

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
дополнительного профессионального образования  
«Российская медицинская  
академия непрерывного профессионального образования»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**КРЫЛОВЕЦКАЯ МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ПРИ МЕТАСТАЗАХ МЕЛАНОМЫ В  
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Комаров Игорь Геннадьевич**

Москва – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>3</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>8</b>
1.1. Клинико-эпидемиологические особенности первичной меланомы кожи	8
1.2. Основные подходы в лечении метастатической меланомы .....	14
1.3.1. Метастазы меланомы без выявленного первичного очага .....	20
1.3.2. Определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациентов с меланомой кожи методом проточной цитометрии	27
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>31</b>
2.1. Дизайн исследования .....	31
2.2. Клиническая характеристика больных .....	32
2.3. Методы исследования.....	33
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	41
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>43</b>
<b>ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ .....</b>	<b>58</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>70</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>74</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>75</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>77</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>78</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Метастазы злокачественной опухоли без выявленного первичного очага – понятие, включающее в себя случаи онкологического заболевания, проявляющегося метастатическими опухолями, в то время как первичный очаг невозможно установить ни на основании анамнеза, ни при обследовании. По данным различных авторов такие пациенты составляют от 2 до 10% онкологических больных, обратившихся за медицинской помощью [1]. Опухоли без выявленного первичного очага занимают 7-е место по частоте встречаемости и 4-е место в структуре смертности среди всех злокачественных новообразований [2]. Такое проявление заболевания нередко встречается и при меланоме – злокачественной опухоли, развивающейся из меланоцитов (пигментных клеток, продуцирующих меланин), преимущественно локализующейся в коже, реже – сетчатке глаза, слизистых оболочках. За последние три десятилетия в России и в мире отмечается неуклонный рост заболеваемости меланомой.

После установления диагноза: метастазы злокачественной опухоли без выявленного первичного очага идентификация первичного источника осуществляется при жизни только у 25% больных. Даже на аутопсии первичный очаг находят в среднем в 15–20% случаев [1].

Так как заболевание на первых этапах проявляется метастазами, можно говорить о первично генерализованном процессе, который к моменту обращения пациента за медицинской помощью, как правило, выходит за пределы органа или локальной зоны. Клинические проявления заболевания неспецифичны и зависят от локализации очагов метастатического поражения и распространенности опухолевого процесса.

При метастазах меланомы без выявленного первичного очага идентификация первичной опухоли при её локализации на коже не представляет сложностей, однако при расположении первичного очага на слизистой, его

выявление может быть весьма затруднительным. В то же время в доступных источниках нет данных о том, влияет ли выявление первичного очага на прогноз заболевания у больных с метастазами меланомы.

Таким образом, проблема метастатического поражения меланомой без выявленного первичного очага представляет собой сложный вопрос в онкологии, требующий тщательного изучения. Для ответа на поставленные задачи необходимо проведение исследования, основанного на репрезентативном материале, позволяющем провести полноценный анализ и сравнение ретроспективных данных, полученных при сравнении групп пациентов.

### **Цель исследования**

Улучшение результатов лечения больных с метастазами меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага.

### **Задачи исследования**

1. Сравнить особенности клинического течения метастазов меланомы без выявленного первичного очага и меланомы с известной локализацией и аналогичными метастазами.

2. Оценить прогностическое значение факта выявления первичного очага при метастазах меланомы.

3. Определить значение панели иммуногистохимических реакций, включая HMB45, Melan A, MITF, S-100, тирозиназу для дифференциальной диагностики меланомы и других опухолей при метастазах без выявленного первичного очага.

4. Изучить частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при меланоме в зависимости от клинических и морфологических характеристик опухоли.

5. Разработать диагностический алгоритм и практические рекомендации для больных метастазами меланомы без выявленного первичного очага.

## **Научная новизна**

Впервые в Российской Федерации на большом клиническом материале подробно изучены демографические, клинические и морфологические особенности больных метастазами меланомы без выявленного первичного очага. Проведена сравнительная оценка клинического течения метастазов меланомы без выявленного первичного очага и меланомы с известной локализацией и аналогичными клиническими проявлениями. Разработан алгоритм диагностических и лечебных мероприятий, позволяющий проводить больным с метастазами меланомы без выявленного первичного очага комплексное лечение. На основании сравнения групп пациентов с метастазами меланомы без установленной первичной опухоли и меланомы с известной локализацией и аналогичными метастазами установлено отсутствие достоверных различий в клиническом течении.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанная тактика диагностики позволяет персонализировать лечение больных метастазами меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага, что позволило улучшить результаты лечения данной когорты пациентов.

## **Методология и методы исследования**

Для проведения диссертационного исследования была выбрана группа пациентов с метастазами меланомы в лимфатических узлах с последующей стратификацией их на группы в зависимости от наличия выявленного первичного очага. Проведен анализ полученных данных и разработан алгоритм по диагностике меланомы без выявленного первичного очага.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Клиническое течение метастазов меланомы без выявленного первичного очага протекает более благоприятно по сравнению с пациентами с выявленной первичной опухолью.

2. Определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных меланомой с выявленным первичным очагом имеет важное значение, так как позволяет установить истинную распространенность опухоли, что влияет на эффективность лечения и выживаемость больных.

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

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований п. 3 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний».

### **Степень достоверности и апробация диссертации**

Достаточный объем клинического материала (263 пациента с метастазами меланомы в лимфатических узлах, получивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России с 2005 г. по 2019 г. в соответствии с Клиническими рекомендациями Российской Федерации), качественный ретроспективный анализ клинического материала, всесторонняя и тщательная оценка роли иммуногистохимии, а, в частности, роли экспрессии HMB-45 и отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в костном мозге в дальнейшем прогнозировании и лечении пациентов с метастазами меланомы без выявленного первичного очага, а также использование современных методов статистической обработки данных делают полученные результаты достоверными.

Основные положения научной работы представлены на научных конференциях в России.

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием отделения эндоскопического, отделения абдоминальной онкологии №4 (эндокринной хирургии), отделения опухолей костей и мягких тканей №2 (онкоортопедии) и отделения опухолей головы и шеи НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры онкологии и паллиативной медицины им. А.И. Савицкого ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, состоявшейся 01 июня 2023 года.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из которых 5 – в научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикаций материалов кандидатских и докторских диссертаций.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Клинико-эпидемиологические особенности первичной меланомы кожи

С 70-х годов прошлого столетия проблема меланомы кожи все чаще становится объектом исследований. Меланома – одна из злокачественных опухолей, плохо поддающихся лечению, так как является одной из агрессивных форм новообразований, обладающей высоким потенциалом регионарного метастазирования, способностью к диссеминации по коже, множественному метастазированию в совокупности с возможным отсутствием местного роста [3].

Термин «меланома» предложен Carswell в 1838 г., но широко вошел в лексикон онкологов лишь в шестидесятых годах двадцатого века. Ранее использовались названия «меланокарцинома», «невокарцинома», «меланосаркома», «меланобластома», «меланоцитобластома» [3, 4].

Данная патология составляет 1–4% всех онкологических заболеваний. Заболеваемость и смертность от меланомы кожи в ряде стран увеличивается значительно быстрее, чем от других злокачественных опухолей. Рост заболеваемости меланомой кожи отмечен многими российскими и зарубежными исследователями, такая тенденция наблюдается повсеместно в мире [5]. Наибольшая заболеваемость меланомой кожи наблюдается в Австралии и Новой Зеландии, наиболее низкий уровень заболеваемости в Микронезии и Восточной Африке. По данным международного интерактивного проекта Globocan (2020 год), стандартизованные показатели заболеваемости среди населения различных стран довольно вариабельны: среди мужчин – от 0,35 в Микронезии до 41,6 в Новой Зеландии и Австралии среди женщин – от 0,6 в Микронезии до 30,5 в Новой Зеландии и Австралии (на 100 тысяч женщин).

В России, по данным А. Д. Каприна с соавторами, ежегодно меланомой кожи заболевают свыше 10200 человек и более 3600 больных умирают от нее. В 2020 году в структуре онкозаболеваемости доля меланомы кожи у мужчин



составила 1,6%, у женщин – 2%. По сравнению с 2010 годом эти цифры возросли на 44,36% у мужчин, при среднегодовом темпе прироста 3,57% и 27,96% у женщин, при среднегодовом темпе прироста 2,42%. Темп прироста стандартизованных показателей заболеваемости меланомой кожи в России с 2010 по 2020 гг. равен 19,91%, уступая раку предстательной, щитовидной, поджелудочной желез, печени и злокачественным опухолям полости рта и глотки. Средний возраст больных с впервые в жизни установленным диагнозом «меланома кожи» составил в 2020 году у женщин – 62,1, у мужчин – 61,5 лет. От меланомы кожи в 2020 году умерло 1597 мужчин и 1841 женщин. Средний возраст умерших составил 65,9 лет. Прирост динамики смертности в России от меланомы кожи составил 1,95% [6].

Меланома кожи представляет собой злокачественную опухоль, возникающую в результате неопластической трансформации меланобластов, меланоцитов и невусных клеток, являясь первым локальным проявлением общего неопластического заболевания всей меланоцитарной системы организма человека [7]. В этиологии меланомы кожи лидируют избыточная инсоляция и генетические факторы [8, 9, 10]. Одним из основных пусковых механизмов, лежащих в основе заболевания меланомой, считается произошедшее за последнее время по различным причинам увеличение суммарного времени воздействия ультрафиолетовой части спектра естественного солнечного света на кожу человека. Избыточная инсоляция приводит не только к повреждению кератиноцитов и меланоцитов, но и вызывает специфическую иммуносупрессию, связанную с нарушением функции естественных клеток-киллеров, что сопровождается повышенным риском развития меланомы [11]. Среди других факторов риска меланомы выделяют: фототип кожи I-II, общее число доброкачественных меланоцитарных невусов на коже, наличие атипичных меланоцитарных невусов, а также семейное накопление случаев меланомы у близких родственников. Имеются указания на определенное значение наследственности в риске появления меланомы [3]. Т. П. Казубская и соавторы провели анализ роли наследственных факторов и синдромов, предрасполагающих

к развитию меланомы кожи, и назвали следующие: семейная меланома, синдром семейных диспластических невусов, нейрокожный меланоз, нейрофиброматоз, синдром базальноклеточного невуса, синдром Гарднера, пигментная ксеродерма, синдром «семейного рака», синдром Li-Fraumeni [12].

Как указывает В. G. Kousseff, потенциальная роль генетических факторов при возникновении меланомы кожи очевидна, хотя до конца остается неясной. Обращает на себя внимание участие различных систем генов, мутация которых, по-видимому, объясняет предрасположенность к развитию различных опухолей в ассоциации с меланомой. Отмечена также возможность постепенного перерождения невусов, пигментных пятен – лентиго [13].

Среди эндогенных предрасполагающих факторов отмечают такие биологические особенности, как белая раса, светлая, склонная к солнечным ожогам кожа, рыжие либо светлые волосы, голубые глаза, нарушения пигментации, а также эндокринные, иммунные, репродуктивные нарушения и сопутствующие заболевания [3]. Таким образом, имеется огромное количество предрасполагающих факторов и факторов риска развития меланомы.

Патогенез меланомы – сложный процесс, сопровождающийся значительными метаболическими и молекулярными нарушениями, и следует признать, что многие вопросы остаются пока неясными, недостаточно изученными [14]. В патогенез меланомы вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов. Основная роль в патогенезе меланомы кожи принадлежит MAPK-сигнальному пути (RAS/RAF/MEK/ERK) – ключевому регулятору клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания и метастазирования. Гиперактивация MAPK-сигнального пути в клетках меланомы в первую очередь происходит вследствие мутации генов BRAF и NRAS [15–17]. Клинико-патологические характеристики меланом с мутациями BRAF и NRAS различаются [18, 19]. Активирующие мутации протеинкиназы BRAF характерны для меланомы кожи, не подверженной хроническому ультрафиолетовому облучению, тогда как мутации ГТФ-азы NRAS чаще встречаются в образцах меланомы на участках кожи с повреждениями, вызванными хронической

инсоляцией. Частота мутантного NRAS выше в акральной меланоме и меланоме слизистых оболочек, а также во врожденных меланоцитарных невусах с повышенным риском трансформации в меланому [20]. Мутации гена KIT не встречаются одновременно с мутациями NRAS или BRAF. Мутации рецептора KIT, обладающего тирозинкиназной активностью, являются специфичными для акральной меланомы и меланомы слизистых оболочек, а в меланоме кожи встречаются в 2% случаев на участках тела, подверженных хроническому солнечному облучению и повреждению [21, 22]. Тестирование мутаций онкогенов BRAF, NRAS и KIT в первичных опухолях или метастазах меланомы крайне важно для выбора тактики лечения больных и для определения мишеней таргетной терапии с целью назначения соответствующих препаратов [15, 23].

Несмотря на то, что меланома кожи относится к числу опухолей визуальных локализаций, современную диагностику ее нельзя считать удовлетворительной. Н. Трапезников с соавторами справедливо считали меланому «главной нозологической формой по диагностической ответственности врача» [24]. Настораживает невысокая выявляемость меланомы кожи при профилактических осмотрах (12,1%) [25]. В России лишь больше половины лиц, страдающих данной патологией, выявляется на ранних стадиях заболевания, по данным за 2021 г. больные с I стадией выявлены в 36,0% случаев, с II стадией – в 43,5%, с III стадией – в 11,0%, и с IV стадией – в 8,5%, стадия не установлена в 0,9% случаев.

Меланома кожи отличается чрезвычайным разнообразием клинической картины, вариабельностью течения неопластического процесса. Чаще заболевание характеризуется бурным прогрессированием и диссеминацией по организму, реже – относительно благоприятным течением с продолжительным интервалом от момента возникновения первичной опухоли до клинической манифестации метастазов [26–28].

Уже давно отмечено, что различные клинико-морфологические факторы влияют на характер течения болезни, частоту регионарного и отдаленного метастазирования, а также на выживаемость. К таким факторам относятся: локализация опухоли, ее размер, форма роста, наличие изъязвления, лимфоидно-

плазмоцитарная реакция, гистологический тип опухоли, толщина опухоли по A. Breslow [29] в мм, уровень инвазии по W. Clark [30, 31], митотическая активность клеток опухоли и так далее [32–34]. Прогнозирование при меланоме кожи с использованием отдельных клинических и морфологических признаков неэффективно, так как позволяет судить о возможности того или иного исхода заболевания с вероятностью в пределах 15–45% [35]. Совокупность клинико-морфологических признаков без учета отдаленных результатов лечения в сроки 3, 5, 10 лет определяет прогноз жизни с точностью до 86,5, 84,0, 82%, соответственно [36].

Наиболее важным прогностическим фактором является распространенность болезни. Практически все исследователи отмечают резкое снижение уровня выживаемости при развитии метастазов у больных меланомой кожи. Локализованную форму меланомы диагностируют примерно в 80–85% случаев, меланому с метастазами в регионарных лимфатических узлах – в 10–15%. В 3–5% случаев выявляется первично-дессеминированная опухоль. Лимфогенный путь – главный при метастатическом прогрессировании меланомы кожи. Появление метастазов без поражения лимфатической системы встречается достаточно редко (8–10%) [37].

У каждого третьего больного, впервые обратившегося к врачу, уже имеются клинические признаки метастатического поражения регионарных лимфатических узлов. По данным секционного материала умерших от меланомы, гематогенные метастазы наиболее часто развиваются в легких (67%), в печени (62%), костях (49%), сердце (44%), желудке (41%) [38]. Гематогенные метастазы, как правило, бывают множественные. Наиболее высокий риск их развития в первые 2 года после удаления первичной опухоли, однако метастазы могут реализовываться и через 7–10 и более лет. Важным в плане понимания механизмов запуска «дремлющих» метастазов является открытие факторов роста, ставших предметом исследования последних десятилетий. В 1949 году Сильвен (B. Sylven) предложил клиническую классификацию степени распространения меланомы кожи [39]. Автор различал три стадии опухолевого процесса в зависимости от наличия или

отсутствия регионарных и отдаленных метастазов. Впоследствии неоднократно предпринимались попытки расширить и детализировать данную классификацию. В настоящее время эта модифицированная классификация широко используется клиницистами всего мира. При диагностике и выборе тактики лечения меланомы кожи используется более информативная в клинических и патологоанатомических аспектах классификация TNM Международного противоракового союза. Клиническая классификация особенно важна для выбора и оценки методов лечения, а морфологическая – для определения прогноза, выбора дальнейшей тактики лечения и оценки отдаленных результатов. Согласно данным большинства патологоанатомов, важное значение для прогноза заболевания имеют такие морфологические признаки как митотическая активность и уровень инвазии в дерму [40, 30, 31], толщина опухоли [29], наличие изъязвления новообразования. Особенностью меланомы кожи является раннее местное распространение путем инфильтративного роста и непосредственного проникновения опухолевых клеток в межтканевые щели, кожные и подкожные лимфатические пути, а также продвижение эмболов (опухолевых клеточных комплексов) по лимфатическим и кровеносным сосудам [41–43].

При распространении заболевания наиболее часто первыми в метастатический процесс вовлекаются регионарные лимфатические узлы [35, 44–46]. При этом пятилетняя выживаемость пациентов с метастазами в лимфатических узлах по сравнению с выживаемостью пациентов без подобных метастазов ниже примерно на 40%, при прочих равных условиях [35, 47–50]. Выживаемость пациентов с меланомой кожи зависит как от количества лимфатических узлов, вовлеченных в опухолевый процесс [51–54], так и от степени их поражения (т.е. наличия в лимфатических узлах макро- или микрометастазов) [35, 52, 55–58].

Так, десятилетняя выживаемость пациентов с меланомой кожи при наличии микрометастазов в одном лимфатическом узле составляет 63% (при IIIA стадии) и 47,7% (при IIIB стадии) в зависимости от наличия либо отсутствия изъязвления первичной опухоли, тогда как при макрометастазах в одном лимфоузле – 24,4%, при

макрометастазах более чем в четырех лимфатических узлах – 18,4% [28, 35, 52, 59, 60]. Эти факты имеют важное прогностическое значение, что было доказано Американским Объединенным Комитетом по Раку (AJCC) на основании исследования 30946 пациентов и внесены в систему определения стадийности TNM 7 [61–63].

## **1.2. Основные подходы в лечении метастатической меланомы**

У пациентов с мутацией в гене BRAF в 1-й линии терапии, как правило, используется либо комбинация ингибиторов протеинкиназы (ИПК) BRAF и MEK, либо комбинированное лечение МКА-блокаторами PD1 и МКА, блокирующими тормозные сигналы каскада CTLA4 (МКА-блокаторы CTLA4), либо монотерапия МКА-блокаторами PD1. При недоступности комбинированного лечения ИПК BRAF и MEK или МКА-блокаторами PD1 возможно проведение монотерапии ИПК BRAF. Лечение ИПК BRAF и MEK проводится до прогрессирования заболевания или развития выраженных некупируемых токсических явлений [64].

У пациентов с большой опухолевой массой и высокой скоростью прогрессирования заболевания отдается предпочтение комбинации ИПК BRAF и MEK. У пациентов с метастатической меланомой, не имеющих симптомов заболевания, предпочтительным вариантом лечения следует считать комбинированное лечение МКА-блокаторами PD1 и МКА-блокаторами CTLA4 либо монотерапию МКА-блокаторами PD1.

Терапия ИПК BRAF или комбинацией ИПК BRAF и MEK пациентам с неизвестным статусом опухоли в отношении мутации в гене BRAF, как правило, не проводится, так как имеются сведения о возможности парадоксальной активации MAPK-сигнального пути и ускорения роста опухоли при применении ИПК BRAF на клеточных линиях без мутации в гене BRAF [65].

При проведении терапии ИПК BRAF или комбинацией ИПК BRAF и MEK оценка эффекта лечения проводится каждые 8–10 недель, при этом не допускается перерывов в приеме препаратов на период оценки эффекта лечения.

При наличии признаков прогрессирования заболевания на фоне применения ИПК BRAF либо комбинации ИПК BRAF и MEK или появления признаков непереносимости такой терапии при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и при ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев пациентов, как правило, переводят на терапию МКА-блокаторами PD1 или комбинацию МКА-блокаторов PD1 и CTLA4 [66].

При монотерапии МКА-блокаторами PD-1 (Programmed cell death 1) и комбинированной терапии МКА-блокаторами PD1 и CTLA4 получены сходные результаты у пациентов с меланомой, резистентной к ИПК BRAF и MEK. Однако комбинированная терапия МКА-блокаторами PD1 и CTLA4 была связана с более высокой частотой нежелательных явлений по сравнению с монотерапией.

При наличии признаков прогрессирования заболевания на фоне применения монотерапии ИПК BRAF переключение пациентов на комбинированную терапию ИПК BRAF + MEK нежелательно, так как вероятность получить ответ на лечение остается низкой, а медиана времени до прогрессирования не превышает трех месяцев.

При медленно прогрессирующей метастатической меланоме у пациентов с ожидаемой продолжительностью жизни не менее 6 месяцев при отсутствии противопоказаний независимо от статуса мутации BRAF, как правило, используются препараты ипилимумаб или комбинации МКА-блокаторов PD1 и CTLA4 после прогрессирования болезни на фоне стандартной терапии (МКА-блокаторы PD1, ИПК BRAF, комбинация ИПК BRAF и MEK) или в случае ее непереносимости.

При невозможности проведения терапии (или сроке ожидания начала такой терапии более одного месяца) ИПК BRAF или комбинацией ИПК BRAF и MEK, или МКА-блокаторами PD1, или МКА-блокаторами CTLA4 в 1-й или во 2-й линии у пациентов с метастатической меланомой и мутацией в гене BRAF в опухоли при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и при ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев рекомендовано проведение цитотоксической химиотерапии [67, 68].

Данный вид лечения менее эффективен в отношении увеличения общей продолжительности жизни, времени до прогрессирования, частоты объективных ответов на лечение и в большинстве случаев сопровождается более выраженными нежелательными реакциями в сравнении с ИПК BRAF или комбинацией ИПК BRAF и MEK, или МКА-блокаторами PD1 или CTLA4. В связи с этим следует избегать применения химиотерапии в первой линии лечения пациентов метастатической или нерезектабельной меланомой и мутацией в гене BRAF всегда, когда это возможно.

При прогрессировании после первой линии терапии одним из МКА-блокаторов PD1 у больных меланомой кожи с мутацией в гене BRAF предпочтение отдается монотерапии блокатором CTLA4 или комбинированной терапии ИПК BRAF и MEK [69, 70].

Рекомендуется повторное назначение комбинированной терапии ИПК BRAF и MEK у пациентов, которые ранее длительно (более шести месяцев) получали терапию ИПК BRAF и MEK и у которых был отмечен объективный ответ на лечение, в случае прогрессирования или непереносимости МКА-блокаторами PD1 или комбинации МКА-блокаторов PD1 и CTLA4, назначенных во второй линии.

При изолированном прогрессировании единичных метастазов с возможностью их хирургического удаления или проведения стереотаксической радиохирургии на прогрессирующие очаги («олигопрогрессирование»), как правило, продолжается проведение монотерапии МКА-блокаторами PD-1.

У пациентов с мутацией в гене c-Kit и ожидаемой продолжительностью жизни более трех месяцев в качестве терапии первой или последующих линий проводится монотерапия МКА-блокаторами PD1 или комбинацией МКА-блокаторов CTLA4 и PD1 [69, 70].

У пациентов с мутацией в гене c-Kit и ожидаемой продолжительностью жизни более трех месяцев в качестве терапии первой или последующих линий рекомендована терапия ИПК c-Kit иматинибом. Лечение иматинибом проводится до прогрессирования заболевания или развития выраженных, некупируемых редукцией дозы токсических явлений.



Оценка эффекта терапии ИПК иматинибом проводится не реже одного раза через каждые 8–10 недель терапии, не допуская перерывов в приеме препарата на период оценки эффекта [71, 72].

При наличии признаков прогрессирования заболевания на фоне применения иматиниба при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев проводится терапия модуляторами иммунологического синапса – МКА-блокаторами PD1 и/или CTLA4 (в случае, если она не проводилась ранее).

При невозможности проведения терапии (или сроке ожидания начала такой терапии более одного месяца) иматинибом или МКА-блокаторами PD1 и/или CTLA4 в 1-й или во 2-й линии у пациентов с метастатической или нерезектабельной меланомой с мутацией в гене *c-Kit* в опухоли при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и при ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев рекомендуется проведение цитотоксической химиотерапии. Данный вид лечения менее эффективен в отношении увеличения общей продолжительности жизни, времени до прогрессирования, частоты объективных ответов на лечение и в большинстве случаев сопровождается более выраженными нежелательными реакциями в сравнении с ИПК *c-Kit* или МКА-блокаторами PD1 или CTLA4. В этой связи следует избегать применения химиотерапии в первой линии лечения пациентов метастатической или нерезектабельной меланомой и мутацией в гене *c-Kit* всегда, когда это возможно [73, 74].

У пациентов без мутаций в генах BRAF и *c-Kit* при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и при ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев проводится терапия комбинацией МКА-блокаторов PD1 и CTLA4 или монотерапия МКА-блокаторами PD1.

При очевидном прогрессировании болезни на фоне терапии одним из МКА-блокаторов PD1 рекомендовано рассмотрение возможности проведения терапии комбинацией МКА-блокаторов PD1 и CTLA4 или монотерапию МКА-блокатором CTLA4.

При невозможности проведения терапии (или сроке ожидания начала такой терапии более 1 мес.) МКА-блокаторами PD1 и CTLA4 в 1-й или во 2-й линии у пациентов с метастатической или нерезектабельной меланомой без мутаций в генах BRAF и c-Kit в опухоли при сохранении удовлетворительного общего состояния пациента (ECOG 0–2) и при ожидаемой продолжительности жизни более трех месяцев рекомендуется проведение цитотоксической химиотерапии. Назначение других лекарственных препаратов для лечения диссеминированной формы меланомы проводится решением консилиума или врачебной комиссии. Данный вид лечения менее эффективен в отношении увеличения общей продолжительности жизни, времени до прогрессирования, частоты объективных ответов на лечение и в большинстве случаев сопровождается более выраженными нежелательными реакциями в сравнении с МКА-блокаторами PD1 или CTLA4. В связи с этим следует избегать применения химиотерапии в 1-й линии лечения пациентов метастатической или нерезектабельной меланомой без мутаций в генах BRAF и c-Kit всегда, когда это возможно [75].

При прогрессировании после адьювантной терапии одним из МКА-блокаторов PD1 предпочтение рекомендуется отдавать комбинации МКА-блокаторов PD1 и блокаторов CTLA4.

МКА-блокаторы PD1 или CTLA4 представляют собой принципиально новый класс лекарственных препаратов, эффект которых развивается в результате воздействия на элементы иммунной системы пациента. Сами лекарственные средства не обладают противоопухолевым эффектом, а элиминация опухолевых клеток достигается за счет активации клеток иммунной системы пациента. Это обуславливает особенности развития клинического и радиологического ответа на лечение.

Всем пациентам с меланомой на фоне лечения МКА-блокаторами PD1 или CTLA4 рекомендуется проводить первоначальную радиологическую оценку ответа на лечение не ранее 12 недель от начала терапии (при отсутствии клинического ухудшения состояния пациента). Повторные исследования

проводятся через 8–12 недель (при отсутствии клинического ухудшения состояния больного).

Пациентов с солитарными отдаленными метастазами меланомы (в мягких тканях, легких, головном мозге и др.) и хорошим соматическим статусом рекомендуется рассматривать в качестве кандидатов для радикального хирургического лечения, которое может обеспечить длительный безрецидивный период [75].

Роль хирургии возрастает в связи с появлением для этой группы пациентов эффективной адъювантной терапии МКА-блокатором PD1 – препаратом ниволумаб, при применении которого в рандомизированном исследовании показано увеличение безрецидивной выживаемости в сравнении с наблюдением [76].

При достижении эффекта от проводимой системной терапии может рассматриваться выполнение полных циторедуктивных вмешательств. Проведение неполной циторедукции не рекомендовано.

При метастазах в регионарных лимфатических узлах и невозможности их хирургического удаления рекомендуется рассмотреть возможность проведения дистанционной лучевой терапии в различных режимах: 50 Гр за 20 фракций в течение 4 недель; 32 Гр за 4 фракции в течение четырех недель.

Также может применяться режим лучевой терапии 30 Гр за 10 фракций в течение двух недель.

При симптомных метастазах в костях с обезболивающей целью рекомендуется проведение паллиативной лучевой терапии в одном из следующих режимов: 30 Гр за 10 фракций в течение двух недель; 20 Гр за 5 фракций за 5–7 дней, 24 Гр за 6 фракций в течение трёх недель.

Пациентам после полного (R0) удаления отдаленных метастазов меланомы кожи или метастазов меланомы без выявленного первичного очага (в мягких тканях, легких, головном мозге и др.) в течение трех месяцев после хирургического лечения при отсутствии противопоказаний рекомендовано проводить адъювантную терапию ниволумабом по схеме: ниволумаб 3 мг/кг

каждые две недели внутривенно капельно 12 месяцев, или ниволумаб 240 мг каждые две недели внутривенно капельно 12 месяцев, или ниволумаб 480 мг внутривенно каждые четыре недели 12 месяцев. Пациентам с метастатической меланомой (эквивалент индексу M1) после хирургического удаления всех метастатических узлов, без признаков заболевания) возможно проведение адъювантной комбинированной терапия МКА-блокаторами CTLA4 и МКА-блокаторами PD1 [77, 78].

### **1.3.1. Метастазы меланомы без выявленного первичного очага**

У некоторых больных первое клиническое проявление меланомы может выражаться появлением метастазов в лимфатических узлах, в мягких тканях или во внутренних органах. Несмотря на тщательное клиническое обследование этих пациентов или даже данные аутопсии, выявить у них первичную опухоль не удастся. В онкологической практике такая клиническая форма заболевания получила название «метастазы меланомы без выявленного первичного очага» (ММБВПО). Возникновение у больных ММБВПО не является клинической особенностью, характерной только для меланом. Частота случаев, когда онкологическое заболевание диагностируется по наличию метастазов, а локализация первичной опухоли даже при тщательном патологоанатомическом исследовании остается неизвестной, составляет от 3 до 15% случаев от всех онкологических заболеваний [79–83]. Причем при гистологическом исследовании пораженных лимфатических узлов в 50–80% случаев обнаруживаются клетки плоскоклеточного рака, в 20–40% – клетки аденокарциномы, в 10–15% – меланомы. Возникновение ММБВПО патогенетически может быть обусловлено исчезновением первичной меланомы кожи в процессе ее травматизации или полного разрушения, спонтанной регрессии и беспигментного варианта течения. По данным ряда авторов, клинические и гистологические проявления частичной спонтанной регрессии наблюдаются у 10–56% больных первичной меланомой кожи. Полная спонтанная регрессия первичной опухоли у больных меланомой

кожи является казуистикой и встречается в 0,3% наблюдений [84,85]. Также по литературным данным, причинами отсутствия первичной опухоли являются невозможность визуально дифференцировать первичную опухоль от доброкачественных пигментных невусов, локализация ее в глубоких слоях кожи, а также во внутренних органах и в лимфатических узлах в результате дисонтогенеза или захвата меланоцитов лимфатическими узлами в течение жизни человека [79, 86]. Пациенты с ММБПО составляют примерно от 1 до 8% от всех случаев меланомы и до 6%– среди всех случаев метастазов рака без первичной опухоли [85,87–89].

Впервые термин «метастаз рака без клинически определяемой первичной опухоли (*metastasis cancer of unknown primary tumor*)» был предложен Т. Das Gupta с соавторами в 1963 г., которые проводили исследование с включением группы пациентов с метастазами меланомы неизвестной первичной локализации опухоли [90]. В настоящее время в литературе можно встретить целый ряд терминов, обозначающих «метастаз опухоли без клинически определяемого первичного очага» (синонимы: «метастаз рака с неизвестным первичным очагом», «метастаз рака без выявленного первичного очага», «метастаз рака из невыявленного первичного очага», «*cancer of unknown primary*», «*tumor of unknown primary*», «*unknown primary origin*», «*occult primary*» и другие), смысл которых в разных публикациях может существенно изменяться в зависимости от использованных методов обследования больных [79, 86, 90, 91]. Большинство авторов под метастазами меланомы без клинически определяемой первичной опухоли подразумевает те случаи, когда первичная меланома остается не выявленной как при первичном обследовании пациента, так и в течение всего его лечения. Для научного обоснования оптимальной стратегии диагностики и лечения ММБПО необходимы рандомизированные исследования, которые в силу специфики этой патологии до сих пор не проводились, однако к определенным выводам все же можно прийти на основе анализа немногочисленных публикаций. У пациентов с метастазами меланомы без выявленного первичного очага при обращении могут иметь место как метастазы в лимфатических узлах, так и

метастазы во внутренних органах. По некоторым наблюдениям, у до 75% больных метастазы локализовались более чем в 5 органах [86, 92, 93]. Наиболее частым является метастазирование в периферические лимфатические узлы. Метастатическому поражению подвержены любые группы лимфатических узлов. Отмечается, что у таких больных чаще поражаются подмышечные лимфатические узлы (35,3%). Лимфатические узлы шеи поражались в 29,4% случаев; в 2,9% – шейно-надключичные; в 14,7% – паховой области, в 8,8% – пахово-подвздошной области, в 8,8% – поражение более двух коллекторов лимфатических узлов. [94].

В 69,1% случаев отмечено множественное поражение лимфатических узлов, в 17% имелись висцеральные метастазы. Исследователям удалось установить, что ММБВПО в 2,5–3 раза чаще встречаются у мужчин (64,7%), чем у женщин (35,3%). Возраст больных составлял от 17 до 79 лет, в среднем – 42,3 года. Продолжительность анамнеза была от 1 месяца до 3 лет, в среднем – 5,1 месяцев [82, 89, 95–97]. При анализе анамнестических данных отмечено, что у 42,9% больных на коже имелись различные пигментные образования. Из них у 11,8% пациентов отмечено травматическое повреждение пигментного образования с последующей спонтанной регрессией опухоли, у 14,7% – спонтанная регрессия без травматического повреждения. В 11,8% случаев при поступлении в клинику на коже имелся депигментированный участок от 0,2 до 1,5 см в диаметре, в 3,3% – рубец после травмы пигментного образования [98].

Таким образом, все пациенты с метастазами меланомы без выявленного первичного очага могут быть условно разделены на две группы. Первая группа представлена больными с первичной меланомой, которая по своим размерам, скрытой локализации и метаболической активности находится вне пределов диагностических возможностей и поэтому не может быть обнаружена. Ко второй группе относятся больные со спонтанно регрессировавшей или механически разрушенной и к моменту наблюдения полностью отсутствующей первичной меланомой. По данным ряда авторов [86, 92, 99], частичная или полная самопроизвольная регрессия первичной меланомы может иметь место в 15% случаев. Время от спонтанной регрессии пигментных образований кожи до

появления увеличенных лимфатических узлов составило от одного года до 17 лет, в среднем три года [95]. В свое время физикальное обследование являлось основным и единственным методом в поиске первичной меланомы. В настоящее время такое обследование является недостаточным в связи с возможными микроскопическими размерами первичной меланомы [7]. Учитывая тот факт, что меланома относится к категории нейроэктодермальных опухолей и часто располагается не только на коже верхних и нижних конечностей, туловища и головы, а также встречается на сосудистой оболочке глаза и слизистых оболочках внутренних органов, пациенты с ММБВПО наряду с осмотром кожных покровов обязательно должны быть подвергнуты тщательному клиническому обследованию слизистых оболочек и внутренних органов [86, 89]. Еще в 1963 г. Das Gupta предложил включить в медицинские осмотры пациентам с метастазами меланомы без выявленного первичного очага офтальмоскопию и осмотр аногенитальной области [90]. Усовершенствование методов ультразвуковой и эндоскопической диагностики, появление компьютерной (КТ), магнитно-резонансной (МРТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) предоставило целый ряд новых возможностей для визуализации новообразований и выявления скрытых опухолей.

Чувствительность совместного применения КТ и МРТ, а также ПЭТ и КТ в диагностике пациентов с ММБВПО составляет 71%, специфичность – 73%, точность – 72% [94]. Однако установить локализацию первичной опухоли удается далеко не во всех случаях. Многие авторы [100–102] сообщают, что до трети пациентов получают лечение по поводу метастазов меланомы без клинически определяемой первичной опухоли после всестороннего клинического обследования, панэндоскопии, КТ или МРТ мягких тканей и ПЭТ. Выполнение тонкоигольной аспирационной (ТАБ), инцизионной, эксцизионной или трепанбиопсии пораженного лимфатического узла является необходимой процедурой для морфологической верификации диагноза при метастазах без клинически определяемой первичной опухоли и в ряде специализированных учреждений является стандартным этапом обследования больных.

Цитологическим исследованием пунктата измененного лимфатического узла, по некоторым данным, подтверждается опухолевый процесс более чем в 65,7% случаев [103]. Наиболее рациональным является выполнение трепан-биопсии под ультразвуковым контролем, что повышает вероятность получения информативного материала для морфологического исследования [104]. Другой перспективной возможностью использования биопсийного материала является выполнение иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа [102, 105, 106]. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) прочно вошло в клиническую практику при различных онкологических заболеваниях и является определяющим для верификации процесса, дифференциальной диагностики и определения тактики дальнейшего лечения и прогноза. В настоящее время определена следующая иммуногистохимическая картина при метастазах меланомы: характерными являются экспрессия Vimentin, protein S100(A4) в опухолевых клетках, а также наличие специфических меланоцитарных маркеров: PanMelanoma (Cocktail, of HMB-45, Mart-1 and Tyrosinasa), Melan-A (A103), Melanosoma (HMB45), MITF-M (microphthalmia transcription factor Melan-A), Tyrosinasa (Tyrosinasa-related proteins 1 and 2), в 3–10% может наблюдаться экспрессия PanCK(AE1/AE3). К прогностическим маркерам меланомы относятся p53, Ki67, белки теплового шока, bcl 2, VLA-,  $\alpha$ -v/b-3 интегрины, CD 26, NM 23, E-кадгерин, циклин D1, циклин D3, p16INK4a, фактор VIII, CD 31, CD 34, подоплатин, C-kit [102, 107].

Применение молекулярно-генетического исследования – флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с определением состояния генов RREB1(6p25), MYB(6q23), CCND1(11q13), CEP6 – позволяет выявить генетические нарушения, улучшить диагностику меланоцитарных поражений кожи, установить предмеланомные процессы (невусы с пограничными диспластическими изменениями), а также проводить дифференциальный диагноз между меланомой и немеланоцитарными новообразованиями. Для меланомы характерны следующие параметры: среднее количество гена CCND1 на ядро  $\geq 2,5$ ; ядер с «ненормальным» количеством гена RREB1 (т.е. ядра с сигналами RREB1 более



или менее 2)  $\geq 63\%$ ; ядер с потерей гена MYB относительно CEP6  $\geq 31\%$ ; среднее количество гена MYB на ядро  $\geq 2,5$ . Генетические нарушения присутствуют как на ранней стадии формирования опухоли (фаза радиального роста), так и на более поздней (фаза вертикального роста). При этом степень выраженности этих нарушений не зависит от фазы развития опухоли. Помимо этого, отмечено существование меланом с преобладающим типом нарушений: с амплификацией или с делецией исследуемых генов. Также было установлено, что в наибольшей степени (в 72,1%) подвержен абберациям ген RREB1. Не менее чем у 50% больных меланомой кожи обнаруживаются мутации генов BRAF V600E, NRAS, C-KIT, которые играют важную роль для выбора дальнейшей тактики лечения [102, 107].

Следует отметить, что в литературе проблема ММБВПО мало освещена. Не существует единого мнения относительно методов хирургического и/или комбинированного лечения метастазов, включая системную лекарственную терапию [86, 89, 92, 95]. Отдаленные результаты лечения таких больных нельзя признать удовлетворительными. Тактика лечения пациентов с ММБПО предусматривает, в первую очередь, выявление первичной опухоли и устранение ее и метастатического очага хирургическим путем вне зависимости от статуса первичной опухоли, с последующей морфологической верификацией и уточнением уровня дифференцировки опухоли и ее метастатической активности. Объем лимфодиссекций при метастазах в регионарный коллектор принципиально остается тем же, что и при опухолях установленной локализации. Пациентам, имевшим органное распространение метастазов, была проведена монокимиотерапия дакарбазином (2–6 курсов). Средняя продолжительность жизни больных, получивших хирургическое лечение, составила  $27,7 \pm 5,1$  (17,6–37,8) мес. У пациентов, чье лечение было дополнено химиотерапией (иммунотерапией) –  $32,8 \pm 5,8$  (21,5–44,2) мес. Общий показатель средней продолжительности жизни лиц с метастазами меланомы без выявленного первичного очага составил  $27,0 \pm 3,8$  (19,6–34,3) мес. По данным ряда авторов [73], при медиане наблюдения в 7,7 лет, результаты пятилетней и десятилетней общей

выживаемости до применения таргетной терапии и современных иммунотерапевтических препаратов у больных ММБВПО составили 55% и 44% соответственно. Результаты зарубежных исследований свидетельствуют о том, что ситуация значительно улучшилась за последние пять лет после внедрения в клиническую практику современных высокоэффективных препаратов. В 2011 г. FDA для клинического применения был утвержден вемурафениб – селективный ингибитор BRAF-киназы (при мутации BRAFV600E), в 2013 г. – дабрафениб (также ингибитор BRAF-киназы) и траметиниб (MEK ингибитор). Препараты обладают высокой эффективностью, но эффекты в большинстве случаев кратковременны [108–110].

На основании данных доклинического исследования показана возможность использования антител, которые блокируют рецепторы PD-1 и PD-L1 (Programmed death-ligand 1), для лечения различных опухолей [111, 112]. В настоящее время зарегистрированы или проходят клинические исследования несколько препаратов, блокирующих PD-1 или рецептор PD-L1: Pembrolizumab (MK3475) IgG4 генно-инженерные антитела, Nivolumab (MDX1106, BMS-936558) IgG4 человеческие антитела, Pidilizumab (CT-011) IgG1 гуманизированные антитела, PD-L1 BMS935559 (MDX-1105) IgG4 человеческие антитела, MPDL3280A IgG1 генноинженерные человеческие антитела, MEDI4736 IgG1 генно-инженерные человеческие антитела, MSB0010718C IgG1 человеческие антитела [113, 114]. Возможно, что разрабатываемые более специфические иммунотерапевтические подходы (вакциноterapia, генная терапия) позволят улучшить результаты и таким образом перевести диссеминированную меланому из разряда резистентных опухолей в чувствительные [115]. Неоднозначными остаются суждения в отношении прогноза при метастазах меланомы без клинически определяемой первичной опухоли [116]. Наиболее часто в качестве прогностических факторов рассматриваются спонтанная регрессия, число пораженных лимфатических коллекторов, число пораженных лимфатических узлов в пределах одного коллектора, размеры метастазов, возраст больных. Следует отметить, что даже полный регресс первичной меланомы не связан с каким-либо улучшением

прогноза заболевания. В европейских исследованиях описаны наблюдения, когда метастазы возникали спустя 10 лет и более после самопроизвольной регрессии первичной меланомы кожи [99]. Рядом авторов отмечено, что у пациентов, переживших пятилетний срок наблюдения, имело место изолированное поражение метастазами только одного лимфатического коллектора. Этим больным было проведено хирургическое лечение, дополненное системной полихимиотерапией. У таких пациентов прогноз заболевания не отличается от такового у больных с наличием первичной опухоли III стадии. Неблагоприятный прогноз отмечен при поражении метастазами шейных лимфатических узлов; ни один из пациентов не пережил 5-летний срок наблюдения [86, 95]. Возраст 50 лет и старше, мужской пол и III стадия заболевания были определены как неблагоприятные прогностические факторы [11, 40, 102]. Нельзя оставить без внимания тот факт, что в исследовании, проведенном в США N. J. Samadder с соавторами (2015), представлены случаи наследственной предрасположенности к развитию метастазов меланомы без клинически определяемой первичной опухоли. Их частота составила (ОР 1,28 [95%-й ДИ 1,01–1,62]) среди 4160 больных с метастазами без клинически определяемой первичной опухоли [97].

### **1.3.2. Определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациентов с меланомой кожи методом проточной цитометрии**

Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) – это эпителиальные клетки, которые присутствуют у онкологических больных и определяются в минимальных количествах ( $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$ ) среди миелокариоцитов. Считается, что их наличие свидетельствует о гематогенной диссеминации опухоли [117, 118]. Присутствие ДОК у радикально леченных больных относят к признакам резидуального рака, резистентного к проводимой терапии, для излечения которого необходима разработка новых эффективных методов.

Как и солидные опухоли, меланома способна к гематогенной диссеминации уже на ранних стадиях развития [119]. Случаи возникновения висцеральных

метастазов при меланоме спустя десять [120] и даже 40 лет [121] после удаления первичной опухоли без вовлечения регионарных зон, а также частое манифестирование меланомы без выявленного первичного очага позволяют говорить о склонности меланомных клеток к распространению из индолентных [122] очагов, таких как костный мозг.

Миелоидный костный мозг (КМ) – основной орган-мишень для колонизации диссеминированных опухолевых клеток. Костный мозг имеет хорошее кровоснабжение, а также развитую сеть мелких фенестрированных кровеносных сосудов-синусоидов. Это создает повышенную проницаемость и более легкий физический барьер для экстравазации опухолевых клеток в костном мозге в отличие от других органов [123].

В то же время уникальные характеристики костномозговой ниши обеспечивают сигналы самонаведения, а биохимические (цитокины, хемокины, факторы роста и др.) и физические (кислотный pH, высокая концентрация внеклеточного кальция и др.) факторы создают тонко организованное микроокружение, которое является наиболее притягательным местом для опухолевых клеток [124]. Будучи изначально чужеродным, костный мозг подстраивает свою среду за счет сложных антигенных, иммуногенных и клеточных механизмов, формируя благоприятные условия для персистенции диссеминированных опухолевых клеток [125, 126].

Диагностика гематогенного распространения злокачественных новообразований на ранних стадиях – одна из главных проблем современной онкологии. Выявить диссеминированные опухолевые клетки с помощью рутинных патоморфологических методов крайне сложно. Диагностика ДОК требует применения высокочувствительных иммунологических методов.

Исследование диссеминированных опухолевых клеток возможно несколькими методами – иммуногистохимии, флуоресцентной микроскопии, однако приоритетным можно обозначить многоцветную проточную цитометрию высокого разрешения. Наиболее важное открытие в исследовании метастазов –

доказательство распространения опухолевых клеток с так называемой стадии *in situ*, задолго до обнаружения первичной опухоли.

Однако очень важным моментом является контроль чистоты образца костного мозга, т.е. отсутствие разбавления образца клетками периферической крови, что соблюдается при условии набора не более 1 мл костного мозга. Также возможна поправка на гемодиллюцию на основании способа, предложенного M. Loken и адаптированного в России.

При исследовании диссеминированных опухолевых клеток оценка их жизнеспособности и функциональной активности является одним из важных моментов, поскольку только жизнеспособные клетки способны к дальнейшему метастазированию. Метод EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT), разработанный С. Alix Panabieres (Франция), идентифицирует ДОК по секретируемым опухолеспецифическим белкам и определяет жизнеспособность клеток. При помощи специальной мембраны, покрытой антителами, опухолевые клетки обогащаются негативной селекцией, с удалением гемопоэтических клеток. Далее с помощью флуоресцентно меченных антител происходит детекция секретируемых белков.

Часто для определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге используется метод ПЦР. Чувствительность ПЦР при выявлении опухолевых клеток составляет 1 на  $10^5$ – $10^6$  нормальных клеток КМ. Обнаружение в образцах тканей заданной матричной РНК производится модифицированным методом ПЦР с обратной транскрипцией. Выявление матричной РНК опухолевых антигенов (цитокератина, маммоглобина, ракового эмбрионального антигена), экспрессируемых опухолевыми клетками, свидетельствует о присутствии опухолевых клеток в крови и костном мозге [127].

Методика определения диссеминированных опухолевых клеток на высокоскоростном проточном цитофлуориметре Attun отработана в ФГБУ «НМИЦ им. Н. Н. Блохина».

Одним из наиболее надежных маркеров идентификации клеток меланомы является НМВ-45 (цитоплазматический премелацитарный гликопротеин gp100).

Он классифицируется как антиген дифференцировки меланоцитов и отсутствует в опухолях немеланоцитарного происхождения. Обладая высокой чувствительностью (до 93%) и специфичностью (до 100%), НМВ-45 служит надежным маркером идентификации клеток меланомы, что позволяет использовать его для идентификации диссеминированных опухолевых клеток [128].

Исходя из всего вышеизложенного можно сделать вывод, что иммуногистохимический, молекулярно-генетический и иммуноцитохимический анализы представляются перспективными и требуется включение последнего в стандарты диагностики метастазов меланомы без выявленного первичного очага.

Таким образом, представленный анализ литературы свидетельствует о том, что проблема метастатического поражения меланомой без выявленного первичного очага представляет собой сложный вопрос в онкологии, требующий тщательного изучения. Литературные данные немногочисленны и иногда даже противоречивы. Поэтому необходимы дальнейшие ретроспективные и проспективные исследования особенностей клинического течения, разработка оптимального алгоритма диагностики, а также анализ результатов лечения больных с метастазами меланомы без клинически определяемой первичной опухоли.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Дизайн исследования

Для проведения нашего исследования был разработан оригинальный дизайн, состоящий из клинического и экспериментального разделов.

В клинический раздел исследования включено 263 пациента с метастазами меланомы в лимфатических узлах, получивших лечение и наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2005г. по 2019г.

Осуществлен ретроспективный анализ клинического материала – историй болезни и амбулаторных карт пациентов, с верифицированным диагнозом меланомы в лимфатических узлах, получавших лечение согласно клиническим рекомендациям Минздрава России и наблюдавшихся в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина. Все пациенты после лечения наблюдались амбулаторно.

При формировании групп исследования проведен анализ документации пациентов: историй болезней, амбулаторных карт, протоколов операций, протоколов гистологических и цитологических исследований, выписных эпикризов 263 больных.

В исследовании оценивались демографические характеристики больных, включающие пол, возраст, сопутствующие заболевания, жалобы, предшествующие выявлению заболевания, индекс массы тела (ИМТ).

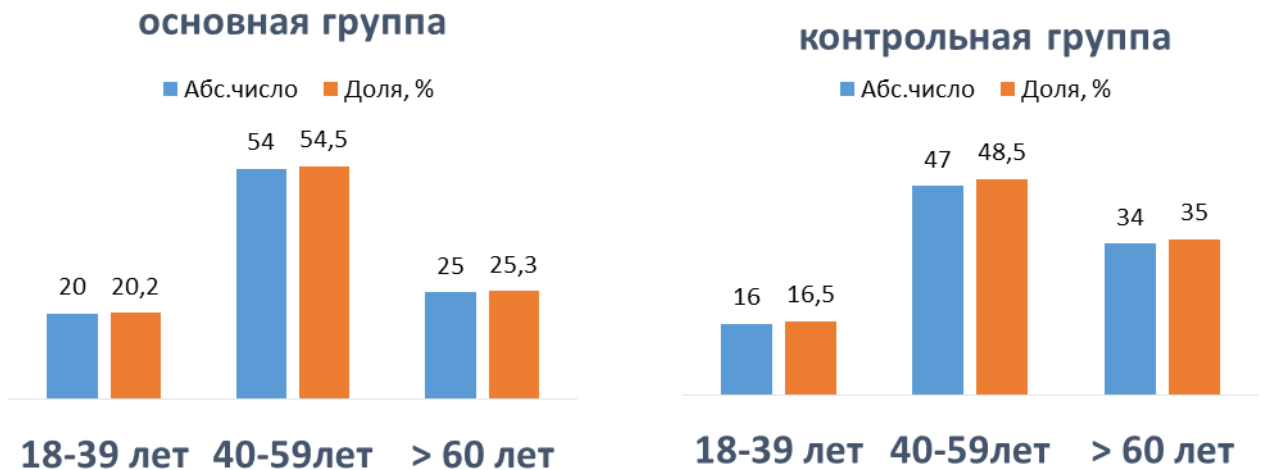
В экспериментальный раздел работы включены пациенты, у которых получены образцы костного мозга путем пункции задней верхней ости подвздошной кости.

На полученных образцах, окрашенных по методу Романовского, проведено морфологическое исследование с подсчетом показателей миелограммы и поиском опухолевых клеток, а также иммунологическое исследование методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, напрямую меченных различными флюорохромами.

## 2.2. Клиническая характеристика больных

Все пациенты были разделены на две группы. В первую группу (основную) вошли 99 больных с морфологически подтвержденным диагнозом «метастазы меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага». Во вторую (контрольную) – 164 пациента с метастазами при известном первичном очаге, причем у 97 больных были аналогичные метастазы меланомы в лимфатических узлах, а 67 пациентам было выполнено морфологическое и иммунологическое исследование костного мозга с целью изучения течения и прогноза заболевания.

В основной группе преобладали женщины – 59 пациентов (59,5%), мужчин было 40 (40,5%). В контрольной группе (при известной локализации меланомы) мужчин было 56 (57,7%), женщин 41 (42,3%). Возраст пациентов в основной группе варьировал от 16 до 79 лет (медиана составила 52 года), в контрольной группе – от 18 до 83 лет (медиана составила 54 года) (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Распределение пациентов по возрасту

Из представленной диаграммы на рисунке 1 видно, что в основной и контрольной группе преобладали пациенты в возрасте старше 40 лет, соответственно группы сопоставимы по возрастным критериям.

В обеих группах больные обращались с жалобой на увеличение лимфатических узлов различной локализации. У большинства пациентов это являлось единственным проявлением болезни. У других увеличение лимфатических



узлов сочеталось с такими симптомами, как общая слабость, боль, осиплость голоса и другие. Жалобы чаще всего зависели от локализации пораженных лимфоузлов. Однако в контрольной группе, помимо жалобы на увеличение лимфатических узлов различной локализации, пациенты также обращали внимание на наличие пигментного образования (первичный очаг меланомы) на коже той или иной части тела.

### **2.3. Методы исследования**

Методика исследования больных с метастазами меланомы без выявленного первичного очага имеет большое значение для успешного и своевременного распознавания заболевания. Помимо поиска первичного очага предусматривается оценка общего состояния и распространенности опухолевого процесса. Все пациенты, поступившие и наблюдавшиеся в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, подверглись общепринятому клиническому обследованию, включавшему сбор анамнеза, физикальное обследование (в частности, пальпаторное исследование периферических лимфатических узлов), клиническое и биохимическое исследование крови. Обязательным этапом являлось выполнение УЗИ регионарных лимфатических узлов ( $n = 197$ ) с обязательной оценкой объема и числа пораженных лимфатических узлов, а также оценкой возможности выполнения пункционной биопсии и core-биопсии, УЗИ органов брюшной полости и органов малого таза. В случае поражения шейно-надключичных лимфоузлов обязательным исследованием являлась консультация отоларинголога с проведением риноскопии и ларингоскопии ( $n = 43$ ), КТ головы и шеи ( $n = 43$ ), эзофагогастроскопия ( $n = 43$ ). При поражении подмышечных лимфоузлов обязательным этапом обследования является проведение маммографии ( $n = 42$ ), бронхоскопии, эзофагогастроскопии ( $n = 84$ ), КТ органов грудной клетки ( $n = 84$ ). При поражении паховых и бедренных лимфатических узлов обследование включает КТ малого таза ( $n = 51$ ), колоноскопию, консультацию гинеколога ( $n = 26$ ) с возможным проведением гистероскопии и цистоскопии. ПЭТ-КТ

проведена в двух случаях в связи с недостаточной доступностью этого диагностического метода на момент отбора пациентов. В ходе обследования выявлены следующие сопутствующие заболевания, которые приведены в таблице 1.

**Таблица 1** – Сопутствующие заболевания больных меланомой

	Гипертоническая болезнь	ХОБЛ	Бронхиальная астма	Язвенная болезнь желудка	Гастрит	Гепатит	Сахарный диабет	Нет
Основная группа	30 (30,3%)	1 (1,0%)	1 (1,0%)	6 (6,1%)	7 (7,1%)	2 (2,0%)	7 (7,1%)	45 (45,4%)
Контрольная Группа	27 (27,8%)	0	0	0	0	3 (3,1%)	2 (2,1%)	65 (67,0%)

Окончательно диагноз меланомы установлен всем больным на основании гистологического и иммуногистохимического исследования, что является «Золотым стандартом» для диагностики и постановки диагноза. Большое значение в диагностике метастазов меланомы без выявленного первичного очага имеет морфологическое исследование биопсийного материала, операционного материала, выполнение иммуногистохимического исследования опухоли при сложности ее верификации, а также молекулярно-генетического анализа на предмет определения терапевтически значимых мутаций для оценки возможности проведения таргетного лечения. Морфологическая верификация диагноза у больных проводилась путем цитологического, гистологического и иммуногистохимического исследований специалистами патологоанатомического отделения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

**Гистологический метод.** Из гистологических препаратов на ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной 5 мкм и располагали их на предметных стеклах. Стандартную окраску гематоксилином и эозином проводили в

автоматическом устройстве. Готовые препараты изучали с помощью светового микроскопа.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на автостейнере по общепринятой методике на депарафинизированных срезах толщиной 3–4 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах согласно протоколам фирм-производителей с использованием следующих антител: S100 (Genemed, Poly, 1:200), MelanA (Genemed, A103, 1:100), Melanosome (Genemed, HMB45, 1:100), V 600E (BOX Spring, VE1, 1:100), MITF (Cell Marque, C5/D5, 1:300), Tyrosinase (Leica Biosystems, T311, 1:100), Vimentin (SRL 33). Интенсивность иммунного окрашивания оценивали визуально и характеризовали как отсутствие реакции, слабая, умеренно выраженная и выраженная экспрессия. Количество опухолевых клеток, экспрессирующих антиген, оценивали полуколичественно:

- 1) 0 – нет окрашивания,
- 2) 1+ – окрашивание <5% клеток,
- 3) 2+ – окрашивание 5–25% опухолевых клеток,
- 4) 3+ – окрашивание 26– 50% клеток,
- 5) 4+ – окрашивание >50% клеток.

Исследование костного мозга выполнялось в лаборатории иммунологии гемопоэза клинично-лабораторного отдела НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ (заведующий: д.м.н., профессор Н. Н. Тупицын). Костный мозг для исследования был получен при пункции задней верхней ости подвздошной кости (*spina iliaca posterior superior*). Морфологическое исследование (миелограмма) костного мозга выполнялось на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток осуществлялись параллельно двумя независимыми экспертами - морфологами.

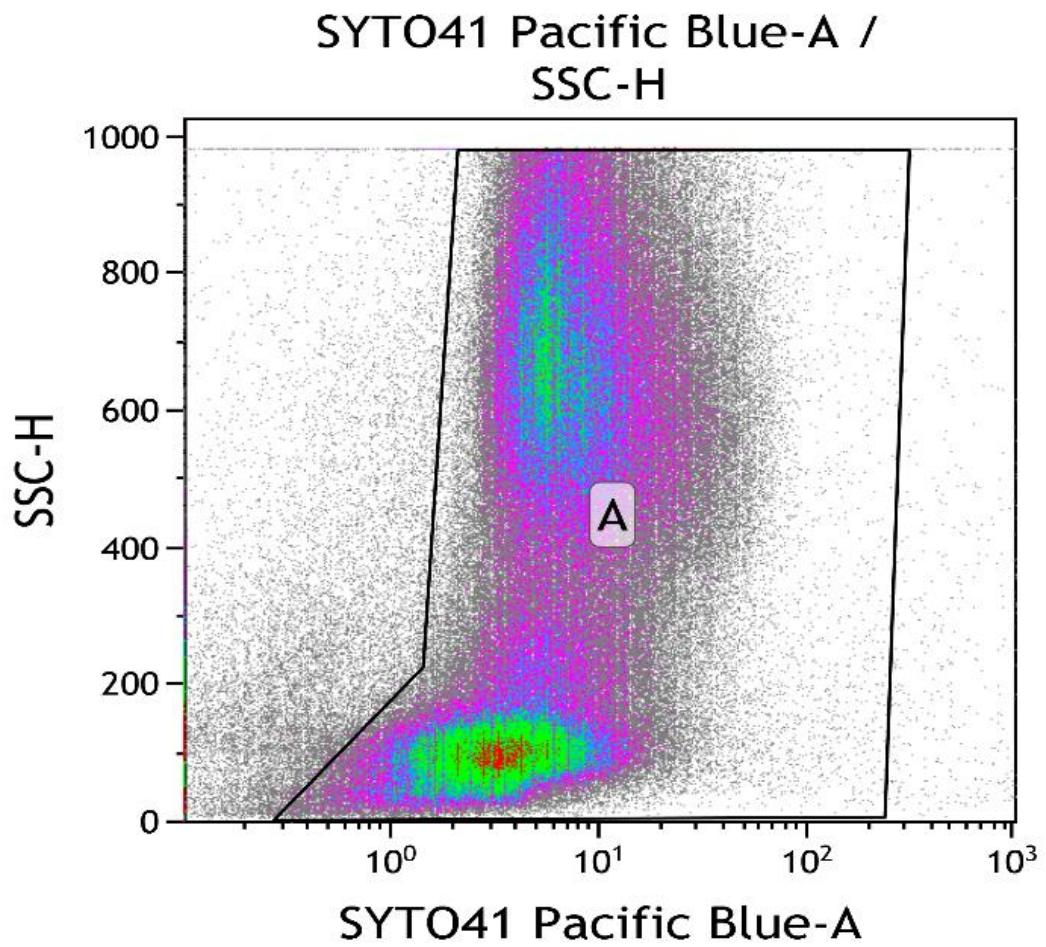
Иммунологическое исследование костного мозга проводилось методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, напрямую меченных различными флюорохромами. Использованные в работе моноклональные антитела представлены в таблице 2.

**Таблица 2** – Моноклональные антитела, использованные в исследовании

№	Антитело	Флуоресцентная метка	Производитель
1	CD45	V500-A, V450, PerCP	Becton Dickinson, США
2	HMB-45	APC-A	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Tx, USA
3	Syto41	APCH7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

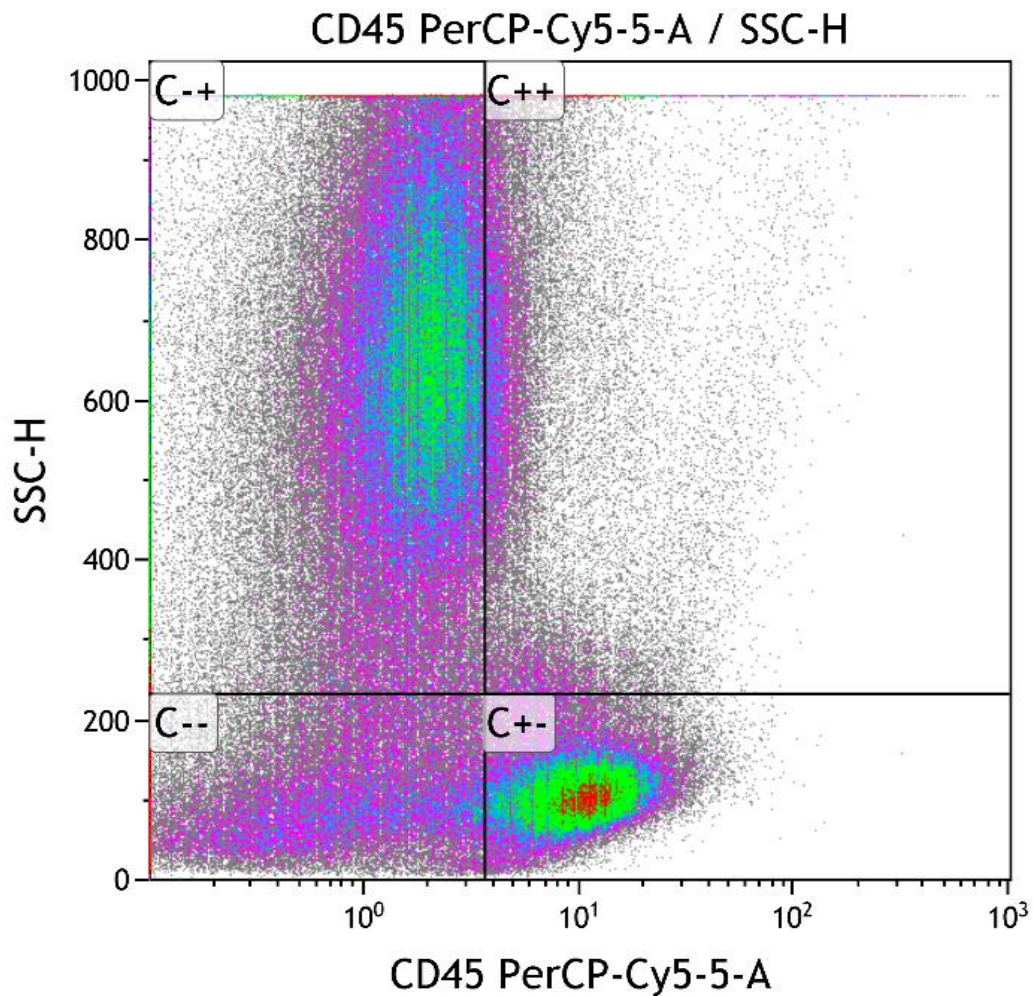
Нативный костный мозг отмывали буферным раствором PBS Cell Wash (BD), Клетки ресуспензировали (vortex 10 сек.), добавляли лизирующий раствор FACS Lysing Solution (BD) на 5 минут. После завершения лизирования эритроцитов проводили отмывку клеточной суспензии. Клетки осаждали на центрифуге (1500 об/мин, 5 мин.). Полученный осадок ресуспензировали и вносили в пробирки для инкубации с моноклональными антителами. Инкубация проводилась в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем клетки отмывали дважды раствором PBS. Сбор клеток проводили на восьмицветном проточном цитометре FACSCanto II (США). Оценка экспрессии антигенов выполнялась с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, USA). Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) выявлялись по отсутствию экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией HMB-45 среди всех ядродержащих клеток (Syto41+). Анализировались 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца), при этом положительными считались случаи при обнаружении не менее 1 клетки на 10 млн миелокариоцитов. На Рисунках 2–6 представлены примеры цитограмм. На цитограмме по оси Y представлен параметр бокового светорассеяния SSC, по оси X – маркер Syto41. Выделены все ядродержащие клетки (Syto41+) образца (гейт A), что представлено на рисунке 2.

На рисунке 3 представлена цитограмма, где по оси Y представлен параметр бокового светорассеяния SSC, по оси X – маркер панлейкоцитарного антигена CD45.



Gate	Number	%Total	%Gated
All	18 959 325	100,00	100,00
A	16 490 027	86,98	86,98

**Рисунок 2** – Распределение клеток костного мозга по параметру SSC

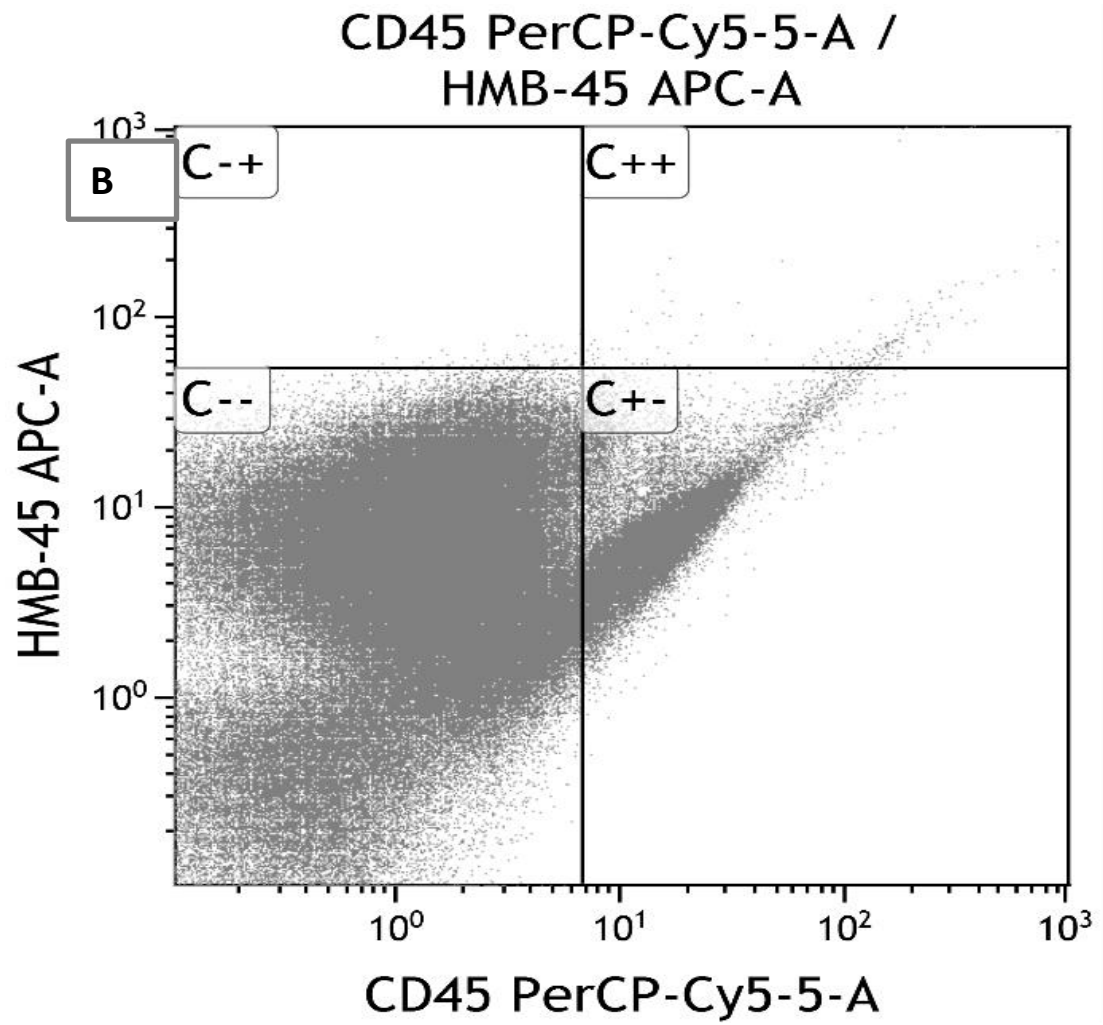


**Рисунок 3** – Распределение клеток костного мозга по параметру SSC

На рисунке 4, на цитограмме по оси Y представлен маркер HMB-45, по оси X – маркер панлейкоцитарного антигена CD45. Клетки с фенотипом HMB-45+ CD45- не обнаружены (гейт В).

На цитограмме (Рисунок 5) по оси Y представлен маркер HMB-45, по оси X – маркер панлейкоцитарного антигена CD45. Клетки с фенотипом HMB-45+ CD45- обнаружены (гейт В).

На цитограмме на рисунке 6 по оси Y представлен параметр бокового светорассеяния SSC, по оси X – маркер панлейкоцитарного антигена CD45. ДОК меланомы характеризуются низкими характеристиками бокового светорассеяния, не экспрессируют CD45.



**Рисунок 4** – Большой Б. Оценка экспрессии маркера HMB-45



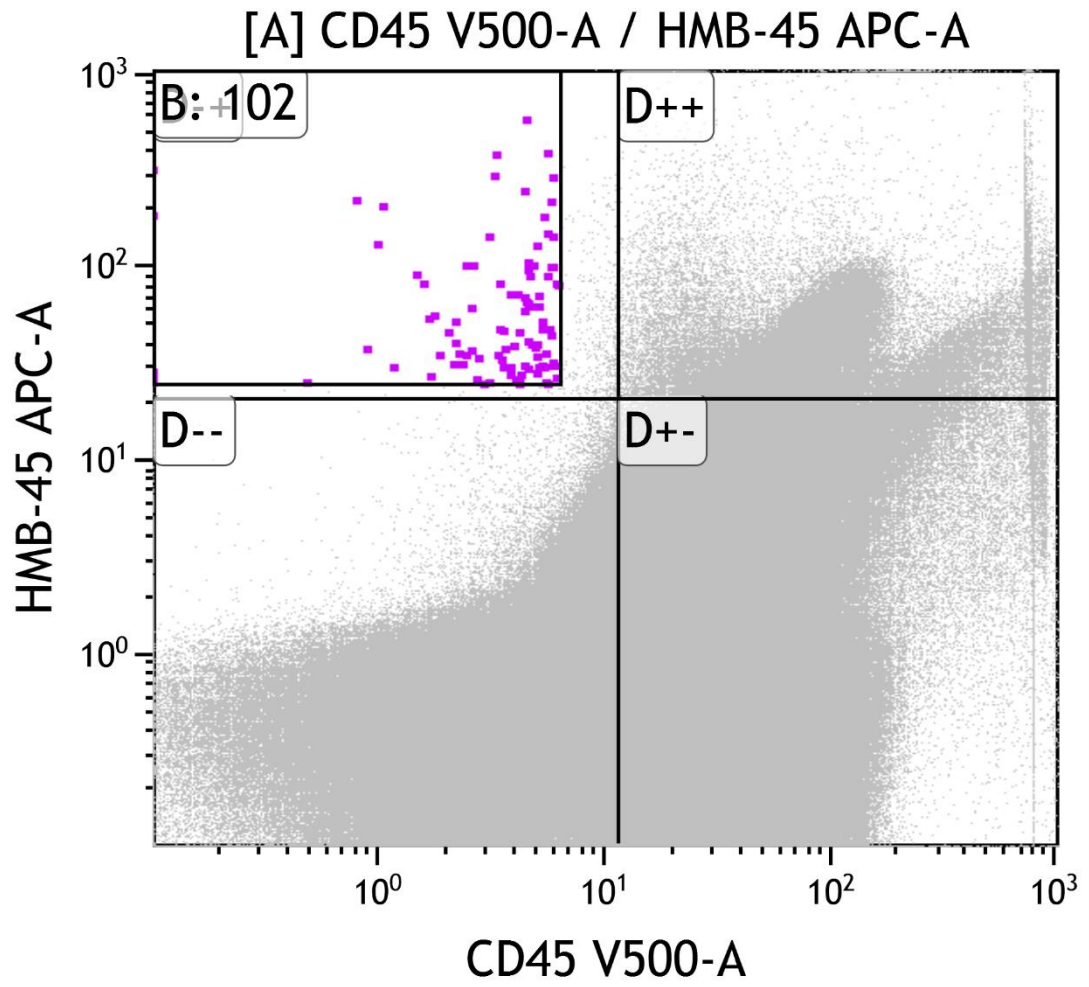
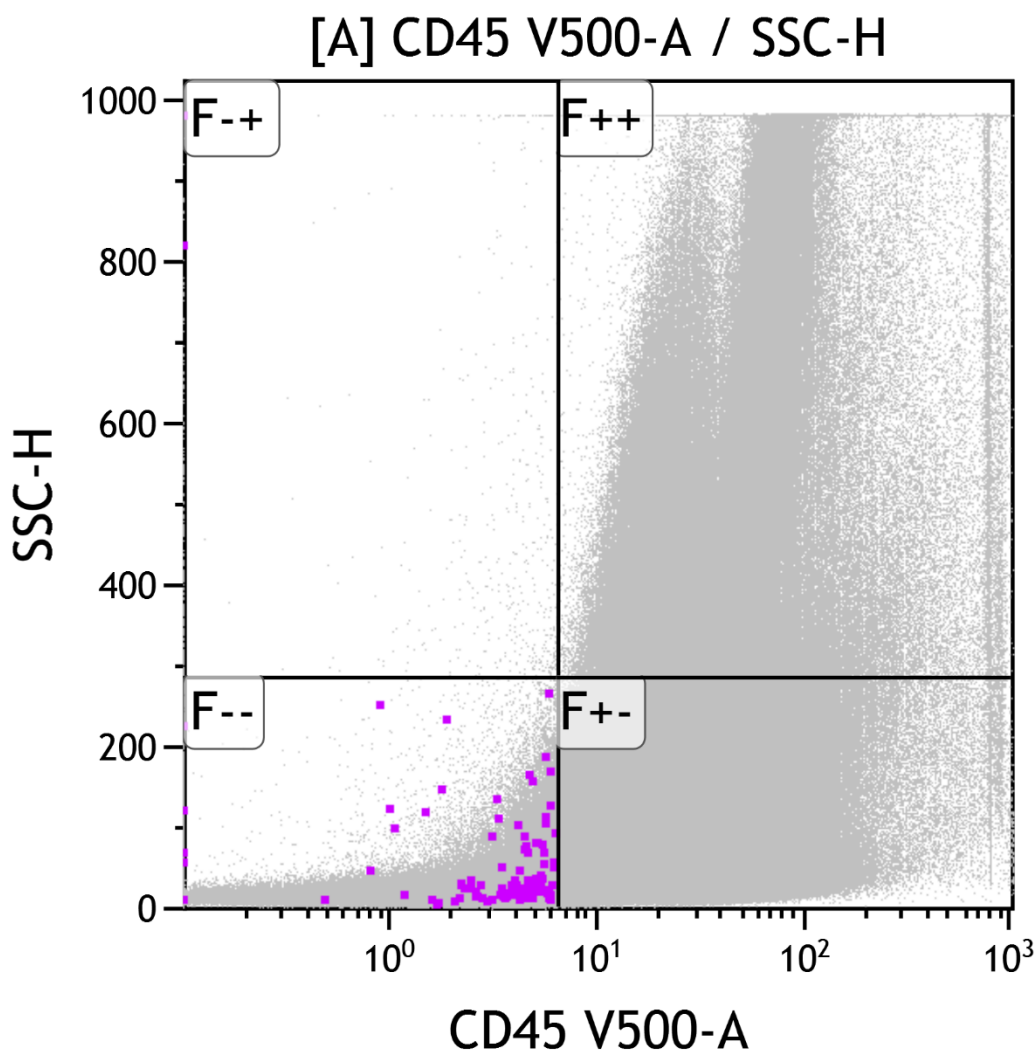


Рисунок 5 – Больной Г. Оценка экспрессии маркера HMB-45





**Рисунок 6** – Оценка экспрессии CD45 клетками меланомы

#### **2.4. Статистическая обработка результатов исследования**

Для проведения статистического анализа полученных результатов работы был разработан специальный кодификатор. Все данные, касающиеся 263 больных меланомой были внесены в таблицы и обработаны при помощи программы SPSS, v. 21.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна – Уитни. Для установления связи между двумя дискретными величинами, в зависимости от их типа и получаемых таблиц сопряженности использовали точный критерий Фишера и  $\chi^2$  по Пирсону, различия

считали значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводили по Пирсону или Спирмену.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статистической разницы по возрасту (см. Рисунок 1) между группой пациентов с диагнозом «метастазы меланомы без выявленного первичного очага» и группой пациентов с выявленной первичной опухолью получено не было ( $p > 0,05$ ). Равным образом группы были сопоставимы по полу: в основной группе женщины – 59 (59,5%), мужчины – 40 (40,5%). В контрольной группе (при известной локализации меланомы) мужчины – 56 (57,7%), женщины – 41 (42,3%).

В исследование в обеих группах в большем количестве вошли пациенты с метастазами меланомы в подмышечных лимфатических узлах. Шейные и паховые лимфоузлы были поражены примерно в одинаковой степени (Таблица 3).

**Таблица 3** – Группы пораженных лимфатических узлов

Пораженные лимфоузлы	Подмышечные лимфоузлы	Шейные лимфоузлы	Паховые лимфоузлы	Прочие
Основная группа (N = 99 чел.)	41 (41,5%)	23 (23,2%)	24 (24,2%)	11 (11,1%)
Контрольная группа (N = 97 чел.)	43 (44,4%)	20 (20,6%)	27 (27,8%)	7 (7,2%)

В основной группе у 95 (96%) пациентов отмечалось преимущественно одностороннее поражение лимфоузлов и лишь у 4 (4,0%) было двустороннее поражение. В контрольной группе наблюдалась аналогичная картина, преобладало одностороннее поражение лимфатических узлов – 92 (94,9%) пациентов и у 5 (5,1%) было двустороннее поражение.

В контрольной группе в зависимости от локализации первичного очага меланомы были получены следующие данные, которые представлены в таблице 4. Локализация первичного очага у 14 (14,4%) больных была в области головы: из них у 6 (6,2%) – кожа теменной области и 8 (11,9%) – кожа височной области, у 29 (29,9%) пациентов – в области спины, у 22 (22,7%) больных меланома

локализовалась в области нижних конечностей, в 15 (15,5%) случаях – в области грудной стенки и у 4 (4,2%) больных – в области передней брюшной стенки, у 6 (6,2%) пациентов – в области шеи.

**Таблица 4** – Локализация первичного очага и метастазов у больных контрольной группы

Локализация первичного очага	Локализация пораженных лимфатических узлов	Количество
Теменная область	Шейные	3
	Над/подключичные	3
Височная область	Шейные	4
	Над/подключичные	4
Спина	Подмышечные	22
	Паховые	6
	Шейные	1
Нижняя конечность	Шейные	5
	Паховые	17
Грудная стенка	Подмышечные	13
	Шейные	1
	Паховые	1
Передняя брюшная стенка	Паховые	3
	Подмышечные	1
Шея	Шейные	6
Верхняя конечность	Подмышечные	7

Основным методом получения материала по месту жительства в основной группе была пункционная биопсия у 37 больных (37,3%). Другими методами взятия материала были открытая биопсия у 33 (33,2%) пациентов и core-биопсия у 16 (16,1%) больных. У 13 (13,4%) пациентов материал был получен при операции (различные виды лимфодиссекций). Объектами для забора материала были: подмышечные лимфоузлы – 38 (38,3%), шейные лимфоузлы – 28 (28,2%), паховые лимфоузлы 26 (26,2%), надключичные лимфоузлы 4 (4,3%), лимфоузлы слюнных желез 3 (3,0%).

В контрольной группе по месту жительства первичный диагноз: меланома был подтвержден у 59 (60,8%) пациентов, в 100% это было иссечение первичного очага, а у 38 (39,2%) диагноз меланомы не был установлен.

По результатам морфологической верификации до обращения в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в основной группе были получены следующие результаты: метастаз меланомы у 51 (51,5%), метастаз светлоклеточной меланомы у 9 (9,1%), метастаз пигментной меланомы у 11 (11,2%), метастаз беспигментной меланомы у 3 (3,0%), метастаз рака молочной железы у 3 (3,0%), рак без дополнительных уточнений у 6 (6,1%), низкодифференцированная карцинома у 2 (2,0%), не обнаружено заболевания (гиперплазия) у 1 (1,0%) пациента.

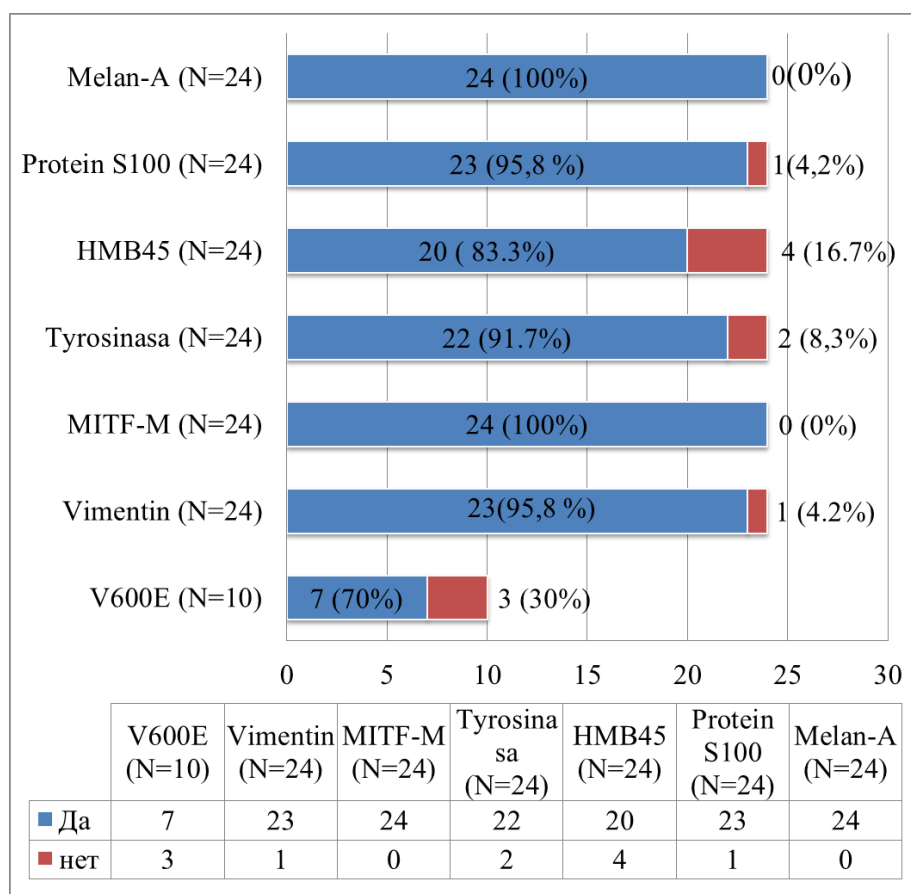
До визита в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в соответствии с распространенностью опухолевого процесса пациентам в обеих группах назначались различные варианты лечения. В группе пациентов с метастазами меланомы без выявленного первичного очага хирургическое лечение в объеме радикального иссечения метастатической опухоли было выполнено 12 (12,1%) пациентам из них четверем больным лечение было дополнено полихимиотерапией (ПХТ), полихимиотерапия – 8 (8,1%) больным, лучевая терапия 1 (1,0%), никакого лечения не проводилось у 78 (78,8%) лиц. Схемы ПХТ включали в себя: Дакарбазин 2 (2,0%), CVD 2 (2,0%), мюстафарон + реальдирон 2 (2,0%), дакарбазин + цисплатин 1 (1,0%), другие 5 (5,1%), 87 (87,1%) ПХТ не назначалась.

В контрольной группе пациентов хирургическое лечение (радикальное иссечение опухоли) было выполнено 35 (36,0%) пациентам, хирургическое лечение с последующим назначением интерферона – 9 (9,3%) больным, хирургическое лечение и лучевая терапия назначалась 2 (2,1%) пациентам, химиолучевая терапия 2 (2,1%), комплексное лечение потребовалось 2 (2,1%). В 44 (45,4%) случаях было рекомендовано динамическое наблюдение.

При обращении в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина пересмотр гистологического материала в основной группе осуществлялся у 32 (32,3%) пациентов, у 67 (67,7%) – не производился. Далее, при повторном комплексном

обследовании, рецидив был выявлен у 13 (13,1%) пациентов, без рецидива были 86 (86,9%) больных. Основной, по-прежнему, оставалась жалоба на наличие опухоли – увеличение лимфатических узлов 72 (72,7%). Поражение одной зоны наблюдалось у 79 (79,8%) пациентов, нескольких – у 14 (14,1%). Поражение единичных лимфоузлов было отмечено у 39 (39,4%) больных, а конгломерат лимфоузлов был выявлен у 54 (54,4%) человек. Основными методами получения материала для морфологического исследования также оставались пункционная биопсия и core- биопсия.

В группе пациентов с метастазами меланомы без выявленного первичного очага, помимо стандартного гистологического исследования, для верификации и проведения дифференциальной диагностики также выполнялось иммуногистохимическое исследование 24 пациентам (24%) из 99. На гистограмме представлена основная панель иммуногистохимических показателей, необходимых для подтверждения диагноза: меланома (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Панель иммуногистохимических показателей, необходимых для подтверждения диагноза: меланома

На основании результатов иммуногистохимического исследования удалось не только в ряде случаев подтвердить диагноз: меланома, но и установить, что 11 (11%) больным по месту жительства был поставлен неверный морфологический диагноз: рак без дополнительных уточнений у 6 (6,1%), метастаз рака молочной железы у 3 (3,0%), низкодифференцированная карцинома у 2 (2,0%).

В этой же группе на основании данных первичной биопсии диагноз не смогли поставить 13 пациентам. Это в дальнейшем потребовало выполнения повторной расширенной биопсии метастатической опухоли с последующим иммуногистохимическим исследованием, включавшим в себя HNB45, Melan A, MITF, S-100, тирозиназу для дифференциальной диагностики меланомы и других опухолей при метастазах без выявленного первичного очага.

При обращении в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина пациентам в контрольной группе также было проведено комплексное обследование. Морфологическая верификация диагноза проводилась путем гистологического исследования у 82 (84,5%) больных, цитологического исследования – у 2 (2,1%) пациентов и путем иммуногистохимического исследования – у 3 (3,1%) больных. У 10 (10,3%) лиц диагноз был подтвержден при пересмотре готовых гистологических препаратов. Полученный гистологический и цитологический материал фиксировали по стандартной методике, в дальнейшем окрашивали гематоксилин-эозином в условиях патологоанатомического отделения. Таким образом установлено, что верификация диагноза путем гистологического исследования наиболее информативна. Результаты гистологического исследования представлены в таблице 5.

**Таблица 5** – Результаты гистологического исследования первичной опухоли в контрольной группе

Тип опухоли	Группа ПВ (N = 97)	
	абс. число	доля, %
Эпителиоидный тип	65	67
Веретеночлеточный тип	15	15,5

*Продолжение таблицы 5*

Смешанный тип	12	12,4
Невоклеточный тип	5	5,1

Из данных таблицы видно, что преобладал эпителиоидный тип опухоли.

Распределение больных по распространенности опухолевого процесса в соответствии с классификацией TNM 7-го пересмотра представлено в таблице 6.

**Таблица 6** – Распространенность опухолевого процесса у лиц контрольной группы в соответствии с классификацией TNM

Признак	Абс.	%
Число больных	97	100
Стадия		
III	97	100
T		
Tx	12	12,3
T0	15	15,5
T1	4	4,1
T2a	5	3,1
T3a	13	7,2
T4a	48	9,3
N		
N1	40	41,2
N2	32	33
N3	25	25,8
M		
M0	97	100

После обследования в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина пациенты обеих групп в зависимости от вида лечения были разделены на 5 подгрупп: группа



хирургического лечения, группа комбинированного лечения (хирургическое [X] + лучевая терапия [ЛТ]), группа хирургического (X) в комбинации с лекарственным (Л) (адьювантная иммунотерапия препаратами интерферона альфа 2b [ИТ] / химиотерапия [ХТ]), комплексного лечения (хирургическое [X] + ЛТ и химиотерапия [ХТ] / иммунотерапия [ИТ]) и группа консервативного лечения (ЛТ и/или химиотерапия/иммунотерапия), которые представлены в таблице 7.

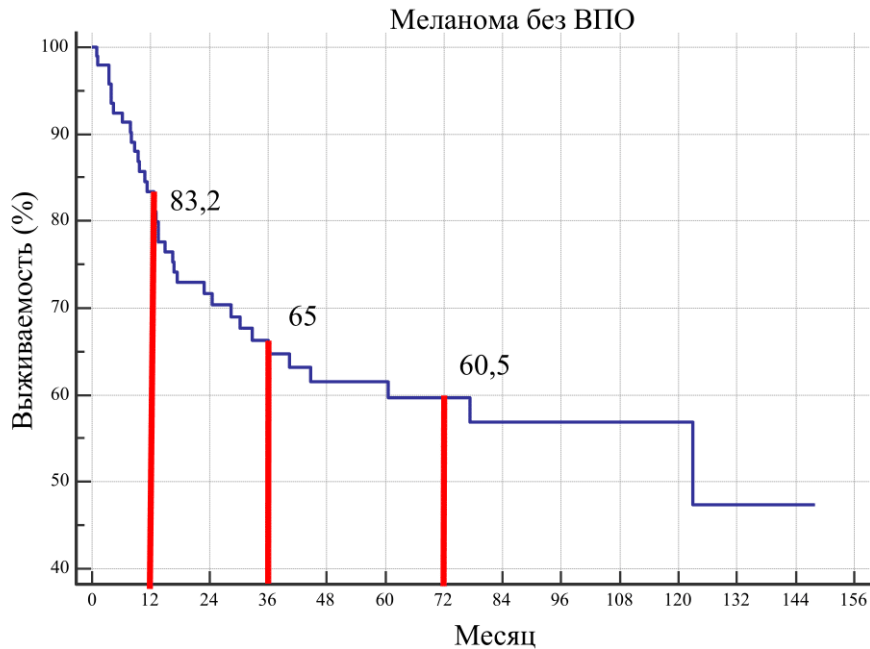
**Таблица 7** – Распределение больных контрольной и основной групп в зависимости от вида лечения

Вид лечения	Контрольная группа (N = 97)		Основная группа (N = 99)	
	абс.	%	абс.	%
Хирургическое	39	40,2	48	48,5
Комбинированное (X + ЛТ)	3	3,1	1	1
Комбинированное (X + Л)	47	48,5	29	29,3
Динамическое наблюдение	8	8,2	20	20,2
Комплексное	–	–	1	1

Всем пациентам при проведении ХТ/ПХТ применялись следующие химиопрепараты: алкилирующие агенты (производные нитрозомочевины, метилирующие агенты, комплексные соединения платины), антиметаболиты, флеомицины, винилалкалоиды, антиэстрогены, таксаны, а также ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (Ниволумаб). При проведении ИТ использовали препараты интерферона альфа 2b.

При анализе имеющихся данных установлено, что течение заболевания в обеих группах практически одинаково, и после комплексного обследования и получения морфологической верификации диагноза назначается сходное лечение, следовательно, нет необходимости в длительном поиске первичного очага, который удлиняет диагностический этап и отдаляет назначение своевременного лечения.

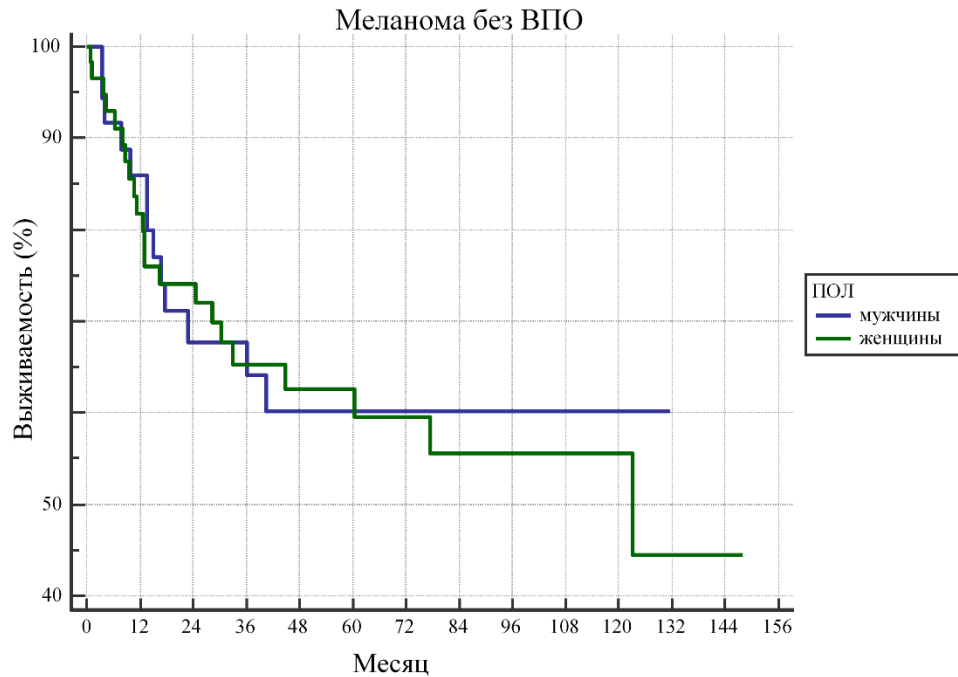
При изучении отдаленных результатов получены следующие результаты. Выживаемость пациентов с меланомой без выявленного первичного очага представлена на рисунке 8.



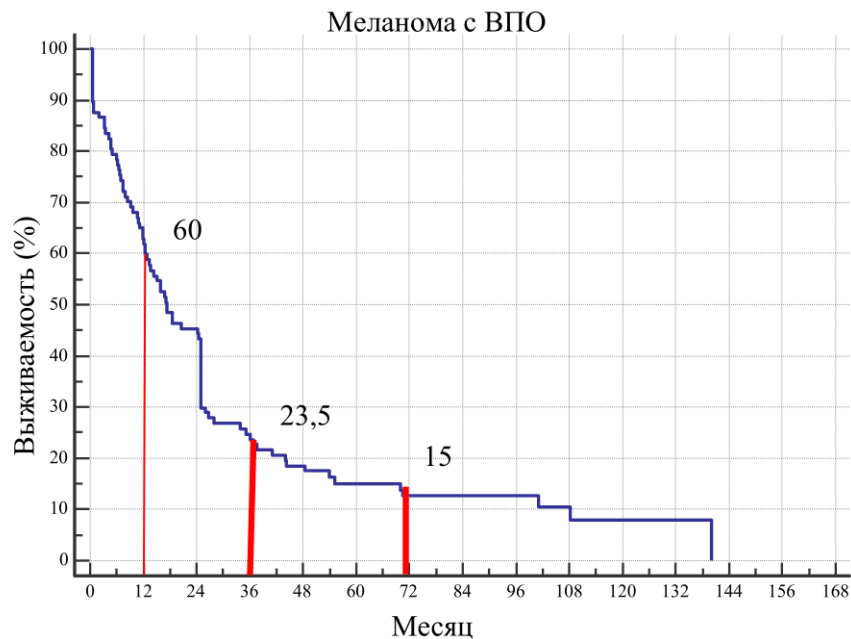
**Рисунок 8** – Выживаемость пациентов с меланомой без выявленного первичного очага

При анализе общей выживаемости группы пациентов с диагнозом «меланома без выявленного первичного очага (ВПО)» ( $n = 99$ ) оказалось, что в первый год выживаемость составила 83,2%, 3-летняя выживаемость составила 65%, 5-летняя выживаемость – 60,5%. Общая медиана выживаемости данной группы составила 122,2 месяца. Выживаемость пациентов в зависимости от пола представлена на рисунке 9.

Оказалось, что в первый год выживаемость у мужчин составила 80%, у женщин 76,3%. 3-летняя выживаемость у женщин составила 65%, у мужчин – 64,6%. 5-летняя выживаемость у женщин составила 59,9%, у мужчин – 60%. Медиана выживаемости у мужчин не была достигнута в течение 132 месяцев, а у женщин медиана выживаемости составила 123 месяца. Выживаемость пациентов с меланомой с выявленным первичным очагом представлена на рисунке 10.



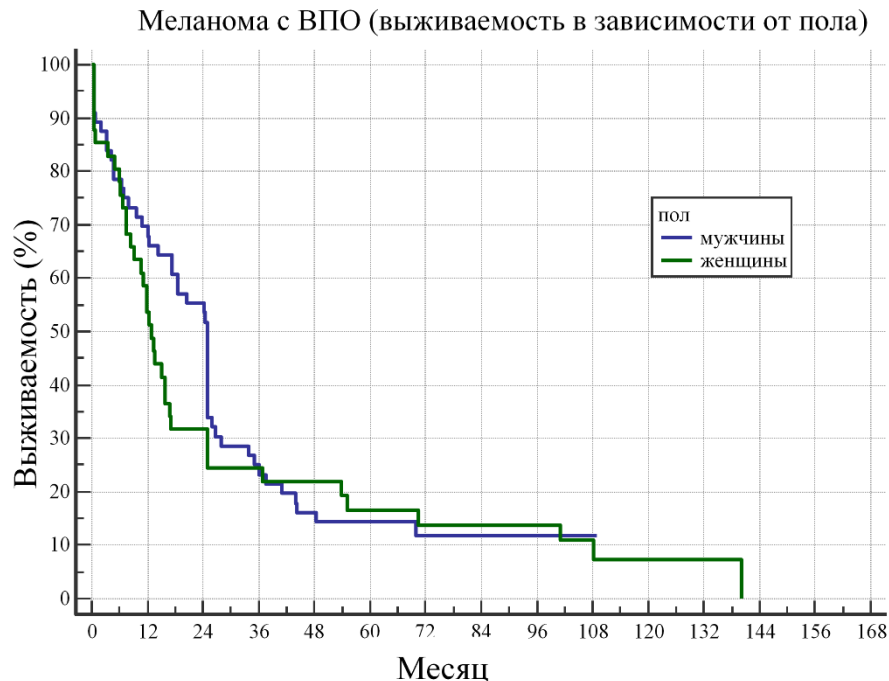
**Рисунок 9** – Выживаемость пациентов меланомой без выявленного первичного очага в зависимости от пола



**Рисунок 10** – Выживаемость пациентов меланомой с выявленной первичной опухолью

При анализе общей выживаемости группы пациентов контрольной группы с выявленной первичной опухолью ( $n = 97$ ) оказалось, что в первый год выживаемость составила 60%, 3-летняя – 23,5%, 5-летняя выживаемость составила 15%. Общая медиана выживаемости данной группы составила 17,3

месяца. Выживаемость пациентов в зависимости от пола представлена на рисунке 11.



**Рисунок 11** – Выживаемость больных меланомой с выявленной первичной опухолью в зависимости от пола

В первый год выживаемость у мужчин была 73%, у женщин – 51%. Трехлетняя выживаемость у женщин – 21,6%, у мужчин – 21%. Пятилетняя выживаемость у женщин – 16,4% у мужчин – 14,5%. Медиана выживаемости у мужчин составила 25 месяцев, а у женщин – 12,8 месяца.

Сводные данные выживаемости в обеих группах, а также в зависимости от пола представлены в таблице 8.

При сравнении основной и контрольной групп отмечено, что в основной группе общая выживаемость и медиана выживаемости выше, чем во контрольной группе. При сравнении выживаемости среди полов в основной группе не было отмечено существенной разницы, но у мужской группы не была достигнута медиана выживаемости (возможно, что это связано с малой выборкой). При сравнении среди полов в контрольной группе, также отмечена небольшая разница в выживаемости, однако медиана у мужчин больше, чем у женщин.

**Таблица 8** – Выживаемость в зависимости от пола пациентов основной и контрольной групп

№ группы	Группа 1 (N = 99)	Группа 2 (N = 97)	Группа 1 (М) (N = 40)	Группа 1 (Ж) (N = 59)	Группа 2 (М) (N = 56)	Группа 2 (Ж) (N = 41)
Выживаемость за 1 год (%)	83,2	60	80	76,3	73	51
Выживаемость за 3 года (%)	65	23,5	64,6	65	21	21,6
Выживаемость за 5 лет (%)	60,5	15	60	59,9	14,5	16,4
Медиана выживаемости (месяцы)	122,2	17,3	более 132	123	25	12,8

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что пациенты с метастазами меланомы без выявленного первичного очага имеют лучший прогноз в сравнении с больными, у которых первичная опухоль была выявлена.

### **Клинический пример № 1**

Пациентка Х., 66 лет, обратилась в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с диагнозом: метастаз саркомы в паховых лимфоузлах справа без выявленного первичного очага. Из анамнеза известно, что с февраля 2018 отмечает появление опухоли в левой паховой области. В апреле 2018 года при обследовании по месту жительства подтверждено наличие опухоли в левой паховой области. 17.05.2018 выполнена биопсия опухоли. Проведено гистологическое исследование полученного материала – подозрение на саркому. Впоследствии направлена в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина для дообследования и дальнейшего лечения. По данным пересмотра готовых гистологических препаратов и ИГХ: процесс в паховых узлах следует классифицировать как метастаз меланомы. При дообследовании в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина по результатам осмотра кожных покровов и видимых слизистых оболочек первичный очаг не выявлен. По данным ПЭТ-КТ выявлено опухолевое поражение исключительно лимфатических узлов пахово-подвздошной области. По данным МРТ таза, проксимальных отделов бедра: в левой паховой области паравазально вдоль проксимальных

отделов бедренных артерий и вены, охватывая до половины их окружности, определяется опухолевый узел солидной структуры с преимущественно четкими неровными контурами, размерами 4,3×3,2×3,4 см. Пациентке 02.08.2018 выполнена подвздошно-пахово-бедренная лимфаденэктомия (операция Дюкена).

По данным гистологического заключения: № 29224/2018 от 07.08.2018: Учитывая данные ранее проведенного ИГХ-исследования, опухоль представлена метастазом меланомы, врастающим в стенку сосуда. В 3 из 7 лимфоузлов – метастазы. При ПЦР-секвенировании в исследованном материале в 12 и 13 кодонах 2 экзона, а также в 61 кодоне 3 экзона гена N ras мутации не обнаружено; в 599–601 кодонах 15 экзона гена BRAF мутации не обнаружено; в 9, 11, 13, 17 и 18 экзонах гена c-kit мутаций не обнаружено. Для уточнения гистогенеза опухоли дополнительно проведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к виментину, S 100 протеину, HMB45, Melan A, CD3, CD20, CD99, CD138, MUM1, MPO, цитокератину 18, синаптофизину, хромогранину A, p63, Bcl2, ER и Ki67. Выявлена экспрессия в большинстве опухолевых клеток виментина, S 100 протеина, HMB45 и Melan A, Bcl2, что при отсутствии экспрессии опухолевыми клетками остальных иммуногистохимических маркеров, свидетельствует в пользу их меланоцитарной дифференцировки. Индекс пролиферации в опухолевых клетках Ki67 – 20%. Принимая во внимание гистологическое строение опухоли и результаты иммуногистохимического исследования, процесс в левых паховых лимфатических узлах следует классифицировать как метастазы меланомы. Пациентке с учетом гистологического заключения и ИГХ назначена терапия ниволумабом в адьювантном режиме и контрольное обследование через 3 месяца. При контрольном обследовании через 3, 6, 12, 24 месяцев – без признаков прогрессирования основного заболевания.

В данном случае при углубленном морфологическом исследовании иммуногистохимических и генетических методик удалось установить точный диагноз и после оценки распространенности опухолевого процесса выбрать оптимальную лечебную тактику. Причем факт отсутствия определяемого

первичного очага не повлиял на эффективность лечения.

### **Клинический пример №2**

Пациентка С., 51 года, обратилась в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с диагнозом: метастаз рака в подмышечных лимфатических узлах без выявленного первичного очага. Из анамнеза известно, что в феврале 2005 г. после иглотерапии по поводу артроза плечевых суставов пациентка отметила появление опухоли в правой подмышечной области. Обследовалась по месту жительства, произведена пункционная биопсия, диагностирован рак. С данным диагнозом направлена в НМИЦ онкологии для дообследования. При первичном осмотре отмечено наличие в правой подмышечной области опухолевого узла до 4 см в диаметре. При проведении радиоизотопного исследования костной системы визуализированы изменения обменного характера в области суставов, позвоночника. По результатам УЗИ: поражения лимфатических узлов слева не выявлено; справа измененные надключичные и подключичные лимфоузлы не определяются; в подмышечной области справа лимфатический узел до 2,0×1,0 см с признаками опухолевого поражения. На границе правой молочной железы и подмышечной области узловое образование 5,1 см в диаметре. По результатам маммографии –от 24.04.2006 на фоне 2-сторонней диффузной мастопатии в ткани молочных желез узловые образования не определяются. В правой аксиллярной области плотное узловое образование размерами 6,8×5,5 см и инфильтрацией в окружающие ткани, рядом два узла – 2,1×0,95; 1,5×0,75. Заключение: следует думать о раке добавочной доли справа. При цитологическом исследовании готовых препаратов диагностирован метастатический рак. 02.05.2006 выполнена трепанобиопсия опухоли. По результатам цитологического исследования выявлена цитограмма, характерная для ткани молочной железы без признаков опухолевого роста. По результатам гистологического исследования № 10683, учитывая локализацию удаленного фрагмента тканей, а именно подмышечную область, можно говорить о добавочной дольке молочной железы. Таким образом, у больной морфологически доказано метастатическое поражение лимфатических

узлов правой молочной железы. Окончательный диагноз необходимо дифференцировать между раком правой молочной железы T3N1M0, предположительно исходящим из хвостовой доли правой молочной железы, и метастазом рака без выявленного первичного очага в подмышечных лимфатических узлах справа. Пациентке проведено оперативное лечение в объеме радикальной резекции правой молочной железы. По результатам гистологического исследования операционного материала получена морфоиммуногистохимическая картина метастаза беспигментной веретеночелочной меланомы в лимфатическом узле с прорастанием капсулы узла, инфильтрацией окружающей жировой ткани и ткани рядом лежащего лимфатического узла с формированием опухолевого конгломерата в подмышечной клетчатке. Для уточнения гистогенеза опухолевых клеток проведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к виментину, НМВ 45, антигену, S100 протеину, тирозиназе, CD 117 (KIT), CD 31, CD 34, эпителиальному мембранному антигену, общему цитокератину AE/AУЗ, цитокератинам 7 и 20, Ber EP 4, P63, CK, HMW, синаптофизину, хромогранину А, и TTF 1. Выявлена экспрессия большинством опухолевых клеток виментина (+++) и S 100 протеина (+++), в части клеток опухоли – НМВ 45 антигена (++) . Реакции на остальные иммуногистохимические маркеры в клетках опухоли отрицательные. Принимая во внимание гистологическое строение опухоли и результаты иммуногистохимического исследования, процесс в лимфатических узлах следует классифицировать как метастазы меланомы. Послеоперационный период протекал удовлетворительно. При дальнейшем наблюдении первичную локализацию опухоли выявить не удалось.

Следует отметить, что в данном случае результаты стандартного обследования и данные цитологического и гистологического исследований не позволили установить истинный диагноз, и патологические изменения расценены как проявления рака хвостовой доли правой молочной железы T3N1M0.

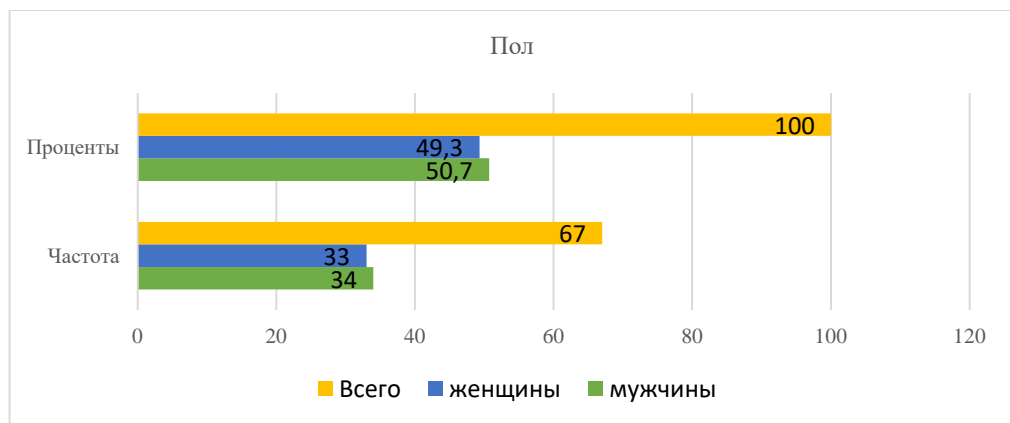
Таким образом, единственным методом диагностики при метастазах меланомы, позволяющим точно установить патоморфологический диагноз



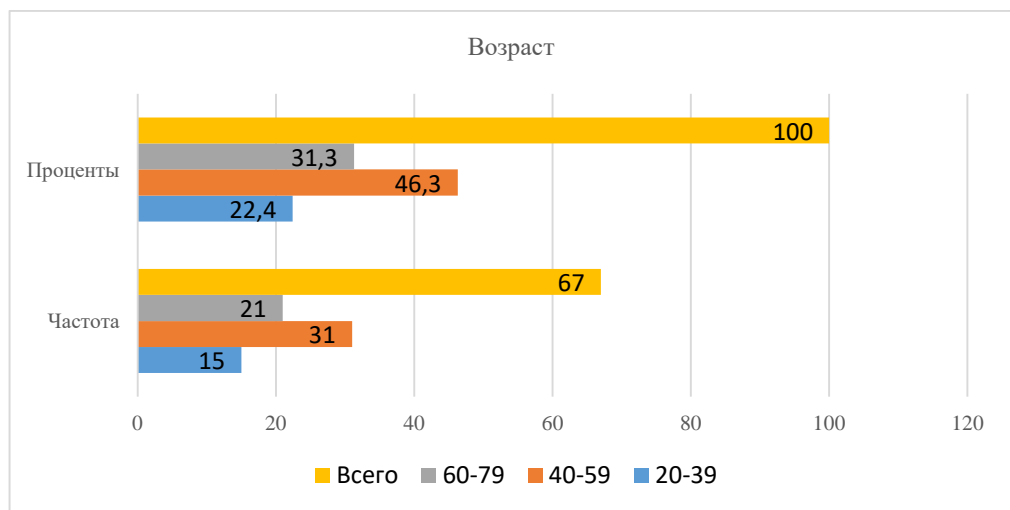
является иммуногистохимическое исследование опухоли. Только четкое представление о морфологической структуре опухоли обеспечивает установление точного диагноза и адекватное лечение.

## ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ

В исследование были включены 67 пациентов меланомой с выявленным первичным очагом, которым было выполнено иммунологическое и морфологическое исследование костного мозга с целью изучения частоты обнаружения диссеминированных опухолевых клеток (ДОК). Распределение по полу и возрасту представлено на Диаграммах 2 и 3, соответственно (Рисунок 12, 13). Всего в исследовании приняли участие 34 (50,7%) больных мужского пола и 33 (49,3%) больных женского пола. Средний возраст пациентов составил:  $52,7 \pm 1,6$  года. В возрасте от 20–39 лет наблюдалось 15 (22,4%) больных, в возрасте 40–59 лет – 31 (46,3%) больной и в интервале 60–79 лет – 21 (31,3%) больной.



**Рисунок 12** – Распределение больных меланомой по полу



**Рисунок 13** – Распределение больных меланомой по возрасту

Всем пациентам в результате стандартного комплексного обследования в условиях НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина был установлен диагноз: «меланома с метастазами в периферических лимфатических узлах». Локализация первичного очага у 7 (10,2%) больных была в области головы и шеи, у 9 (13,4%) пациентов – в области верхних конечностей, у 20 (29,9%) больных опухоль локализовалась в области нижних конечностей и в 31 (46,3%) случае – в области туловища. Данные представлены в таблице 9.

**Таблица 9** – Локализация первичной опухоли у больных меланомой

Локализация первичного очага	абс.	%
кожа головы–шеи	7	10,4
кожа верхних конечностей	9	13,4
кожа нижних конечностей	20	29,9
кожа туловища	31	46,3
Всего	67	100,0

Распределение больных по распространенности опухолевого процесса в соответствии с классификацией TNM представлено в таблице 10.

**Таблица 10** – Распределение больных меланомой по распространенности опухолевого процесса в соответствии с классификацией TNM и по стадиям

Признак	Абс.	%
Всего	67	100
Стадия		
I	18	26,9
II	35	52,2
III	8	11,9
IV	3	4,5
Первичная опухоль (Т)		
Tx	3	4,5

T1	8	11,9
<i>Продолжение таблицы 10</i>		
T2	17	25,4
T3	24	35,8
T4	15	22,4
Регионарные метастазы (N)		
Nx	2	3,0
N0	54	80,6
N1	5	7,5
N2	3	4,5
N3	3	4,5
Отдаленные метастазы (M)		
M0	65	97,1
M1	2	2,9

Следует отметить, что в исследовании преобладали больные со стадиями II (n = 35; 52,2%), I (n = 18; 26,9%). III стадия установлена в 8 (11,9%) случаях, а у 3 (4,5%) больных отмечена IV стадия опухолевого процесса. В трех случаях точная стадия не установлена ввиду отсутствия данных о первичной опухоли (Tx). Размеры первичного очага в большинстве случаев соответствовали T3 (35,8%) и T2 (25,4%), стадия T1 наблюдалась у 8 (11,9%) больных, T4 – у 15 (22,4%) больных.

В 80,6% случаев регионарные лимфатические узлы были интактны. Индекс N1 был у 5 (7,5%) больных. В равном числе случаев установлена распространенность N2 и N3: 3 (4,5%). Nx – 3,0%.

Метастатическое поражение отдаленных органов (M1) выявлено в двух случаях (2,9%).

До визита в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина 73,1% (n = 51) больным меланомой в соответствии с распространенностью опухолевого процесса проведено хирургическое лечение в объеме иссечения первичного очага.

Операция в комбинации с иммунотерапией проведена 13,4% (n = 9) пациентам. Одному больному после операции проводилась таргетная терапия. Данные представлены в таблице 11.

**Таблица 11** – Распределение больных меланомой в соответствии с видом лечения до обращения в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Вид вмешательства	Абс.	%
Нет лечения	6	9,0
Операция	51	73,1
Операция + иммунотерапия	9	13,4
Операция + таргетная терапия	1	1,5
Итого	67	100,0

После обследования в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина установлено, что у 33 (49,2%) больных имело место прогрессирование меланомы. Выявлены как лимфогенные, так и гематогенные метастазы. Поэтому мы сочли целесообразным выполнить рестадирование согласно распространенности опухолевого процесса, на момент пункции костного мозга. Информация по данным больным представлена в таблице 12. Как видно из таблицы 12 большинство больных на момент исследования костного мозга имели распространенный опухолевый процесс.

Таким образом, на момент пункции костного мозга распространенность опухолевого процесса соответствовала следующим стадиям: IA– 7,4%, IB – 7,4%, IIA-C –19,4%, IIIA-C – 27,0%, IV – 38,8%

**Таблица 12** – Распределение больных меланомой в соответствии с распространенностью опухолевого процесса на момент эксфузии костного мозга (рестадирование)

Стадия	Абс.	%
I A	5	7,4
I B	5	7,4

II А	5	7,4
------	---	-----

*Продолжение таблицы 12*

II В	4	6,0
II С	4	6,0
III А	1	1,6
III В	4	6,0
III С	13	19,4
IV	26	38,8

Оперативному лечению подверглись 18 больных (26,8%). Из них в 12 (17,9%) случаях операция была дополнена лекарственной терапией. Только лекарственное лечение проводилось 33 (49,3%) больным. В остальных случаях было рекомендовано наблюдение. Лекарственное лечение, которое получали больные, представлено в таблице 13. Всего лекарственное лечение получили 45 пациентов. Таргетная терапия проводилась 19 (42,2%) больным, 25 больных (55,5%) получили иммунотерапию, таргетная терапия + иммунотерапия была проведена 1 (2,2%) пациенту.

**Таблица 13** – Распределение больных меланомой в соответствии с видом лекарственного лечения

Лекарственное лечение	Абс.	%
Таргетная терапия	19	42,2
Иммунотерапия	25	55,5
Иммунотерапия + таргетная терапия	1	2,2
Всего	45	100,0

В схемах лекарственной терапии использованы следующие группы лекарственных препаратов: ингибиторы контрольных точек иммунного ответа и ингибиторы тирозинкиназы. В монотерапии использовались: Ниволумаб, Пембролизумаб, Вемурафениб, Дабрафениб. Также использованы комбинации

препаратов: Вемурафениб + Кобиметиниб, Дабрафениб + Траметиниб, Ипилимумаб + Ниволумаб, Ниволумаб + Дабрафениб.

Ввиду того, что в клинические рекомендации уже внесен дополнительный метод диагностики распространенности рака (трепанобиопсия костного мозга, пункция) при солидных опухолях, а именно при раке молочной железы, раке желудка, нами выполнено иммунологическое и морфологическое исследование костного мозга у больных меланомой, учитывая ее высокий потенциал гематогенного метастазирования. Изучение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге больных меланомой выполнялось в несколько этапов. Первым этапом в работе проводился подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток. Морфологически ДОК в костном мозге не были обнаружены.

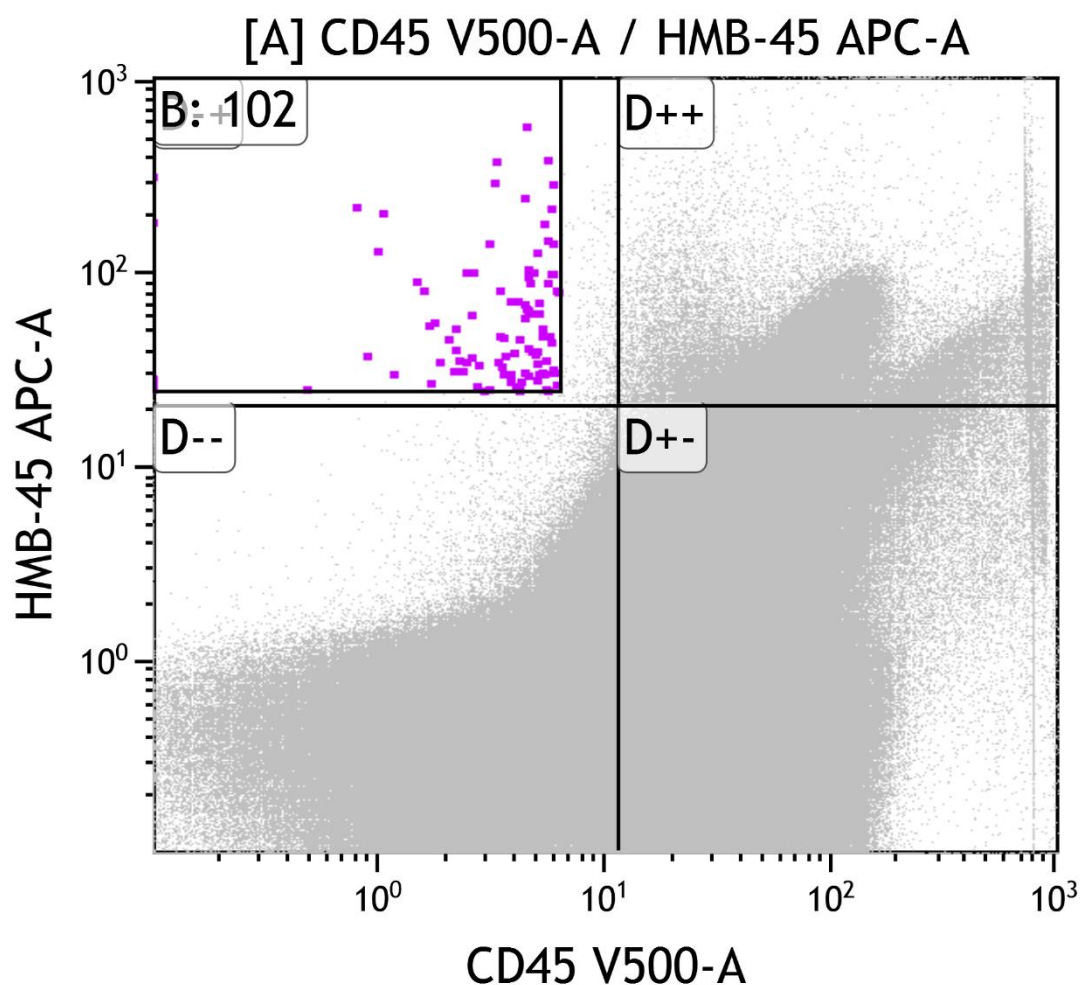
Следующим этапом проводилось иммунофенотипирование костного мозга с использованием проточной цитометрии. На основании экспрессии НМВ-45 и отсутствии экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в костном мозге больных меланомой диссеминированные опухолевые клетки выявлены в 62,7% случаев (n = 42).

Диссеминированные опухолевые клетки характеризовались низкими параметрами светорассеяния (Таблица 14).

**Таблица 14** – Частота выявления ДОК в костном мозге больных меланомой

Диссеминированные опухолевые клетки	Абс.	%
Отсутствуют	25	37,3
Присутствуют	42	62,7
Всего	67	100,0

На рисунке 14 представлена цитограмма, на которой в координатах CD45 (ось X) и НМВ-45 (ось Y) в гейте В обнаружены клетки, экспрессирующие маркер меланомы НМВ-45 и не экспрессирующие маркер CD45.



**Рисунок 14** – Диссеминированные опухолевые клетки меланомы в костном мозге (гейт В)

Связи частоты поражения костного мозга с полом не выявлено, тогда как с возрастом обнаружена достоверная взаимосвязь (Таблица 15). Установлено, что частота ДОК позитивных случаев выше в группе пациентов молодого возраста (20–39 лет): 93,3%,  $n = 14$ ,  $p = 0,02$ .

**Таблица 15** – Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от возраста

		ДОК		Всего
		отсутствуют	присутствуют	
20–39 лет	абс.	1	14	15
	%	6,7	93,3	100,0
40–59 лет	абс.	14	17	31
	%	45,2	54,8	100,0



60–79 лет	абс.	10	11	21
	%	47,6	52,4	100,0
Всего	абс.	25	42	67
	%	37,3	62,7	100,0

При изучении поражения костного мозга в зависимости от локализации первичного очага установлено, что частота выявления ДОК выше, если опухоли находятся в области верхних конечностей или в области туловища: 100% и 77,8% соответственно,  $p = 0,024$ . (Таблица 16). При локализации опухоли в области головы и шеи этот показатель составил 25%, а в области нижних конечностей – 50%. Эти результаты анализа довольно интересны и стоит обратить на них внимание. Возможно дальнейшее исследование по мере накопления материала позволит расширить представления об особенностях метастазирования изучаемой опухоли.

**Таблица 16** – Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от локализации первичного очага

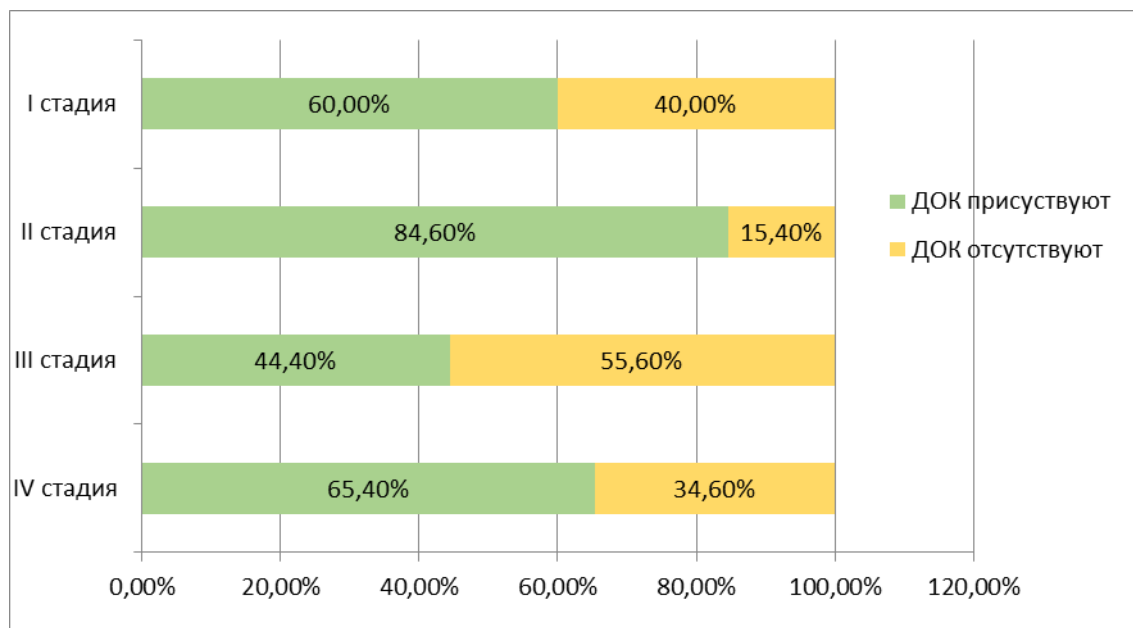
		ДОК		Всего
		отсутствуют	присутствуют	
Кожа головы шеи	абс.	3	1	4
	%	75,0	25,0	100,0
Кожа верхних конечностей	абс.	0	5	5
	%	0	100,0	100,0
Кожа нижних конечностей	абс.	6	6	12
	%	50,0	50,0	100,0
Кожа туловища	абс.	4	14	18
	%	22,2	77,8	100,0
Всего	абс.	13	26	39
	%	33,3	66,7	100,0

Изучена частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от стадии опухолевого процесса. Распределение ДОК позитивных и ДОК негативных случаев по стадиям представлены в таблице 17. Как видно из таблицы, диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге выявлялись на всех стадиях меланомы.

**Таблица 17** – Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от стадии

Стадия		ДОК		Всего
		отсутствуют	присутствуют	
IA	абс.	3	2	5
	%	60,0	40,0	100,0
IB	абс.	1	4	5
	%	20,0	80,0	100,0
IIA	абс.	0	5	5
	%	0,0	100,0	100,0
IIB	абс.	2	2	4
	%	50,0	50,0	100,0
IIC	абс.	0	4	4
	%	0,0	100,0	100,0
IIIA	абс.	0	1	1
	%	0,0	100,0	100,0
IIIB	абс.	1	3	4
	%	25,0	75,0	100,0
IIIC	абс.	9	4	13
	%	69,2	30,8	100,0
IV	абс.	9	17	26
	%	34,6	65,4	100,0
Всего	абс.	25	42	67
	%	37,3	62,7	100,0

На основании представленных данных установлено, что при I и II стадиях процент выявления ДОК составляет 60,0% (6\10) и 84,6%(11\13) соответственно, при III и IV стадии – 44,4% (8\18) и 65,4% (17\26). Вместе с тем статистически значимого различия не достигнуто (Рисунок 15). Тем не менее, на это стоит обратить внимание, поскольку частота поражения костного мозга при стадии I-II меланомы довольно высокая. Такое раннее событие гематогенной диссеминации, как мы предполагаем, может свидетельствовать о более агрессивном злокачественном потенциале меланомы в фазе начального роста, что, по мнению других исследователей, может быть продиктовано особой популяцией стволовых опухолевых клеток [129, 130]. Они способны к стимулированию роста и метастазирования опухолей, тогда как большинство опухолевых клеток имеют ограниченный пролиферативный потенциал [131].



**Рисунок 15** – Частота поражения костного мозга при ранних и распространенных стадиях меланомы

Поскольку у части больных на момент пункции костного мозга было установлено прогрессирование меланомы, то факт поражения костного мозга в таких случаях вполне ожидаем, и мы видим, что при IV стадии оно выявлено у 65,4% больных. Вместе с тем следует принять во внимание следующее. Во-

первых, мы не располагаем данными о состоянии костного мозга на момент первичной постановки диагноза у этих больных. Во-вторых, хорошо известен факт персистенции ДОК в костном мозге на ранних стадиях, что показано целом ряде злокачественных опухолей [132–140]. Также известно, что они имеют биологические характеристики, отличающие их от первичной опухоли, могут поступать в циркуляторное русло и метастатически поражать отдаленные органы [134, 141].

Известно, что частота мутаций в гене BRAF при меланоме кожи, по данным разных исследователей, варьирует от 50% до 80%. Так, во всероссийском молекулярно-эпидемиологическом исследовании меланомы соматические мутации BRAF были выявлены в 64% первичных опухолей [142]. При этом с наибольшей распространенностью мутации BRAF отмечены среди пациентов молодого и среднего возраста [142].

В 49 случаях мы располагали данными BRAF-статуса пациентов. Интересным представлялось сравнить частоту выявления ДОК у таких больных. При анализе частоты выявления ДОК в костном мозге в зависимости от BRAF статуса значимых различий не выявлено (Таблица 18).

**Таблица 18** – Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от статуса BRAF

			ДОК		Всего
			отсутствуют	присутствуют	
BRAF	нет мутации	абс.	8	13	21
		%	38,1	61,9	100,0
	есть мутация	абс.	6	22	28
		%	21,4	78,6	100,0
P = 0,203		абс.	14	35	49
		%	28,6	71,4	100,0

При отсутствии или наличии мутаций целевого гена процент ДОК позитивных случаев был в равной степени высоким. При этом следует отметить,

что BRAF позитивные случаи характеризовались более высокой частотой поражения костного мозга (78,6% против 61,9%).

Таким образом, по результатам проведенного анализа взаимосвязи ДОК статуса с клинико-морфологическими характеристиками опухоли установлено, что поражение костного мозга при меланоме выявляется в 62,7% случаев, при этом даже у больных с локализованным опухолевым процессом. Более того, необходимо отметить, что в молодом возрасте, при малых размерах опухоли, когда клинически еще не наблюдается лимфогенного метастазирования, отмечается гематогенная диссеминация. Последнее, возможно, отражает агрессивность опухоли именно на начальных этапах ее развития. Интересным является факт взаимосвязи частоты поражения костного мозга и локализации первичного очага, установленный в данном исследовании. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследование костного мозга у больных меланомой является важным этапом в изучении процесса метастазирования меланомы и в понимании истоков ее агрессивных свойств.

Резюмируя, можно отметить, что определение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге может иметь важное прогностическое значение и данный метод следует рассмотреть, как дополнительный инструмент для уточнения распространенности опухолевого процесса, что, в конечном итоге, может влиять на лечебную тактику.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальный анализ клинических наблюдений показывает, насколько важен современный подход к исследованию проблемы метастазов меланомы без выявленного первичного очага с учетом патогенеза, особенностей развития и клинического течения, знания клинико-морфологических характеристик, анализа эффективности хирургического и лекарственного лечения. Такая детализация обеспечивает понимание биологической сущности злокачественной опухоли и способствует адекватному выбору тактики лечения.

В клинический этап исследования включено 263 пациента с метастазами меланомы в лимфатических узлах, получивших лечение и наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2005 г. по 2019 г. Осуществлен ретроспективный анализ клинического материала – историй болезни и амбулаторных карт пациентов, с верифицированным диагнозом меланомы в лимфатических узлах, получавших лечение согласно клиническим рекомендациям Минздрава России и наблюдавшихся в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина. Все больные после лечения наблюдались амбулаторно. При формировании групп исследования проведен анализ документации пациентов: историй болезней, амбулаторных карт, протоколов операций, протоколов гистологических и цитологических исследований, выписных эпикризов. В исследовании оценивались демографические характеристики больных, включающие пол, возраст, сопутствующие заболевания, жалобы, предшествующие выявлению заболевания, индекс массы тела (ИМТ).

В экспериментальный этап работы включены образцы костного мозга, полученные в результате пункции задней верхней ости подвздошной кости.

На данных образцах, окрашенных по методу Романовского, проведено морфологическое исследование с подсчетом показателей миелограммы и поиском опухолевых клеток, а также иммунологическое исследование методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, напрямую меченных

различными флюорохромами. Диагностический алгоритм при метастазах меланомы без выявленного первичного очага должен включать в себя следующее:

Первый аспект – сбор анамнеза и тщательный физикальный осмотр, который включает оценку общего состояния, осмотр кожных покровов и слизистых оболочек, пальпацию всех групп доступных периферических лимфатических узлов, молочных желез, половых органов и гинекологический осмотр. Особое внимание следует уделять случаям самопроизвольного исчезновения пигментных образований или их удаления в анамнезе.

Второй аспект – оценка распространенности метастатического поражения. Необходимо получить информацию о состоянии всех групп лимфоузлов и органов, наиболее часто поражаемых метастазами меланомы. Следует выполнить ультразвуковое исследование органов брюшной полости, забрюшинного пространства, малого таза, периферических лимфоузлов, рентгенографию органов грудной клетки. По возможности целесообразно использовать более точные методики; КТ, МРТ. Применение позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ/КТ) также показано пациентам с метастазами без выявленного первичного очага.

Третий аспект – морфологическая верификация опухоли: биопсия или пункция лимфоузла с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием (HMB45, Melan A, MITF, S-100, тирозиназу). Цитологическое исследование пациентам с метастазами меланомы без выявленной первичной опухоли целесообразно для подтверждения злокачественности процесса и выбора очага для последующей биопсии. При обнаружении положительных маркеров меланомы и подтверждении диагноза необходимо начать проводить системное специальное лечение.

Таким образом, комплексное обследование пациентов с диагнозом: метастазы меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага должно включать клинические, ультразвуковые, рентгенологические, цитологические гистологические, молекулярно-генетические и

иммуногистохимические методы исследования с учетом индивидуального подхода к каждому больному.

Также следует отметить, что важным фактором в выборе диагностической тактики является общее состояние больного. Очевидно, что пациенту в тяжелом состоянии нецелесообразно проводить обследование в полном объеме, так как не приходится надеяться, что пациент перенесет агрессивное специальное лечение. В таких случаях следует обсудить вопрос о симптоматической терапии.

Как показал анализ, изученные группы сопоставимы, поэтому данные о больных с установленной первичной опухолью могут быть экстраполированы на пациентов с метастазами меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага.

С одной стороны, при метастазах меланомы без выявленного первичного очага логично предположить агрессивное течение болезни, поскольку первым проявлением заболевания является метастатическое поражение, однако нами получены данные, что общая выживаемость и медиана выживаемости в группе пациентов с метастазами меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага выше, чем при метастазах меланомы с установленной первичной опухолью. В первый год выживаемость при метастазах меланомы в лимфатических узлах без ВПО составила 83,2% против 60% при меланоме с ВПО. Общая медиана выживаемости при метастазах меланомы без ВПО составила 122,2 месяца, против 17,3 месяцев ( $p = 0,87$ ) Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что первичный очаг у группы пациентов с метастазами меланомы без ВПО был подвергнут воздействию ряда механизмов иммунного ответа организма вплоть до его полной супрессии, в то время как на метастатические очаги такое воздействие по каким-то причинам не было осуществлено. Гипотетическими причинами отсутствия первичного очага могут являться: ингибирование роста первичного очага, регресс первичного очага, преимущественный рост метастазов по сравнению с первичным очагом. В настоящее время выделяют две основные гипотезы невозможности определения первичного очага: модель параллельной прогрессии, а также гипотеза «истинной» опухоли без выявленного первичного очага. Согласно первой теории



первичный очаг точно присутствует, однако ввиду малого размера не распознан, диссеминация первичной опухоли происходит на ранних стадиях развития, а последующая клональная эволюция метастазов отличается от эволюции первичной опухоли. Согласно второй теории в связи с ранней и длительной стадией покоя первичный очаг будет отсутствовать в течение всего периода болезни. В данном случае независимая клональная эволюция под дифференциальным давлением отбора может объяснять регрессию первичного очага наряду с растущим метастатическим поражением [143].

Одним из самых перспективных современных направлений в диагностике является исследование молекулярно-генетических особенностей опухоли, которые позволили бы персонализировать терапию исходя из индивидуальных особенностей каждой опухоли. 67 больным выполнено морфологическое и иммунологическое исследование костного мозга. Методом проточной цитометрии в костном мозге больных меланомой диссеминированные опухолевые клетки выявлены в 62,7% случаев. Установлено, что на начальных стадиях заболевания их процент довольно высок, также, как и при небольших размерах опухоли. Этот факт может помочь объяснить клинические проявления патологического процесса в виде метастазов меланомы без выявленного первичного очага, когда первичную опухоль не удаётся выявить, возможно, из-за микроскопических её размеров, в то время как она имеет высокий метастатический потенциал. Кроме того, в молодом возрасте частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге была выше. Можно предположить, что этим обусловлено более агрессивное течение опухолевого процесса у молодых. Изложенные факты представляются интересными и требуют дальнейшего изучения с целью оценки прогностической значимости диссеминированных опухолевых клеток при меланоме и анализа ресурсов лекарственной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Клиническое течение метастазов меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага не отличается от течения опухолевого процесса у больных с выявленной первичной опухолью и в первую очередь зависит от морфологических характеристик и распространенности опухоли.

2. Общая выживаемость группы пациентов с диагнозом «метастазы меланомы в лимфатических узлах без выявленного первичного очага» (n=99) составила в первый год 83,2%, против 60% при меланоме с выявленной первичной опухолью (n=97); 3-летняя выживаемость была 65 %, тогда как в контрольной группе - 23,5%, 5-летняя выживаемость соответственно - 60,5% и - 15%. Общая медиана выживаемости в данных группах составила 122,2 месяца и 17,3 месяца соответственно,  $p=0,087$ .

3. Иммуногистохимическое исследование тканей опухоли было выполнено 24 пациентам, в результате которого Melan-A выявлен в 24(100%), protein S100 - в 23(95,8%), Melanosoma (HMB45) - 20(83,3%), Tyrosinasa 22(91,7%), MITF-M - 24(100%), Vimentin-23(95,8%), V600E - 7(70%), что позволило дифференцировать меланому от опухолей иной морфологии.

4. На основании экспрессии HMB-45 и отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в костном мозге больных меланомой диссеминированные опухолевые клетки выявлены в 62,7% случаев (n=42). Клетки характеризовались низкими параметрами светорассеяния. Установлено, что частота позитивных случаев диссеминированных опухолевых клеток выше в группе пациентов молодого возраста (20 - 39 лет): 93,3%, n=14, чем в возрасте от 40-59 лет: 54,8% и в возрастной группе от 60-79 лет: 52,4%,  $p=0,02$ .

5 Частота выявления позитивных случаев диссеминированных опухолевых клеток выше на начальных стадиях меланомы: процент диссеминированных опухолевых клеток при I-II стадиях составил 60,0% и 84,6%, тогда как при III – IV стадиях составил 44,4% и 65,4%, соответственно,  $p=0,039$ .

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Усовершенствование алгоритма дифференциальной диагностики метастазов меланомы без выявленного первичного очага в лимфоузлах возможно путем включения в диагностический алгоритм, помимо рекомендованных в настоящее время методик обследования, морфологическое и иммуногистохимическое исследование костного мозга с целью изучения диссеминированных опухолевых клеток (Рисунок 16).

2. Для повышения точности дифференциальной диагностики при метастазах злокачественной опухоли в лимфатических узлах без выявленного первичного очага целесообразно включение в диагностический алгоритм иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования.

3. Поиск первичного очага не должен являться самоцелью, так как факт его выявления не влияет на результаты лечения. После оценки общего состояния пациента, получения морфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли, оценки распространенности опухолевого поражения целесообразно начинать лечение.

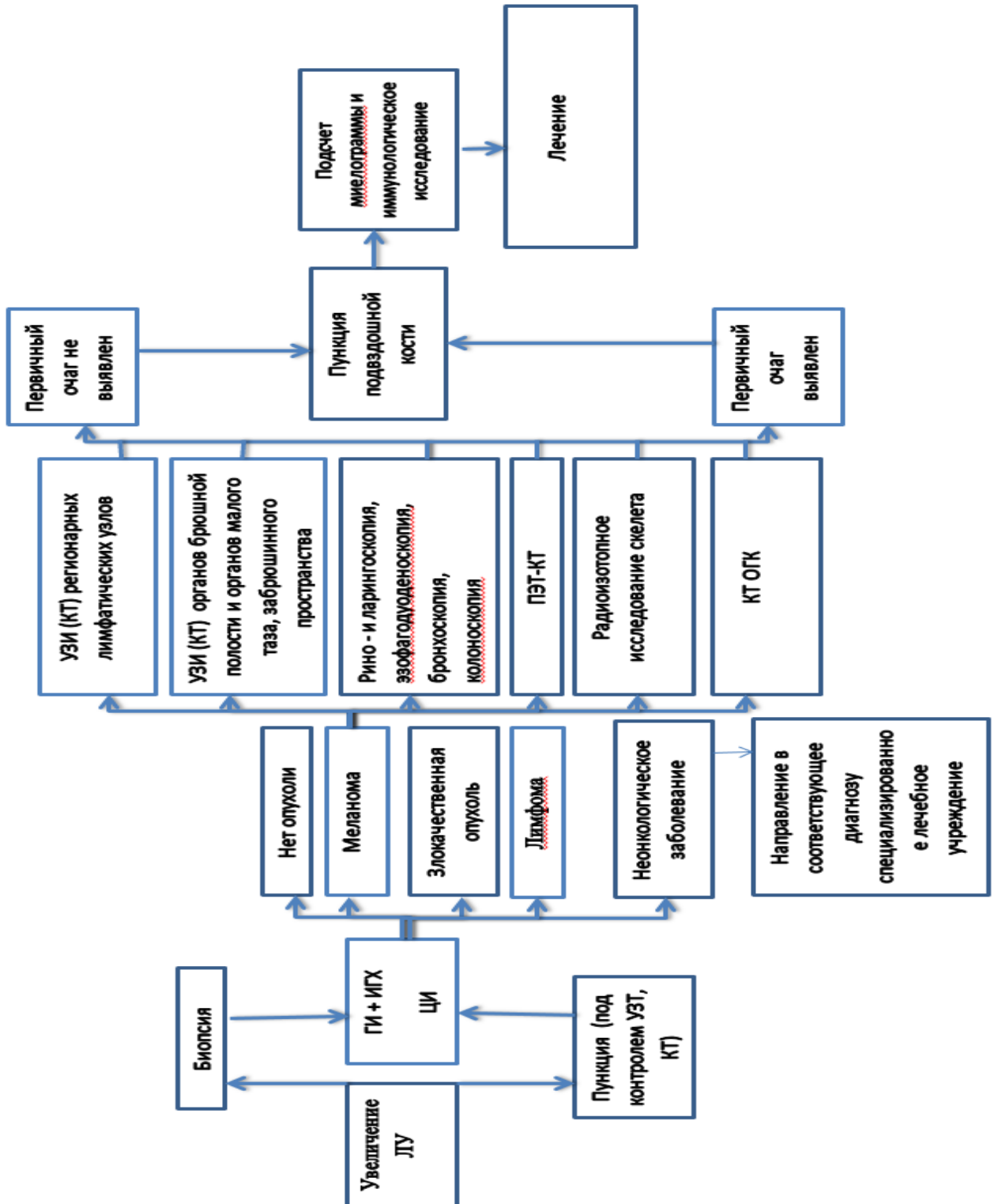


Рисунок 16 - Диагностический алгоритм при метастазах меланомы без выявленного первичного очага

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВПО – выявленного первичного очага

Гр – Грей

ДОК – диссеминированные опухолевые клетки

ИГХ – иммуногистохимия

ИТ– иммунотерапия

КТ – компьютерная томография

ЛУ – лимфатические узлы

ММБВПО – метастаз меланомы без выявленного первичного очага

МРТ – магнитно-резонансная терапия

МТС – метастаз

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РОД – разовая очаговая доза

СОД – суммарная очаговая доза

УЗИ – ультразвуковое исследование

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Benderra, M. A. Standard of care of carcinomas on cancer of unknown primary site in 2016 / M. A. Benderra [et al.] // *Bull Cancer*. – 2016. – № 103 (7-8). – P. 697–705.
2. Pavlidis, N. Cancer of unknown primary site / N. Pavlidis, G. Pentheroudakis // *Lancet* – 2012. – № 379 (9824). – P. 1428–1435.
3. Блинов, Н. Н. Меланома кожи. Факторы риска и прогноза / Н. Н. Блинов, М. М. Константинова // *Onconews*. – 2004. – № 4. – С. 2–4.
4. Нивинская, М. М. Клиника и лечение меланомы / М. М. Нивинская. – М.: «М», 1970. – 184 с.
5. Sharov, S. V. Epidemiological features of melanoma skin cancer and survival of oncology patients in Krasnodar Region / S. V. Sharov [et al.] // *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. – 2018. – № 2 (25). – P. 140–148. (In Russ.)
6. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / под ред. О. В. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2021. – 250 с.
7. Вагнер, Р. И. Меланома кожи. Часть 1 / Р. И. Вагнер, В. В. Анисимов, А. С. Барчук. – СПб.: Наука, 1995. – 151 с.
8. Albrecht, K. [et al.] Self-efficacy for coping with cancer in melanoma patients: its association with physical fatigue and depression / K. Albrecht [et al.] // *Psychooncology*. – 2013. – № 9 (22). – P. 1972–1978.
9. Griewank, K. G. New developments in biomarkers for melanoma / K. G. Griewank [et al.] // *Curr. Opin. Oncol.* – 2013. – № 2 (25). – P. 145–151.
10. Read, J. Recent advances in cutaneous melanoma: towards a molecular model and targeted treatment / J. Read // *Australas. J. Dermatol.* – 2013. – № 3 (54). – P. 163–172.
11. Демидов, Л. В. Меланома кожи: стадирование, диагностика и лечение / Л. В. Демидов, Г. Ю. Харкевич // *РМЖ*. – 2003. – № 11. – С. 658.

12. Казубская, Т. П. Меланома кожи: клиничко-генетическая гетерогенность и принципы медико-генетического консультирования / Т. П. Казубская, В. К. Мусатов, А. В. Михайловский [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2003. – № 3. – С. 26–32.

13. Kousseff, B. G. The genetics of malignant melanomas / B. G. Kousseff // Ann. Plast. Surg. – 1992. – № 1 (28). – P. 11–13.

14. Боровская, Т. Ф. Клиничко-прогностическая значимость молекулярно-биологических маркеров супрессии опухолевого роста, пролиферации и их регуляторов при меланоме кожи / Т. Ф. Боровская, А. Ю. Марочко, Я. А. Машенкина, Э. Х. Курпас // Дальневост. мед. журнал. – 2010. – № 1. – С. 119–122.

15. Мазуренко, Н. Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи / Н. Н. Мазуренко // Молекулярный канцерогенез / под ред. М. А. Красильникова, И. Б. Зборовской – М., 2016. – С. 253–273.

16. Rajkumar, S. Molecular characterization of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies / S. Rajkumar, I. R. Watson // British J. Cancer. – 2016. – № 2 (115). – P. 145–155.

17. Bello, D. M. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling / D. M. Bello, C. E. Ariyan, R. D. Carvajal // Cancer Control. – 2013. – № 4 (20). – P. 261–281.

18. Platz, A. [et al.] Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site / A. Platz [et al.] // Molecular Oncology. – 2008. – № 1 (4). – P. 395–405.

19. Ellenhorst, J. Clinical correlations of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma / J. Ellenhorst [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2011. – № 2 (17). – P. 229–235.

20. Fedorenko, I. V. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management / I. V Fedorenko., G. T. Gibney, S. M. Keiran // Oncogene. – 2013. – № 25 (32). – P. 3009–3018.

21. Bello, D. M. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling / D. M. Bello, C. E. Ariyan, R. D. Carvajal // Cancer Control. – 2013. – № 4 (20). – P. 261–281.

22. Beadling, C. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes / C. Beadling [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008. – № 14 (21). – P. 6821–6828.
23. Rajkumar, S. Molecular characterization of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies / S. Rajkumar, I. Watson R. // British J. Cancer. – 2016. – № 2 (115). – P. 145–155.
24. Трапезников, Н. Н. Пигментные невусы и новообразования кожи / Н. Н. Трапезников, А. С. Рабен, В. В. Яворский, Г. Б. Титинер. – М. : Медицина, 1976. – 177 с.
25. Веснин, А. Г. Рентгенологическая и ультразвуковая диагностика меланобластом кожи и ее лимфогенных и гематогенных метастазов / А. Г. Веснин, С. И. Филимонов, И. И. Семенов, Б. А. Тришкин // Актуальные вопросы диагностики и лечения. – Ленинград, 1987. – С. 57–72.
26. Анисимов, В. В. Содержание понятия «местный рецидив» после хирургического лечения злокачественной меланомы кожи / В. В. Анисимов // Вопросы онкологии. – 1985. – Т. 31, № 1. – С. 32–37.
27. Фрадкин, С. З. Меланома кожи / С. З. Фрадкин, И. В. Залуцкий. – Минск : Беларусь, 2000. – 221 с.
28. Nambiar, S. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays / S. Nambiar [et al.] // Arch. Dermatol. – 2005. – № 141. – P. 165–173.
29. Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma / A. Breslow // Ann. Surg. – 1970. – № 182. – P. 902–908.
30. Clark, W. H. Human malignant melanoma / W. H. Clark, L. I. Goldman, M. J. Mastrangelo. – New York : Grune and Stratton. 1979. – 509 p.
31. Clark, W. H. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin / W. H. Clark [et al.] // Cancer Res. – 1969. – № 29. – P. 705–726.
32. Березкин, Д. П. Прогностические факторы, наиболее влияющие на выживаемость больных меланомой кожи / Д. П. Березкин, М. Х. Айрапетян, В. С.



Барсегян // Клиника и лечение меланом кожи : Тез. Всесоюз. симпозиума. – Л., 1990. – С. 7–9.

33. Reintgen, D. Recent advances in the care of the patient with malignant melanoma / D. Reintgen, C. M. Balch, J. Kirkwood [et al.] // *Ann. Surg.* – 1997. – № 225. – P. 1–14.

34. Kokoska, M. S. The use of lymphoscintigraphy and PET in the management of head and neck melanoma / M. S. Kokoska, G. Olson, P. R. Kelemen [et al.] // *Otolaryngol. Head Neck. Surg.* – 2001. – № 125. – P. 213–220.

35. Демидов, Л. В. Изучение факторов прогноза при меланоме кожи : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.14 / Л. В. Демидов. – М., 1982. – 188 с.

36. Хасанов, Ш. Р. Прогнозирование при основных клинических разновидностях меланомы кожи : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.14 / Хасанов Шавкат Ризаевич. – Москва, 1988.

37. Barannikova T. V. Dermal and uveal melanoma methods of treatment and preventive maintenance of development of metastasises (the literature review) / T. V. Barannikova // *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России.* – 2011. – Т. 11, № 3.

38. Nambisan, R. N. Early metastatic patterns and survival in malignant melanoma / R. N. Nambisan // *J. Surg. Oncol.* – 1987. – Vol. 34, N 4. – P. 248–252.

39. Sylven, B. Malignant melanoma of the skin. Report of 341 cases treated during the years 1929–1943 / B. Sylven // *Acta Radiol.* – 1949. – Vol. 32, № 1. – P. 33–59.

40. Clark, W. H. Jr. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression / W. H. Clark Jr., D. E. Elder, D. Guerry [et al.] // *J. Nat. Cancer. Inst.* – 1989. – № 81. – P. 1893–1904.

41. Цанев, П. Е. Роль лизосомальных и мембраносвязанных катепсинов и коллагенкз в процессе инвазии меланомы : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.14 / Цанев Петър Енчев. – Москва, 1991. – 195 с.

42. Чупров, И. Н. Свободные клетки стромы в меланоцитарных опухолях кожи / И. Н. Чупров. – СПб., 1996. – 110 с.

43. Wiggins, C. L. Malignant melanoma in pregnancy / C. L. Wiggins, M. Berwick, J. A. Bishop // *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* – 2005, Dec. – V. 4 (32). – P. 559–568.

44. Анисимов В. В. Меланома кожи (перспективы улучшения диагностики и лечения) : дис. .. д-ра мед. наук в виде науч. докл. / В. В. Анисимов. – Санкт-Петербург, 2000. – 97 с.

45. Селюжинский, И. В. Некоторые вопросы диагностики и лечения меланомы кожи / И. В. Селюжинский, Ю. Н. Найденов // *Вестник дерматологии и венерологии.* – 1995. – № 2. – С. 59–62.

46. Scoggins, C. R. Prognostic information from sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma / C. R. Scoggins., A. L. Bowen, R. C. Martin 2<sup>nd</sup> [et al.]// *Arch Surg.* – 2010 Jul. – № 7 (145). – P. 622–627.

47. Баженова, А. П. Хирургическое лечение меланомы кожи / А. П. Баженова // *Хирургия.* – 1975. – № 11. – С. 25–30.

48. Abu-Dalu, J. Prophylactic regional lymph node excision in malignant melanoma / J. Abu-Dalu, Z. Urea, Benbassat [et al.] // *J. Isr. Med. Assoc.* – 1971. – N 3. – P. 128.

49. Halpern, B. S. Presurgical staging of non-small cell lung cancer: positron emission tomography, integrated positron emission tomography/CT, and software image fusion / B. S. Halpern, C. Schiepers, W. A. Weber [et al.] // *Chest.* – 2005. – № 128. – P. 2289–2297.

50. Makela, P. J. Pretreatment sonographic evaluation of inguinal lymph nodes in patients with vulvar malignancy / P. J. Makela, A. Leminen, M. Kaariainen, P. Lehtovirta // *J. Ultrasound Med.* – 1993. – V. 12, N 5. – P. 255–258.

51. Cochran, A. J. The Augsburg Consensus: techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy and completion' lymphadenectomy in cutaneous malignancies / A. J. Cochran, B.-R. Balda, H. Starz [et al.] // *Cancer.* – 2000. – № 89. – P. 237–241.

52. Bergqvist, L. Particle sizing and biokinetics of interstitial lymphoscintigraphic agents / L. Bergqvist, S.-E., Strand B. Persson // *Semin. Nucl. Med.* – 1983. – № 12. – P. 9–19.

53. Essner, R. The role of lymphoscintigraphy and sentinel node mapping in assessing patient risk in melanoma / R. Essner // *Semin. Oncol.* – 1997. – № 24 (I Suppl 4). – P. S8–S10.

54. Krag, D. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe / D. Krag, D. Weaver, J. C. Alex, J. T. Fairbank // *Surg Oncol.* – 1993. – № 2. – P. 335–340.

55. Журавлев, К. В. Определение целесообразности профилактических лимфаденэктомий у больных меланомами кожи с повышенным риском регионарного метастазирования : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.14 / Журавлев Кирилл Валерианович. – Санкт-Петербург, 1992. – 22 с.

56. Bartolomei, M. Sentinel node localization in cutaneous melanoma: lymphoscintigraphy with colloids and antibody fragments versus blue dye mapping / M. Bartolomei, A. Testori, M. Chinol [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med.* – 1998. – № 25. – P. 1489–1494.

57. Calabro, A. Patterns of relapse in 1001 consecutive patients with melanoma nodal metastases / A. Calabro, S. F. Singletary, C. M. Balch // *Arch. Surg.* – 1989. – Vol. 124. – P. 1051–1055.

58. Steinert, H. C. Malignant melanoma: staging with whole-body positron emission tomography and 2-F-18.-fluoro-2-deoxy-Dglucose / H. C. Steinert, R. A. Huch Boni, A. Buck [et al.] // *Radiology.* – 1995. – № 195. – P. 705–709.

59. Fornage, B. D. Imaging of the skin with 20-MHz US / B. D. Fornage, M. H. McGavran, M. Duvic, C. A. Waldron // *Radiology.* – 1993. – V. 189, N 1. – P. 69–76.

60. Goldsmith, H. S. Prognostic significance of lymph node dissection in treatment of malignant melanoma / H. S. Goldsmith, P. Shan Jatin, H. Kim Dong // *Cancer.* – 1970. – Vol. 26, N 3. – P. 606–609.

61. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Handbook : TNM Classification of Malignant Tumors. – Sixth edition. – New York : SpringerVerlag, 2002.

62. Balch, C. M. A randomized evaluation of adjunctive chemoimmunotherapy versus immunotherapy in patients with resected metastatic melanoma / C. M. Balch, D. R. Murray, C. A. Presant, A. Bartolucci ; The Southeastern Cancer Study Group // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1981. – № 7. – P. 38.

63. MacKie R. M. Incidence, risk factors and prevention of melanoma / R. M. MacKie // European Journal of Cancer. – 1998. – V. 34. – P. 53–56.

64. Larkin, J. [et al.] Update of progression-free survival and correlative biomarker analysis from coBRIM: cobimetinib plus vemurafenib in advanced BRAFmutated melanoma / J. Larkin [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2015 ASCO Annual Meeting (May 29 – June 2, 2015). Vol 33, No 15\_suppl (May 20 Supplement), 2015. – P. 9006

65. Ascierto, P. coBRIM: A phase III, double-blind placebo-controlled study of vemurafenib vs vemurafenib + cobimetinib in previously untreated BRAF v600 mutationpositive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma / P. Ascierto [et al.] // Society for Melanoma Research 2015 Congress. – Presented 2015 Nov 18–21.

66. Robert, C. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib / C. Robert, B. Karaszewska, J. Schachter [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2015. – № 1 (372). – P. 30–39.

67. Keir, M. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M. Keir, M. Butte, G. Freeman, A. Sharpe // Annu. Rev. Immunol. – 2008. – № 26. – P. 677–704.

68. Postov, M. Initial report of overall survival rates from a randomized phase II trial evaluating the combination of nivolumab and ipilimumab in patients with advanced melanoma / M. Postov, J. Chesney, A. Pavlick [et al.] // 2016 AACR Annual Meeting. Abstract CT 002. – Presented April 17, 2016.

69. Middleton, M. R. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma /

M. R. Middleton, J. J. Grob, N. Aaronson [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – № 18. – P. 158–166.

70. Bedikian, A. Y. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The Oblimersen Melanoma Study Group / A. Y. Bedikian, M. Millward, Pehamberger [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – № 24. – P. 4738–4745.

71. Curtin, J. A. Distinct sets of genetic alterations in melanoma / J. A. Curtin, J. Fridland, T. Kageshita [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005 Nov. 17. – № 20 (353). – P. 2135–2147.

72. Ballantyne, A. D. Dabrafenib: first global approval / A. D. Ballantyne, K. P. Garnock-Jones // *Drugs.* – 2013. – № 73. – P. 1367–1376.

73. Wright, C. J. Trametinib: first global approval / C. J. Wright, P. L. McCormack // *Drugs.* – 2013. – № 73. – P. 1245–1254.

74. Long, G. V. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib / G. V. Long, J. S. Weber, J. R. Infante [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – № 8. – P. 871–878.

75. Sznol, M. Advances in treatment of metastatic melanoma: new immunomodulatory agents / M. Sznol // *Semin. Oncol.* – 2012. – № 39. – P. 192–203.

76. Robert, C. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma, (KEYNOTE-006) / C. Robert, J. Schachter, G. V., Long [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – № 26 (372). – P. 2521–2532.

77. Hodi, F. S. Durable, long-term survival in previously treated patients with advanced melanoma (MEL) who received nivolumab (NIVO) monotherapy in a phase I trial. [abstract] / F. S. Hodi, H. Kluger, M. Sznol [et al.]. // *Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (New Orleans, LA, 2016 Apr 16–20) // AACR. Cancer Res.* – Philadelphia (PA), 2016. – № 76 (14 Suppl.). – Abstract CT001.

78. Long, G. V. Effect of nivolumab on health-related quality of life in patients with treatment-naive advanced melanoma: results from the phase III CheckMate 066

study / G. V. Long, V. Atkinson, P. A. Ascierto [et al.]. – DOI 10.1093/annonc/mdw265 // *Ann. Onc.* Aug. – 2016.

79. Baab, G. H. Malignant melanoma. The patient with an known site of primary origin / G. H. Baab, C. M. Bride // *Arch. Surg.* – 1975. – Vol. 8 (110). – P. 896–900.

80. Рудык, А. Н. Результаты диагностики и лечения больных с метастазами плоскоклеточного рака в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага / А. Н. Рудык, С. В. Зинченко, Р. Ш. Хасанов [и др.] // *Сибирский онкологический журнал.* – 2010. – № 1. – P. 64–67.

81. Merabishvili, V. M. Malignant Melanoma-up-to-date tendencies (the morbidity, the mortality, the diagnostics) / V. M. Merabishvili // *Oncological issues.* – 2006. – № 3. – P. 275–287.

82. Зинченко, С. В. вопросу о классификации метастазов злокачественных опухолей без выявленного первичного очага / С. В. Зинченко, Р. Ш. Хасанов, А. Н. Рудык // *Казанский медицинский журнал.* – 2010. – № 2 (91). – P. 246–248.

83. Чиссов, В. И. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) / В. И. Чиссов, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. – М., 2013. – 289 с.

84. Анисимов, В. В. Оценка метода регионарного распространения опухолевого процесса у больных первичной меланомой кожи – Усовершенствованная медицинская технология / В. В. Анисимов, З. А. Раджабова, А. Г. Веснин, А. С. Барчук. – СПб., 2008.

85. Зинченко, С. В. Лечение больных с метастазами злокачественных опухолей без выявленного первичного очага / С. В. Зинченко, А. Н. Рудык, Р. Ш. Хасанов // *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* – 2009. – № 3 (20). – P. 3–12.

86. Вагнер, Р. И. Меланома кожи. Часть 2 / Р. И. Вагнер, В. В. Анисимов, А. С. Барчук – СПб. : Наука, 1996. – 280 с.

87. Grech, A. Metastatic malignant melanoma of unknown primary in temporalis muscle / A. Grech, N. Mercieca, J. Calleja-Agius, R. Abela. – DOI 10.1093/jscr/rjaa202. – PMID: 32665835. – PMCID: PMC7332289 // *J. Surg. Case Rep.* – 2020 Jul 2. – № 6. – P. rjaa202.

88. Cormier, J. N. Metastatic Melanoma to Lymph Nodes in Patients with Unknown Primary Sites / J. N. Cormier, Y., Xing L. Feng, [et al.] // *Cancer*. – 2006 May 1. – № 9 (106). – P. 2012–2020.

89. Марочко, А. Ю. Метастазы меланомы без выявленного первичного очага / А. Ю. Марочко, Н. Э. Косых, А. И., Брянцева [и др.] // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2009. – № 1. – P. 47–49.

90. Das Gupta, T. Malignant melanoma of unknown primary origin / T. Das Gupta, L. Bowden, J. W. Berg // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1963. – № 117. – P. 341–345.

91. Merabishvili, V. M. Malignant Melanoma-up-to-date tendencies (the morbidity, the mortality, the diagnostics) / V. M. Merabishvili // *Oncological issues*. – 2006. – № 3. – P. 275–287.

92. Ахметов, И. Р. Меланома кожи: тактика хирургического лечения в отношении регионарных лимфатических узлов / И. Р. Ахметов // *Siberian Journal of Oncology*. – 2006. – № 3. – P. 68–73.

93. Комаров, И. Г. Метастазы злокачественных опухолей без выявленного первичного очага / И. Г. Комаров, Д. В. Комов // *Онкология* / под ред. И. В. Поддубной. – М., 2009. – С. 750–757.

94. Крыловецкая, М. А. Диагностика и лечение метастазов меланомы без выявленного первичного очага / М. А. Крыловецкая, И. Г. Комаров, Д. А. Карселадзе // *Современная онкология*. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 30–34.

95. Гафур-Ахунов, М. А., Амирасланов А. Т., Паршиков С. М. [и др.] Метастазы меланомы в периферические лимфатические узлы без выявленного первичного очага. / М. А. Гафур-Ахунов, А. Т. Амирасланов, С. М. Паршиков [и др.] // *Вестник ВОИЦ АМН СССР*. – 1991. – № 3. – P. 24–27.

96. Savoia, P. Melanoma of unknown primary site: a 33-year experience at the turin melanoma centre / P. Savoia, P. Fava, S. Osella-Abate, [et al.] // *Melanoma Res.* – 2010. – № 20. – P. 227–232.

97. Samadder, N. J. Familial risk in patients with carcinoma of unknown primary / N. J. Samadder, K. R. Smith, H. Hanson [et al.]. – DOI 10.1001/jamaoncol.2015.4265 // *JAMA Oncol.* – 2016 Mar. – № 2 (3). – P. 340–346.

98. Рзаева, В. Ш. Метастазы меланомы без клинически определяемой первичной опухоли / В. Ш. Рзаева, Г. И. Гафтон, В. В. Анисимов [и др.]. – DOI 10.21294/18144861-2017-16-2-79-85 // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – № 3 (16). – P. 79–85.

99. Manola, J. Prognostic factors in metastatic / J. Manola, J. Ibrahim, M. Atkins, J. Kirkwood // J. Clin. Oncol. – 2000 Nov 15. – № 18 (22). – P. 3782–93.

100. Guarischi, A. Metastatic inguinal nodes from an unknown primary neoplasm. A review of 56 cases / A. Guarischi, T. J. Keane, T. Elhakim // Cancer (Philad.). – 1987. – № 3 (59). – P. 572–577.

101. Анисимов, В. В. Стандартное обследование пациентов с подозрением на меланому. Современная клиническая классификация / В. В. Анисимов // Практическая онкология. – 2001. – № 4. – P. 12–22.

102. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань, 2012. – 624 с.

103. Strojjan, P. Contemporary management of lymph node metastases from an unknown primary to the neck: I. A review of diagnostic approaches / P. Strojjan, A. Ferlito, J. E. Medina [et al.]. – DOI 10.1002/hed.21898 // Head Neck. – 2011 Jan. – № 1 (35). – P. 123–132.

104. Starritt, E. C. Ultrasound Examination of Sentinel Nodes in the Initial Assessment of Patients With Primary Cutaneous Melanoma. / E. C. Starritt, R. F. Uren, R. A. Scolyer [et al.]. – DOI 10.1245/ASO.2005.03.019 // Ann. Surg. Oncol. – 2005. – № 1 (12). – P. 18–23.

105. Velez, A. Karakousis. Treatment of Unknown Primary Melanoma / A. Velez, D. Walsh, P. Constantine // Cancer. – 1991 Dec 15. – № 12 (68). – P. 2579–2581.

106. Новик, А. В. Диагностика и лечение опухолей неизвестной первичной локализации / А. В. Новик, В. М. Моисеенко // Вопросы онкологии. – 2004. – № 3. – P. 271–278.

107. Вишневецкая, Я. В. Современная гистологическая, иммуногистохимическая и молекулярногенетическая диагностика меланомы кожи



/ Я. В. Вишневецкая, А. М. Строганова, А. И. Сендерович [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – № 4. – P. 74–75.

108. Bollag, G. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer / G. Bollag, J. Tsai, J. Zhang, [et al.]. – DOI 10.1038/nrd3847 // Nat. Rev. Drug Discov. – 2012. – № 11 (11). – P. 873–886.

109. Ballantyne, A. D. Dabrafenib: first global approval / A. D. Ballantyne, K. P. Garnock-Jones. – DOI 10.1007/s40265-013-0095-2 // Drugs. – 2013. – № 12 (73). – P. 1367–1376.

110. Wright, C. J. Trametinib: first global approval / C. J. Wright, P. L. McCormack. – DOI 10.1007/s40265-013-0096-1 // Drugs. – 2013. – № 11 (73). – P. 1245–1254.

111. Blank, C. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8<sup>+</sup> T cells / C. Blank, I. Brown, A. C. Peterson [et al.] // Cancer Res. – 2004. – № 3 (64). – P. 1140–1145.

112. Okazaki, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application / T. Okazaki, T. Honjo // Int. Immunol. – 2007. – № 7 (19). – P. 813–824.

113. Абрамов, М. Е. Современные достижения в лекарственной терапии диссеминированной меланомы кожи / М. Е. Абрамов // Фарматека. – 2015. – № 18 (311).

114. Postow, M. A. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy / M. A. Postow, M. K. Callahan, J. D. Wolchok. – DOI 10.1200/JCO.2014.59.4358 // J. Clin. Oncol. – 2015. – № 17 (33). – P. 191–199.

115. Chin, L. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era / L. Chin, L. A. Garraway, D. E. Fisher // US Genes Dev. – 2006. – Vol. 16 (20). – P. 2149–2148.

116. Kamposioras, K. Malignant melanoma of unknown primary site. To make the long story short. A systematic review of the literature / K. Kamposioras, G., Pentheroudakis D. Pectasides, N. Pavlidis – DOI 10.1016/j.critrevonc.2010.04.007 // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2011. – № 2 (78). – P. 112–126.

117. Balch, C. M. A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage 11) / C. M. Balch, S. J. Soong, T. M. Murad [et al.] // *Ann. Surg.* – 1981. – № 193. – P. 377–388.

118. Тупицын, Н. Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников / Н. Н. Тупицын // *Онкогинекология.* – 2013. – № 1. – P. 12–18.

119. Palmieri, G. Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction / G. Palmieri, P. Ascierto, F. Perrone [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 767–773.

120. Eskelin, S. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment / S. Eskelin, S. Pyrhonen, P. Summanen [et al.] // *Ophthalmology.* – 2000. – Vol. 107, № 8. – P. 1443–1449.

121. Coupland, S. E. Metastatic choroidal melanoma to the contralateral orbit 40 years after enucleation / S. E. Coupland, S. Sidiki, B. J. Clark [et al.] // *Arch. Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 114, № 6. – P. 751–756.

122. Damsky, W. mTORC1 activation blocks BrafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation / W. Damsky, G. Micevic, K. Meeth [et al.] // *Cancer Cell.* – 2015. – Vol. 27, № 1. – P. 41–56.

123. Nguyen, D. X. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization / D. X. Nguyen, P. D. Bos, J. Massagué // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 4 (9). – P. 274–284.

124. Guise, T. Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment / T. Guise // *Semin. Oncol.* – 2010. – Vol. 37, Suppl. 2. – P. S2–14.

125. Aguirre-Ghiso, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy / J. A. Aguirre-Ghiso // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7, № 11. – P. 834–846.

126. Sosa, M. S. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field / M. S. Sosa, P. Bragado, J. A. Aguirre-Ghiso // *Nat. Rev. Cancer.* – 2014. – Vol. 14, № 9. – P. 611–622.

127. Козловская, С. П. Современное состояние проблемы лечения пациенток с микрометастазами в костном мозге / С. П. Козловская, Н. Н. Антоненкова, Э. А. Жаврид // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2016. – № 1 (12). – С. 12–18.

128. Wick, M. R. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors / M. R. Wick, P. E. Swanson, A. Rocamora // J. Cutan. Pathol. – 1988. – Vol. 15, № 4. – P. 201–207.

129. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg. – DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013 // Cell. – 2011. – V. 144, No. 5. – P. 646–674.

130. Schatton, T. Cancer stem cells and human malignant melanoma / T. Schatton, M. H. Frank. – DOI 10.1111/j.1755-148X.2007.00427.x // Pigment Cell Melanoma Res. – 2008. – Vol. 21, No. 1. – P. 39–55.

131. Wang, Z. Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche / Z. Wang, G. Ouyang. – DOI 10.1016/j.stem.2012.01.002. // Cells Stem Cells. – 2012. – Vol. 10, No. 2. – P. 111–112.

132. Braun, S. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer / S. Braun, F. D. Vogl, B. Naume [et al.]. – DOI: 10.1056/NEJMoa050434 // N. Engl. J. Med – 2005. – № 353. – P. 793–802.

133. Alix-Panabieres, C. Current status in human breast cancer micrometastasis / C. Alix-Panabieres, V. Muller, K. Pantel. – DOI: 10.1097/CCO.0b013e3282f0ad79 // Curr. Opin. Oncol. – 2007. – № 6. – P. 558–563.

134. Тупицын, Н. Н. Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоэз, иммунная система / Н. Н. Тупицын // Иммунология гемопоэза. – 2018. – № 2 (16). – P. 10–54.

135. Тупицын, Н. Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников / Н. Н. Тупицын // Онкогинекология – 2013. – № 1. – P. 12–18.

136. Бесова, Н. С. Прогностическое значение наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка до начала противоопухолевой терапии / Н. С. Бесова, Е. С. Обаревич, М. М. Давыдов [и др.] // Фарматека. – 2017. – № 17 (350). – Р. 62–66.

137. Рябчиков, Д. А. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы / Д. А. Рябчиков, О. А. Безнос, И. А. Дудина [и др.]. – DOI 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57 // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – № 1 (17). – Р. 53–57.

138. Lilleby, W. Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients / W. Lilleby, A. Stensvold, I. G. Mills, J. M. Nesland // *Int. J. Cancer*. – 2013. – Vol. 133, № 1. – Р. 149–155.

139. Flatmark, K. Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer / K. Flatmark, E. Borgen, J. M. Nesland [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2011. – Vol. 104, № 9. – Р. 1434–1439.

140. Чулкова, С. В. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого / С. В. Чулкова, Н. Н. Тупицын, Т. М. Джуманазаров [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 29–37.

141. Janni, W. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis / W. Janni, F. D. Vogl, G. Wiedswang [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2011. – Vol. 17, № 9. – Р. 2967–2976.

142. Франк, Г. А. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF / Г. А. Франк [и др.] // *Архив патологии*. – 2014. – Т. 3. – С. 65–73.

143. Löffler, H. Molecular driver alterations and their clinical relevance in cancer of unknown primary site / H. Löffler, N. Pfarr, M. Kriegsmann [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget10035 // *Oncotarget*. – 2016 Jul 12. – № 7 (28). – Р. 44322–44329.