего фенотипа отличает данный полиморфизм от *R151C* и *R160W* и указывает на его независимую прогностическую значимость, связанную с агрессивным течением заболевания. Корреляционный анализ выявил связь с худшим временем без прогрессирования ($r = -0,208$; $p = 0,002$), которая сохранила значимость после поправки. Детальный анализ распределения признаков представлен в таблице 10.

Ассоциации минорной аллели Т полиморфизма R160W (rs1805008). Носительство минорной (вариантной) аллели Т выявлено у 45 пациентов (21,1 %): 42 гетерозиготы (генотип СТ), 3 гомозиготы (генотип ТТ). Анализ генотипов выявил ассоциации с рыжими волосами ($OR = 3,32$; 95 % ДИ: 1,27-8,68; $p = 0,011$) и семейным анамнезом меланомы ($OR = 4,94$; 95 % ДИ: 1,06-23,05; $p = 0,035$), которые сохранили значимость после поправки FDR. Наибольшая доля носителей минорной аллели Т отмечена среди пациентов с семейным анамнезом меланомы (42,9 %) и рыжими волосами (36,4 %). Ассоциация с атипичными невусами утратила значимость после поправки. При анализе распределения генотипов выявлены значимые различия по рыжим волосам ($\chi^2 = 11,713$; $p = 0,003$), семейному анамнезу меланомы ($\chi^2 = 9,243$; $p = 0,010$) и размеру пигментных невусов ($\chi^2 = 10,275$; $p = 0,036$). У гомозигот по минорной аллели Т ($n = 3$) отмечены максимальные

показатели. Корреляционный анализ подтвердил дозозависимые связи с чувствительностью кожи к солнцу ($r = 0,240$; $p < 0,001$), наличием злокачественных новообразований в анамнезе ($r = 0,277$; $p < 0,001$) и мутацией *BRAF* ($r = 0,251$; $p = 0,013$), которые сохранили значимость после поправки. Ассоциация с мутацией *BRAF V600E* отличает данный полиморфизм от *R151C*, для которого подобной связи не выявлено. Детальный анализ распределения признаков представлен в таблице 11.

Ассоциации минорной аллели С полиморфизма I155T (rs1110400). Носительство минорной (вариантной) аллели С выявлено у 12 пациентов (5,6 %), все гетерозиготы (генотип ТС). Анализ генотипов выявил ассоциации с локализацией поражения ($p = 0,035$), критерием М ($p < 0,001$) и клинической картиной – В-критерий ($OR = 7,580$; 95 % ДИ: 0,960-59,850; $p = 0,031$), которые сохранили значимость после поправки FDR. Наибольшая доля носителей минорной аллели С наблюдалась при акральной локализации (18,2 %) и на верхних конечностях (11,9 %). Связь с рыжими волосами отсутствовала. Корреляционный анализ выявил дозозависимые связи с наличием метастазов в лимфатических узлах ($r = 0,169$; $p = 0,014$) и проведением PUVA-терапии ($r = 0,144$; $p = 0,036$), все связи сохранили значимость после поправки. У носителей минорной аллели С отмечена большая толщина опухоли по Бреслоу (медиана 1,9 мм против 1,3 мм; $p = 0,046$). Отсутствие ассоциации с фенотипическими маркерами рыжего фенотипа, наряду со связью с акральной локализацией, лимфогенным метастазированием и толщиной опухоли, указывает на независимый от фенотипа прогностический эффект данного полиморфизма.

Ассоциации минорной аллели А полиморфизма R163Q (rs885479). Носительство минорной (вариантной) аллели А выявлено у 32 пациентов (15,0 %): 30 гетерозигот (генотип ГА), 2 гомозиготы (генотип АА). Анализ генотипов выявил ассоциации с локализацией поражения ($OR = 0,193$; 95 % ДИ: 0,086-0,435; $p < 0,0001$) и семейным анамнезом по меланоме ($OR = 8,48$; 95 % ДИ: 1,80-39,90; $p = 0,011$), которые сохранили значимость после

поправки FDR. Ассоциация с критерием C ($p = 0,048$) утратила значимость после поправки. Корреляционный анализ выявил дозозависимые связи с уровнем CD4⁺ лимфоцитов ($r = 0,396$; $p < 0,001$), количеством отдаленных метастазов ($r = 0,277$; $p < 0,001$), семейным анамнезом по меланоме ($r = 0,214$; $p = 0,002$) и семейным анамнезом по раку поджелудочной железы ($r = 0,201$; $p = 0,003$), которые сохранили значимость после поправки. Связи с рыжими волосами и фототипом отсутствовали. Выявленная корреляция с уровнем CD4⁺ лимфоцитов указывает на потенциальную иммуномодулирующую роль данного полиморфизма, что отличает его от других изученных вариантов MC1R. Детальный анализ распределения признаков представлен в таблицах 12-13.

Сочетанный анализ полиморфизмов MC1R и мутации BRAF V600E. У пациентов с одновременным наличием полиморфизма гена MC1R и мутации BRAF V600E обнаружена выраженная статистическая связь с метастазами в лимфатических узлах и развитием отдаленных метастатических очагов ($p \leq 0,005$). Частота встречаемости данной комбинации в группе с летальным исходом была значимо выше, чем в группе без летального исхода, что позволяет рассматривать сочетанные молекулярно-генетические нарушения как неблагоприятный прогностический фактор, повышающий риск генерализации опухолевого процесса. Детальный анализ представлен в таблице 14.

В ходе исследования установлено, что изученные полиморфные варианты гена MC1R демонстрируют дифференцированные ассоциации с фенотипическими признаками, характеристиками первичной опухоли и прогностическими параметрами у больных меланомой кожи в Красноярском крае. Варианты, ассоциированные с рыжим фенотипом (*R151C* и *R160W*), подтвердили свою роль как модификаторы пигментного фенотипа и предрасположенности к меланоме: *R151C* наиболее тесно связан с фоточувствительностью, развитием первично-множественных меланом, локальным прогрессированием и агрессивными морфологическими

характеристиками опухоли, тогда как *R160W* дополнительно ассоциирован с наличием мутации *BRAF V600E*, семейным анамнезом меланомы и размером пигментных невусов, причём для обоих вариантов прослеживается дозозависимый эффект. Редкие функционально значимые варианты, не связанные с рыжим фенотипом (*D294H* и *I155T*), продемонстрировали связь с агрессивностью опухолевого процесса и прогнозом: *D294H* ассоциирован с мужским полом, вертикальной фазой роста, наличием местных метастазов и худшим временем без прогрессирования, а *I155T* – с акральной локализацией, толщиной опухоли и лимфогенным метастазированием. Вариант *R163Q*, также не ассоциированный с рыжим фенотипом, продемонстрировал многофункциональные эффекты, включая связь с локализацией меланомы, семейным анамнезом по меланоме и раку поджелудочной железы, количеством отдаленных метастазов, а также с уровнем CD4⁺ лимфоцитов, что указывает на его потенциальную иммуномодулирующую роль.

Таким образом, полиморфизмы гена *MC1R* вносят разнонаправленный вклад в патогенез меланомы кожи: варианты *R151C* и *R160W* выступают преимущественно как маркеры наследственной предрасположенности, определяя фенотип высокого риска, в то время как редкие варианты *D294H* и *I155T* обладают наибольшей прогностической ценностью, ассоциируясь с агрессивным течением заболевания и неблагоприятным прогнозом, что обосновывает целесообразность их учёта в комплексной оценке риска метастазирования и выживаемости пациентов. Ввиду ретроспективного дизайна и малочисленности групп гомозигот полученные результаты требуют подтверждения в проспективных когортных исследованиях.

Таблица 9 – Распределение пациентов с мутацией *R151C* по признакам

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	Р	V Крамера
		п	%	п	%	п	%			
Пол	Женский	108	81,8	24	18,2	0	0,0	7,166	0,028	0,183
	Мужской	66	81,5	11	13,6	4	4,9			
Фототип кожи	1 тип	12	57,1	9	42,9	0	0,0	17,276	0,008	0,201
	2 тип	62	77,5	15	18,8	3	3,8			
	3 тип	85	89,5	9	9,5	1	1,1			
	4 тип	15	88,2	2	11,8	0	0,0			
Солнечные ожоги в детском возрасте	Нет	87	92,6	7	7,4	0	0,0	21,672	0,0001	0,226
	От 1 до 3	52р	80,0	10	15,4	3р	4,6			
	3 и более	35р	64,8	18р	33,3	1р	1,9			
Солнечные ожоги во взрослом возрасте	Нет	83	91,2	7	7,7	1	1,1	13,941	0,007	0,181
	От 1 до 3	53р	80,3	11р	16,7	2	3,0			
	3 и более	38р	67,9	17р	30,4	1	1,8			
Первично–множественная МК в анамнезе		5	62,5	0	0,0	3	37,5	57,907	0,0001	0,521
Критерий Т	T1a	36	100,0	0	0,0	0	0,0	16,404	0,022	0,278
	T1b	19р	95,0	1р	5,0	0	0,0			
	T2a	30	100,0	0	0,0	30	0,0			
	T2b	19р	100,0	0р	0,0	19р	0,0			
	T3a	23р	95,8	1р	4,2	23р	0,0			
	T3b	12р	85,7	2р	14,3	12р	0,0			
	T4a	20р	100,0	0р	0,0	20р	0,0			
	T4b	50	100,0	0	0,0	50	0,0			

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	p	V Крамера
		п	%	п	%	п	%			
Наличие местного метастазирования	нет	111	82,2	24	17,8	0	0,0	7,342	0,025	0,300
	да	63	80,8	11	14,1	5	5,1			
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент сопряжённости Крамера; 4 r коэффициент корреляции										

Таблица 10 – Распределение пациентов с мутацией *D294H* по признакам

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	p	V Крамера
		n	%	n	%	n	%			
Пол	Женский	129	97,7	2	1,5	1	0,8	9,980	0,007	0,216
	Мужской	72	88,9	9	11,1	0	0			
Фаза роста опухоли	Радиальная	76	100	0	0	0	0,0	7,054	0,029	0,182
	Вертикальная	125	91,2	11	8,0	1	0,7			
Критерий M	нет	194	95,1	9	4,4	1	0,5	19,729	0,001	
	1в	6	85,7	1	14,3	0	0			
	1d	0	0,0	1	100	0	0			
Наличие местного прогрессирования	нет	131	97,0	4	3,0	0	0,0	4,496	0,026	0,522
	да	70	89,7	7	9,0	1	1,3			

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ 2	p	V Крамера
		п	%	п	%	п	%			
Наличие прогрессирования в головной мозг	нет	187	95,4	14	82,4	0	0,0	9,567	0,025	0,222
	да	9	4,6	3	17,6	0,0	0			
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 χ2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент сопряжённости Крамера; 4 r коэффициент корреляции										

Таблица 11 – Распределение пациентов с мутацией *R160W* по признакам

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	p	V Крамера
		n	%	n	%	n	%			
Первично–множественная МК в анамнезе		4	50,0	3	37,5	1	12,5	9,472	0,009	0,211
Наличие врожденных невузов	Нет	112	84,8	19	1,4	1	0,8	12,302	0,015	0,170
	1-5	44	66,7	21	31,8	1	1,5			
	Более 5	12	80,0	2	13,3	1	6,7			
Наличие атипических невузов	Нет	181	99,5	1	0,5	0,0	0,0	8,022	0,018	0,194
	1-5	25	92,6	2	7,4	1	2,0			
	Более 5	4	100,0	0	0,0	0,0	0,0			
	1в	5	100	0	0	1в	5			
	2а	3	75	1	25	2а	3			
	2в	6	100	0	0	2в	6			
	2с	3	100	0	0	2с	3			
	3а	2	100	0	0	3а	2			
	3в	1	100	0	0	3в	1			

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	Р	V Крамера
		п	%	п	%	п	%			
Наличие <i>BRAF</i> V600E мутация	<i>BRAF</i> V600E–	55	85,9	9р	14,1	55р	85,9	12,456	0,049	0,192
	<i>BRAF</i> V600E+	22	64,7	12	35,3	22	64,7			
Критерий N	1a	12	100	0	0	1a	12	16,561	0,020	
Наличие пограничных невусов	До 50шт	80	80,8	18	18,2	1	1,0	37,886	0,0001	
	От 50 до 100шт	36	70,6	14	27,5	1	2,0			
	Более 100шт	1	50,0	0	0,0	1р	50,0			
Примечания: 1 р статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент сопряжённости Крамера; 4 r коэффициент корреляции										

Таблица 12 – Распределение пациентов с мутацией *R163Q* по признакам

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	p	V Крамера
		n	%	n	%	n	%			
Локализация первичной опухоли	ОГШ	25	73,5	9	26,5	0	0,0	24,702	0,002	0,241
	туловище	88	93,6	6	6,4	0	0,0			
	в/конеч	29	69,0	11	26,2	2	4,8			
	н/конеч	28	87,5	4	12,5	0	0,0			
	акральная	11	100	0	0,0	0	0,0			
Отягощенный семейный анамнез	Нет	178	86,4	26	12,6	2	1,0	11,107	0,004	0,228
	Да	3р	42,9	4р	57,1	0	0,0			
Примечание – p – статистическая значимость различий; χ^2 – критерий согласия Пирсона; V – коэффициент сопряжённости Крамера; r – коэффициент корреляции										

Таблица 13 – Распределение пациентов с мутацией *I155T* по признакам

Признак		Нормо		Гетеро		Мутант		χ^2	Р	V Крамера
		п	%	п	%	п	%			
Локализация первичной опухоли	ОГШ	34	100	0	0,0	0	0,0	10,322	0,035	0,220
	туловище	89	94,7	5	5,3	0	0,0			
	в/конеч	37	88,1	5	11,9	0	0,0			
	н/конеч	32	100	0	0,0	0	0,0			
	акральная	9	81,8	2	18,2	0	0,0			
Критерий М	Нет	194	95,1	10	4,9	0	0,0	17,862	0,000	0,290
	1в	6	85,7	1	14,3	0	0,0			
	1д	0	0,0	1	100	0	0,0			
Примечания: 1 р статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент сопряжённости Крамера; 4 r коэффициент корреляции										

Таблица 14 – Распределение пациентов с наличием полиморфизма по прогрессии и летальному исходу

Признак		Группа 1		Группа 2		χ^2	Р	V Крамера
		п	%	п	%			
Прогрессирование болезни	n R151C	98	82,4	76	80,9	5,321	0,070	0,158
	m R151C	0	0,0	4р	4,3	5,161	0,023	0,156
Летальный исход	gR151C	25	16,9	10	15,4	9,290	0,010	0,209
	mR151C	0	0,0	4	6,2	9,282	0,002	0,209
	m D294H	0	0,0	1	1,5	8,409	0,015	0,199

Примечание – р – статистическая значимость различий; χ^2 – критерий согласия Пирсона; V – коэффициент сопряжённости Крамера; r – коэффициент корреляции

3.1.2 Выживаемость больных МК в зависимости от наличия полиморфизма гена рецептора меланокортина–1 (MC1R)

Полиморфизм D294H (rs1805009). Проведен анализ общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) в зависимости от носительства минорной аллели С. Группу носителей минорной аллели С составили 11 гетерозигот (генотип GC) и 1 гомозигота (генотип CC) – суммарно 12 пациентов; группу сравнения – носители дикого типа (генотип GG, n = 201).

При анализе общей выживаемости установлено, что смертность от метастатической болезни в группе носителей мутантного аллеля *D294H* значительно превышала таковую у дикого типа (71,6 % против 33,3 %, $p = 0,0001$, log-rank тест). Ожидаемая продолжительность жизни, рассчитанная по кривой Каплана–Мейера составила $51,21 \pm 1,13$ мес. В группе носителей минорного аллеля *D294H* медиана общей выживаемости составила 31,0 месяц (95 % ДИ 18,0-44,0), среднее время – $30,84 \pm 6,44$ мес., что в 1,7 раза ниже, чем в группе дикого типа (рисунок 4).

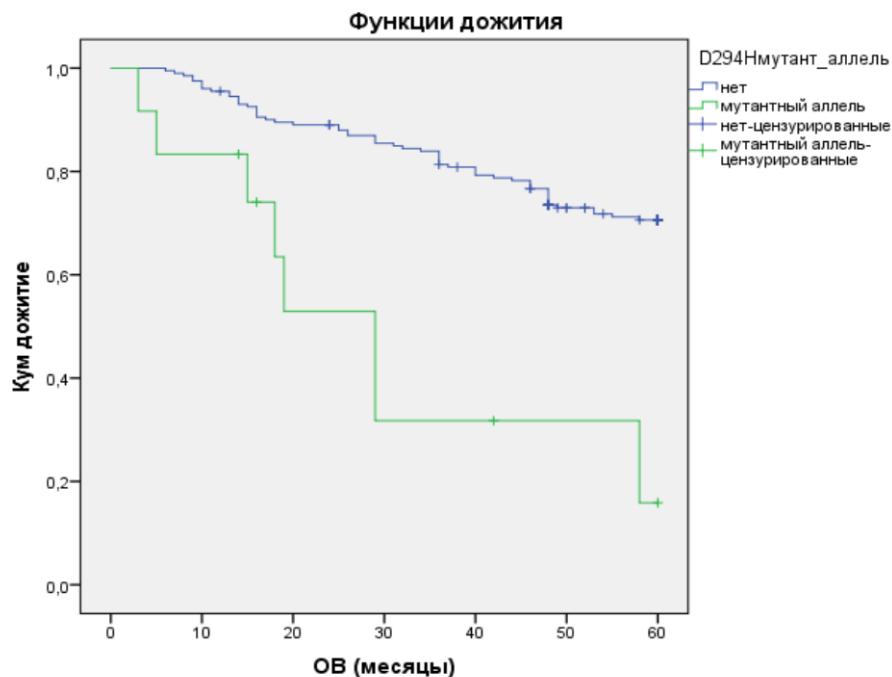


Рисунок 4 – ОВ пациентов с МК в зависимости от носительства мутантного аллеля *D294H* гена *MC1R* (метод Каплана-Мейера)

При анализе бессобытийной выживаемости доля цензурированных случаев (пациентов без события) среди носителей мутантного аллеля *D294H* составила 33,3 %, среди дикого типа – 71,6 % (рисунок 5).

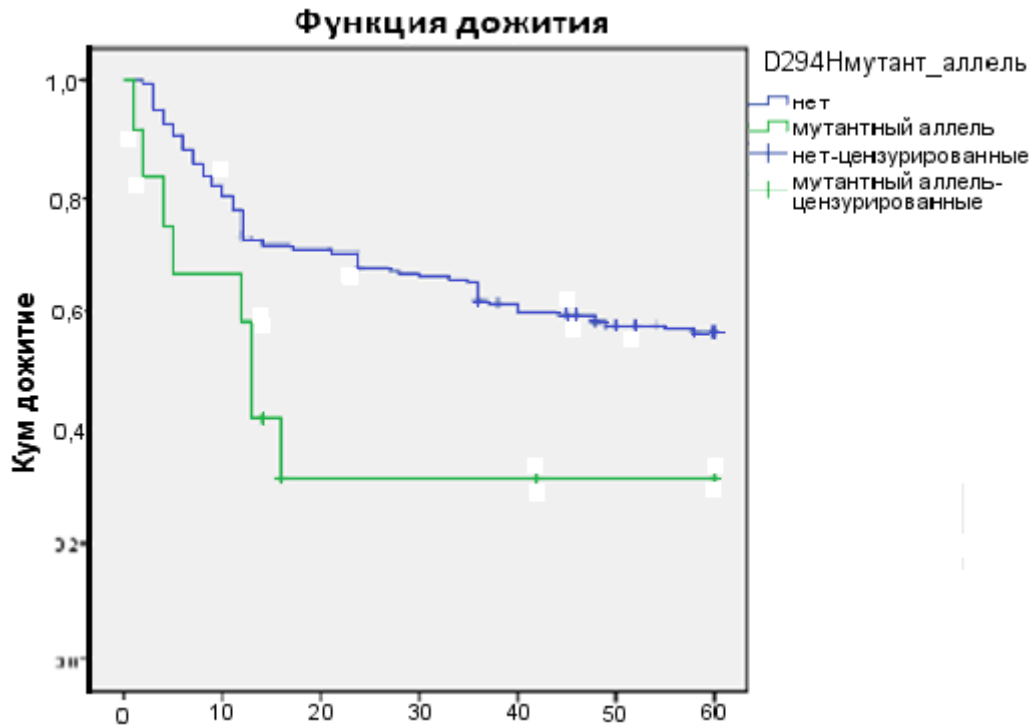


Рисунок 5 – БСВ пациентов с МК в зависимости от носительства мутантного аллеля *D294H* гена *MC1R* (метод Каплана-Мейера)

Выявлены статистически значимые различия ($p = 0,009$, log-rank тест). Медиана БСВ в группе нормозигот не достигнута; среднее время БСВ составило $41,44 \pm 1,65$ мес. В группе носителей минорного аллеля *D294H* медиана БСВ достигнута и составила 13,0 мес. (95 % ДИ 11,33-14,67), среднее время – $24,59 \pm 7,24$ мес. Вероятность достижения 5-летней БСВ у носителей дикого типа превышает 70 %, у носителей минорного аллеля *D294H* составляет 30-35 % (таблица 15).

Таблица 15 – Оценка бессобытийной выживаемости (в месяцах) пациентов с МК в зависимости от носительства мутантного аллеля *D294H* (метод Каплана–Мейера)

D294H	Среднее		95 % ДИ		p*
	Оценка	Ст. ошибка	Нижняя гр.	Верхняя гр.	
Дикий тип	41,437	1,648	38,207	44,667	0,009
Мутант	24,583	7,241	10,391	38,775	
Всего	40,484	1,627	37,295	43,674	
Примечания: 1 p статистическая значимость различий (лог–ранк тест); 2 * широкий доверительный интервал в группе носителей обусловлен малым объемом выборки					

Полиморфизм I155T. Аналогичный анализ проведен для полиморфизма *I155T*. Группу носителей мутантного аллеля составили 12 гетерозигот (гомозиготы отсутствовали), группу сравнения – дикий тип (n = 201).

Уровень общей выживаемости среди носителей *I155T* составил 58,3 %, что ниже показателя в группе нормозигот (70,1 %) (рисунок 6). Медиана общей выживаемости в группе дикого типа не достигнута; в группе носителей *I155T* различия не достигли статистической значимости (p = 0,058, log-rank тест). Доля цензурированных случаев при анализе БСВ у носителей *I155T* составила 41,7 %, в группе дикого типа – 56,7 %.

Установлены статистически значимые различия БСВ (p = 0,045, log-rank тест). Медиана БСВ в группе дикого типа не достигнута; среднее время БСВ составило $41,13 \pm 1,65$ мес.

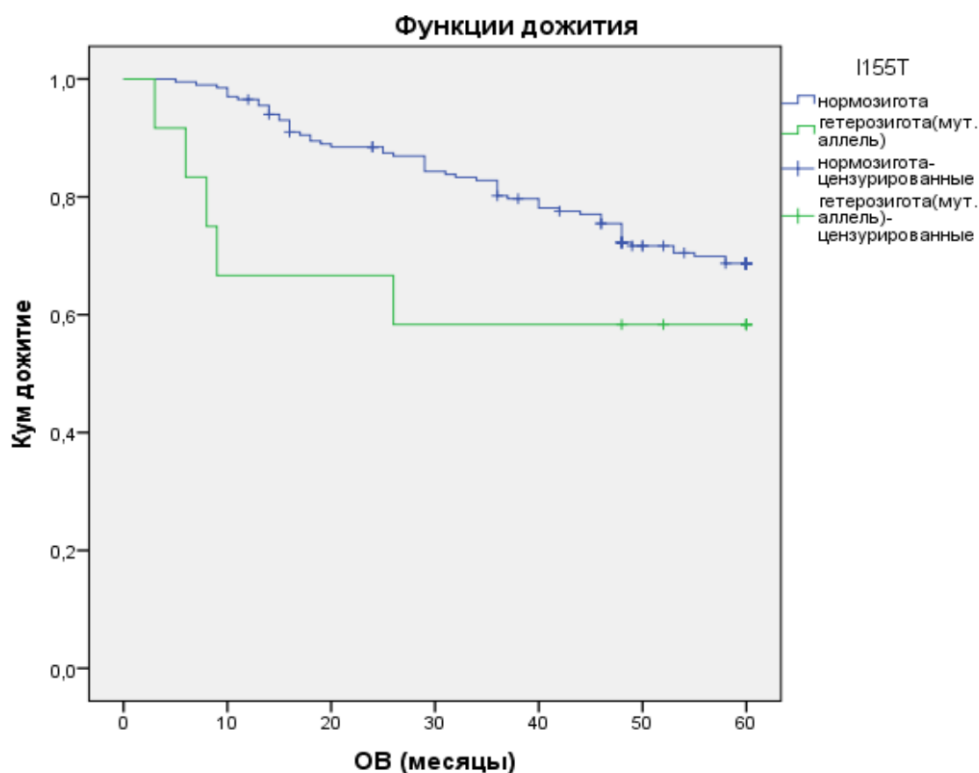


Рисунок 6 – ОВ пациентов с МК в зависимости от носительства мутантного аллеля *I155T* гена *MC1R* (метод Каплана-Мейера)

В группе носителей *I155T* медиана БСВ достигнута и составила 11,0 мес. (95 % ДИ 0,00-34,76), среднее время – $29,58 \pm 7,60$ мес. (рисунок 7, таблица 16).

Таблица 16 – Оценка БСВ (в месяцах) пациентов по методу Каплана–Мейера после лечения МК в зависимости от аллеля *mI155T*

<i>I155T</i>	Среднее		95 % ДИ		p*
	Оценка	Ст. ошибка	Нижняя гр.	Верхняя гр.	
Дикий тип	41,134	1,653	37,895	44,373	0,045
Мутант	29,583	7,603	14,682	44,484	
Всего	40,484	1,627	37,295	43,674	

Примечания:

1 p статистическая значимость различий (лог–ранк тест);

2 * широкий доверительный интервал в группе носителей обусловлен малым объемом выборки

Вероятность достижения 5-летней БСВ у дикого типа превышает 55 %, у носителей I155T составляет 40-45 %.

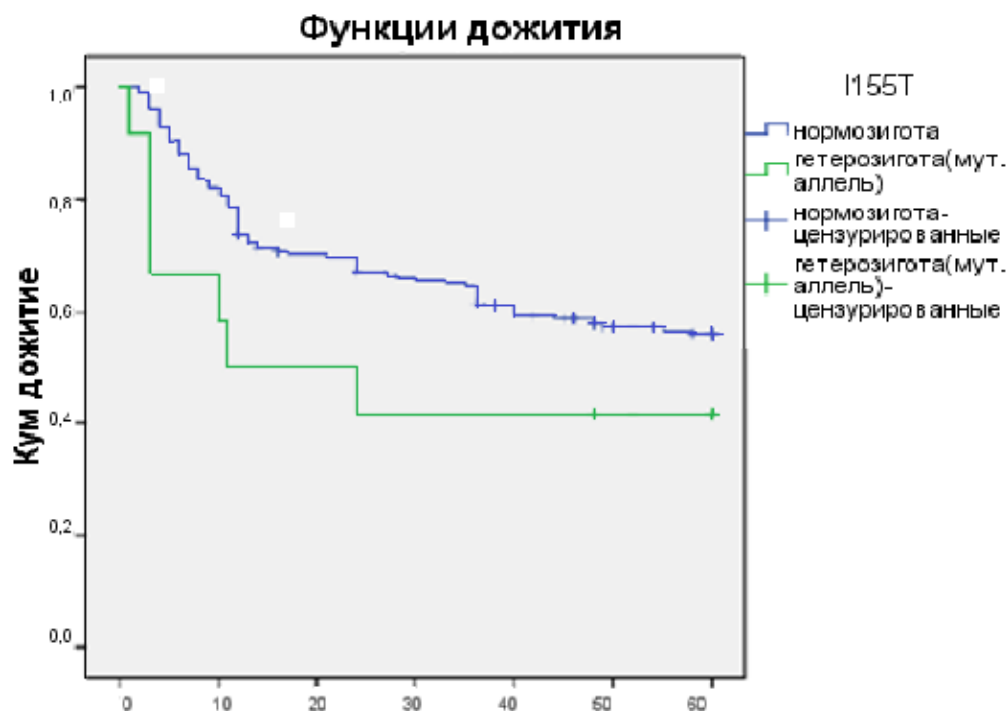


Рисунок 7 – БСВ пациентов с МК в зависимости от носительства мутантного аллеля *I155T* гена *MC1R* (метод Каплана–Мейера)

Полиморфизмы *R151C*, *R160W*, *R163Q*. Для полиморфизмов *R151C* ($n = 25$), *R160W* ($n = 31$) и *R163Q* ($n = 21$) статистически значимых различий в показателях общей и бессобытийной выживаемости между носителями мутантных аллелей и дикого типа не выявлено ($p = 0,673$; $p = 0,923$; $p = 0,963$ соответственно, log-rank тест). Летальность в сравниваемых группах была сопоставима.

Проведенное исследование впервые на территории Красноярского края установило прогностическую значимость полиморфизмов *D294H* и *I155T* гена *MC1R* при меланоме кожи. Носительство мутантного аллеля *D294H* ассоциировано с сокращением общей выживаемости в 1,7 раза (30,8 vs 51,2 мес.; $p < 0,0001$) и бессобытийной выживаемости в 1,7 раза (24,6 vs 41,4 мес.; $p = 0,009$); носительство мутантного аллеля *I155T* – с сокращением бессобытийной выживаемости в 1,4 раза (29,6 vs 41,1 мес.; $p = 0,045$).

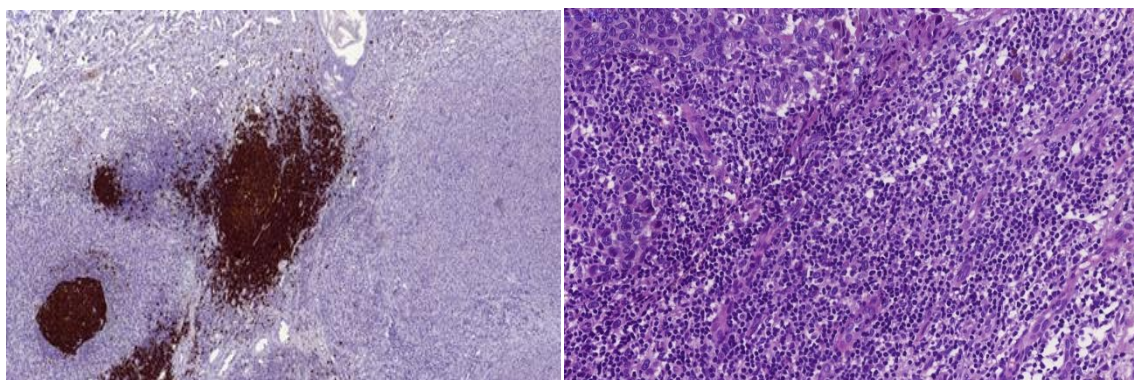
Включение данных маркеров в прогностические модели позволяет повысить точность стратификации риска и обосновать более интенсивную тактику ведения пациентов-носителей.

3.2 Количественная и качественная оценка лимфоцитарной инфильтрации опухоли при меланоме кожи

Нами выполнена морфометрическая оценка операционного материала первичной опухоли после проведения рутинного гистологического исследования (срезы с парафиновых блоков, окрашенных гематоксилином и эозином). При оценке характера лимфоидной инфильтрации по схеме MIA выявлена различная степень инфильтрации: слабая – 62 (29,1 %); умеренная – 93 (43,7 %), выраженная – 32 (15 %); наличие третичных лимфоидных структур (ТЛС) с явлениями регрессии опухоли – 26 (12,2 %) случаев.

Результаты гистологического исследования МК в зависимости от степени TILs показали следующее. Патогномоничным признаком являлось наличие в составе инфильтрата как Т-, так и В-лимфоцитов, а также других воспалительных элементов, таких как эозинофилы и плазматические клетки, расположенные в виде скоплений или изолированно. У пациентов с выраженным перитуморальным лимфоцитарным инфильтратом (тип brisk) гистологическая картина характеризовалась диффузным распространением лимфоцитов по всей опухолевой ткани, разделяющих её на отдельные группы клеток или на единичные клетки. Инфильтрация непрерывно охватывала всю периферическую границу новообразования (рисунок 8б). Ядра опухолевых клеток – округлые, овальные или удлинённые, с нечеткими контурами, нежным хроматином и одним-двумя хорошо различимыми ядрышками. В поле зрения определяется обилие митотических фигур.

В ряде наблюдений выраженный инфильтрат сопровождался формированием третичных лимфоидных структур (рисунок 8а), что расценивалось как проявление организованного иммунного ответа.



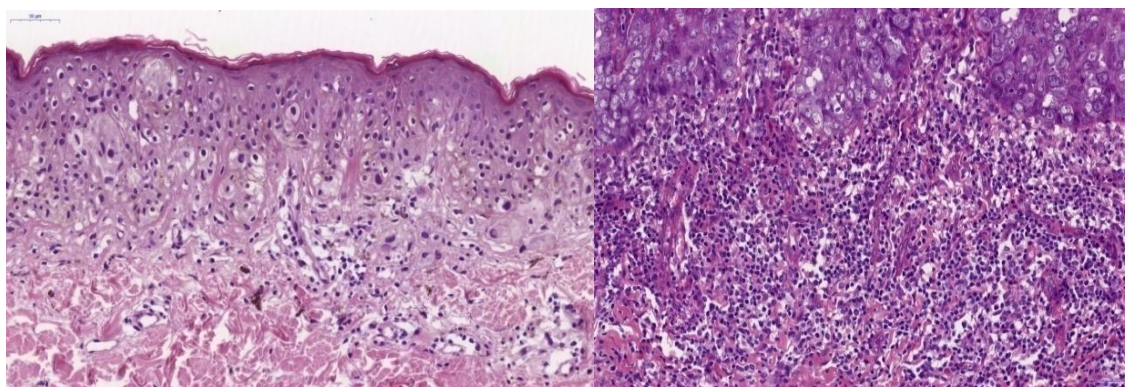
А

Б

Рисунок 8 – Варианты выраженной лимфоцитарной инфильтрации меланомы кожи: а – перитуморальный инфильтрат с формированием третичной лимфоидной структуры (стрелка); б – диффузный перитуморальный инфильтрат (brisk). Окраска гематоксилином и эозином, ув. x200

Гистологическое исследование препаратов МК позволило выявить различные морфологические изменения, характерные для отсутствия лимфоцитарной инфильтрации (тип absent). В таких случаях опухолевая ткань была представлена светлыми полигональными и округлыми клетками с крупными размерами, выраженной гиперхроматозностью ядер и атипичной, уродливой формой. Лимфоциты присутствовали в строме, но не инфильтрировали опухоль (рисунок 9А). Клетки полиморфны, резко аплазированы, встречаются гигантские многоядерные клетки, много атипичных митозов.

Для микроскопической картины у пациентов с меланомой кожи, характеризующейся умеренным лимфогистиоцитарным инфильтратом (тип non-brisk), была свойственна прерывистая инфильтрация периферических отделов опухоли (рисунок 9Б). В таких случаях лимфоцитарная инфильтрация носила очаговый (фокальный) характер. Опухолевая ткань состояла из клеток средних размеров, умеренно полиморфных, полигональных с гиперхромным ядром.



А

Б

Рисунок 9 – Степени лимфоцитарной инфильтрации меланомы кожи:
 А – отсутствие инфильтрации (absent): лимфоциты в строме, но не инфильтрируют опухоль; Б – умеренный инфильтрат (non-brisk): очаговая инфильтрация периферических отделов.
 Окраска гематоксилином и эозином, ув. x200

Сравнительная характеристика всех групп наблюдения представлена в таблице 17. Данные свидетельствуют о том, что средний возраст больных во всех сравниваемых группах составлял примерно 55 лет, при этом статистически достоверных различий выявлено не было. Среди больных с наличием лимфоидной инфильтрации МК доля женщин была несколько выше доли мужчин, однако эти различия также не являлись статистически достоверными ($p = 0,336$).

Таблица 17 – Клинические параметры больных меланомой кожи в зависимости от уровня TILs

Параметры		Уровень TILs				p
		Скудная	Умеренная	Выраженная	ТЛС	
Средний возраст, лет		56,53 ± 14,27	57,13 ± 14,40	54,78 ± 10,93	55,23 ± 15,19	
Пол n (%)	м	28 (45,16)	30 (32,26)	17 (53,12)	6 (23,07)	0,336
	ж	34 (54,84)	63 (67,74)	15 (46,82)	20 (76,93)	
Стадия n (%)	I	14 (22,58)	42 (45,16)	9 (28,12)	13 (50,0)	0,001
	II	29 (46,77)	38 (40,86)	19 (59,37)	12 (46,15)	
	III	12 (19,35)	12 (12,90)	4 (12,51)	1 (3,85)	
	IV	7 (11,3)	1 (1,08)	0 (0,0)	0 (0,0)	



Рисунок 10 – Корреляционные связи TILs с клиническими параметрами

Выявлено, что у пациентов с длительным течением заболевания, а также наличием клинических симптомов (зуд, болезненность, кровоточивость) уровень TILs был достоверно ниже, что свидетельствует об отрицательной корреляционной связи между выраженностью клинических симптомов и степенью лимфоцитарной инфильтрации (рисунок 10) ($p = 0,035$). Также выявлена отрицательная корреляционная связь между степенью лимфогистиоцитарной инфильтрации и объемом требуемого радикального лечения: низкая степень ТИЛ коррелировала с большим объемом оперативного вмешательства ($p = 0,025$) и необходимостью проведения адъювантной терапии ($p = 0,004$). При этом также наблюдалась прямая зависимость между исходным уровнем ТИЛ и ответом на проведенную адъювантную терапию: у пациентов с более высокой инфильтрацией ответ на лечение был лучше ($p = 0,017$).

Полученные данные о корреляции степени TILs с прогнозом заболевания закономерно поставили вопрос о качественном составе инфильтрата. Остается неясным, за счет каких субпопуляций (Т-хелперы, цитотоксические Т-клетки, В-клетки) достигается выраженная инфильтрация и формирование третичных лимфоидных структур. Для ответа на этот вопрос

нами проведена сравнительная характеристика субпопуляций лимфоцитов с использованием иммуногистохимического метода.

3.2.1 Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов в перитуморальном инфильтрате при меланоме кожи

Прогрессирование опухолевого процесса является результатом сложного взаимодействия клеток опухоли и иммунной системы организма. Количество, локализация и фенотипы TILs являются не только прогностическими факторами ответа на иммунотерапию, но и ключевыми модуляторами течения заболевания [196]. В связи с этим на следующем этапе исследования была проведена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов в перитуморальной зоне первичной МК.

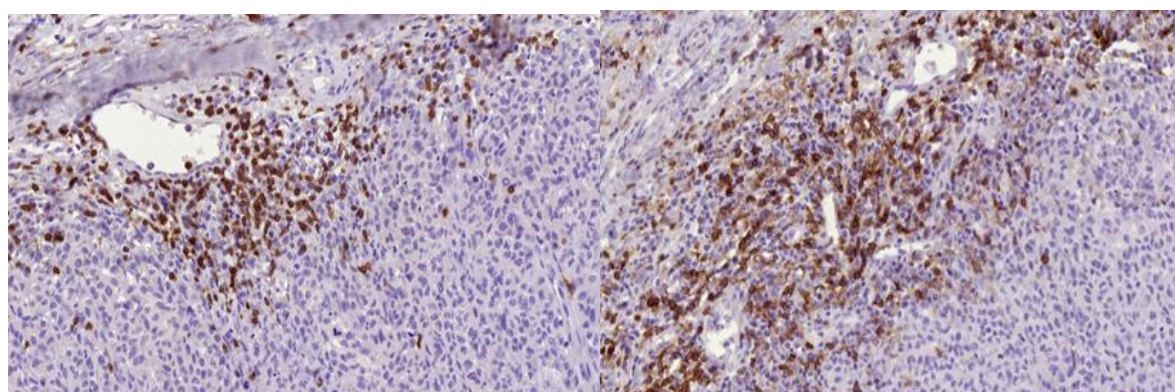
Патоморфологическое исследование микропрепаратов с использованием световой микроскопии (окраска гематоксилин-эозином) подтвердило присутствие лимфоцитов в строме всех изученных образцов МК, а также позволило идентифицировать макрофаги – клетки с четкими контурами и эксцентрично расположенным ядром.

Результаты иммуногистохимического анализа показали наличие в микроокружении меланомы кожи различных лимфоцитарных субпопуляций, количественная характеристика которых представлена в таблице 18.

Таблица 18 – Субпопуляционный состав лимфоцитов в перитуморальной зоне и строме меланомы кожи

Субпопуляция	Маркер	Среднее количество клеток на 1 мм ² (M±m)	Медиана (мин. – макс.)
Зрелые Т-лимфоциты	CD3+	4581,98 ± 2591,79	3969,96 (2875,01-6588,29)
Т-хелперы	CD4+	3153,86 ± 1969,82	2835,99 (1767,78-4052,59)
Т-цитотоксические	CD8+	2130,28 ± 1438,69	1772,01 (998,85-3323,73)
В-лимфоциты	CD20+	1336,22 ± 1289,29	889,03 (572,77-1754,40)
Натуральные киллеры (NK)	CD56+	112,91 ± 164,48	88,31 (36,51-120,39)

Анализ полученных данных показал, что основную массу инфильтрата составили зрелые Т-лимфоциты (CD3+), которые обнаруживались в виде скоплений крупных групп клеток (30-70 клеток), локализованных преимущественно периваскулярно (рисунок 11А). Субпопуляции Т-хелперов CD4+ (рисунок 11Б) и цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+ были представлены в меньшем количестве.



А

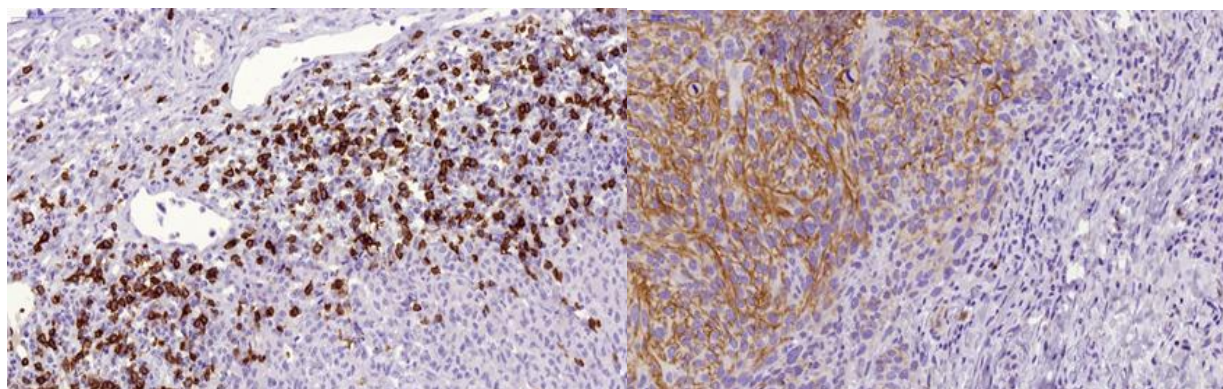
Б

Рисунок 11 – Иммуногистохимическая характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов в перитуморальном инфильтрате меланомы кожи:

А – CD3⁺ (зрелые Т-лимфоциты); Б – CD4⁺ (Т-хелперы).

Иммуногистохимическая реакция, ув. ×400

При изучении топографии отмечена склонность CD8⁺ Т-лимфоцитов к диффузному распределению в виде единичных клеток или компактных скоплений (10-20 клеток) (рисунок 12А). Анализ численности NK-клеток (CD56⁺) продемонстрировал, что их абсолютное количество было минимальным среди всех исследованных субпопуляций (рисунок 12Б).



А

Б

Рисунок 12 – Цитотоксические лимфоциты в перитуморальном инфильтрате меланомы кожи: А – CD8⁺ Т-цитотоксические лимфоциты; Б – CD56⁺ натуральные киллеры (NK-клетки).

Иммуногистохимическая реакция, ув. $\times 400$

Содержание CD20⁺ В-лимфоцитов в инфильтрате уступало количеству CD8⁺ клеток ($1336,22 \pm 1289,29$ против $2130,28 \pm 1438,69$ соответственно). В ряде наблюдений В-лимфоциты формировали фолликулоподобные структуры (рисунок 13). Таким образом, в перитуморальном инфильтрате преобладают зрелые Т-лимфоциты (CD3⁺), тогда как доля NK-клеток (CD56⁺) минимальна.

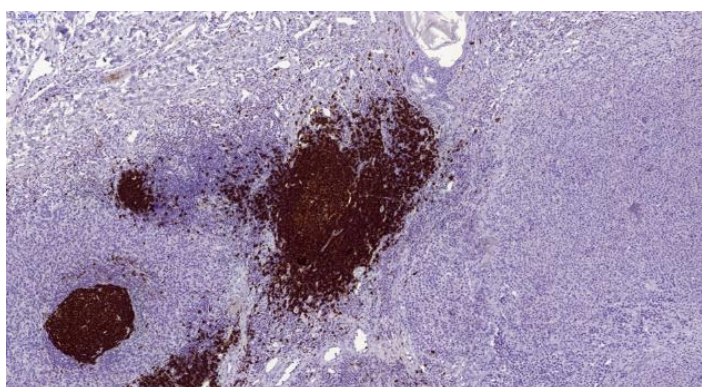


Рисунок 13 – В-клеточный компонент перитуморального инфильтрата меланомы кожи: CD20⁺ В-лимфоциты с формированием третичной лимфоидной структуры. Иммуногистохимическая реакция, ув. $\times 100$

При корреляционном анализе плотности субпопуляций лимфоцитов с клиничко-морфологическими параметрами МК (таблица 19) выявлен ряд статистически значимых взаимосвязей. Плотность CD3⁺ клеток

отрицательно коррелировала с диаметром первичной опухоли ($r = -0,314$; $p = 0,030$) и положительно – с наличием предшествующего невуса ($r = 0,338$; $p = 0,019$). Наличие предшествующего невуса также ассоциировалось с повышением плотности CD8⁺ лимфоцитов ($r = 0,331$; $p = 0,022$). Среди клинических проявлений заболевания установлены следующие корреляции: критерий «А» (асимметрия) отрицательно коррелировал с количеством CD56⁺ клеток ($r = -0,402$; $p = 0,005$); критерий «В» (неровные границы) положительно коррелировал с CD3⁺ клетками ($r = 0,308$; $p = 0,033$); критерий «Е» (эволюция) положительно коррелировал с CD20⁺ клетками ($r = 0,288$; $p = 0,047$). Обращает на себя внимание связь мутантного полиморфизма гена *MC1R* (Spn R163Q) с увеличением плотности CD4⁺ ($r = 0,396$; $p = 0,005$) и CD20⁺ ($r = 0,368$; $p = 0,010$) клеток, что может указывать на генетическую детерминированность иммунного ответа. Пол, возраст пациентов и стадия опухолевого процесса с плотностью распределения лимфоцитов взаимосвязаны не были.

Таблица 19 – Корреляционные взаимосвязи плотности субпопуляций Т–лимфоцитов при МК с клиничко–морфологическими особенностями

Параметры	CD 56+	CD8+	CD4+	CD3+	CD20+
Пол	$p = 0,381$ $r = 0,129$	$p = 0,626$ $r = -0,072$	$p = 0,903$ $r = -0,018$	$p = 0,655$ $r = 0,066$	$p = 0,919$ $r = -0,015$
Возраст	$p = 0,274$ $r = 0,161$	$p = 0,974$ $r = 0,005$	$p = 0,669$ $r = -0,063$	$p = 0,985$ $r = 0,003$	$p = 0,192$ $r = 0,192$
Стадия	$p = 0,596$ $r = -0,079$	$p = 0,850$ $r = 0,028$	$p = 0,881$ $r = 0,022$	$p = 0,743$ $r = 0,048$	$p = 0,970$ $r = -0,006$
Уровень по Breslow	$p = 0,955$ $r = 0,008$	$p = 0,681$ $r = 0,061$	$p = 0,392$ $r = 0,126$	$p = 0,959$ $r = 0,008$	$p = 0,387$ $r = 0,128$
Диаметр опухоли	$p = 0,543$ $r = -0,090$	$p = 0,054$ $r = -0,280$	$p = 0,085$ $r = -0,251$	$p = 0,030$ $r = -0,314$	$p = 0,124$ $r = -0,225$
Изъязвление	$p = 0,296$ $r = -0,154$	$p = 0,450$ $r = -0,112$	$p = 0,287$ $r = -0,157$	$p = 0,368$ $r = -0,133$	$p = 0,287$ $r = -0,157$
Связь МК с невусом	$p = 0,363$ $r = 0,134$	$p = 0,022$ $r = 0,331$	$p = 0,180$ $r = 0,197$	$p = 0,019$ $r = 0,338$	$p = 0,302$ $r = 0,152$

Параметры	CD 56+	CD8+	CD4+	CD3+	CD20+
Spn R163Q	p = 0,806 r = 0,036	p = 0,056 r = 0,277	p = 0,005 r = 0,396	p = 0,294 r = 0,155	p = 0,010 r = 0,368
Spn R151C	p = 0,544 r = 0,090	p = 0,869 r = 0,025	p = 0,729 r = 0,051	p = 0,578 r = 0,082	p = 0,324 r = 0,146
Spn R160W	p = 0,603 r = 0,077	p = 0,637 r = -0,070	p = 0,904 r = 0,018	p = 0,192 r = 0,191	p = 0,176 r = 0,199
Spn D294H	p = 0,085 r = -0,252	p = 0,282 r = -0,158	p = 0,488 r = -0,103	p = 0,818 r = -0,034	p = 0,785 r = 0,040
Spn I155T	p = 0,659 r = 0,065	p = 0,941 r = -0,011	p = 0,633 r = -0,071	p = 0,912 r = 0,016	p = 0,741 r = -0,049
Примечания: 1 r коэффициент корреляции; 2 p уровень статистической значимости					

Дальнейший анализ был направлен на изучение субпопуляционного состава инфильтрата в зависимости от степени лимфоидной инфильтрации (TILs), выделенной на предыдущем этапе исследования (таблица 20).

Таблица 20 – Сравнительная характеристика показателей уровней Т-лимфоцитов в перитуморальной зоне при различном уровне TILs

Лимфоциты	Уровень лимфоидной инфильтрации			
	Скудная TILs, М ± m	Умеренная TILs, М ± m	Выраженная TILs, М ± m	Выраженная TILs с формированием ТЛС, М ± m
CD56 на 1мм2	78,82 ± 53,41 (5,31-172,52)	62,45 ± 69,06 (7,52 -185,58)	132,75 ± 195,81 (9,59-1115,35)	83,41 ± 15,64 (72,36-94,47)
CD8 на 1мм2	1832,19 ± 1027,33 (998,10-3981,87)	1265,81 ± 881,94 (311,15-2611,88)	2344,36 ± 1596,92 (119,10-5364,61)	2490,73 ± 171,34 (2369,58-2611,88)
CD4 на 1мм2 *	2940,41 ± 1707,95 (836,59-6200,72)	1486,88 ± 1085,43 (250,91-3123,37)	3518,10 ± 2067,81 (817,79-9011,78)	3180,96 ± 1491,02 (2126,65-4235,27)
CD3 на 1мм2 *	4841,80 ± 2653,52 (1090,17-9241,51)	2274,61 ± 571,53 (507,68-4735,61)	4898,92 ± 2586,33 (790,06-10881,56)	4358,88 ± 1319,51 (1220,77-5852,01)
CD20 на 1 мм2	1230,11 ± 1256,00 (162,49-4195,36)	820,41 ± 1114,41 (21,29-3039,17)	5393,91 ± 1393,91 (3191,35-7596,46)	2945,59 ± 132,34 (2852,01-3039,17)
Примечание – * - различия статистически значимы				

При сравнении экспрессии маркеров CD⁺ на разных уровнях TILs достоверность различий оценивалась по H-критерию Краскела-Уоллиса ($p \leq 0,05$). Установлено, что количество исследованных субпопуляций лимфоцитов изменялось в зависимости от степени инфильтрации. Статистически значимые различия между группами были выявлены для CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов ($p < 0,05$). Для CD8⁺ и CD20⁺ клеток, несмотря на колебания средних значений, различия не достигли статистической значимости. Зарегистрирована прямая высокая корреляционная связь между количеством CD3⁺ и CD4⁺—лимфоцитов ($r = 0,820$), что свидетельствует о тесной сопряженности активации Т-хелперов и общего пула Т-клеток в перитуморальной зоне.

При анализе взаимосвязи субпопуляционного состава лимфоцитов с прогнозом заболевания (таблица 21) с помощью критерия Манна-Уитни статистически значимых различий в группах с прогрессированием и без него, а также в группах с летальным исходом и без него, не выявлено ($p > 0,05$ для всех сравнений).

При оценке средних значений обращает на себя внимание тенденция к повышению CD56⁺ и CD20⁺ лимфоцитов в группе пациентов с летальным исходом по сравнению с группой без прогрессирования, однако эти различия не являются статистически значимыми, что требует дальнейшего изучения на расширенной выборке.

Резюмируя результаты иммуногистохимического исследования, можно заключить следующее:

- В субпопуляционном составе перитуморального инфильтрата при МК преобладают зрелые Т-лимфоциты (CD3⁺). Содержание CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов сопоставимо между собой; количество CD20⁺ В-лимфоцитов уступает CD8⁺ клеткам, тогда как доля CD56⁺ NK-клеток минимальна.

- Выявлены корреляционные связи плотности лимфоцитарных субпопуляций с клинико-морфологическими параметрами: диаметром

первичной опухоли (отрицательная связь с CD3+), наличием предшественствующего невуса (положительная связь с CD3+ и CD8+), клиническими симптомами (асимметрия, границы, эволюция) и мутационным статусом гена *MC1R* (R163Q). Пол, возраст и стадия заболевания значимых корреляций с плотностью лимфоцитов не показали (рисунок 14).

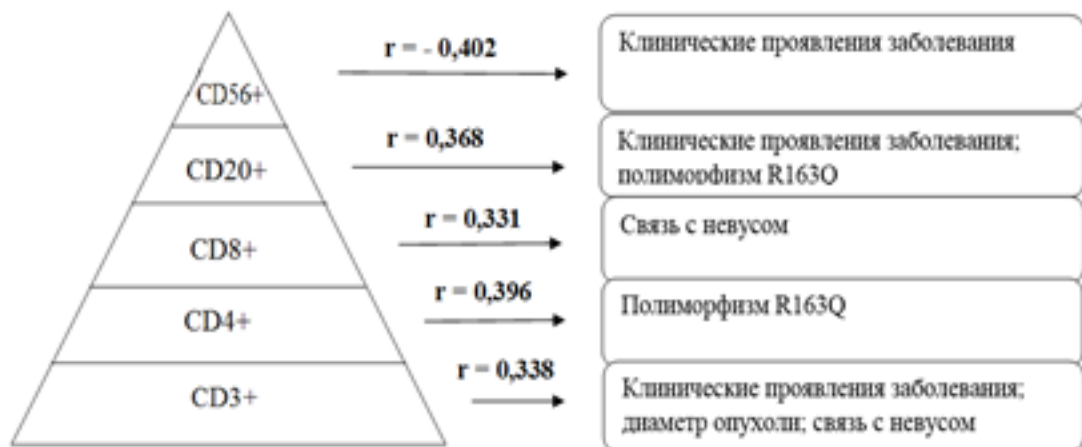


Рисунок 14 – Корреляция субпопуляций лимфоцитов с клинико-морфологическими параметрами

- Уровень TILs влияет на количественный состав субпопуляций: статистически значимые различия между группами с разной степенью инфильтрации установлены для CD3+ и CD4+ лимфоцитов. Выявленная высокая прямая корреляция между CD3+ и CD4+ клетками ($r = 0,820$) свидетельствует о согласованности Т-клеточного ответа в перитуморальной зоне (рисунок 15).

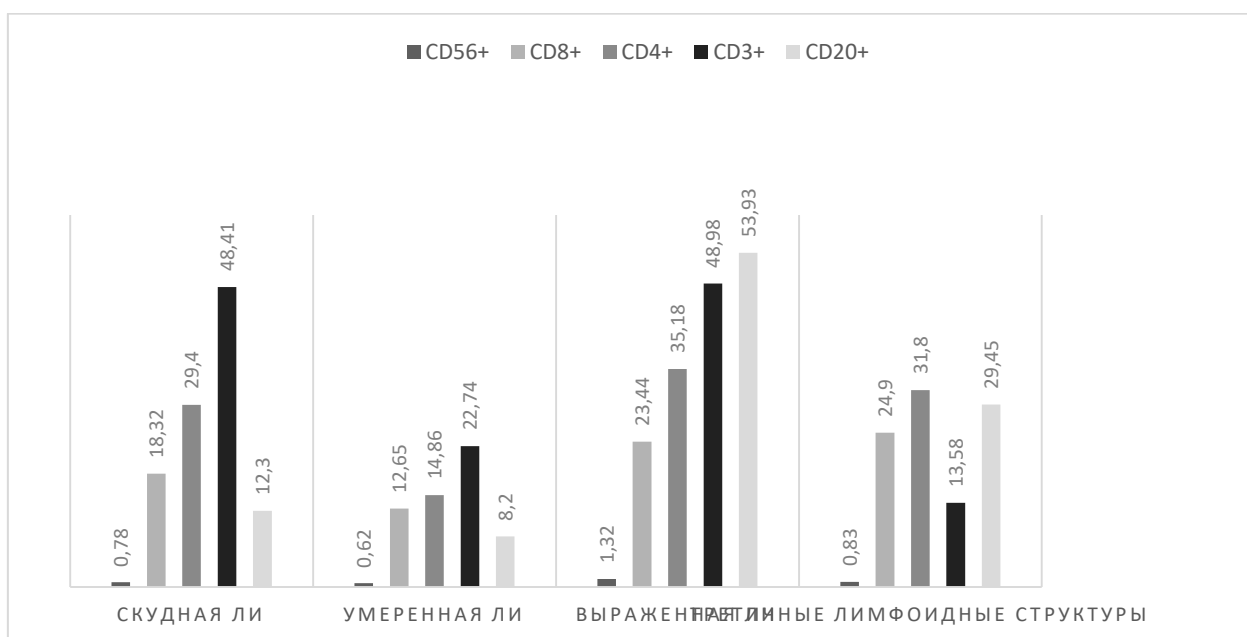


Рисунок 15 – Соотношение субпопуляций лимфоцитов (CD+) в перитуморальном инфильтрате при различной степени TILs

Статистически значимых различий в субпопуляционном составе лимфоцитов между группами пациентов с прогрессированием заболевания и без него, а также между группами с летальным исходом и без него, не обнаружено. Наблюдаемые тенденции (повышение CD20+ и CD56+ клеток при летальном исходе) требуют подтверждения на большей выборке и могут отражать сложную, неоднозначную роль этих субпопуляций в противоопухолевом иммунитете.

Таблица 21 – Сравнительная характеристика показателей уровней Т-лимфоцитов в перитуморальной зоне при различном исходе заболевания

Лимфоциты	Прогрессирование заболевания		p	Летальный исход		p
	Да M ± m (мин. – макс.)	Нет M ± m (мин. – макс.)		Да M ± m (мин. – макс.)	Нет M ± m (мин. – макс.)	
CD56 на 1мм2	123,59 ± 195,04 (7,52 – 1115,35)	93,45 ± 86,71 (5,31 – 378,52)	0,923	134,10 ± 223,79 (7,52 – 1115,35)	93,43 ± 79,03 (5,31 – 378,52)	0,992
CD8 на 1мм2	2052,15 ± 1374,22 (311,15– 5164,65)	2272,75 ± 1582,98 (119,10 – 5364,61)	0,698	2197,33 ± 1490,48 (369,81 – 5164,65)	2068,59 ± 1417,29 (119,10 – 5364,61)	0,781
CD4 на 1мм2	3161,61 ± 1938,19 (250,91– 9011,78)	3139,75 ± 2086,66 (817,79 – 8074,79)	0,829	3437,60 ± 2061,13 (408,84 – 9011,78)	2892,84 ± 1885,83 (250,91 – 8074,79)	0,297
CD3 на 1мм2	4457,35 ± 2331,44 (507,68– 9267,01)	4809,26 ± 3075,00 (790,06 – 10881,56)	0,880	4777,39 ± 2359,60 (772,06 – 9267,01)	4402,21 ± 2825,06 (507,68 – 10881,56)	0,403
CD20 на 1 мм2	1479,64 ± 1467,92 (21,29 – 5852,01)	1074,70 ± 854,53 (162,49 – 3039,17)	0,425	1488,06 ± 1497,06 (137,14 – 5852,01)	1196,53 ± 1076,32 (21,29 – 4195,36)	0,348

Примечание – p – различия статистически значимы

3.2.2 Взаимосвязь уровня лимфоидной инфильтрации с прогностическими факторами и выживаемостью при меланоме кожи

Для исследования взаимосвязей лимфогистиоцитарной инфильтрации с наиболее значимыми морфологическими факторами прогноза МК нами был проведен корреляционный анализ (рисунок 16). Установлено, что между степенью лимфоидной инфильтрации и диаметром опухоли, гистологическим типом, уровнем инвазии по Clark и Breslow имеется сильная отрицательная корреляционная связь ($p = 0,0001$): в более крупных и глубоко инвазивных опухолях лимфоидная инфильтрация была слабее. Между TILs и такими прогностическими факторами, как наличие изъязвления опухоли, сосудистая инвазия, нейротропизм, наличие микросателлитов и положительный край резекции, прослеживалась статистически значимая корреляция умеренной степени ($p = 0,005$).

Выявленные корреляции позволяют рассматривать уровень лимфоидной инфильтрации в качестве дополнительного морфологического маркера для оценки агрессивности опухоли и риска метастазирования: низкий уровень TILs ассоциирован с неблагоприятными прогностическими факторами и требует более интенсивного наблюдения за пациентами.



Рисунок 16 – Корреляционные связи TILs с морфологическими параметрами

При анализе общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (БСВ) с использованием метода Каплана-Мейера установлены статистически значимые различия в зависимости от степени TILs (таблица 22).

Таблица 22 – ОВ больных МК в зависимости от уровня TILs, мес

TILs	Среднее		95 % ДИ		p
	Оценка	Ст. ошибка	Нижняя гр.	Верхняя гр.	
Скудная	37,098	3,057	31,106	43,089	$p_{1-2} = 0,170$ $p_{1-3} = 0,153$ *$p_{1-4} = 0,0001$
Умеренная	42,028	2,385	37,353	46,704	$p_{2-1} = 0,170$ *$p_{2-3} = 0,005$ *$p_{2-4} = 0,0001$
Выраженная	68,250	4,293	39,836	76,664	$p_{3-1} = 0,153$ *$p_{3-2} = 0,005$ *$p_{3-4} = 0,0001$
ТЛС	58,077	1,886	54,381	61,773	*$p_{4-1} = 0,0001$ *$p_{4-2} = 0,001$ *$p_{4-3} = 0,0001$
Всего	51,363	2,905	40,669	57,057	
Примечание – * – есть статистически значимые различия					

Кумулятивная доля выживших пациентов составила: в группе со скудной TILs – 67,7 %, с умеренной TILs – 71,0 %, с выраженной TILs – 76,9 %, при наличии третичных лимфоидных структур – 96,2 % (различия достоверны согласно log-rank критерию). Точечная оценка средней длительности общей выживаемости была наибольшей в группе с выраженной инфильтрацией ($68,3 \pm 4,3$ мес.) и в группе с ТЛС ($58,1 \pm 1,9$ мес.), тогда как при скудной инфильтрации этот показатель составил лишь $37,1 \pm 3,1$ мес. ($p = 0,0001$) (рисунок 17).

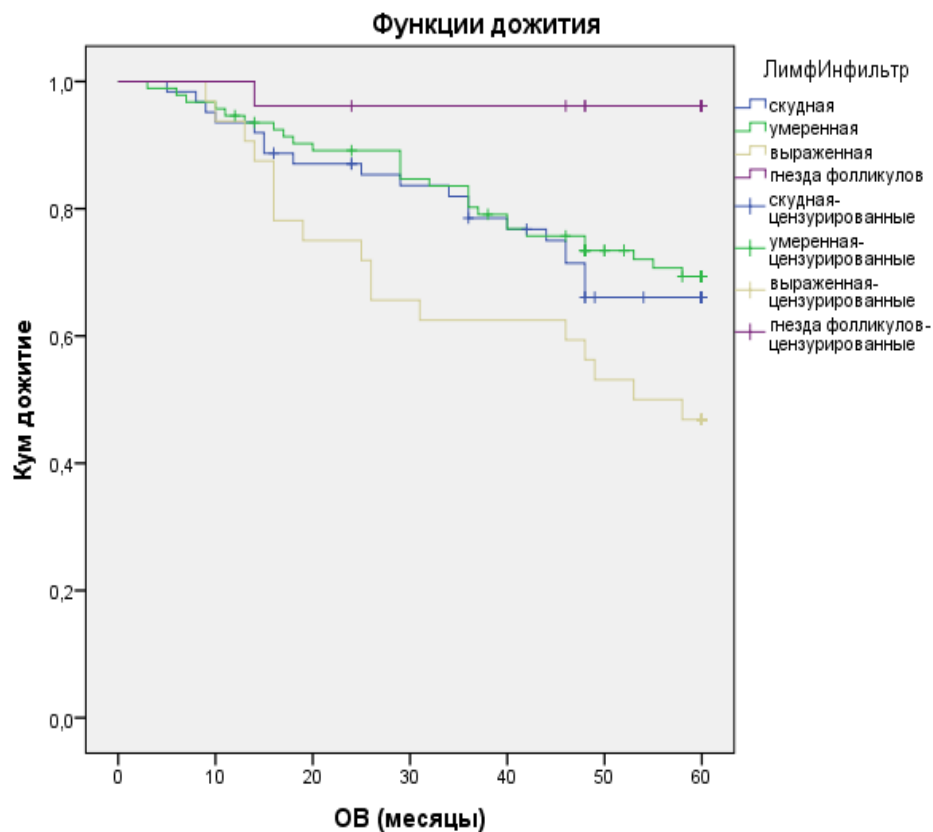


Рисунок 17 – Кривые Каплан–Майера общей выживаемости больных МК в зависимости от уровня TILs

При анализе бессобытийной выживаемости установлено, что доля цензурированных случаев составила: для скудной TILs – 46,8 %, для умеренной – 58,1 %, для выраженной – 74,4 %, для лимфоидных структур – 96,2 %. Выявлены статистически значимые различия БСВ между группами ($p = 0,001$, log-rank тест) (таблица 23, рисунок 18). Медиана БСВ в группах со скудной и умеренной инфильтрацией достигнута и составила 32,0 мес. (95 % ДИ 28,0-36,0) и 48,0 мес. (95 % ДИ 42,0-54,0) соответственно. В группах с выраженной инфильтрацией и ТЛС медиана БСВ не достигнута за 60 месяцев наблюдения. Наибольшая средняя длительность БСВ (ожидаемая продолжительность без прогрессирования, рассчитанная по кривой Каплана-Мейера) отмечена в группах с выраженной инфильтрацией ($62,97 \pm 2,5$ мес.) и третичными лимфоидными структурами ($58,23 \pm 1,7$ мес.), тогда как при

скудной инфильтрации этот показатель составил $49,59 \pm 2,2$ мес. (различия статистически значимы, $p = 0,001$, log-rank тест).

Таблица 23 – Бессобытийная выживаемость больных меланомой кожи в зависимости от уровня лимфоидной инфильтрации (TILs), мес.

TILs	Среднее		95 % ДИ		p по Бреслоу
	Оценка	Ст. ошибка	Нижняя гр.	Верхняя гр.	
Скудная	49,594	2,183	45,316	53,872	$p_{1-2} = 0,593$ $p_{1-3} = 0,092$ *$p_{1-4} = 0,007$
Умеренная	50,928	1,698	47,599	54,257	$p_{2-1} = 0,593$ *$p_{2-3} = 0,016$ *$p_{2-4} = 0,017$
Выраженная	62,969	2,497	46,114	69,824	$p_{3-1} = 0,092$ *$p_{3-2} = 0,016$ *$p_{3-4} = 0,0001$
ТЛС	58,231	1,735	54,830	61,631	*$p_{4-1} = 0,007$ *$p_{4-2} = 0,013$ *$p_{4-3} = 0,0001$
Всего	55,430	2,028	48,464	59,896	
Примечание – * есть статистически значимые различия					

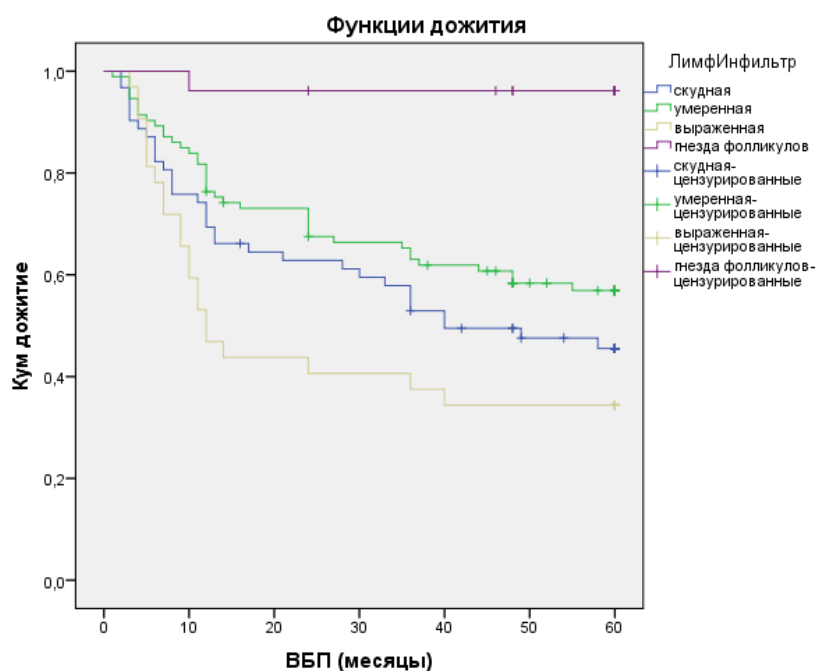


Рисунок 18 – Кривые Каплана–Майера бессобытийной выживаемости в зависимости от уровня TILs

Проведенный анализ подтвердил прогностическую значимость уровня лимфоидной инфильтрации (TILs) при меланоме кожи: установлены статистически значимые корреляционные связи между степенью TILs и основными морфологическими факторами прогноза (диаметр опухоли, глубина инвазии по Clark и Breslow, наличие изъязвления), при этом высокий уровень инфильтрации ассоциирован с более благоприятными морфологическими характеристиками. Показатели общей и бессобытийной выживаемости демонстрируют достоверные различия в зависимости от степени TILs: наилучшие результаты отмечены в группах с выраженной инфильтрацией и формированием лимфоидных структур (ОВ $68,3 \pm 4,3$ и $58,1 \pm 1,9$ мес. соответственно), тогда как при скудной инфильтрации зарегистрированы минимальные показатели выживаемости ($37,1 \pm 3,1$ мес.; $p = 0,0001$). Кумулятивная доля выживших пациентов прогрессивно возрастает от 67,7 % при скудной TILs до 96,2 % при наличии лимфоидных структур, что подтверждает целесообразность использования степени лимфоидной инфильтрации в качестве дополнительного прогностического маркера для стратификации пациентов с меланомой кожи.

3.3 Разработка и валидация прогностической модели риска летального исхода у больных меланомой кожи после радикального лечения на основе регрессии Кокса

3.3.1 Отбор прогностически значимых переменных на основе комплексного анализа изученных клинико–морфологических и молекулярно–генетических параметров

С целью отбора потенциальных предикторов течения МК был проведен сравнительный анализ в двух временных срезах. На первом этапе оценивались факторы, ассоциированные с риском прогрессирования (сравнение групп пациентов без признаков прогрессирования ($n = 119$) и с

Пол. Анализ распределения по полу выявил статистически значимые различия на обоих этапах исследования (таблица 24). В группе прогрессирования доля мужчин составила 48,9 %, тогда как в группе без метастазов – только 29,4 % ($p = 0,004$). С мужским полом ассоциирован более высокий риск прогрессирования МК (ОШ = 2,300; 95 % ДИ: 1,307-4,046). При анализе летальности эта тенденция усилилась: доля мужчин в группе умерших более чем в 2,8 раза превышала таковую среди выживших (ОШ = 2,841; 95 % ДИ: 1,557-5,186; $p < 0,001$). Выявленная корреляционная связь подтверждает, что мужской пол является неблагоприятным прогностическим фактором, в то время как женский пол демонстрирует протективный эффект, что согласуется с данными крупных эпидемиологических исследований [158, 159].

Показатель	Группа 1		Группа 2		χ^2	p	V Крамера
	n	%	N	%			
Женщины	84	70,6	48	51,1	8,495	0,004	V = 0,200
Мужчины	35	29,4	46	48,9			

Примечания:
1 p статистическая значимость различий;
2 χ^2 критерий согласия Пирсона;
3 V коэффициент Крамера;
4 r коэффициент корреляции

Возраст. Статистически значимого влияния возраста пациента на течение заболевания в обеих сравниваемых группах не обнаружено ($p > 0,05$).

Анамнестические факторы

Предшествующие заболевания кожи. Из всего спектра сопутствующей кожной патологии статистически значимые различия между группами были выявлены только для наличия в анамнезе атипичных невусов. Установлена обратная слабая корреляционная связь: присутствие атипичных невусов чаще встречалось в группе без прогрессирования ($p = 0,030$; $r = -0,148$; $V = 0,119$). Отношение шансов (ОШ = 0,497; 95 % ДИ: 0,240-0,980) указывает на то, что наличие атипичных невусов ассоциировано с меньшим риском прогрессирования уже верифицированной меланомы. Данный факт может быть связан с более тщательным динамическим наблюдением за такими пациентами и, как следствие, более ранней диагностикой первичной опухоли, что требует дальнейшего изучения. Влияния на летальность не выявлено ($p = 0,397$).

Сопутствующие злокачественные новообразования и семейный анамнез. При анализе сопутствующих ЗНО обнаружены статистически значимые различия между группами (таблица 25).

Впервые продемонстрирована значимая прямая корреляционная связь (средней силы) между наличием в анамнезе других ЗНО (в особенности, инвазивного рака молочной железы и опухолей головного мозга) и повышенным риском летального исхода у больных МК ($p = 0,008$; $V = 0,255$).

Наличие отягощенного семейного анамнеза по МК, напротив, было ассоциировано с риском прогрессирования заболевания (3,4 % в 1-й группе против 13,8 % во 2-й; $p = 0,005$), но не влияло на летальность ($p = 0,345$). Это может указывать на роль наследственной предрасположенности в агрессивности течения опухоли.

Таблица 25 – Сопутствующие ЗНО у пациентов с МК

Показатель	Группа 1		Группа 2		χ 2	р	V Крамера
	п	%	п	%			
Инвазивная карцинома молочной железы	2	1,4	5	7,7	13,845	0,008	0,255
Почечно–клеточный рак	3	2,0	0	0,0			
Папиллярный рак щитовидной железы	2	1,4	0	0,0			
Другие ЗНО	1	0,7	4	6,2			
Примечания: 1 р статистическая значимость различий; 2 χ² критерий согласия Пирсона; 2 V коэффициент Крамера							

Клинические факторы

При госпитализации статистически значимыми для прогноза оказались следующие клинические параметры.

Длительность клинических проявлений. В группе прогрессирования преобладали пациенты с длительностью симптомов от 3 до 12 месяцев (35,1 %), тогда как в благоприятной группе более половины пациентов (58,0 %) имели длительный анамнез заболевания (> 12 мес.) ($p = 0,006$) (таблица 26). Это может отражать как агрессивность опухоли, так и онкологическую настороженность пациентов.

Размер опухоли и симптомы. Средний диаметр пигментного образования во 2-й группе (с прогрессией) был достоверно больше ($18,0 \pm 10,54$ мм), чем в 1-й ($12,18 \pm 6,54$ мм; $p \leq 0,001$). Среди клинических признаков по системе ABCD только симптом «С» (изменение цвета) показал умеренно значимые различия между группами (72,3 % во 2-й группе против 57,4 % в 1-й; $p = 0,039$; ОШ = 1,935). Локализация первичной опухоли значимо не влияла на риск прогрессирования ($p > 0,05$).

Таблица 27 – Распределение стадий TNM в зависимости от исхода заболевания

Показатель		Группа 1		Группа 2		χ^2	p	V Крамера
		n	%	n	%			
Стадия процесса	IA	43	36,1	7	7,4	51,644	0,001	V= 0,492 r = 0,476
	I B	21	17,6	7	7,4			
	II A	24	20,2	14	14,9			
	II B	8	6,7	19	20,2			
	II C	11	9,2	22	23,4			
	III A	4	3,4	2	2,1			
	III B	4	3,4	6	6,4			
	III C	3	2,5	7	7,4			
	III D	0	0,0	3	3,2			
	IV	1	0,8	7	7,4			

Примечания:

1 p статистическая значимость различий;

2 χ^2 критерий согласия Пирсона;

3 V коэффициент Крамера;

4 r коэффициент корреляции

Толщина опухоли по Бреслоу и уровень инвазии по Кларку. Толщина первичной опухоли по Бреслоу (таблица 28) и уровень инвазии по Кларку (таблица 29) показали высокую прогностическую значимость ($p \leq 0,0001$). Сила корреляции для обоих показателей сопоставима ($r = 0,493$ для Бреслоу и $r = 0,464$ для Кларка), что позволяет рассматривать уровень инвазии по Кларку как самостоятельный важный предиктор наряду с индексом Бреслоу, особенно для тонких меланом [171, 182, 183].

Уровень	Группа 1		Группа 2		χ^2	p	VKрамера
	n	%	n	%			
StageI	33	27,7	4	4,3	48,703	0,0001	V = 0,478 r = 0,493
StageII	28	23,5	10	10,6			
Stage III	22	18,5	10	10,6			
Stage IV	15	12,6	15	16,0			
Stage V	21	17,6	55	58,5			
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент Крамера; 4 r коэффициент корреляции							

Таблица 29 – Уровень инвазии по Кларку в группах сравнения

Уровень	Группа 1		Группа 2		χ^2	p	VKрамера
	n	%	n	%			
0	2	1,7	0	0,0	53,249	0,0001	V = 0,500 r= 0,464
1	23	19,3	3	3,2			
2	45	37,8	12	12,8			
3	36	30,3	33	35,1			
4	8	6,7	23	24,5			
5	5	4,2	23	24,5			
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент Крамера; 4 r коэффициент корреляции							

Гистологические особенности. Агрессивное течение заболевания ассоциировано с узловым и лентиги-меланомой гистотипами, наличием изъязвления, сосудистой инвазии, нейротропизма, микросателлитов и вертикальной фазой роста (таблица 30).

Наличие выраженной TILs, напротив, коррелировало с более благоприятным прогнозом ($r = -0,179$; $p = 0,0001$ для летального исхода), что подтверждает роль противоопухолевого иммунного ответа [193, 194]. Связь с предшествующим невусом чаще встречалась в группе без прогрессирования ($r = -0,190$; $p = 0,009$).

Молекулярно-генетические факторы

Обнаружена крайне сильная статистически значимая ассоциация между наличием мутации BRAF V600E в опухоли и риском прогрессирования заболевания ($p < 0,0001$; $V = 0,849$) (таблица 31). В группе пациентов с метастазами мутация выявлялась значительно чаще (31,9 % против 3,4 % в группе без прогрессии), что согласуется с данными о связи данного

генетического события с более агрессивными фенотипами опухоли [154, 155].

Таблица 30 – Сравнительный анализ гистологических характеристик опухоли

Показатель		Группа 1		Группа 2		χ 2	p	VKрамера
		п	%	п	%			
Гистотип	ПР	66	55,5	10	10,6	51,503	0,0001	V = 0,492
	Узл	40	33,6	52	55,3			
	Лен	12	10,1	30	31,9			
	Десм	1	0,8	0	0,0			
	Нев	0	0,0	2	2,1			
Митотический индекс		20	16,8	4	4,3	8,275		
Изъязвление		32	26,9	60	63,8	29,205	0,0001	V= 0,370 r= 0,362
Радиальный рост		63	52,9	13	13,8	35,005	0,0001	V= 0,405 r= 0,450
Вертикальный рост		56	47,1	81	86,2			
Сосудистая инвазия		7	5,9	26	27,7	19,023	0,0001	V= 0,299 r= 0,319
Нейротропизм		1	0,8	6	6,4	5,076	0,024	V= 0,154 r= 0,151
Микросателлиты		6	5,0	13	13,8	4,992	0,025	V= 0,153 r= 0,146
Связь с невусом		39	32,8	16	17,0	6,803	0,009	V= 0,179 r= −0,190
TILs	Скудная	29	24,4	33	35,1	25,372	0,0001	V= 0,345 r= −0,179
	Умеренная	54	45,4	39	41,5			
	Выраженная	11	9,2	21	22,3			
	ТЛС	25	21,0	1	1,1			

Примечания:

1 p статистическая значимость различий;

2 χ^2 критерий согласия Пирсона;

3 V коэффициент Крамера;

4 r коэффициент корреляции

5 ПР поверхностно–распространяющая меланома;

6 Узл узловая форма меланомы;

7 Лен лентиго–меланома;

8 Десм десмопластическая форма меланомы;

9 Нев невоидная форма меланомы;

10 ЛИ лимфоидная инфильтрация

Таблица 31 – Частота выявления мутации *BRAF V600E* в исследуемых группах

Показатель	Группа 1		Группа 2		χ^2	p	V Крамера
	n	%	n	%			
Положительно	4	3,4	30	31,9	153,566	0,0001	0,849
Отрицательно	6	5,0	58	61,7			
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 χ^2 критерий согласия Пирсона; 3 V коэффициент Крамера							

Обобщенные данные о корреляции клинико-морфологических признаков с прогнозом заболевания представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Корреляция клинико–морфологических признаков с прогрессированием болезни и риском летального исхода

Показатель	Прогрессия		Летальный исход	
	r	p	r	p
Наличие атипических невусов в анамнезе	–0,148	0,030	–0,058	0,397
Сопутствующие ЗНО патологии	0,087	0,008	0,143	0,037
Отягощенный семейный анамнез	0,133	0,05	–0,065	0,345
Клинические симптомы болезни	–0,214	0,031	–0,143	0,038
Наличие лимфоидной инфильтрации	–0,179	0,009	–0,179	0,0001
Примечания: 1 p статистическая значимость различий; 2 r коэффициент корреляции				

Анализ показал, что спектр факторов, ассоциированных с риском прогрессирования, оказался шире и включал, помимо патоморфологических характеристик опухоли, такие анамнестические параметры, как наличие атипических невусов (защитный эффект) и отягощенный семейный анамнез по МК. В свою очередь, риск летального исхода в большей степени определялся факторами, отражающими агрессивность опухолевого процесса и системный ответ организма: мужской пол, сопутствующие ЗНО и, наиболее значимо, выраженность лимфоидной инфильтрации ($r = -0,179$; $p = 0,0001$). В результате однофакторного анализа идентифицирован широкий спектр параметров, значимо связанных с течением меланомы кожи. Наряду с хорошо известными факторами (пол, толщина по Бреслоу, изъязвление, стадия TNM), на исследуемой популяции подтверждена прогностическая роль уровня инвазии по Кларку, лимфоидной инфильтрации и мутации *BRAF V600E*. К числу новых или требующих дальнейшего осмысления находок можно отнести выявленную обратную корреляцию между наличием атипических невусов и риском прогрессирования, а также прямую связь отягощенного онкологического анамнеза (другие ЗНО) с повышенной летальностью. Выявленные факторы послужат основой для построения многофакторной регрессионной модели Кокса с целью оценки их независимого вклада в прогноз пятилетней выживаемости пациентов с МК.

3.3.2 Многофакторный анализ выживаемости больных меланомой кожи

Обнаружение отдельных фенотипических, морфологических и молекулярно-генетических признаков при меланоме кожи не позволяет с достаточной точностью прогнозировать вероятность прогрессирования заболевания и идентифицировать пациентов с высоким риском метастазирования. Для решения этой задачи целесообразно применение методов многомерного регрессионного анализа, позволяющих оценить

независимый вклад каждого фактора в динамику риска развития неблагоприятных исходов во времени.

С использованием пошагового алгоритма были построены две многомерные модели пропорциональных рисков Кокса. В качестве конечных точек выбраны бессобытийная выживаемость (БСВ, как суррогатный маркер прогрессирования) и общая выживаемость (ОВ) пациентов после лечения.

Модель прогнозирования бессобытийной выживаемости (БСВ). В финальную модель вошли пять независимых предикторов, достоверно ухудшающих БСВ (таблица 33). В многофакторной регрессионной модели Кокса в качестве предикторов, оказывающих негативное влияние на длительность бессобытийной выживаемости после лечения меланомы кожи, были определены: диаметр опухоли в мм (HR = 1,03; 95 % ДИ 1,01-1,05), уровень инвазии по Clark (HR = 1,53; 95 % ДИ 1,24-1,89), наличие мутантного аллеля гена I155T (HR = 3,32; 95 % ДИ 1,49-7,36), выполнение нерадикальной операции (HR = 2,29; 95 % ДИ 1,23-4,27), отсутствие иммунотерапии (HR = 4,26; 95 % ДИ 2,69 -6,72).

Таблица 33 – Переменные регрессионной модели Кокса при оценке влияния факторов на длительность бессобытийной выживаемости у больных МК после лечения

Предикторы	β	Стд. ошибка	χ^2 Вальда	Знач. (p)	HR	95 % ДИ для HR	
						Нижняя	Верхняя
D, mm	0,03	0,01	4,91	0,027	1,03	1,01	1,05
Cl, уровни	0,43	0,12	15,72	< 0,001	1,53	1,24	1,89
I155T (мут. аллель)	1,20	0,41	8,72	0,003	3,32	1,49	7,36
Операция	0,83	0,32	6,86	0,009	2,29	1,23	4,27
Иммуно–терапия	1,45	0,23	38,63	< 0,001	4,26	2,69	6,72
Примечание – HR – отношение рисков							

В результате построения ROC-кривой для оценки прогностической способности модели была рассчитана площадь под кривой (AUC). Её

значение составило $0,573 \pm 0,042$ (95 % доверительный интервал: 0,490-0,655; $p = 0,071$). Полученный результат свидетельствует о низком прогностическом качестве разработанной модели (рисунок 19).

При построении регрессионной модели Кокса с целью прогнозирования пятилетней выживаемости пациентов у больных МК после лечения было выявлено 9 статистически значимых предикторов, включенных в данную модель (таблица 34).

Факторами, наиболее точно отражающими риск возможного снижения выживаемости после лечения пациентов по поводу меланомы кожи, являются группа риска (HR = 1,70; ДИ 95 % 1,09-2,64), критерий М (HR = 2,65; ДИ 95 % 1,00-7,16), уровень инвазии по Clark (HR = 1,39; ДИ 95 % 1,04-1,88), скудная лимфоидная инфильтрация (HR = 1,53; ДИ 95 % 1,11-2,12), наличие мутантного аллеля гена *D294H* (HR = 4,03; ДИ 95 % 1,09-2,64), наличие мутантного аллеля гена *I155T* (HR = 4,05; ДИ 95 % 1,44-11,38), наличие местных метастазов (HR = 2,28; ДИ 95 % 1,18-4,41), количество метастазов (HR = 2,08; ДИ 95 % 1,57-2,763).

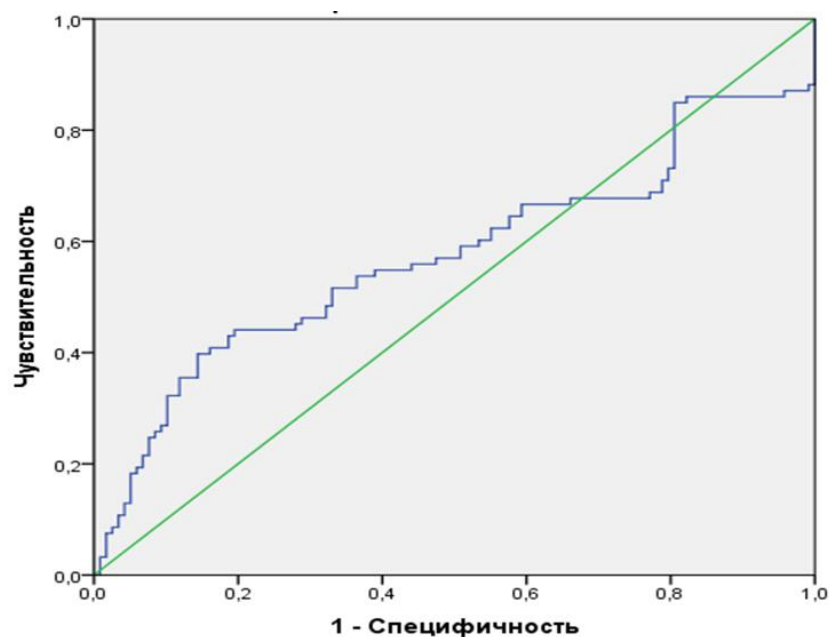


Рисунок 19 – ROC-кривая регрессионной модели Кокса прогнозирования БСВ у больных МК после лечения

Таблица 34 – Переменные регрессионной модели Кокса при оценке влияния факторов на показатели выживаемости после лечения меланомы кожи

Предикторы	β	Стд. ошибка	χ^2 Вальда	Знач. (p)	HR	95 % ДИ для HR	
						Нижняя	Верхняя
Возрастная группа	-0,32	0,11	8,58	0,003	0,73	0,59	0,90
Группа риска	0,53	0,22	5,61	0,018	1,71	1,09	2,64
M	0,97	0,51	3,69	0,050	2,65	1,001	7,16
Cl, уровни	0,33	0,15	4,82	0,028	1,39	1,03	1,88
Лимфоидная инфильтрация	0,43	0,16	6,89	0,009	1,53	1,11	2,12
mD294H	1,39	0,41	11,50	0,001	4,03	1,80	9,02
mI155T	1,40	0,53	7,04	0,008	4,05	1,44	11,38
Mts местные	0,82	0,34	6,03	0,014	2,28	1,18	4,41
Mts количество	0,73	0,14	25,78	< 0,001	2,08	1,57	2,76
Примечание – HR отношение рисков							

Принадлежность пациента к более старшим возрастным группам, напротив, повышает вероятность выживаемости (HR = 0,73; ДИ 95 % 0,59-0,90), что, вероятно, может быть обусловлено меньшей биологической агрессивностью опухолевого процесса у пожилых либо конкурентных причин смерти.

На основании построенной ROC-кривой установлено, что AUC равен $0,78 \pm 0,03$ (95 % ДИ 0,71-0,85; $p < 0,001$). Это демонстрирует хорошую прогностическую точность модели, разработанной на основе данных факторов (рисунок 20).

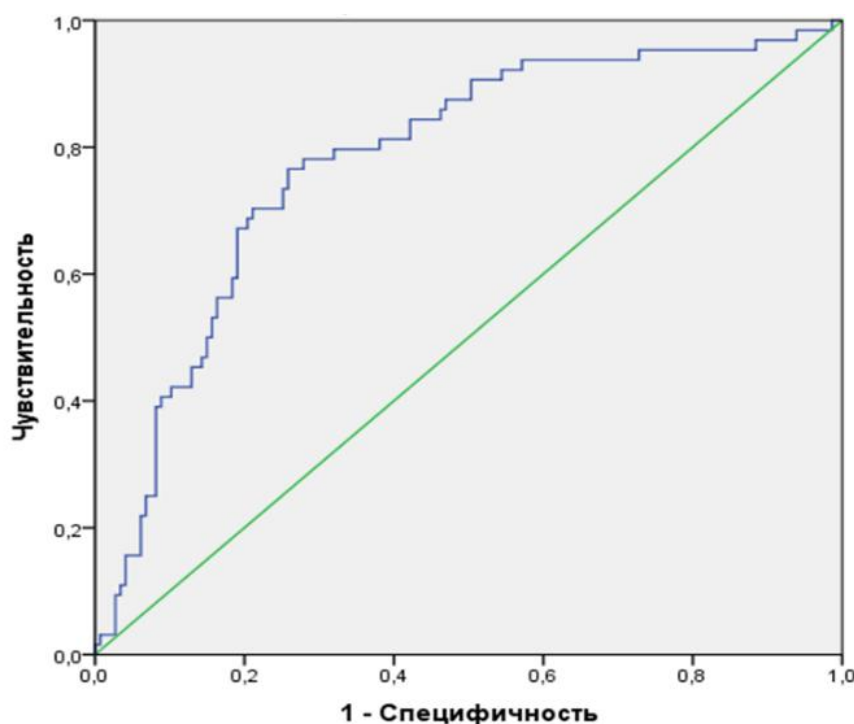


Рисунок 20 – ROC-кривая регрессионной модели Кокса прогнозирования показателей выживаемости у больных МК после лечения

На основе анализа регрессионных моделей Кокса можно сделать следующие выводы.

Факторы, ухудшающие бессобытийную выживаемость:

1. Диаметр опухоли (D): увеличение диаметра на 1 мм увеличивает риск прогрессирования на 3 % (HR = 1,03; 95 % ДИ 1,01-1,05).
2. Уровень инвазии по Clark: более высокий уровень инвазии увеличивает риск на 53 % (HR = 1,53; 95 % ДИ 1,24-1,89).
3. Мутация I155T: наличие мутантного аллеля увеличивает риск более чем в 3 раза (HR = 3,32; 95 % ДИ 1,49-7,36).
4. Нередикальная операция: выполнение нерадикального хирургического вмешательства увеличивает риск более чем вдвое (HR = 2,29; 95 % ДИ 1,23-4,27).
5. Отсутствие иммунотерапии: отсутствие адъювантной терапии повышает риск более чем в 4 раза (HR = 4,26; 95 % ДИ 2,69-6,72).

Факторы, ассоциированные с общей выживаемостью:

1. Молекулярные мутации (*I155T* и *D294H*) являются наиболее сильными предикторами неблагоприятного исхода, увеличивая риск летальности в 4 раза.

2. Параметры опухоли (уровень инвазии по Clark), статус метастазирования (наличие отдаленных и местных метастазов, их количество) и качество хирургического лечения также вносят независимый вклад в прогноз.

3. Низкий уровень лимфоидной инфильтрации подтвержден как независимый фактор неблагоприятного течения.

4. Старший возраст пациентов ассоциирован с парадоксальным снижением риска ($HR = 0,73$), что требует дальнейшего изучения.

Модель прогнозирования общей выживаемости продемонстрировала высокую прогностическую точность ($AUC = 0,78$) и может быть рекомендована для стратификации риска в клинической практике, в то время как модель бессобытийной выживаемости требует доработки ввиду низкой предсказательной способности ($AUC = 0,573$; $p = 0,071$).

Включение выявленных факторов в клиническую практику позволяет более точно оценивать риск прогрессирования и летального исхода у пациентов с меланомой кожи для персонализации наблюдения и лечебной тактики.

3.3.3 Построение интегральных прогностических моделей на основе логистической регрессии для стратификации риска прогрессирования и летального исхода при меланоме кожи

Для количественной оценки риска развития неблагоприятных исходов у пациентов с меланомой кожи после лечения были разработаны две логистические регрессионные модели, позволяющие прогнозировать вероятность прогрессирования заболевания и летального исхода в течение пятилетнего периода наблюдения.

Модель прогнозирования прогрессирования меланомы кожи

С учетом данных наблюдения 213 пациентов, включенных в анализ, была построена логистическая регрессионная модель прогнозирования прогрессии опухоли в течение пятилетнего наблюдения пациентов после лечения меланомы кожи, формула (1):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-3,203 + 0,701x_1 + 0,706x_2 + 0,835x_3)}}$$

где

- p – вероятность прогрессии опухоли;
- x_1 – уровень инвазии по Кларку (от 1 до 5);
- x_2 – наличие изъязвления опухоли (0 – нет, 1 – да);
- x_3 – фаза роста (0 – радиальная, 1 – вертикальная).

Модель является статистически значимой ($\chi^2 = 225,06$; $p < 0,001$). Предикторы, включенные в модель, согласуются с наблюдаемыми частотами событий в исследуемой выборке, критерия Хосмера–Лемешоу ($\chi^2 = 3,444$; $p = 0,751$). Данные, характеризующие логистическую модель, представлены в таблице 35.

В таблице 35 представлены ключевые предикторы прогрессии, статистически значимо повышающие ее вероятность от 2,015 до 2,305 раз. Коэффициент детерминации Найджелкерка (R^2) составил 0,353, что показывает статистически значимое объяснение данными предикторами 35,3 % вариации зависимой переменной.

Таблица 35 – Факторы прогнозирования МК (логистическая регрессионная модель)

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	p	OR	95 % Доверит. интервал для OR	
						Нижняя	Верхняя
Cl уровни	0,701	0,179	15,277	< 0,001	2,015	1,418	2,864
Изъязвление	0,706	0,347	4,143	0,042	2,025	1,026	3,994

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	p	OR	95 % Доверит. интервал для OR	
						Нижняя	Верхняя
Фаза роста	0,835	0,420	3,944	0,047	2,305	1,011	5,254
Константа	-3,203	0,518	38,265	0,001	0,041		
Примечание – OR (odds ratio) – отношение шансов							

Модель обладает специфичностью 78,8 % (способность правильно предсказывать отсутствие прогрессии) и чувствительностью 68,8 % (точность прогнозирования прогрессии). Общая точность модели составила 74,4 %. По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,805 \pm 0,030$ (95 % ДИ 0,746-0,864; $p < 0,001$), что соответствует хорошему качеству прогностической модели (рисунок 21).

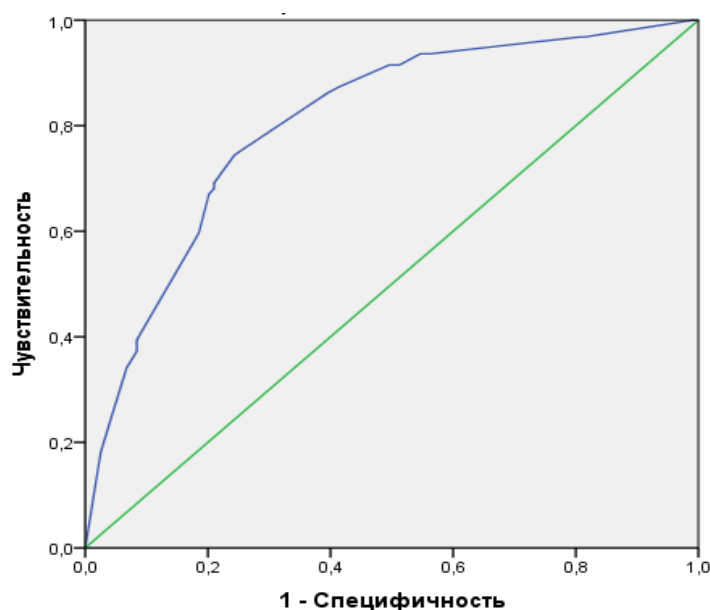


Рисунок 21 - ROC-кривая модели прогнозирования прогрессии МК

Модель прогнозирования летального исхода при меланоме кожи

Модель, описывающая результаты прогнозирования летального исхода в течение пятилетнего периода наблюдения после лечения меланомы кожи на основании включения 6 наиболее значимых предикторов, может быть выражена следующим уравнением, формула (2):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(5,989 + 1,907x_1 + 0,604x_2 + 1,630x_3 + 0,578x_4 + 1,638x_5 + 0,930x_6)}}$$

где

- p – вероятность смерти пациента;
- x_1 – наличие других злокачественных новообразований в семейном анамнезе (0 – нет, 1 – да);
- x_2 – уровень инвазии по Кларку (от 1 до 5);
- x_3 – наличие сосудистой инвазии (0 – нет, 1 – да);
- x_4 – степень лимфоидной инфильтрации (0 – скудная, 1 – умеренная, 2 – выраженная, 3 – третичные лимфоидные структуры); увеличение степени (более выраженная инфильтрация) ассоциировано со снижением риска;
- x_5 – наличие местных метастазов (0 – нет, 1 – да);
- x_6 – количество метастазов (от 0 до 3).

Модель является согласованной с используемыми данными (критерий Хосмера–Лемешоу: $\chi^2 = 8,013$; $p = 0,432$) и статистически значимой ($\chi^2 = 128,09$; $p < 0,001$). Подробное описание предикторов представлено в таблице 36.

В таблице 36 представлены предикторы, статистически значимо повышающие вероятность летального исхода в течение пятилетнего периода после лечения меланомы. Наибольшие значения отношения шансов определены для наличия других ЗНО в семейном анамнезе (OR = 6,731; 95 % ДИ 1,455-31,128), наличия местных метастазов (OR = 5,145; 95 % ДИ 1,901-13,925) и наличия сосудистой инвазии (OR = 5,104; 95 % ДИ 1,378-18,899). Степень лимфоидной инфильтрации (OR = 1,78; 95 % ДИ 1,04-3,06) демонстрирует защитный эффект: чем более выражена инфильтрация, тем ниже риск.

Таблица 36 – Факторы прогнозирования смерти от меланомы кожи
(логистическая регрессионная модель)

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	p	OR	95 % Доверит. интервал для OR	
						Нижняя	Верхняя
ЗНО в семейном анамнезе	1,91	0,78	5,95	0,015	6,73	1,45	31,13
Cl, уровни	0,61	0,23	6,75	0,009	1,83	1,16	2,88
Сосудистая инвазия	1,63	0,67	5,95	0,015	5,11	1,38	18,89
Степень ЛИ	0,58	0,27	4,38	0,036	1,78	1,04	3,06
Наличие местных Mts	1,64	0,51	10,39	0,001	5,14	1,90	13,92
Количество Mts	0,93	0,22	18,29	< 0,001	2,54	1,65	3,88
Константа	-5,99	1,03	33,91	< 0,001	0,003		
Примечание – OR (odds ratio) – отношение шансов							

Коэффициент детерминации (R^2) составил 0,644, что показывает статистически значимое объяснение наступления летального исхода включенными предикторами на 64,4 %. Модель обладает высокой специфичностью (89,1 %) и чувствительностью (71,9 %). Общий процент корректных предсказаний составил 83,9 %.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,927 \pm 0,018$ (95 % ДИ 0,892-0,961; $p < 0,001$), что соответствует отличному качеству прогностической модели (рисунок 22).

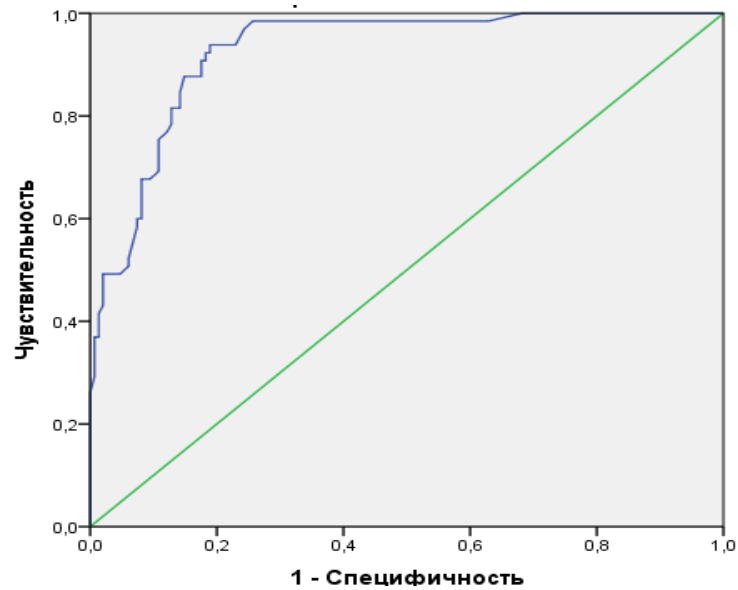


Рисунок 22 – ROC-кривая модели прогнозирования смерти от МК

Дополнительный анализ предикторов летального исхода методом деревьев решений

Для идентификации наиболее значимых предикторов и визуализации их иерархии дополнительно применено моделирование в форме деревьев решений с использованием методов интеллектуального анализа данных (data mining). Наиболее существенным прогностическим фактором летального исхода является наличие местных метастазов (рисунок 23).

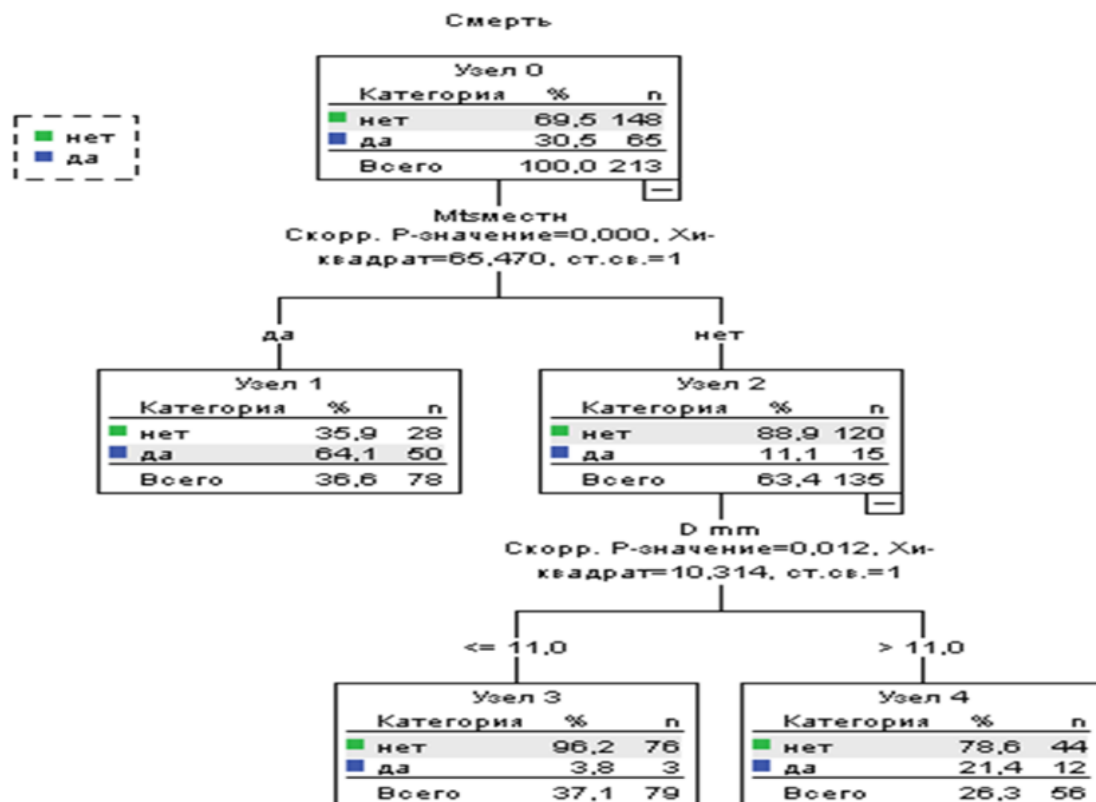


Рисунок 23 – Прогноз летального исхода у пациентов с меланомой кожи на основе дерева решений

При их отсутствии наиболее весомым фактором выступает диаметр опухоли (≤ 11 мм или > 11 мм). Общая мера риска ошибки модели составила $0,202 \pm 0,028$. Чувствительность модели (точность прогнозирования летального исхода) достигла 76,9 %, специфичность (способность предсказывать отсутствие исхода) – 81,1 %. Общий процент корректных предсказаний составил 79,8 %.

По результатам ROC-анализа (рисунок 24) площадь под кривой (AUC) составила $0,831 \pm 0,029$ (95 % ДИ 0,773-0,888; $p < 0,001$). Полученное значение соответствует высокому уровню прогностической ценности модели, подтверждая роль местных метастазов как ведущего фактора неблагоприятного исхода, что полностью согласуется с результатами логистической регрессионной модели.

Таким образом, разработаны две прогностические модели на основе логистической регрессии:

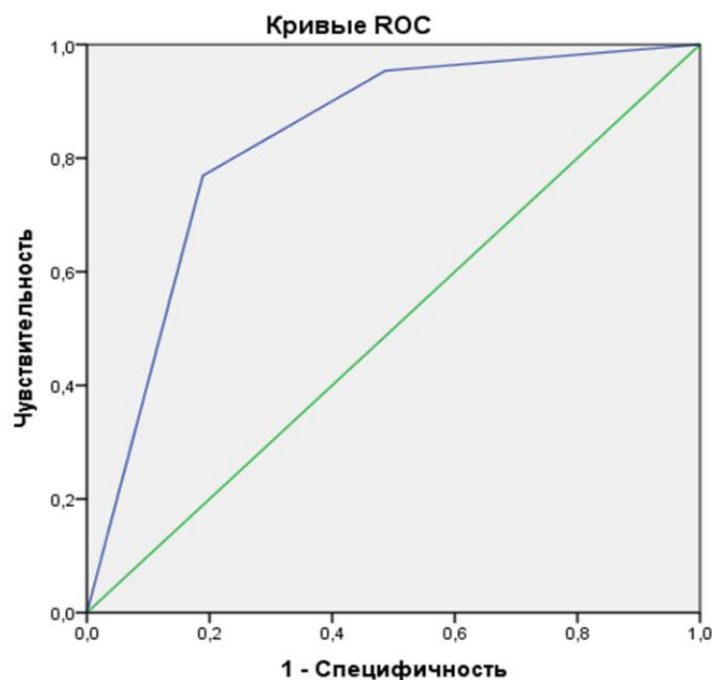


Рисунок 24 – ROC-кривая модели прогнозирования летального исхода методом дерева решений

1. *Модель прогнозирования прогрессирования* включает уровень инвазии по Кларку, наличие изъязвления и фазу роста. Модель характеризуется чувствительностью 68,8 %, специфичностью 78,8 % и $AUC = 0,805$, что соответствует очень хорошему качеству.
2. *Модель прогнозирования летального исхода* включает наличие других ЗНО в семейном анамнезе, уровень инвазии по Кларку, сосудистую инвазию, степень лимфоидной инфильтрации, наличие и количество местных метастазов. Модель характеризуется чувствительностью 71,9 %, специфичностью 89,1 % и $AUC = 0,927$, что соответствует отличному качеству.
3. *Древо решений* подтвердило ключевую роль местных метастазов как ведущего фактора прогноза ($AUC = 0,831$), продемонстрировав

сопоставимые с логистической регрессией прогностические характеристики (чувствительность 76,9 %, специфичность 81,1 %).

Разработанные модели обладают высокими прогностическими характеристиками и могут быть рекомендованы для стратификации риска и персонализации лечебной тактики у пациентов с меланомой кожи.

Для внедрения в клиническую практику и разработки практических рекомендаций выбрана модель прогнозирования летального исхода как обладающая наибольшей специфичностью (89,1 %) и прогностической точностью ($AUC = 0,927$), что позволяет с высокой надежностью идентифицировать пациентов с максимальным риском неблагоприятного исхода для персонализации наблюдения и лечебной тактики.

3.4 Разработка персонализированного алгоритма динамического наблюдения пациентов с меланомой кожи с учётом генетического и фенотипического профиля

3.4.1 Оценка непосредственных и отдаленных результатов комбинированного лечения больных меланомой кожи

Среди пациентов, включенных в исследование, показатель общей 5-летней выживаемости достиг 69,5 %. При этом средняя продолжительность жизни в данной когорте составила $50,21 \pm 1,16$ месяца (95 % доверительный интервал: 47,93-52,49).

При анализе показателя бессобытийной выживаемости (БСВ) в общей когорте пациентов 55,9 % наблюдений были отнесены к цензурированным данным. Расчетное среднее время до возникновения рецидива или прогрессирования заболевания, оцененное методом Каплана-Майера, равнялось $40,48 \pm 1,63$ месяца (95 % ДИ: 37,30-43,67). Согласно данным, полученным с использованием метода Каплана-Майера, вероятность 5-

летней безрецидивной выживаемости среди всех пролеченных пациентов с меланомой кожи составила 56 %.

Однако при детальном анализе фактических сроков возникновения рецидивов (таблица 37) выявлено, что в реальной клинической практике у пациентов с верифицированным прогрессированием заболевание манифестирует существенно раньше: среднее время до наступления события составило $29,49 \pm 8,47$ месяца (здесь и далее для подгруппы пациентов с зарегистрированным прогрессированием, $n = 98$), тогда как интегральный показатель, оцененный методом Каплана–Майера для всей когорты с учетом цензурированных данных, равнялся $40,48 \pm 1,63$ месяца. Полученные данные свидетельствуют, что рецидив или прогрессирование патологии в 55,1 % случаев наступают в течение первого года после завершения терапии.

Таблица 37 – Распределение больных МК по времени прогрессирования заболевания

Время (месяцы)	n	%
3-6	27	27,55
6-12	27	27,55
12-24	16	16,33
24-60	28	28,57
Всего	98	100

При оценке путей метастазирования установлено, что метастазы в мягкие ткани и регионарные лимфатические узлы встречались в 2,6 раза чаще, чем висцеральные метастазы. Всем пациентам с диагностированным метастатическим процессом была проведена специализированная противоопухолевая терапия: при наличии активирующей мутации в кодоне V600E гена *BRAF* назначались ингибиторы BRAF-киназы, при отсутствии мутации или прогрессировании на таргетной терапии применялась иммунотерапия (в том числе комбинированная).

Выявленные закономерности (55 % рецидивов в первый год, различие в сроках прогрессирования) обосновывают необходимость дифференцированного подхода к наблюдению. Это послужило основой для разработки персонализированной стратификации риска на основе генетических и фенотипических маркеров, представленной в следующем разделе.

3.4.2 Стратификация пациентов на группы риска с учетом их генетического и фенотипического профиля, оценка риска прогрессирования МК после радикального лечения

Современные клинические рекомендации предлагают унифицированные схемы наблюдения за пациентами с меланомой кожи, основанные преимущественно на стадии заболевания по системе AJCC/TNM. Однако гетерогенность клинического течения меланомы кожи даже в пределах одной стадии диктует необходимость поиска дополнительных факторов, позволяющих индивидуализировать тактику ведения пациентов. Данные настоящего исследования доказали, что полиморфизмы гена *MC1R* являются независимыми прогностическими факторами, существенно модифицирующими течение меланомы кожи. Это позволяет использовать их для выделения пациентов с высоким риском прогрессирования и создаёт основу для перехода от унифицированного к персонализированному динамическому наблюдению.

Проведённый анализ выявил дифференцированную прогностическую роль вариантов гена *MC1R*. Полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфизмы данного гена несут двоякую клиническую информацию: они помогают идентифицировать пациентов с исходно высоким риском развития меланомы и, что критически важно, выделить среди уже заболевших тех, у кого выше вероятность агрессивного течения и прогрессирования заболевания.

На основании многофакторного анализа установлены следующие закономерности:

- *Аллели высокого риска прогрессирования.* Наличие минорных аллелей *D294H* и *I155T* ассоциировано с высоким риском прогрессирования и худшей выживаемостью. Их носительство служит прямым указанием на неблагоприятный прогноз независимо от исходной стадии заболевания, что требует наиболее интенсивного наблюдения.

- *Фенотипический профиль риска.* Полиморфизмы *R151C* и *R160W*, связанные с соответствующими внешними признаками (I/II фототип кожи, рыжие или светлые волосы, наличие веснушек), формируют «фенотипический профиль высокого риска». Данный профиль указывает на повышенную исходную предрасположенность и, при наличии других неблагоприятных факторов (толщина опухоли по Бреслоу, изъязвление, мужской пол, мутация *BRAF V600E*), дополнительно отягощает прогноз.

Интеграция этих молекулярно-генетических данных с общепринятыми клинико-морфологическими прогностическими факторами (стадия по AJCC, изъязвление, толщина опухоли) позволяет создать более точную модель стратификации риска.

На основе полученных результатов предлагается двухуровневая модель оценки риска, предназначенная для определения интенсивности динамического наблюдения после радикального лечения:

- Уровень 1: Генетический прогностический риск. Определяется по наличию аллелей, ассоциированных с выживаемостью (аллели *D294H/I155T*).

- Уровень 2: Комплексный клинико-фенотипический риск. Учитывает стадию заболевания по AJCC/TNM и интегральный «фенотипический портрет» пациента (на основе полиморфизмов *R151C* и *R160W* и соответствующих им внешних признаков).

3.4.3 Разработка персонализированных алгоритмов динамического наблюдения

Создание прогностических моделей течения меланомы кожи на основании фенотипических, морфологических и молекулярно-генетических параметров показало целесообразность комплексной оценки факторов в прогнозировании данного заболевания. Наличие полиморфизмов гена *MC1R* позволяет отнести пациентов с гетерозиготными и гомозиготными вариантами минорных аллелей к группе неблагоприятного прогноза, то есть к пациентам с высоким риском прогрессирования заболевания независимо от стадии опухолевого процесса.

При подтверждении диагноза меланомы кожи, особенно при большом уровне инвазии по Breslow и наличии факторов риска (мужской пол, наличие изъязвления, сосудистой инвазии, низкий уровень лимфоидной инфильтрации опухоли, наличие мутации *BRAF V600E*), а также исходя из фенотипических критериев, ассоциированных с носительством полиморфизмов *MC1R*, всем пациентам из групп высокого и очень высокого риска требуется интенсификация инструментального обследования с целью выявления отдалённых метастазов уже на этапе первичной диагностики (таблица 38).

Таблица 38 – Алгоритм комплексного обследования больных МК на этапе первичной диагностики

Фенотипический портрет	Рекомендуемые мероприятия	Обоснование
Очень высокий риск (носительство минорных аллелей D294H или I155T; наличие фенотипического профиля: I–II фототип + R151C/R160W)	1. Генетическое тестирование на полиморфизмы <i>MC1R</i> 2. Обследование кожи с дерматоскопией 3. МРТ головного мозга (при наличии факторов риска) 4. ПЭТ/КТ с 18–ФДГ	Высокая вероятность агрессивного течения и метастазирования болезни

Фенотипический портрет	Рекомендуемые мероприятия	Обоснование
Высокий риск (отрицательные или гетерозиготные полиморфизмы без дополнительных факторов)	1. Стандартное клиническое обследование 2. Дерматоскопия 3. Оценка семейного анамнеза 4. При необходимости — УЗИ лимфатических узлов	Стандартная тактика с учетом индивидуальных факторов
Умеренный риск (отсутствие генетических маркеров и неблагоприятных признаков)	1. Осмотры каждые 6–12 месяцев 2. Контроль за кожей и лимфатическими узлами 3. Обследование по показаниям	Минимальный уровень риска

Наличие фенотипического профиля, ассоциированного с полиморфизмами гена *MC1R*, у данной группы пациентов позволяет решать следующие задачи:

- прогнозировать вероятность развития определенных клинических проявлений;
- определять группу риска по неблагоприятным исходам;
- обосновывать необходимость более интенсивного обследования (включая лучевую диагностику) в полном объеме вне зависимости от стадии заболевания (в частности, выполнение МРТ головного мозга с контрастом показано для всех пациентов – носителей полиморфизма *D294H*);
- проводить генетическое консультирование и информировать пациентов о возможных рисках.

После завершения лечения пациент должен быть поставлен на диспансерный учёт у онколога по месту жительства. Цели наблюдения включают раннее выявление рецидивов и метастазов, диагностику новых первичных опухолей, а также оказание психосоциальной поддержки. Согласно действующим клиническим рекомендациям, базовый объём обследования определяется стадией заболевания. Однако учёт генетического и фенотипического профиля позволяет индивидуализировать тактику

обследования и профилактики у пациентов с выявленными полиморфизмами гена *MC1R*.

Разработанная интегрированная стратификация риска и соответствующий алгоритм динамического наблюдения представлены в таблице 39.

Действующие клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации (версия 2025 г., применение с 1 января 2024 г.) по диспансерному наблюдению пациентов с меланомой кожи базируются преимущественно на стадии заболевания по системе AJCC/TNM и предлагают унифицированные схемы обследования.

Согласно данным рекомендациям, объём и периодичность инструментальной диагностики определяются главным образом патоморфологической стадией, без учёта молекулярно-генетических маркеров (полиморфизмов гена *MC1R*) и фенотипических факторов риска.

Проведённое исследование позволило модифицировать существующий подход за счёт интеграции прогностически значимых полиморфизмов гена *MC1R*, что соответствует современному тренду на персонализацию онкологической помощи. Ключевые различия между стандартным (регламентированным Минздравом РФ) и разработанным персонализированным алгоритмами представлены в таблице 40.

Таблица 39 - Интегрированная стратификация риска и алгоритм динамического наблюдения пациентов с МК после радикального лечения

Группа риска	Критерии включения	Рекомендуемый режим динамического наблюдения (дополняет стандартные клинические осмотры)
Очень высокий риск	Наличие ЛЮБОГО из критериев: • Генетический критерий: Носительство аллелей D294H или I155T. • Комбинированный критерий: Стадия IIС–III и наличие фенотипического профиля (I/II фототип + R151C/R160W).	1. Обследование кожи с дерматоскопией 2. Генетическое тестирование на полиморфизмы MC1R 3. УЗИ регионарных лимфоузлов: каждые 3-4 мес. в первые 3 года, затем каждые 6 мес. до 5 лет 4. Лучевая диагностика (КТ органов грудной клетки, брюшной полости и малого таза с контрастированием или ПЭТ/КТ; каждые 6 мес. в первые 3 года, затем ежегодно до 5 лет. 5. МРТ головного мозга с контрастированием: целесообразно рассмотреть ежегодное проведение в первые 3-5 лет, особенно для носителей D294H.
Высокий риск (отрицательные или гетерозиготные полиморфизмы без дополнительных факторов)	Наличие ЛЮБОГО из критериев: • Клинико-морфологический критерий: Стадия IB–IIA. • Фенотипический критерий: Наличие фенотипического профиля (I/II фототип + R151C/R160W) при стадии 0–IIA.	• УЗИ регионарных лимфоузлов: каждые 6 мес. в первые 3 года, затем ежегодно до 5 лет. • Лучевая диагностика (КТ органов грудной клетки, брюшной полости и малого таза): рекомендуется ежегодно в первые 3-5 лет.
Стандартный риск (отсутствие генетических маркеров и неблагоприятных признаков)	Все перечисленные условия: • Стадия 0–IA. • Отсутствие аллелей D294H и I155T. • Отсутствие фенотипического профиля.	• Наблюдение строго в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями (например, Минздрава РФ). • Инструментальные обследования — только при появлении клинических симптомов или подозрительных изменений.

Ключевые изменения, внесенные в алгоритм наблюдения:

1. Раннее выявление пациентов с агрессивным течением: Выделение группы «очень высокого риска» (носители *D294H/I155T*) позволяет

инициировать интенсивный мониторинг (УЗИ каждые 3 мес., КТ каждые 6 мес., МРТ головного мозга) независимо от стадии заболевания, что ранее не предусматривалось действующими рекомендациями.

2. Интенсификация наблюдения при ранних стадиях: Пациенты со стадией 0-IIА, являющиеся носителями фенотипического профиля риска (R151C/R160W + I/II фототип), переводятся в группу «высокого риска» с соответствующим расширением объема обследований (УЗИ каждые 6 мес., КТ ежегодно). В стандартном подходе такие пациенты наблюдались бы по минимальной программе.

3. Впервые обоснована необходимость проведения МРТ головного мозга с контрастированием у носителей аллели *D294H* вне зависимости от стадии, что связано с высоким риском висцерального метастазирования у данной категории пациентов.

4. Дифференциация групп риска внутри одной стадии: Разработанный алгоритм позволяет избежать как гиподиагностики (у пациентов сотягощенным генетическим фоном), так и гипердиагностики (у пациентов с благоприятным профилем), что оптимизирует использование ресурсов здравоохранения и снижает лучевую нагрузку на пациентов низкого риска.

5. Интеграция фенотипических факторов: Впервые фенотипические характеристики (фототип кожи, цвет волос, наличие веснушек) получили количественную прогностическую оценку через ассоциированные полиморфизмы *MC1R*, что позволяет объективизировать понятие «фенотип высокого риска» и использовать его для стратификации.

Таким образом, интеграция генетических и фенотипических маркеров в существующую систему стратификации риска, регламентированную клиническими рекомендациями Минздрава РФ 2024-2025 гг., позволяет персонализировать тактику динамического наблюдения, смещая акцент с унифицированного подхода («одна стадия – одна схема») на индивидуализированный («конкретный пациент – конкретная схема с учётом его генетического профиля и фенотипа»). Предложенный алгоритм не

противоречит действующим рекомендациям, а дополняет и углубляет их, предоставляя инструмент для более точной стратификации пациентов.

Таблица 40 - Сравнение стандартного (Минздрав РФ, 2024/2025) и персонализированного алгоритмов динамического наблюдения

Параметр	Рекомендации Минздрава РФ (стандартный подход)	Разработанный персонализированный алгоритм
Основа стратификации	Только стадия заболевания по AJCC/TNM (0-IA, IB-IV, IIC-IV)	Стадия + генетический профиль (аллели D294H/I155T) + фенотипический профиль (R151C/R160W + I/II фототип)
Учет генетических факторов	Не предусмотрен (генетическое тестирование не входит в рутинный протокол наблюдения)	Носительство D294H/I155T переводит пациента в группу «очень высокого риска» независимо от стадии Носительство R151C/R160W модифицирует риск
МРТ головного мозга	Рекомендуется для пациентов с метастазами в головном мозге и при стадиях IB-IV для первичного стадирования. Периодичность в динамике четко не регламентирована	Дополнительно рекомендуется для всех носителей D294H, включая ранние стадии (0-IIA), с периодичностью 1 раз в 1-2 года в первые 3-5 лет наблюдения
УЗИ регионарных лимфоузлов (стадия 0-IA)	Только при клинических показаниях (рутинное УЗИ не требуется)	При наличии фенотипического профиля (R151C/R160W + I/II фототип) УЗИ каждые 6 мес. в первые 3 года
Лучевая диагностика (стадия IB-IIIА)	КТ 1 раз в год (или по показаниям) в течение первых 3-5 лет	• При наличии фенотипического профиля – КТ ежегодно в первые 3-5 лет • При носительстве D294H/I155T – КТ каждые 6 мес. в первые 3 года

Параметр	Рекомендации Минздрава РФ (стандартный подход)	Разработанный персонализированный алгоритм
Дифференциация внутри стадий	Отсутствует (все пациенты одной стадии наблюдаются по единой схеме)	Присутствует: пациенты со стадией IA, но с отягощенным фенотипом или генетическими маркерами, наблюдаются по программе «высокого» риска
Учет фенотипических факторов	Не предусмотрен (фототип кожи, цвет волос, наличие веснушек не влияют на график наблюдения)	Интегрирован в стратификацию: I/II фототип + R151C/R160W формируют «фенотипический профиль высокого риска»

Периодичность контрольных обследований для пациентов с выявленными полиморфизмами *MC1R* устанавливается следующим образом: УЗИ периферических лимфатических узлов выполняется с частотой раз в 3 месяца на протяжении первых 3 лет, а в последующий период (до 10 лет) – каждые 6 месяцев. Лучевая диагностика (КТ органов грудной клетки, брюшной полости и малого таза с внутривенным контрастированием) назначается с интервалом в 6 месяцев в течение первых 5 лет наблюдения. При наличии технической возможности рекомендовано ежегодное проведение ПЭТ/КТ всего тела с радиофармпрепаратом ^{18}F -фтордезоксиглюкозой.

Разработанный алгоритм, впервые системно интегрирующий прогностически значимые полиморфизмы гена *MC1R* с традиционными факторами, представляет собой инструмент для персонализации диспансерного наблюдения. Детализированная периодичность обследований для каждой группы риска представлена в таблице 41.

Практическая реализация предлагаемого подхода осуществляется по следующим ключевым направлениям:

1. *На этапе первичной диагностики и стадирования.* Пациентам с фенотипическими признаками высокого риска (I-II фототип кожи,

множественные веснушки, рыжие волосы) рекомендуется проведение генетического тестирования на ключевые полиморфизмы гена *MC1R*. Выявление минорных аллелей D294N или I155T является основанием для рассмотрения вопроса о расширенном первичном обследовании (включая МРТ головного мозга с контрастированием) даже при ранних стадиях заболевания.

2. *При планировании динамического наблюдения.* Определение группы риска по предлагаемой модели позволяет индивидуализировать график контрольных обследований. Данный подход концентрирует интенсивный мониторинг на пациентах с самым неблагоприятным прогнозом (группа «очень высокий риск») и минимизирует необоснованную диагностическую нагрузку (финансовую, лучевую) на пациентов группы «умеренного риска».

3. *Генетическое консультирование и информирование пациентов.* Носителей неблагоприятных прогностических минорных аллелей (D294N, I155T) необходимо информировать о повышенном персональном риске прогрессирования, важности строгого соблюдения графика контрольных обследований, а также о необходимости пожизненного соблюдения методов фото- и самопрофилактики.

Применение разработанного алгоритма в клинической практике Красноярского края и других регионов позволит оптимизировать использование диагностических ресурсов за счёт прицельного мониторинга групп максимального риска.

Разработанная схема группировки пациентов по группам риска с соответствующими протоколами динамического наблюдения позволяет перейти от унифицированного подхода к персонализированному ведению пациентов с меланомой кожи. Индивидуализированный подход, основанный на фенотипических характеристиках и наличии полиморфизмов гена *MC1R*, способствует своевременному выявлению рецидивов и метастазов, оптимизации тактики лечения и профилактики, что потенциально может повысить эффективность лечения и улучшить выживаемость. Комплексные

мероприятия, включающие регулярное инструментальное обследование, генетическое тестирование и динамический мониторинг, обеспечивают повышение качества медицинской помощи и улучшение прогноза у пациентов с меланомой кожи.

Таблица 41 - Персонализированный алгоритм динамического наблюдения в зависимости от группы риска

[illegible]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Меланома кожи – агрессивная опухоль с неуклонным ростом заболеваемости. Пятилетняя выживаемость при I стадии достигает 97 %, тогда как при IV стадии не превышает 10 % [132, 134]. Высокая иммуногенность меланомы, проявляющаяся лимфоидной инфильтрацией и спонтанной регрессией [147], создает предпосылки для иммунотерапии, однако прогнозирование течения заболевания на индивидуальном уровне остается нерешенной проблемой.

Ключевая нерешённая задача – отсутствие персонализированных инструментов для стратификации риска прогрессирования на этапе первичной диагностики. Биологическим основанием для их создания служит взаимодействие конституциональных генетических факторов (полиморфизмов гена MC1R) и локального противоопухолевого иммунитета (TILs), чей совокупный прогностический вклад в региональных популяциях изучен недостаточно. В связи с этим актуально комплексное изучение MC1R и иммунного микроокружения опухоли для разработки прогностической модели, и персонализированного алгоритма ведения пациентов.

Цель работы: Изучение прогностической роли клинικο-морфологических и молекулярно-генетических параметров для оптимизации алгоритмов диагностики и динамического наблюдения у больных меланомой кожи.

В соответствии с целью и задачами работы объектом исследования явились пациенты с меланомой кожи, получившие комбинированное лечение в КККОД (n = 213).

В исследование включено 213 пациентов с меланомой кожи, получивших комбинированное лечение. Преобладали женщины (62 %), средний возраст составил $56,4 \pm 13,9$ лет. Наиболее частой сопутствующей патологией кожи были атипичные невусы (15,5 %). Распределение по фототипам кожи (Fitzpatrick): I тип – 9,9 %; II – 37,6 %; III – 44,6 %; IV –

8,0 %. Рыжие волосы отмечены у 10,3 % пациентов, веснушки – у 44,1 %. Отягощенный онкологический анамнез выявлен в 12,2 % случаев, преимущественно у родственников первой-второй линии.

Всем пациентам выполнено хирургическое лечение: 89,7 % оперированы радикально, 10,3 % потребовалось повторное иссечение из-за нерадикальности первичной операции. Опухоль чаще локализовалась на туловище и конечностях, акральная форма выявлена у 5,1 % больных.

Гистологически преобладали узловая (43,2 %) и поверхностно-распространяющаяся (35,7 %) формы; лентиго-меланома диагностирована в 15,5 % случаев, редкие варианты (акральная, десмопластическая, невоидная) составили 5,6 %. Изъязвление опухоли выявлено в 43,2 % наблюдений, вертикальная фаза роста – в 64,3 %. Сосудистая инвазия отмечена у 15,5 % больных, нейротропизм – у 3,3 %, микросателлиты – у 8,9 %. Связь с предшествующим невусом прослеживалась в 25,8 % случаев. Высокий митотический индекс ($\geq 1/\text{мм}^2$) зарегистрирован у 11,3 % пациентов.

Медиана наблюдения составила 50,2 месяца. За этот период прогрессирование заболевания зафиксировано у 98 (46 %) пациентов, из них у 65 (30,5 %) наступил летальный исход, связанный с меланомой. В структуре прогрессирования преобладали локорегионарные рецидивы (17,8 %), отдаленные метастазы выявлены у 12,7 % больных, смешанный тип – у 15,5 %. Среди висцеральных метастазов чаще поражались печень (8,9 %), легкие (8,5 %) и головной мозг (8,0 %). Множественное метастатическое поражение (35,2 %) встречалось в 3,4 раза чаще олигометастатического (10,3 %). Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана-Майера и регрессии Кокса для учета времени до события.

Проведенное комплексное исследование полиморфных вариантов гена MC1R у больных меланомой кожи в популяции Красноярского края позволило впервые получить детальную характеристику региональных особенностей распределения генетических маркеров, установить их

ассоциации с клинико-морфологическими параметрами и определить прогностическую значимость для оценки выживаемости пациентов.

Секвенирование гена *MC1R* выявило пять полиморфных вариантов: *R151C* (18,3 %), *R160W* (21,1 %), *R163Q* (15,0 %), *D294H* (5,7 %) и *I155T* (5,6 %). Распределение соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Установлены следующие частоты носительства минорных аллелей (гетерозиготы и гомозиготы суммарно): *R160W* – 21,1 %, *R151C* – 18,3 %, *R163Q* – 15,0 %, *D294H* – 5,7 %, *I155T* – 5,6 %.

В ходе анализа подтверждена ключевая роль гена *MC1R* в формировании фенотипа высокого риска развития меланомы. Для носителей минорного аллеля *R151C* установлены статистически значимые ассоциации с мужским полом ($p = 0,028$), I и II фототипом кожи по Фитцпатрику ($p = 0,008$), наличием солнечных ожогов в детском и взрослом возрасте ($p = 0,0001$) с четкой дозозависимой закономерностью: частота носительства возрастала с кратностью ожогов. При поданализе I фототипа кожи у гетерозигот *R151C* выявлена значимая ассоциация с наличием веснушек ($p = 0,006$, $r = 0,220$). Кроме того, носительство *R151C* коррелировало с первично-множественной меланомой в анамнезе ($p = 0,0001$, $V = 0,521$ – сильная связь).

Для носителей аллеля *D294H* характерны иные закономерности: преобладание мужского пола среди гетерозигот (9 мужчин, 2 женщины; $p = 0,007$), ассоциация с наличием в анамнезе злокачественных новообразований других локализаций ($p = 0,0001$) и с наличием предшествующего меланоме невуса кожи ($p = 0,035$). При морфологическом анализе показана ассоциация *D294H* с вертикальной фазой роста опухоли ($p = 0,029$): среди пациентов с вертикальной фазой роста выявлено 11 гетерозигот (8,0 %) и 1 гомозигота (0,7 %), тогда как при радиальной фазе роста носители мутантного аллеля отсутствовали.

Наиболее широкий спектр фенотипических ассоциаций выявлен для полиморфизма *R160W*. Установлена сильная статистически значимая

взаимосвязь с наличием базальноклеточного рака в анамнезе (в 2,1 раза чаще по сравнению с нормозиготами), с первично-множественной меланомой кожи ($p = 0,009$), с отягощенным семейным анамнезом по меланоме кожи ($p = 0,010$) и с наличием рака поджелудочной железы у родственников 1 и 2 линии родства ($p = 0,001$). При поданализе I фототипа кожи у носителей *R160W* выявлены ассоциации с рыжим цветом волос ($p = 0,001$), наличием атипических невусов и их количеством ($p = 0,018$), а также с большим количеством врожденных невусов ($p = 0,015$) и пограничных невусов ($p = 0,0001$). Гетерозиготный генотип *R160W* также ассоциировался с критерием N ($p = 0,020$).

Для полиморфизмов *R163Q* и *I155T* установлены ассоциации с локализацией первичной опухоли ($p = 0,002$ и $p = 0,035$ соответственно), а для *R163Q* – также с отягощенным семейным анамнезом по меланоме ($p = 0,004$).

На основании совокупности полученных данных для носителей аллелей *R151C*, *D294H* и *R160W* разработаны детализированные фенотипические профили, позволяющие визуализировать характерные клинические признаки и использовать их для первичной стратификации риска на этапе клинического осмотра.

Ключевым результатом стало выявление независимой прогностической значимости аллелей *D294H* и *I155T*. Носительство *D294H* ассоциировано с резким снижением 5-летней выживаемости (ОВ: 28,4 % против 66,7 %, $p < 0,0001$), *I155T* – с ухудшением безрецидивной выживаемости (41,7 % против 56,7 %, $p = 0,045$). В многофакторном анализе эти маркеры сохранили независимую значимость (HR = 4,03 и HR = 4,05 соответственно), что позволяет рассматривать их как самостоятельные факторы неблагоприятного прогноза, не сводимые к клинико-морфологическим параметрам.

Особый интерес представляет анализ синергичного воздействия молекулярно-генетических нарушений. У пациентов с одновременным наличием полиморфизма гена *MC1R* и мутации *BRAF V600E* обнаружена

выраженная статистическая связь с метастазами в лимфатических узлах и развитием отдаленных метастатических очагов ($p \leq 0,005$).

Проведенное комплексное морфологическое, иммуногистохимическое и клинико-статистическое исследование операционного материала первичной меланомы кожи позволило получить новые данные о роли TILs в прогрессии заболевания, их взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами, субпопуляционном составе и прогностическом значении.

Оценка TILs по схеме MIA выявила выраженную гетерогенность: слабая инфильтрация – в 29,1 %, умеренная – в 43,7 %, выраженная (brisk) – в 15,0 %, лимфоидные структуры – в 12,2 % случаев.

При анализе распределения TILs в зависимости от клинических характеристик пациентов установлено, что средний возраст больных во всех сравниваемых группах составлял около 55 лет, статистически достоверных различий по возрасту не выявлено. Выявлена статистически значимая обратная корреляционная связь между степенью TILs и стадией заболевания. По мере прогрессирования меланомы от ранних стадий к III-IV интенсивность TILs снижалась от обильной инфильтрации с формированием лимфоидных структур при T1 до скудного перитуморального инфильтрата при T4. В группе пациентов с III-IV клинической стадией отмечено достоверное снижение уровня TILs по сравнению с группой I-II стадии.

Установлена сильная обратная корреляция степени TILs с ключевыми факторами неблагоприятного прогноза: стадией заболевания, диаметром опухоли, толщиной по Breslow, уровнем инвазии по Clark, наличием изъязвления, сосудистой инвазии и микросателлитов ($p < 0,01$). Низкий уровень TILs ассоциировался с большим объемом хирургического вмешательства и худшим ответом на адъювантную терапию.

При анализе общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования с использованием метода Каплана-Мейера установлены статистически значимые различия в зависимости от степени TILs. Кумулятивная доля выживших пациентов последовательно возрастала от

группы со скудной инфильтрацией к группе с организованными лимфоидными структурами, составив 67,7 %, 71,0 %, 76,9 % и 96,2 % соответственно. Точечная оценка средней длительности общей выживаемости была наибольшей в группе с выраженной инфильтрацией, достигшей 68,3 месяца, и в группе с лимфоидными структурами, где этот показатель составил 58,1 месяца, тогда как при скудной инфильтрации средняя продолжительность жизни оказалась лишь 37,1 месяца. При анализе бессобытийной выживаемости доля цензурированных случаев составила для скудной TILs 46,8 %, для умеренной – 58,1 %, для выраженной – 74,4 %, для лимфоидных структур – 96,2 %. Наибольшая средняя длительность бессобытийной выживаемости отмечена в группах с выраженной инфильтрацией и лимфоидными структурами, где показатели достигли 62,97 и 58,23 месяца соответственно, тогда как при скудной инфильтрации этот показатель составил 49,6 месяца. Медиана бессобытийной выживаемости в группе с выраженной инфильтрацией достигла 53 месяцев, что указывает на значительно более благоприятный прогноз.

Иммуногистохимическое исследование с использованием маркеров CD3, CD4, CD8, CD20 и CD56 позволило детально охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитарного инфильтрата при меланоме кожи. Установлено, что основную массу инфильтрата составляют зрелые Т-лимфоциты CD3+, которые обнаруживались в виде скоплений крупных групп клеток, локализованных преимущественно периваскулярно. Среди Т-лимфоцитов численно преобладают CD4+ Т-хелперы над CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами. Содержание CD20+ В-лимфоцитов в инфильтрате уступало количеству CD8+ клеток, тогда как доля CD56+ NK-клеток была минимальной среди всех исследованных субпопуляций.

При корреляционном анализе плотности субпопуляций лимфоцитов с клинико-морфологическими параметрами меланомы кожи выявлен ряд статистически значимых взаимосвязей. Плотность CD3+ клеток отрицательно коррелировала с диаметром первичной опухоли и

положительно – с наличием предшествующего невуса. Наличие предшествующего невуса также ассоциировалось с повышением плотности CD8⁺ лимфоцитов. Среди клинических проявлений заболевания установлены следующие корреляции: критерий асимметрии отрицательно коррелировал с количеством CD56⁺ клеток, критерий неровных границ положительно коррелировал с CD3⁺ клетками, критерий эволюции положительно коррелировал с CD20⁺ клетками. Обращает на себя внимание связь мутантного полиморфизма гена MC1R с увеличением плотности CD4⁺ и CD20⁺ клеток, что может указывать на генетическую детерминированность иммунного ответа. Пол, возраст пациентов и стадия опухолевого процесса с плотностью распределения лимфоцитов взаимосвязаны не были.

Дальнейший анализ был направлен на изучение субпопуляционного состава инфильтрата в зависимости от степени TILs. При сравнении экспрессии маркеров на разных уровнях TILs установлено, что количество исследованных субпопуляций лимфоцитов изменялось в зависимости от степени инфильтрации. Статистически значимые различия между группами были выявлены для CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов, тогда как для CD8⁺ и CD20⁺ клеток, несмотря на колебания средних значений, различия не достигли статистической значимости. Зарегистрирована прямая высокая корреляционная связь между количеством CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов, что свидетельствует о тесной сопряженности активации Т-хелперов и общего пула Т-клеток в перитуморальной зоне. При скудной TILs наблюдалось снижение абсолютного и относительного количества всех основных субпопуляций, тогда как по мере увеличения плотности TILs до умеренной и выраженной, вплоть до формирования ТЛС, их уровни закономерно возрастали.

При анализе взаимосвязи субпопуляционного состава лимфоцитов с прогнозом заболевания статистически значимых различий в группах с прогрессированием и без него, а также в группах с летальным исходом и без него не выявлено.

Результаты исследования обосновывают целесообразность включения оценки степени и субпопуляционного состава TILs в стандарт патологоанатомического исследования меланомы кожи для стратификации пациентов по группам риска и персонализации лечебной тактики. Пациенты с низким уровнем TILs требуют более интенсивного наблюдения в связи с высоким риском прогрессирования, тогда как наличие выраженной инфильтрации и организованных лимфоидных структур позволяет прогнозировать благоприятное течение заболевания и лучший ответ на терапию.

Проведен сравнительный анализ двух групп пациентов с морфологически подтвержденной меланомой кожи. На первом этапе оценивались факторы, ассоциированные с риском прогрессирования при сравнении групп пациентов без признаков прогрессирования, включившей 115 человек, и с диагностированными метастазами, составившей 98 человек. На втором этапе анализировались факторы, влияющие на риск летального исхода при сравнении выживших пациентов в количестве 148 человек и умерших от меланомы кожи, которых было 65, за пятилетний период наблюдения.

Для количественной оценки независимого вклада выявленных факторов в динамику риска развития неблагоприятных исходов во времени были построены две многомерные модели пропорциональных рисков Кокса. В финальную модель прогнозирования бессобытийной выживаемости вошли пять независимых предикторов, достоверно ухудшающих этот показатель. Диаметр опухоли с увеличением на один миллиметр повышает риск события на три процента с отношением рисков 1,03 и доверительным интервалом 1,01-1,05. Уровень инвазии по Кларку повышает риск на 53 процента с отношением рисков 1,53 и доверительным интервалом 1,24-1,89. Наличие мутантного аллеля гена P155T увеличивает риск более чем в три раза с отношением рисков 3,32 и доверительным интервалом 1,49-7,36. Нерадикальный характер выполненной операции ассоциирован с

увеличением риска в 2,3 раза с отношением рисков 2,29 и доверительным интервалом 1,23-4,27. Отсутствие адъювантной иммунотерапии является самым мощным негативным фактором, увеличивающим риск в 4,26 раза с отношением рисков 4,26 и доверительным интервалом 2,69-6,72. Прогностическая способность данной модели, оцененная по площади под ROC-кривой, составила 0,78, что указывает на хорошее качество модели.

Финальная модель пропорциональных рисков Кокса для 5-летней общей выживаемости включила девять независимых предикторов. Наибольший вклад в повышение риска летального исхода внесли носительство аллелей *MC1R D294H* (HR = 4,03; 95 % ДИ 1,80-9,02) и *I155T* (HR = 4,05; 95 % ДИ 1,44-11,38), наличие отдаленных (HR = 2,65) и регионарных (HR = 2,28) метастазов, а также низкий уровень TILs (HR = 1,53). Защитным фактором выступил старший возраст (HR = 0,73; $p = 0,004$). Прогностическая точность модели составила AUC 0,78.

Для интеграции выявленных данных в клинически применимый инструмент, позволяющий оценить индивидуальную вероятность события за фиксированный пятилетний период, был проведен логистический регрессионный анализ. Разработанная бинарная логистическая регрессионная модель для прогнозирования индивидуального 5-летнего риска летального исхода включает шесть предикторов: отягощенный семейный онкоанамнез (ОШ = 6,73), наличие регионарных метастазов (ОШ = 5,14), сосудистую инвазию (ОШ = 5,11), количество метастазов (ОШ = 2,54), уровень инвазии по Кларку (ОШ = 1,83) и степень лимфоидной инфильтрации (ОШ = 1,78), где более высокая инфильтрация снижает риск. Модель обладает высокой предсказательной способностью (AUC = 0,927; чувствительность 71,9 %, специфичность 89,1 %, общая точность 83,9 %).

Рекомендуется использовать представленную модель для выделения группы пациентов с наивысшим совокупным риском – тех, у кого сочетаются негативный семейный анамнез, признаки агрессивной первичной опухоли, низкий иммунный ответ и признаки метастатического поражения. Для этой

категории пациентов обоснованы максимально интенсивные режимы динамического наблюдения и рассмотрение всех возможных вариантов адъювантной и системной терапии, что соответствует принципам персонализированной онкологии.

Проведенное комплексное клинико-лабораторное и молекулярно-генетическое исследование было направлено на решение актуальной задачи онкологии – персонализацию динамического наблюдения пациентов с МК на основе анализа фенотипических, морфологических и генетических факторов.

Анализ отдаленных результатов лечения пациентов с меланомой кожи продемонстрировал, что общая 5-летняя выживаемость в изученной когорте составила 69,5 %, а показатель 5-летней безрецидивной выживаемости достиг 56 %. При детальном изучении временной структуры рецидивов установлено, что в 55,1 % случаев прогрессирование заболевания наступает в течение первого года после завершения терапии, что обосновывает необходимость наиболее интенсивного мониторинга именно в этот критический период. Выявлено также, что метастазы в мягкие ткани и регионарные лимфатические узлы встречаются в 2,6 раза чаще, чем висцеральные метастазы, что определяет приоритетные зоны инструментального поиска при динамическом наблюдении.

Ключевым результатом работы стало доказательство того, что полиморфизмы гена *MC1R* являются независимым прогностическим фактором, существенно модифицирующим течение меланомы кожи. Проведенный анализ выявил дифференцированную прогностическую роль различных вариантов данного гена. Установлено, что носительство аллелей *D294H* и *I155T* ассоциировано с высоким риском прогрессирования и худшей выживаемостью независимо от исходной стадии заболевания, что требует наиболее интенсивного наблюдения даже при ранних стадиях опухолевого процесса. В свою очередь, полиморфизмы *R151C* и *R160W*, связанные с соответствующими внешними признаками (I/II фототип кожи, рыжие или светлые волосы, наличие веснушек), формируют «фенотипический профиль

высокого риска», который при наличии других неблагоприятных факторов (толщина опухоли по Бреслоу, изъязвление, мужской пол, мутация *BRAF V600E*) дополнительно отягощает прогноз.

Полученные данные свидетельствуют о том, что информация о полиморфизмах гена *MC1R* несет двоякую клиническую значимость: она позволяет идентифицировать пациентов с исходно высоким риском развития меланомы и, что критически важно, выделить среди уже заболевших лиц с повышенной вероятностью агрессивного течения и прогрессирования болезни. Интеграция этих молекулярно-генетических данных с общепринятыми клинико-морфологическими прогностическими факторами (стадия по AJCC, изъязвление, толщина опухоли) создает основу для построения более точной модели стратификации риска.

На основе полученных результатов была разработана двухуровневая модель оценки риска, предназначенная для определения интенсивности динамического наблюдения после радикального лечения. Первый уровень модели учитывает генетический прогностический риск (наличие аллелей *D294H/I155T*), второй уровень – комплексный клинико-фенотипический риск, включающий стадию заболевания по AJCC/TNM и интегральный «фенотипический портрет» пациента. На основании данной модели предложена группировка пациентов на три категории: очень высокого, высокого и умеренного риска, для каждой из которых разработан соответствующий алгоритм динамического наблюдения.

На основе полученных данных разработан персонализированный алгоритм динамического наблюдения, стратифицирующий пациентов на три группы риска. 1). Очень высокий риск (носители *D294H/I155T* или стадия ПС-III + фенотип риска): УЗИ регионарных зон каждые 3-4 мес. (3 года), КТ/ПЭТ-КТ каждые 6 мес. (3 года), далее ежегодно; МРТ головного мозга 1 р/год (особенно при *D294H*). 2). Высокий риск (стадия IB–IIIA или ранняя стадия + фенотип риска): УЗИ каждые 6 мес. (3 года); лучевая диагностика 1

р/год. 3). Умеренный риск (стадия 0-IA без генетических и фенотипических маркеров): наблюдение согласно стандартным клиническим рекомендациям.

Проведенное сравнение разработанного алгоритма с действующими клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения Российской Федерации (версия 2025 г.) подтвердило его соответствие существующим стандартам и одновременно продемонстрировало существенные преимущества персонализированного подхода. Ключевыми отличиями являются: учет генетических факторов при стратификации риска, интенсификация наблюдения при ранних стадиях у носителей неблагоприятных аллелей, таргетное использование МРТ головного мозга у пациентов с аллелью D294N, а также дифференциация тактики ведения пациентов внутри одной стадии в зависимости от их генетического и фенотипического профиля.

Практическая реализация разработанного алгоритма предполагает три ключевых направления. На этапе первичной диагностики пациентам с фенотипическими признаками высокого риска (I/II фототип кожи, множественные веснушки, рыжие волосы) рекомендуется проведение генетического тестирования на полиморфизмы гена *MC1R*, а выявление аллелей D294N или I155T служит основанием для рассмотрения расширенного первичного обследования, включая МРТ головного мозга. При планировании динамического наблюдения определение группы риска по предлагаемой модели позволяет индивидуализировать график контрольных обследований, концентрируя интенсивный мониторинг на пациентах с самым неблагоприятным прогнозом и минимизируя необоснованную диагностическую нагрузку на пациентов группы умеренного риска.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан и научно обоснован персонализированный алгоритм динамического наблюдения пациентов с меланомой кожи, впервые системно интегрирующий прогностически значимые полиморфизмы гена *MC1R* с традиционными клинико-морфологическими и фенотипическими факторами.

Применение данного алгоритма в клинической практике позволит оптимизировать использование диагностических ресурсов за счет прицельного мониторинга групп максимального риска, обеспечить своевременное выявление прогрессирования заболевания и, как следствие, улучшить долгосрочные результаты лечения пациентов с меланомой кожи.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на популяции больных меланомой кожи в Красноярском крае охарактеризована частота встречаемости полиморфных вариантов гена *MC1R* – *R151C* (rs1805007), *R160W* (rs1805008), *D294H* (rs1805009), *R163Q* (rs885479), *I155T* (rs1110400). Наиболее распространенным являлся *R160W*: минорная аллель Т выявлена у 21,1 % (гетерозиготы 19,7 %, гомозиготы 1,4 %). Частота минорных аллелей остальных полиморфизмов: *R151C* (Т) – 18,3 % (16,4 % и 1,9 %), *D294H* (С) – 5,7 % (5,2 % и 0,5 %), *R163Q* (А) – 15,0 % (14,1 % и 0,9 %), *I155T* (С) – 5,6 % (гетерозиготы 5,6 %, гомозигот нет).

2. При комплексном анализе иммунного микроокружения меланомы кожи выявлено следующее распределение TILs: слабая инфильтрация – 62 случая (29,1 %), умеренная – 93 (43,7 %), выраженная – 32 (15 %), третичные лимфоидные структуры (ТЛС) с явлениями регрессии опухоли – 26 (12,2 %). Установлено, что прогностическая значимость лимфоидной инфильтрации определяется не фенотипическим профилем инфильтрирующих клеток, а количественной плотностью и структурной организацией TILs. 5-летняя общая выживаемость последовательно повышалась от скудной инфильтрации (67,7%) к умеренной (71,0 %), выраженной (76,9 %) и максимальной при наличии ТЛС (96,2 %; $p < 0,001$), что выделяет ТЛС как наиболее благоприятный прогностический фактор.

3. Установлены ассоциации полиморфизмов гена *MC1R* и параметров иммунного микроокружения с клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими параметрами. Носительство редких аллелей *D294H* и *I155T* ассоциировано с повышенным риском летального исхода ($p < 0,05$). При этом выявлен эффект модификации прогностической роли TILs: у носителей данных аллелей протективный эффект высокой степени лимфоидной инфильтрации нивелируется. Независимыми предикторами агрессивного течения заболевания являются: низкий уровень TILs ($p < 0,001$),

большая толщина опухоли по Бреслоу ($p < 0,001$), наличие изъязвления ($p = 0,005$) и сосудистой инвазии ($p = 0,005$).

4. На основе логистического регрессионного анализа разработана высокоточная модель оценки 5-летнего риска летального исхода у больных меланомой кожи. В финальную модель вошли шесть независимых предикторов:отягощенный семейный онкоанамнез, уровень инвазии по Кларку, наличие сосудистой инвазии, степень лимфоидной инфильтрации, наличие и количество метастазов. Модель обладает высокой дискриминационной способностью ($AUC = 0,927$) и диагностической точностью 83,9 %.

5. Разработан персонализированный алгоритм динамического наблюдения, интегрирующий клинические, морфологические и молекулярно-генетические параметры для стратификации пациентов по риску прогрессирования и объему обследования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно определение полиморфизмов гена *MC1R* (*D294H*, *I155T*, *R151C*, *R160W*) у пациентов с I-II фототипом кожи и/или толщиной опухоли > 2 мм как перспективного метода дополнительной стратификации риска.

2. Рекомендуется включить в рутинное гистологическое описание при меланоме кожи оценку уровня и характера TILs по трехбалльной шкале (скудная, умеренная, выраженная) с обязательным указанием наличия организованных третичных лимфоидных структур.

3. В клинической практике рекомендуется использовать зарегистрированную программу для ЭВМ (свидетельство № 2023668706) для автоматизированного расчёта индивидуального 5-летнего риска летального исхода у больных меланомой кожи на основе разработанной регрессионной модели.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-5,989 + 1,907x_1 + 0,604x_2 + 1,630x_3 + 0,578x_4 + 1,638x_5 + 0,930x_6)}}$$

где

p – вероятность смерти пациента,

x_1 - наличие других злокачественных новообразований в семейном анамнезе (0 – нет, 1 - да); x_2 - уровень инвазии по Clark (от 1 до 5); x_3 – наличие сосудистой инвазии (0 – нет, 1 - да); x_4 – степень лимфоидной инфильтрации (0 – скудная, 1 – умеренная, 2 – выраженная, 3 – третичные лимфоидные структуры); x_5 – наличие местных метастазов (0 – нет, 1 - да); x_6 – количество метастазов (от 0 до 3). При $p < 1$ – низкий риск развития летального исхода МК, при $p \geq 1$ – высокий риск развития летального исхода заболевания.

4. При динамическом наблюдении за больными меланомой кожи после специального лечения рекомендуется использовать разработанный

персонализированный алгоритм наблюдения в зависимости от риска метастазирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВБП / DFS – выживаемость без прогрессирования

ВОЗ / WHO – всемирная организация здравоохранения

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно–кишечный тракт

ЗНО – злокачественное новообразование

ИГХ – иммуногистохимия

КККОД – КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского»

МК – меланома кожи

МКА – моноклональные антитела

ОВ / OS – общая выживаемость

ОШ – отношение шансов

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТЛС – третичные лимфоидные структуры

УФ – ультрафиолетовое

AJCC – American Joint Committee on Cancer

АРС – антигенпрезентирующие клетки

AUC – площадь под ROC-кривой

BRAF – v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CD – кластер дифференцировки

CTLA – Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

FDA – Food and Drug Administration

FDR – ложная частота обнаружения (false discovery rate)

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

GLOBOCAN – International Agency for Research on Cancer

GWAS – Genome-Wide Association Studies

MC1R – рецептор меланокортина-1

MDA – антигены дифференцировки меланоцитов

Mi – митотический индекс

MIA – Институт меланомы Австралии

MTS – метастазы

NK – натуральные киллеры

PD-1 – Programmed cell death 1

PD-L1 – лиганд программируемой клеточной гибели 1

ROC – рабочая характеристическая кривая

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

TIL / TILS – опухолинфильтрующие лимфоциты

TNM – Международная классификация стадий злокачественных новообразований

OR / HR – отношение рисков

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шанин, А. П. Пигментные опухоли / А. П. Шанин. – Ленинград: Медгиз. Ленингр. отделение, 1959. – 258 с.
2. Артемьева, А. С. Сложности морфологической диагностики меланоцитарных образований кожи (клинический случай) / А. С. Артемьева, Ю. В. Семилетова // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – № 20. (3) – С. 144–150.
3. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // Cancer Journal for Clinicians. – 2024. – Vol. 74, № 3. – P. 229–263. DOI: 10.3322/caac.21834.
4. 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. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.12.003.
5. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2020 / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // Cancer Journal for Clinicians. – 2020. – Vol. 70, № 1. – P. 7–30. DOI: 10.3322/caac.21590.
6. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году / Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва: ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. – 239 с.
7. Состояние онкологической помощи в России: особенности локализационной структуры, качества учёта и выживаемости больных зно среди основных возрастных групп населения (популяционное исследование). Часть 6 / В. М. Мерабишвили, А. О. Шахзадова, А. М. Беляев [и др.] // Формулы фармации. – 2024. – Т. 6, №1. – С. 16–28.
8. Мерабишвили, В. М. Злокачественная меланома. Эпидемиология, аналитические показатели эффективности деятельности онкологической службы (популяционное исследование) / В. М. Мерабишвили // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63, № 2. – С. 221–233.
9. Чеботарев, В. В. Некоторые аспекты эпидемиологии и диагностики злокачественных новообразований кожи / В. В. Чеботарев, З. Р. Хисматуллина, Ю. А. Закирова // Креативная хирургия и онкология. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 65–73. DOI 10.24060/2076–3093–2020–10–1–65–73
10. Клинические рекомендации. Меланома кожи и слизистых оболочек. 2023 / Ассоциация онкологов России; Ассоциация специалистов по проблемам меланомы; Российское общество клинической онкологии. – 165 с. – Текст: электронный. – URL: https://protiv-raka.ru/wp-content/uploads/2023/07/kr546_9ff0d78a.pdf (дата обращения: 10.10.2023).
11. Меланома кожи: эпидемиология, этиология и молекулярно-генетические основы патогенеза / Д. С. Кутилин, А. М. Зварич, В. В. Позднякова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2025. – № 1 – С. 80.

12. Topical therapy for regression and melanoma prevention of congenital giant nevi / Y. S. Choi, T.H. Erlich, M. von Franque [et al.] // *Cell (Cambridge)*. – 2022. – Vol. 185, № 12. – P. 2071–2085. DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.025.
13. Меланома кожи: аналитический обзор литературы и клинические случаи / А. А. Хрянин, А. П. Надеев, А. В. Соколовская [и др.] // *Фарматека*. – 2025. – Т. 32, № 5. – С. 41–48. DOI 10.18565/pharmateca.2025.5.41–48.
14. Дерматоскопия: от обучения к использованию в практике / А. А. Мартынов, Т. А. Сысоева, А. В. Соколова. [и др.] // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2025. – Т. 101, № 4. – С. 55–64. DOI 10.25208/vdv16901.
15. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7–point checklist based on pattern analysis / G. Argenziano, G. Fabbrocini, P. Carli [et al.] // *Archives of dermatology*. – 1998. – Vol. 134, № 12. – P. 1563–1570. DOI: 10.1001/archderm.134.12.1563
16. The 2023 WHO updates on skin tumors: advances since the 2018 edition / F. Fortarezza, G. Cazzato, G. Ingravallo [et al.] // *Pathologica*. – 2024. – Vol. 116, № 4. – P. 193–206. DOI: 10.32074/1591–951X–1006
17. Exploring dermoscopic structures for melanoma lesions' classification / F. S. Malik, M. H. Yousaf, H. A. Sial [et al.] // *JAMA Dermatology*. – 2024. – Vol. 7. – P. 1366312. DOI: 10.3389/fdata.2024.1366312.
18. Skin Photodamage and Melanomagenesis: A Comprehensive Review / M. Manganelli, G. Stabile, C. Scharf [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2025. – Vol. 17, № 11. – P. 1784. DOI: 10.3390/cancers17111784.
19. Cutaneous Melanoma: A Review of Multifactorial Pathogenesis, Immunohistochemistry, and Emerging Biomarkers for Early Detection and Management / L. M. Gosman, D. A. Țăpoi, M. Costache [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 21. – P. 15881. DOI: 10.3390/ijms242115881.
20. Артемьева, Н. Г. Эксцизионная биопсия диспластического невуса в условиях районной поликлиники – путь к раннему выявлению меланомы кожи / Н. Г. Артемьева, О. А. Романова // *Амбулаторная хирургия*. – 2020. – № 3–4. – С. 66–72. DOI 10.21518/1995–1477–2020–3–4–66–72.
21. Russo, V. General outlines of the practical and theoretical development of immunology / V. Russo // *Minerva anesthesiologica*. – 1978. – Vol. 44, № 10. – P. 625–672.
22. Taylor's Law in Innovation Processes / F. Tria, I. Crimaldi, G. Aletti, V. D. P. Servedio // *Entropy (Basel)*. – 2020. – Vol. 22, № 5. – P. 573. DOI: 10.3390/e22050573.
23. Immunohistochemistry utilization in the diagnosis of melanoma / M. S. Dinehart, S. M. Dinehart, S. Sukpraprut–Braaten, W. A. High // *Journal of cutaneous pathology*. – 2020. – Vol. 47, № 5. – P. 446–450. DOI: 10.1111/cup.13648.
24. Torres–Cabala, C. Pathology–based Biomarkers Useful for Clinical Decisions in Melanoma / C. Torres–Cabala, E. Li–Ning–Tapia, W. J. Hwu //

Archives of medical research. – 2020. – Vol. 51, № 8. – P. 827–838. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.09.008.

25. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи / Д. Л. Строяковский, Н. Х. Абдулоева, Л. В. Демидов [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2022. – № 12. – С. 287–306.

26. Системная терапия метастатической меланомы кожи с мутацией в гене braf / Ю. С. Шах–Пароньянц, С. В. Чепоров, Н. П. Ширяев [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2023. – Т. 10, № 1. – С. 27–35.

27. New emerging treatment options for metastatic melanoma: a systematic review and meta-analysis of skin cancer therapies / A. S. Jarab, V. A. Al-Qerem, L. M. Khdour [et al.] // Archives of dermatological research. – 2024. – Vol. 316, № 10. – P. 735. DOI: 10.1007/s00403-024-03467-2.

28. The Role of Extracellular Vesicles in Mediating Resistance to Anticancer Therapies / S. Maleki, J. Jabalee, C. Garnis [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, №8. – P. 4166. DOI: 10.3390/ijms22084166.

29. Nuclear interaction of Arp2/3 complex and BRAFV600E promotes aggressive behavior and vemurafenib resistance of thyroid cancer / M. Zerfaoui, K. Tsumagari, E. Toraih [et al.] // American journal of cancer research. – 2022. – Vol. 12, № 7. – P. 3014–3033.

30. Wang, R. A panel immunoblot using co-incubated monoclonal antibodies for identification of melanoma cells / R. Wang, L. J. Dworak, M. J. Lacy // Journal of immunological methods. – 2001. – Vol. 249, № 1–2. – P. 167–183. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00357-4.

31. Nivolumab and relatlimab for the treatment of melanoma / X. Y. Chen, Y. D. Li, Y. Xie [et al.] // Drugs of today (Barc). – 2023. – Vol. 59, № 2. – P. 91–104. DOI: 10.1358/dot.2023.59.2.3509756.

32. Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma / E. Faghfuri, M. A. Faramarzi, S. Nikfar, M. Abdollahi // Expert review of anticancer therapy. – 2015. – Vol. 15, № 9. – P. 981–993. DOI: 10.1586/14737140.2015.1074862.

33. Checkpoint inhibitors as immunotherapy for fungal infections: Promises, challenges, and unanswered questions / S. Wurster, S. S. Watowich, D. P. Kontoyiannis [et al.] // Frontiers in immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 1018202. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1018202.

34. Обзор фармакоэкономических исследований лечения меланомы за период 2017–2023 гг / К. А. Кокушкин, М. В. Журавлева, М. Ю. Бяхов // Южно-российский журнал терапевтической практики. – 2023. – Т. 4, № 3. – С. 36–44. DOI 10.21886/2712-8156-2023-4-3-36-44.

35. The expansion of MDSCs induced by exosomal PD-L1 promotes the progression of cancer / H. Li, X. Chen, S. Zhang [et al.] // Journal of translational medicine. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 821. DOI: 10.1186/s12967-024-05611-y

36. Alterations in PD–L1 succinylation shape anti–tumor immune responses in melanoma / L. Liang, X. Kuang, Y. He [et al.] // *Nature genetics*. – 2025. – Vol. 57, № 3. – P. 680–693. DOI: 10.1038/s41588–025–02077–6.
37. Ai, L. Roles of PD–1/PD–L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond / L. Ai, A. Xu, J. Xu // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2020. – Vol. 1248. – P. 33–59. DOI: 10.1007/978–981–15–3266–5_3.
38. Multispecific Antibodies Targeting PD–1/PD–L1 in Cancer / M. Chen, Y. Zhou, K. Bao [et al.] // *BioDrugs*. – 2025. – Vol. 39, № 3. – P. 427–444. DOI: 10.1007/s40259–025–00712–6.
39. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy / Y. Shiravand, F. Khodadadi, S. M. A. Kashani [et al.] // *Current oncology*. – 2022. – Vol. 29, № 5. – P. 3044–3060. DOI: 10.3390/curroncol29050247.
40. Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab in Resectable Stage III Melanoma / C. U. Blank, M. W. Lucas, R. A. Scolyer [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2024. – Vol. 391, № 18. – P. 1696–1708. DOI: 10.1056/NEJMoa2402604.
41. Survival update of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma in the OpACIN and OpACIN–neo trials / J. M. Versluis, A. M. Menzies, K. Sikorska [et al.] // *Annals of oncology*. – 2023. – Vol. 34, № 4. – P. 420–430. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.01.004.
42. Neoadjuvant treatment for stage III and IV cutaneous melanoma / C. Gorry, L. McCullagh, H. O'Donnell [et al.] // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2023. – Vol. 1, № 1. – P. CD012974. DOI: 10.1002/14651858.CD012974.pub2.
43. Nivolumab and Relatlimab in Patients With Advanced Melanoma That Had Progressed on Anti–Programmed Death–1/Programmed Death Ligand 1 Therapy: Results From the Phase I/IIa RELATIVITY–020 Trial / P. A. Ascierto, E. J. Lipson, R. Dummer [et al.] // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 41, № 15. – P. 2724–2735. DOI: 10.1200/JCO.22.02072.
44. Standard–Dose Pembrolizumab Plus Alternate–Dose Ipilimumab in Advanced Melanoma: KEYNOTE–029 Cohort 1C, a Phase 2 Randomized Study of Two Dosing Schedules / G. V. Long, C. Robert, M. O. Butler [et al.] // *Clinical cancer research*. – 2021. – Vol. 27, № 19. – P. 5280–5288. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR–21–0793.
45. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen–specific T cell reactivity and long–term follow–up / J. H. van den Berg, B. Heemskerk, N. van Rooij [et al.] // *Journal for immunotherapy of cancer*. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. e000848. DOI: 10.1136/jitc–2020–000848.
46. Tumor–infiltrating lymphocytes and their prognostic value in cutaneous melanoma / F. Maibach, H. Sadozai, S. M. Seyed Jafari [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 2105. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02105.
47. Сравнительный анализ гистологических предикторов неблагоприятного течения аноректальной меланомы и меланомы кожи / А. Сейдинович, Я. В.

- Вишневская, И.В. Самойленко // Хирургия и онкология. – 2025. – № 1. – С. 62–70.
48. Mechanisms of Melanoma Progression and Treatment Resistance: Role of Cancer Stem-like Cells / Y. A. Hmada, R. T. Brodell, N. Kharouf [et al.] // *Cancers* (Basel). – 2024. – Vol. 16, № 2. – P. 470. DOI: 10.3390/cancers16020470.
 49. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action / Z. N. Willsmore, B. G. T. Coumbe, S. Crescioli [et al.] // *European journal of immunology*. – 2021. – Vol. 51, № 3. – P. 544–556. DOI: 10.1002/eji.202048747.
 50. Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis / M. Emelyanova, L. Ghukasyan, I. Abramov [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 32. – P. 52304–52320. DOI: 10.18632/oncotarget.17014.
 51. Combining BRAF/MEK Inhibitors with Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma / D. C. Ziogas, F. Konstantinou, S. Bouros [et al.] // *American journal of clinical dermatology*. – 2021. – Vol. 22, № 3. – P. 301–314. DOI: 10.1007/s40257-021-00593-9.
 52. Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8+ T cells in melanoma / G. Frederick, K. Stromhaug, S. Klaeger [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 596, № 7870. – P. 119–125. DOI: 10.1038/s41586-021-03704-y.
 53. BRAF Heterogeneity in Melanoma / T. Ito, Y. Tanaka, M. Murata [et al.] // *Current treatment options in oncology*. – 2021. – Vol. 22, № 3. – P. 20. DOI: 10.1007/s11864-021-00818-3.
 54. Correction: KEYNOTE-022 part 3: a randomized, double-blind, phase 2 study of pembrolizumab, dabrafenib, and trametinib in BRAF-mutant melanoma // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. – 2021. – Vol. 9, № 11. – P. e001806corr1.
 55. An artificial intelligence-based model exploiting H&E images to predict recurrence in negative sentinel lymph-node melanoma patients / M. C. Comes, L. Fucci, S. Strippoli [et al.] // *Journal of translational medicine*. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 838. DOI: 10.1186/s12967-024-05629-2.
 56. Dzwierzynski, W. W. Melanoma risk factors and prevention / W. W. Dzwierzynski // *Clinics in plastic surgery*. – 2021. – Vol. 48, № 4. – P. 543–550. DOI: 10.1016/j.cps.2021.05.001.
 57. Differences in risk factors for melanoma in young and middle-aged higher-risk patients / J. S. Palve, N. J. Korhonen, T. H. Luukkaala, M. T. Kääriäinen // *In Vivo*. – 2020. – Vol. 34, № 2. – P. 703–708. DOI: 10.21873/invivo.11827.
 58. Ultraviolet light-induced collagen degradation inhibits melanoma invasion / T. Budden, C. Gaudy-Marqueste, A. Porter [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 2742. DOI: 10.1038/s41467-021-22953-z.
 59. Ostrowski, S. M. Biology of melanoma / S. M. Ostrowski, D. E. Fisher // *Hematology/oncology clinics of North America*. – 2021. – Vol. 35, № 1. – P. 29–56. DOI: 10.1016/j.hoc.2020.08.010.

60. Phenotypic characteristics and melanoma thickness in women / R. Ghiasvand, A. C. Green, T. M. Sandanger [et al.] // *Acta dermato-venereologica*. – 2021. – Vol. 101, № 4. – P. adv00446. DOI: 10.2340/00015555-3806.
61. Wehner, M. R. Sunscreen and melanoma prevention: evidence and expectations / M. R. Wehner // *The British journal of dermatology*. – 2018. – Vol. 178, № 1. – P. 15–16. DOI: 10.1111/bjd.16111.
62. Cutaneous melanoma more likely to be invasive in fairer skin phototypes: a retrospective observational study / L. Mercieca, S. Aquilina, N. Calleja, M. J. Boffa // *Skinmed*. – 2021. – Vol. 19, № 4. – P. 280–283.
63. Врожденная меланома кожи: молекулярно-генетические аспекты и особенности течения / Т. С. Бельшева, Л. Н. Любченко, Я. В. Вишневская [и др.] // *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи*. – 2018. – № 2. – С. 5–13.
64. Insights into the Clinical, Biological and Therapeutic Impact of Copy Number Alteration in Cancer / S. L. Carey-Smith, R. S. Kotecha, L. C. Cheung [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 13. – P. 6815. DOI: 10.3390/ijms25136815.
65. Влияние морфологических факторов прогноза на отдаленные результаты лечения больных с меланомой кожи головы и шеи / М. Б. Пак, А. М. Мудунов, Л. В. Демидов [и др.] // *Опухоли головы и шеи*. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 61–68. DOI 10.17650/2222-1468-2017-7-1-61-68.
66. Pediatric Primary Intracranial Malignant Melanoma: Case Report and Literature Review / M. J. R. Lim, E. E. K. Tan, R. X. Wong [et al.] // *Pediatric neurosurgery*. – 2023. – Vol. 58, № 4. – P. 223–230. DOI: 10.1159/000531544.
67. Prognostic significance of the histological features of malignant melanoma / V. J. McGovern, H. M. Shaw, G. W. Milton, G. A. Farago. // *Histopathology*. – 1979. – Vol. 3, № 5. – P. 385–393. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1979.tb03020.x.
68. Assessing MC1R Variants in Lentigo Maligna Melanoma within the Utah Population / A. Jiang, A. Huntsman, C. Becker [et al.] // *Cancer research communications*. – 2025. – Vol. 5, № 7. – P. 1228–1234. DOI: 10.1158/2767-9764.CRC-25-0263.
69. Breslow, A. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma / A. Breslow // *Annals of surgery*. – 1970. – Vol. 172, № 5. – P. 902–908. DOI: 10.1097/00000658-197011000-00017.
70. Predicting cutaneous malignant melanoma patients' survival using deep learning: a retrospective cohort study / S. Cai, W. Li, C. Deng [et al.] // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2023. – Vol. 149, № 19. – P. 17103–17113. DOI: 10.1007/s00432-023-05421-7.
71. Should we report Breslow density, a new concept in cutaneous melanoma? / I. E. Secinti, D. Gursoy, T. Erturk [et al.] // *The Malaysian journal of pathology*. – 2021. – Vol. 43, № 3. – P. 397–404.
72. Role of Sentinel Lymph Node Biopsy for Skin Cancer Based on Clinical Studies / S. Ishizuki, Y. Nakamura // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 13. – P. 3291. DOI: 10.3390/cancers15133291.

73. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes / C. M. Balch, A. C. Buzaid, S. J. Soong [et al.] // *Seminars in surgical oncology*. – 2003. – Vol. 21, № 1. – P. 43–52. DOI: 10.1002/ssu.10020.
74. The Multi-Omics Landscape and Clinical Relevance of the Immunological Signature of Phagocytosis Regulators: Implications for Risk Classification and Frontline Therapies in Skin Cutaneous Melanoma / J. Xing, L. Guo, Z. Jia [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, № 15. – P. 3582. DOI: 10.3390/cancers14153582.
75. Davidorf, F. H. Lymphocytic infiltration in choroidal melanoma and its prognostic significance / F. H. Davidorf, J. R. Lang // *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*. – 1977. – Vol. 97, № 3. – P. 394–401.
76. The Impact of Clinical and Histopathological Factors on Disease Progression and Survival in Thick Cutaneous Melanomas / D. A. Țăpoi, D. Derewicz, A. A. Gheorghisan-Gălățeanu [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, № 10. – P. 2616. DOI: 10.3390/biomedicines11102616.
77. Germline mutations predisposing to melanoma / A. Toussi, N. Mans, J. Welborn, M. Kiuru // *Journal of cutaneous pathology*. – 2020. – Vol. 47, № 7. – P. 606–616. DOI: 10.1111/cup.13689.
78. Liu, M. T. [CDKN2A gene in melanoma] / M. T. Liu, J. Y. Liu, J. Su // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. – 2019. – Vol. 48, № 11. – P. 909–912. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.11.019.
79. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A / L. G. Aoude, K. A. Wadt, A. L. Pritchard, N. K. Hayward // *Pigment cell & melanoma research*. – 2015. – Vol. 28, № 2. – P. 148–160. DOI: 10.1111/pcmr.12333.
80. Newton-Bishop, J. Melanoma genomics / J. Newton-Bishop, D. T. Bishop, M. Harland // *Acta dermato-venereologica*. – 2020. – Vol. 100, № 11. – P. adv00138. DOI: 10.2340/00015555-3493.
81. CDK4/6 inhibitors in melanoma: a comprehensive review / M. Garutti, G. Targato, S. Buriolla [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 1334. DOI: 10.3390/cells10061334.
82. Palmitoylation-dependent activation of MC1R prevents melanomagenesis / S. Chen, B. Zhu, C. Yin [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 549, № 7672. – P. 399–403. DOI: 10.1038/nature23887.
83. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis / M. C. Fargnoli, S. Gandini, K. Peris [et al.] // *European journal of cancer*. – 2010. – Vol. 46, № 8. – P. 1413–1420. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.01.027.
84. Contributions by MC1R variants to melanoma risk in males and females / J. Wendt, C. Mueller, S. Rauscher [et al.] // *JAMA dermatology*. – 2018. – Vol. 154, № 7. – P. 789–795. DOI: 10.1001/jamadermatol.2018.12.
85. Network rewiring in cancer: applications to melanoma cell lines and the cancer genome atlas patients / K. F. Ding, D. Finlay, H. Yin [et al.] // *Frontiers in genetics*. – 2018. – Vol. 9. – P. 228. DOI: 10.3389/fgene.2018.00228.

86. Malignant melanoma: The role of BRAF inhibition in malignant melanoma / A. Zaremba, L. Zimmer, K. G. Griewank [et al.] // *Der Onkologe*. – 2020. – Vol. 26, No. 8. – P. 713–720. DOI 10.1007/s00761-020-00762-1.
87. Melanin and Melanin-Functionalized Nanoparticles as Promising Tools in Cancer Research—A Review / I. Marcovici, D. Coricovac, I. Pinzaru [et al.] // *Cancers* (Basel). – 2022. – Vol. 14, № 7. – P. 1838. DOI: 10.3390/cancers14071838.
88. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF / Г. А. Франк, Л. Э. Завалишина, Т. В. Кекеева [и др.] // *Архив патологии*. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 65–73.
89. Characterization of two melanoma cell lines resistant to BRAF/MEK inhibitors (vemurafenib and cobimetinib) / M. Kot, A. Simiczyjew, J. Wądryńska [et al.] // *Cell communication and signaling: CCS*. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 410. DOI: 10.1186/s12964-024-01788-3.
90. Kong, Y. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells / Y. Kong, S. M. Kumar, X. Xu // *Archives of pathology & laboratory medicine*. – 2010. – Vol. 134, № 12. – P. 1740–1749. DOI: 10.5858/2009-0418-RAR.1.
91. Tucker, M. A. Melanoma etiology: where are we? / M. A. Tucker, A. M. Goldstein // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22, № 20. – P. 3042–3052. DOI: 10.1038/sj.onc.1206444.
92. A Unique Case of Intracranial Amelanotic Melanoma with BRAF V600E Mutation Successfully Treated via Molecular-targeted Therapy / J. Fujita, Y. Tomita, K. Ichimura [et al.] // *NMC Case Report Journal*. – 2023. – Vol. 10. – P. 67–73. DOI: 10.2176/jns-nmc.2022-0227.
93. 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. DOI: 10.3390/dermatopathology11010005.
94. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022 / C. Garbe, T. Amaral, K. Peris [et al.] // *European journal of cancer*. – 2022. – Vol. 170. – P. 236–255. DOI: 10.1016/j.ejca.2022.03.008.
95. Extent of use of artificial intelligence & machine learning protocols in cancer diagnosis: A scoping review / A. Dang, D. Dang, B. N. Vallish // *The Indian journal of medical research*. – 2023. – Vol. 157, № 1. – P. 11–22. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_555_20.
96. Keung, E. Z. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care / E. Z. Keung, J. E. Gershenwald // *Expert review of anticancer therapy*. – 2018. – Vol. 18, № 8. – P. 775–784. DOI: 10.1080/14737140.2018.1489246.
97. Single-cell RNA Sequencing Analysis Reveals the Role of Cancer-associated Fibroblasts in Skin Melanoma / W. Lian, P. Xiang, C. Ye [et al.] // *Current*

medicinal chemistry. – 2024. – Vol. 31, № 42. – P. 7015–7029. DOI: 10.2174/0109298673282799231211113347.

98. A review of the AJCC melanoma staging system in the TNM classification (eighth edition) / D. Ogata, K. Namikawa, A. Takahashi, N. Yamazaki // Japanese journal of clinical oncology. – 2021. – Vol. 51, № 5. – P. 671–674. DOI: 10.1093/jjco/hyab022.

99. Use of antihypertensive drugs and risk of cutaneous melanoma: a nationwide nested case–control study / R. Ghiasvand, L. A. M. Berge, B. K. Andreassen [et al.] // International journal of epidemiology. – 2023. – Vol. 52, № 3. – P. 887–898. DOI: 10.1093/ije/dyac223.

100. Predicting sentinel node positivity in patients with melanoma: external validation of a risk–prediction calculator the Melanoma Institute Australia nomogram using a large European population–based patient cohort / M. A. El Sharouni, A. H. R. Varey, A. J. Witkamp [et al.] // The British journal of dermatology. – 2021. – Vol. 185, № 2. – P. 412–418. DOI: 10.1111/bjd.19895.

101. Evaluation of Sex–Specific Incidence of Melanoma / C. M. Olsen, J. F. Thompson, N. Pandeya, D. C. Whiteman // JAMA Dermatology. – 2020. – Vol. 156, № 5. – P. 553–560. DOI: 10.1001/jamadermatol.2020.0470.

102. Predicting survival outcome of localized melanoma: an electronic prediction tool based on the AJCC Melanoma Database / S. J. Soong, S. Ding, D. Coit [et al.] // Annals of surgical oncology. – 2010. – Vol. 17, № 8. – P. 2006–2014. DOI: 10.1245/s10434-010-1050-z.

103. Egger, M. E. The Sunbelt Melanoma Trial / M. E. Egger, C. R. Scoggins, K. M. McMasters // Annals of surgical oncology. – 2020. – Vol. 27, № 1. – P. 28–34. DOI: 10.1245/s10434-019-07828-4.

104. Upfront surgical resection of melanoma brain metastases provides a bridge toward immunotherapy–mediated systemic control / C. Alvarez–Breckenridge, A. Giobbie–Hurder, C. M. Gill [et al.] // Oncologist. – 2019. – Vol. 24, № 5. – P. 671–679. DOI: 10.1634/theoncologist.2018-03.

105. Cancer incidence and mortality in firefighters: a state–of–the–art review and meta–analysis / E. S. Soteriades, J. Kim, C. A. Christophi, S. N. Kales // Asian Pacific journal of cancer prevention. – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 3221–3231. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.11.3221.

106. MALDI MSI of MeLiM melanoma: Searching for differences in protein profiles / R. Guran, L. Vanickova, V. Horak [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 12. – P. e0189305. DOI: 10.1371/journal.pone.0189305.

107. Prognostic survival model for people diagnosed with invasive cutaneous melanoma / P. D. Baade, P. Royston, P. H. Youl [et al.] // BMC Cancer. – 2015. – Vol. 15. – P. 27. DOI: 10.1186/s12885-015-1024-4.

108. NCCN Guidelines® Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021 / S. M. Swetter, J. A. Thompson, M. R. Albertini [et al.] // Journal of the National Comprehensive Cancer Network. – 2021. – Vol. 19, № 4. – P. 364–376. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0018.

109. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno–Oncology Biomarker Working Group / K. El Bairi, H. R. Haynes, E. Blackley [et al.]; International Immuno–Oncology Biomarker Working Group // NPJ Breast Cancer. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 150.
110. Sorokin, A. A. The length of joins in Lambek calculus / A. A. Sorokin // Moscow University Mathematics Bulletin. – 2011. – Vol. 66. – P. 101–104. DOI 10.3103/S0027132211030028.
111. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R. Siegel [et al.] // CA: a cancer journal for clinicians. – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
112. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma / S. Pasquali, A. V. Hadjinicolaou, V. Chiarion Sileni [et al.] // The Cochrane database of systematic reviews. – 2018. – Vol. 2, № 2. – CD011123. DOI: 10.1002/14651858.CD011123.pub2.
113. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma / B. Dvořánková, P. Szabo, O. Kodet [et al.] // Protoplasma. – 2017. – Vol. 254, № 3. – P. 143–150. DOI:10.1007/s00709–016–1038–z.
114. Burden of Care for Patients With In–Transit Melanoma / Z. Duncan, N. Garcia, C. Correya [et al.] // The Journal of surgical research. – 2023. – Vol. 283. – P. 550–558. DOI: 10.1016/j.jss.2022.11.009.
115. Gene Mutation–Negative Malignant Melanoma in a Prepubertal Patient: A Clinical and Molecular Case Report / A. Guźniczak, P. Sosnowska–Sienkiewicz, J. Szydłowski [et al.] // Genes (Basel). – 2025. – Vol. 16, № 8. – P. 937. DOI: 10.3390/genes16080937.
116. Indoor tanning and the MC1R genotype: risk prediction for basal cell carcinoma risk in young people / A. M. Molinaro, L. M. Ferrucci, B. Cartmel [et al.] // American journal of epidemiology. – 2015. – Vol. 181, № 11. – P. 908–916. DOI: 10.1093/aje/kwu356.
117. Reporting Quality of Studies Developing and Validating Melanoma Prediction Models: An Assessment Based on the TRIPOD Statement / I. Kaiser, K. Diehl, M. V. Heppt [et al.] // Healthcare (Basel, Switzerland). – 2022. – Vol. 10, № 2. – P. 238. DOI: 10.3390/healthcare10020238.
118. Inter–Rater Agreement in Assessing Risk of Bias in Melanoma Prediction Studies Using the Prediction Model Risk of Bias Assessment Tool (PROBAST): Results from a Controlled Experiment on the Effect of Specific Rater Training / I. Kaiser, A. B. Pfahlberg, S. Mathes [et al.] // Journal of clinical medicine. – 2023. – Vol. 12, № 5. – P. 1976. DOI: 10.3390/jcm12051976.
119. Gazzellone, A. From Churchill to Elephants: The Role of Protective Genes against Cancer / A. Gazzellone, E. Sangiorgi // Genes (Basel). – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 118. DOI: 10.3390/genes15010118.
120. High–coverage genome of the Tyrolean Iceman reveals unusually high Anatolian farmer ancestry / K. Wang, K. Prüfer, B. Krause–Kyora [et al.] // Cell genomics. – 2023. – Vol. 3, № 9. – P. 100377. DOI: 10.1016/j.xgen.2023.100377.

121. Melanoma subtypes: Genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities / R. Rabbie, P. Ferguson, C. Molina–Aguilar [et al.] // *The Journal of pathology*. – 2019. – Vol. 247, № 5. – P. 539–551. DOI: 10.1002/path.5213.
122. Current Advances in the Treatment of BRAF–Mutant Melanoma / P. Hima, N. Yacoub, R. Mishra [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 2. – P. 482. DOI: 10.3390/cancers12020482.
123. Artificial Intelligence in Head and Neck Cancer Diagnosis: A Comprehensive Review with Emphasis on Radiomics, Histopathological, and Molecular Applications / G. Broggi, A. Maniaci, M. Lentini [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2024. – Vol. 16, № 21. – P. 3623. DOI: 10.3390/cancers16213623.
124. Ladányi, A. Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression / A. Ladányi, J. Tímár // *Seminars in cancer biology*. – 2020. – Vol. 60. – P. 249–261. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.011.
125. TMB or not TMB as a biomarker: That is the question / A. Addeo, A. Friedlander, G. L. Banna, G. J. Weiss // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2021. – Vol. 163. – P. 103374. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103374.
126. The Surveillance, Epidemiology, and End Results Cancer Survival Calculator SEER*CSC: validation in a managed care setting / E. J. Feuer, B. A. Rabin, Z. Zou [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. – 2014. – Vol. 2014, № 49. – P. 265–274. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgu021.
127. The Role of Artificial Intelligence in Early Diagnosis and Molecular Classification of Head and Neck Skin Cancers: A Multidisciplinary Approach / Z. M. Semerci, H. S. Toru, E. G. Aytekin [et al.] // *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. – 2024. – Vol. 14, № 14. – P. 1477. DOI: 10.3390/diagnostics14141477.
128. Current surgical management for melanoma / S. Koizumi, T. Inozume, Y. Nakamura // *The Journal of dermatology*. – 2024. – Vol. 51, № 3. – P. 312–323. DOI: 10.1111/1346–8138.17086.
129. BRAF V600E Mutations and Beyond: A Molecular Perspective of Melanoma from a Tertiary Cancer Referral Center of India / V. Vengurlekar, O. Shetty, M. Gurav [et al.] // *South Asian journal of cancer*. – 2023. – Vol. 12, № 4. – P. 359–370. DOI: 10.1055/s–0043–1760759.
130. Biomarkers and surrogate end points: Preferred definitions and conceptual framework / Biomarkers Definitions Working group // *Clinical pharmacology and therapeutics*. – 2001. – Vol. 69, № 3. – P. 89–95. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989.
131. Low incidence of BRAF and NRAS mutations in a population with a high incidence of melanoma / G. Neville, B. Marzario, D. Shilling [et al.] // *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. – 2024. – Vol. 484, № 3. – P. 475–479. DOI: 10.1007/s00428–023–03732–1.
132. Molecular Genomic Profiling of Melanocytic Nevi / A. J. Colebatch, P. Ferguson, F. Newell [et al.] // *The Journal of investigative dermatology*. – 2019. – Vol. 139, № 8. – P. 1762–1768. DOI: 10.1016/j.jid.2018.12.033.
133. MAP2K1–mutated melanocytic tumors have reproducible histopathologic features and share similarities with melanocytic tumors with BRAF V600E

- mutations / A. K. Alomari, P. W. Harms, A. A. Andea, S. J. Warren // *Journal of cutaneous pathology*. – 2023. – Vol. 50, № 12. – P. 1083–1093. DOI: 10.1111/cup.14502.
134. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients / C. Garbe, P. Büttner, J. Bertz [et al.] // *Cancer*. – 1995. – Vol. 75, № 10. – P. 2484–2491. DOI: 10.1002/1097-0142(19950515)75:10 < 2484::aid-cnrcr2820751014>3.0.co;2-u.
135. Germline PDCDL1 Gene Variants Are Associated with Increased Primary Melanoma Thickness / E. Córdoba-Lanús, O. García-Pérez, L. Melgar-Vilaplana [et al.] // *Biomolecules*. – 2025. – Vol. 15, № 4. – P. 255–263. DOI: 10.3390/biom15040584.
136. Increased thickness of pregnancy-associated melanoma / R. L. Travers, A. J. Sober, M. Berwick [et al.] // *British journal of dermatology*. – 1995. – Vol. 15, № 6. – P. 876–883. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1995.tb16942.x.
137. Wang, C. H. Exploring Potential Therapeutic Applications of Tazarotene: Gene Regulation Mechanisms and Effects on Melanoma Cell Growth / C. H. Wang, L. K. Wang, F. M. Tsai // *Current issues in molecular biology*. – 2025. – Vol. 47, № 4. – P. 237. DOI: 10.3390/cimb47040237.
138. Risk of Death Due to Melanoma and Other Causes in Patients With Thin Cutaneous Melanomas / S. N. Lo, G. J. Williams, A. E. Cust [et al.] // *JAMA dermatology*. – 2025. – Vol. 161, № 2. – P. 167–174. DOI: 10.1001/jamadermatol.2024.4900.
139. The Transcriptional Landscape of Immune-Response 3'-UTR Alternative Polyadenylation in Melanoma / X. Yang, Y. Wu, X. Chen [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 5. – P. 3041. DOI: 10.3390/ijms25053041.
140. Machine learning to predict overall short-term mortality in cutaneous melanoma / C. Cozzolino, A. Buja, M. Rugge [et al.] // *Discover oncology*. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 13. DOI: 10.1007/s12672-023-00622-5.
141. Artificial intelligence-assisted metastasis and prognosis model for patients with nodular melanoma / C. Xu, X. Yu, Z. Ding, A. [et al.] // *Public Library of Science one*. – 2024. – Vol. 19, № 8. – P. e0305468. DOI: 10.1371/journal.pone.0305468.
142. Longitudinal evaluation of health-related quality of life after removal of high-risk melanoma in a setting where adjuvant therapy is not available / J. Sladojevic, J. Dotlic, T. Gazibara [et al.] // *Archives of dermatological research*. – 2023. – Vol. 316, № 1. – P. 27. DOI: 10.1007/s00403-023-02766-4.
143. Prognostic subclassifications of T1 cutaneous melanomas based on ulceration, tumour thickness and Clark's level of invasion: results of a population-based study from the Swedish Melanoma Register / J. Lyth, J. Hansson, C. Ingvar [et al.] // *The British journal of dermatology*. – 2013. – Vol. 168, № 4. – P. 779–786. DOI: 10.1111/bjd.12095.

144. PRAME Is an Effective Tool for the Diagnosis of Nevus–Associated Cutaneous Melanoma / A. Ronchi, G. Cazzato, G. Ingravallo [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2024. – Vol. 16, № 2. – P. 278. DOI: 10.3390/cancers16020278.
145. Payette, M. J. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report / M. J. Payette, J. M. Grant–Kels 3rd, M. Katz // *Clinics in dermatology*. – 2009. – Vol. 27, № 1. – P. 53–74. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.09.006.
146. Is Pediatric Melanoma Really That Different from Adult Melanoma? A Multicenter Epidemiological, Clinical and Dermoscopic Study / V. D. Giorgi, E. Magnaterra, B. Zuccaro [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 6. – P. 1835. DOI: 10.3390/cancers15061835.
147. Mitotic rate as an important prognostic factor in cutaneous malignant melanoma / A. Piñero–Madrona, G. Ruiz–Merino, P. Cerezuela Fuentes [et al.] // *Clinical & translational oncology*. – 2019. – Vol. 21, № 10. – P. 1348–1356. DOI: 10.1007/s12094-019-02064-4.
148. Matrakool, P. Prognostic Factors and Outcomes of Cutaneous Malignant Melanoma: A 174–Patient Cohort Study in a Tertiary Hospital in Thailand / P. Matrakool, S. Chaisrisawadisuk, T. Vongviriyangkoon // *Annals of plastic surgery*. – 2023. – Vol. 90, № 6. – P. 621–625. DOI: 10.1097/SAP.0000000000003481.
149. The global, regional, and national burden of cancer, 1990–2023, with forecasts to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2023 / L. M. Force, J. M. Kocarnik, M. L. May [et al.] // *Lancet*. – 2025. – Vol. 406, № 10512. – P. 1565–1586. DOI: 10.1016/S0140-6736(25)01635-6.
150. Dessinioti, C. The Association of Nevus–Associated Melanoma with Common or Dysplastic Melanocytic Nevus: A Systematic Review and Meta–Analysis / C. Dessinioti, A. Befon, A. J. Stratigos // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 856. DOI: 10.3390/cancers15030856.
151. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location / C. Garbe, P. Büttner, J. Bertz [et al.] // *Cancer*. – 1995. – Vol. 75, № 10. – P. 2492–2498. DOI: 10.1002/1097-0142(19950515)75:10<2492::aid-cncr2820751015>3.0.co;2-w.
152. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness / D. L. Morton, D. G. Davtyan, L. A. Wanek [et al.] // *Cancer*. – 1993. – Vol. 71, № 11. – P. 3737–3743. DOI: 10.1002/1097-0142(19930601)71:11<3737::aid-cncr2820711143>3.0.co;2-7
153. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population–based study and review / A. Måsbäck, H. Olsson, J. Westerdahl [et al.] // *Melanoma research*. – 2001. – Vol. 11, № 5. – P. 435–445. DOI: 10.1097/00008390-200110000-00001.
154. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods / C. M. Balch, T. M. Murad, S. J. Soong [et al.] // *Annals of surgery*. – 1978. – Vol. 188, № 6. – P. 732–742. DOI: 10.1097/00000658-197812000-00004.

155. The prognosis of primary and metastasising melanoma. An evaluation of the TNM classification in 2,495 patients / A. C. Häffner, C. Garbe, G. Burg [et al.] // *British journal of cancer*. – 1992. – Vol. 66, № 5. – P. 856–861. DOI: 10.1038/bjc.1992.373.
156. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system / C. M. Balch, S. J. Soong, J. E. Gershenwald [et al.] // *Journal of clinical oncology*. – 2001. – Vol. 19, № 16. – P. 3622–3634. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.16.3622.
157. Melanoma cells repress Desmoglein 1 in keratinocytes to promote tumor cell migration / H. P. Burks, J. L. Pokorny, J. L. Koetsier [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 2023. – Vol. 222, № 11. – P. e202212031. DOI: 10.1083/jcb.202212031.
158. Thin melanoma with nodal involvement: analysis of demographic, pathologic, and treatment factors with regard to prognosis / G. Karakousis, P. A. Gimotty, E. K. Bartlett [et al.] // *Annals of surgical oncology*. – 2017. – Vol. 24, № 4. – P. 952–959. DOI: 10.1245/s10434-016-5646-9.
159. High-frequency ultrasound accuracy in preoperative cutaneous melanoma assessment: A meta-analysis / G. E. Sellyn, A. A. Lopez, S. Ghosh [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2025. – Vol. 39, № 1. – P. 86–96. DOI: 10.1111/jdv.20179.
160. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma / C. M. Balch, J. A. Wilkerson, T. M. Murad [et al.] // *Cancer*. – 1980. – Vol. 45, № 12. – P. 3012–3017. DOI: 10.1002/1097-0142(19800615)45:12<3012::aid-cncr2820451223>3.0.co;2-o.
161. The effect of the AJCC 7th edition change in T1 melanoma substaging on national utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma / T. J. Hieken, T. E. Grotz, N. I. Comfere [et al.] // *Melanoma research*. – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 157–163. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000143.
162. Development and validation of time-to-event models to predict metastatic recurrence of localized cutaneous melanoma / G. Wan, D. W. Leung, M. S. DeSimone [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2024. – Vol. 90, № 2. – P. 288–298. DOI: 10.1016/j.jaad.2023.08.105.
163. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma / R. L. Barnhill, J. Katzen, A. Spatz [et al.] // *Journal of cutaneous pathology*. – 2005. – Vol. 32, № 4. – P. 268–273. DOI: 10.1111/j.0303-6987.2005.00310.x.
164. Clinical impact of ulceration width, lymphovascular invasion, microscopic satellitosis, perineural invasion, and mitotic rate in patients undergoing sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: a retrospective observational study at a comprehensive cancer center / K. Namikawa, P. P. Aung, J. E. Gershenwald [et al.] // *Cancer medicine*. – 2018. – Vol. 7, № 3. – P. 583–593. DOI: 10.1002/cam4.1320.
165. Tumor mitotic rate is an independent predictor of survival for nonmetastatic melanoma / J. L. Evans, R. J. Vidri, D. C. MacGillivray, T. L. Fitzgerald

- // Surgery. – 2018. – Vol. 164, № 3. – P. 589–593. DOI: 10.1016/j.surg.2018.04.016.
166. The Genomic Landscape of Melanoma and Its Therapeutic Implications / T. Yang, S. Yu, C. L. Ke [et al.] // Genes (Basel). – 2023. – Vol. 14, № 5. – P. 1021. DOI: 10.3390/genes14051021.
167. Umbilical cord blood–derived cytotoxic T lymphocytes target melanoma via HLA–A2–restricted tumour antigens / J. Liang, X. Jiang, X. He [et al.] // Clinical and translational medicine. – 2025. – Vol. 15, № 10. – P. e70444. DOI: 10.1002/ctm2.70444.
168. Tumoral inflammatory infiltrate does not predict metastases in thin primary cutaneous melanomas / M. Bevilacqua, M. C. Widholzer Rey, G. C. Antonini Cappellini [et al.] // Anais brasileiros de dermatologia. – 2023. – Vol. 98, № 6. – P. 793–798. DOI: 10.1016/j.abd.2022.09.011.
169. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression / W. H. Clark, D. E. Elder, D. Guerry [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 1989. – Vol. 81, № 24. – P. 1893–1904. DOI: 10.1093/jnci/81.24.1893.
170. Role of tumor–infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and treatment strategies: A systematic review and meta–analysis / M. Garutti, R. Bruno, J. Polesel [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10, № 12. – P. e32433. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e32433.
171. Myofibroblasts persist through immune privilege mechanisms to mediate oral submucous fibrosis: Uncovering the pathogenesis / M. Sharma, S. S. Shetty, S. Soi [et al.] // Journal of oral biology and craniofacial research. – 2024. – Vol. 14, № 6. – P. 773–781. DOI: 10.1016/j.jobcr.2024.10.008.
172. The NSCLC immunotherapy response predicted by tumor–infiltrating T cells via a non–invasive radiomic approach / J. Min, F. Dong, Y. Chen. [et al.] // Frontiers in immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1379812. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1379812.
173. Metabolic regulation of tumor–associated macrophage heterogeneity: insights into the tumor microenvironment and immunotherapeutic opportunities / Y. Qian, Y. Yin, Giraldo, X. Zheng [et al.] // Biomarker research. – 2024. – Vol. 12, №1. – P. 1. DOI: 10.1186/s40364–023–00549–7.
174. The immune contexture in cancer prognosis and treatment / W. H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès–Fridman, G. Kroemer // Nature reviews. Clinical oncology. – 2017. – Vol. 14, № 12. – P. 717–734. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.101.
175. Barnes, T. A. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer / T. A. Barnes, E. Amir // British journal of cancer. – 2017. – Vol. 117, № 4. – P. 451–460. DOI: 10.1038/bjc.2017.220.
176. Invasive Cutaneous Melanoma: Evaluating the Prognostic Significance of Some Parameters Associated with Lymph Node Metastases / O. Vița, A. Jurescu, A. Văduva [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2023. – Vol. 59, № 7. – P. 1241. DOI: 10.3390/medicina59071241.
177. Wouters, M. C. A. Prognostic significance of tumor–infiltrating B cells and plasma cells in human cancer / M. C. A. Wouters, B. H. Nelson // Clinical cancer

- research. – 2018. – Vol. 24, № 24. – P. 6125–6135. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR–18–1481.
178. Recent advances in targeting CD8 T–cell immunity for more effective cancer immunotherapy / A. Durgeau, Y. Virk, S. Corgnac, F. Mami–Chouaib // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 14. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00014.
179. Exhausted T cells hijacking the cancer–immunity cycle: Assets and liabilities / A. E. Brunell, R. Lahesmaa, A. Autio [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1151632. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1151632.
180. Morvan, M. G. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks / M. G. Morvan, L. L. Lanier. // *Nature reviews. Cancer*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 7–19. DOI: 10.1038/nrc.2015.5.
181. The impact of MITF expression on tumor–infiltrating lymphocytes in melanoma: Insights into immune microenvironment dynamics / D. Vučinić, M. Lekić, G. Žauhar [et al.] // *Biomolecules & biomedicine*. – 2025. – Vol. 25, № 9. – P. 2050–2057. DOI: 10.17305/bb.2025.12125.
182. Koenderman, L. Neutrophils in cancer: from biology to therapy / L. Koenderman, N. Vrisekoop // *Cellular & molecular immunology*. – 2025. – Vol. 22, № 1. – P. 4–23. DOI: 10.1038/s41423–024–01244–9.
183. Morphological and Immunohistochemical Aspects with Prognostic Implications and Therapeutic Targets of Primary Sinonasal Mucosal Melanoma: A Retrospective Study / C. M. Trandafir, R. M. Closca, M. Poenaru [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2024. – Vol. 16, № 16. – P. 2863. DOI: 10.3390/cancers16162863.
184. Lymphocyte T Subsets and Outcome of Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma Patients: An Oncologist's Perspective on Current Knowledge / C. Martínez–Vila, E. A. González–Navarro, C. Teixido [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 17. – P. 9506. DOI: 10.3390/ijms25179506.
185. Tumor–infiltrating lymphocytes in melanoma: from prognostic assessment to therapeutic applications / M. Bida, T. V. Miya, R. Hull [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1497522. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1497522.
186. Immunophenotyping of stage III melanoma reveals parameters associated with patient prognosis / N. Jacquelot, M. P. Roberti, D. P. Enot [et al.] // *Journal of investigative dermatology*. – 2016. – Vol. 136, № 5. – P. 994–1001. DOI: 10.1016/j.jid.2015.12.042.
187. B cells present a double–sided effect in digestive system tumors: a review for tumor microenvironment / J. Xu, W. Lu, J. Yang, X. Liu // *Translational gastroenterology and hepatology*. – 2024. – Vol. 6, № 9. – P. 46. DOI: 10.21037/tgh–23–127.
188. Breakthrough of solid tumor treatment: CAR–NK immunotherapy / W. Wang, Y. Liu, Z. He [et al.] // *Cell death discovery*. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 40. DOI: 10.1038/s41420–024–01815–9.
189. Tumor Pigmentation Does Not Affect Light–Activated Belzupacap Sarotalocan Treatment but Influences Macrophage Polarization in a Murine

- Melanoma Model / S. Ma, R. V Huis In't Veld, Y. Hao [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2024. – Vol. 65, № 1. – P. 42. DOI: 10.1167/iovs.65.1.42.
190. Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma / K. Tobal, K. Deuble, A. McCartney, S. Lightman // *Melanoma research*. – 1993. – Vol. 3, № 1. – P. 63–65. DOI: 10.1097/00008390-199304000-00009.
191. Coussens, L. M. Inflammation and cancer / L. M. Coussens, Z. Werb // *Nature*. – 2002. – Vol. 420, № 6917. – P. 860–867. DOI: 10.1038/nature01322.
192. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma / A. Ladányi, J. Kiss, A. Mohos [et al.] // *Cancer immunology, immunotherapy*. – 2011. – Vol. 60, № 12. – P. 1729–1738. DOI: 10.1007/s00262-011-1071-x.
193. Unveiling the pan-cancer landscape of S100A16: A comprehensive analysis of prognostic significance, drug sensitivity, and immunomodulatory roles / S. Shang, L. Hu [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2024. – Vol. 103, № 41. – e39998. DOI: 10.1097/MD.00000000000039998.
194. Златник, Е. Ю. Факторы локального клеточного иммунитета при меланоме кожи / Е. Ю. Златник, А. В. Бахтин, С. С. Кочуев [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 5. – С. 88.
195. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа / З. Г. Кадагидзе, А. И. Черткова, Т. Н. Заботина [и др.] // *Злокачественные опухоли*. – 2015. – № 1(12). – С. 24–30.
196. Houghton, A. N. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma / A. N. Houghton, J. S. Gold, N. E. Blachere // *Current opinion in immunology*. – 2001. – Vol. 13, № 2. – P. 134–140. DOI: 10.1016/s0952-7915(00)00195-3.
197. Suda, K. Recent advances in cancer immunotherapy / K. Suda // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 335. DOI: 10.3390/biom11020335.
198. Circulating immune cell phenotype dynamics reflect the strength of tumor-immune cell interactions in patients during immunotherapy / J. I. Griffiths, P. Wallet, L. T. Pflieger [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117, № 27. – P. 16072–16082. DOI: 10.1073/pnas.1918937117.
199. A matching-adjusted indirect comparison of combination nivolumab plus ipilimumab with BRAF plus MEK inhibitors for the treatment of BRAF-mutant advanced melanoma / A. A. Tarhini, K. Toor, K. Chan [et al.] // *ESMO Open*. – 2021. – Vol. 6, № 2. – P. 100050. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100050.
200. COLUMBUS 5-Year Update: A Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Encorafenib Plus Binimetinib Versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients With BRAF V600-Mutant Melanoma / R. Dummer, K. T. Flaherty, C. Robert [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40, № 36. – P. 4178–4188. DOI: 10.1200/JCO.21/02659.
201. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3

trial / R. Gutzmer, D. Stroyakovskiy, H. Gogas [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395, № 10240. – P. 1835–1844. DOI: 10.1016/S0140–6736(20)30934–X.