

# Иммунологическая детекция и клиническое значение поражения костного мозга при меланоме кожи

М.А. Крыловецкая<sup>✉1</sup>, С.В. Чулкова<sup>1,2</sup>, И.Г. Маркина<sup>1</sup>, О.А. Чернышева<sup>1</sup>, И.Г. Комаров<sup>1</sup>, О.П. Колбацкая<sup>1</sup>, Н.А. Купрышина<sup>1</sup>, А.В. Логачев<sup>1</sup>, И.Н. Михайлова<sup>1</sup>, Л.В. Демидов<sup>1</sup>, Н.Н. Тупицын<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

## Аннотация

**Обоснование.** Меланома кожи характеризуется быстрым прогрессированием и ранним метастазированием. Показано, что при различных видах злокачественных опухолей важное прогностическое значение имеют диссеминированные опухолевые клетки, которые часто обнаруживаются в костном мозге (КМ). Изучение диссеминированных опухолевых клеток при меланоме на современном этапе может являться одним из возможных дополнительных источников информации о характере болезни и потенциальных точках приложения для лекарственной терапии.

**Цель.** Изучить частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в КМ при меланоме в зависимости от клинических и морфологических характеристик опухоли.

**Материалы и методы.** В исследование включены 67 больных с верифицированным диагнозом меланомы, находившихся на обследовании и получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с 2014 по 2019 г. Больные мужского пола составили 50,7% (n=34), больные женского пола – 49,3% (n=33). Средний возраст больных – 50,1±1,5 года. Всем пациентам выполнены морфологическое и иммунологическое исследования КМ. Морфологическое исследование КМ выполнено двумя независимыми врачами-морфологами. Диссеминированные опухолевые клетки оценивались методом проточной цитометрии среди всех ядродержащих клеток (Syto41+) на основании экспрессии антигена HMB-45 и отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 (FACS Canto II, США, программа Kaluza Analysis v2.1). Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v.21.

**Результаты.** Морфологически метастатическое поражение КМ не обнаружено ни в одном случае. Методом проточной цитометрии в КМ больных меланомой диссеминированные опухолевые клетки (CD45-HMB-45+) выявлены в 62,7% (n=42) случаев. Частота поражения КМ при ранних стадиях не ниже, чем при распространенных (p=0,029). При I и II стадиях процент выявления диссеминированных опухолевых клеток составляет 60,0% (6/10) и 84,6% (11/13) соответственно, при III и IV стадиях – 44,4% (8/18) и 65,4% (17/26). В молодом возрасте частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в КМ оказалась выше (p=0,02). Не выявлено связи частоты поражения КМ в зависимости от BRAF-статуса.

**Заключение.** Установлена связь диссеминированных опухолевых клеток с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Меланома характеризуется частым поражением костного мозга, даже на ранних стадиях.

**Ключевые слова:** диссеминированные опухолевые клетки, меланома, костный мозг, проточная цитометрия, морфологическое исследование

**Для цитирования:** Крыловецкая М.А., Чулкова С.В., Маркина И.Г., Чернышева О.А., Комаров И.Г., Колбацкая О.П., Купрышина Н.А., Логачев А.В., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Тупицын Н.Н. Иммунологическая детекция и клиническое значение поражения костного мозга при меланоме кожи. Современная Онкология. 2023;25(1):28–34. DOI: 10.26442/18151434.2023.1.202090

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2023 г.

## Информация об авторах / Information about the authors

<sup>✉</sup>Крыловецкая Мария Александровна – врач-эндоскопист эндоскопического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: mariyakrilo@gmail.com; ORCID: 0000-0002-0868-3948

Чулкова Светлана Васильевна – канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», доц. каф. онкологии и лучевой терапии ФГАУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова». E-mail: chulkova@mail.ru; ORCID: 0000-0003-4412-5019

Маркина Ирина Геннадиевна – канд. мед. наук, науч. сотр. хирургического отделения биотерапии опухолей №10 Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: irina160771@yandex.ru

Чернышева Ольга Алексеевна – канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Комаров Игорь Геннадьевич – д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: komaroving@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3495-5521

Колбацкая Ольга Павловна – канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: helgaopk69@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8493-9012

Купрышина Наталья Александровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: natalya-2511@yandex.ru

Логачев Андрей Владимирович – врач дневного стационара ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: Andr1979l@yandex.ru

<sup>✉</sup>Maria A. Krylovetskaya – Endoscopist, Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: mariyakrilo@gmail.com; ORCID: 0000-0002-0868-3948

Svetlana V. Chulkova – Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University. E-mail: chulkova@mail.ru; ORCID: 0000-0003-4412-5019

Irina G. Markina – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: irina160771@yandex.ru

Olga A. Chernysheva – Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Igor G. Komarov – D. Sci. (Med.), Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: komaroving@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3495-5521

Olga P. Kolbatskaya – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: helgaopk69@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8493-9012

Natalya A. Kupryshina – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: natalya-2511@yandex.ru

Andrey V. Logachev – Daily Hospital Doctor, Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: Andr1979l@yandex.ru

# Immunological detection of bone marrow lesions in skin melanoma and its clinical significance: Observational study

Maria A. Krylovetskaya<sup>✉1</sup>, Svetlana V. Chulkova<sup>1,2</sup>, Irina G. Markina<sup>1</sup>, Olga A. Chernysheva<sup>1</sup>, Igor G. Komarov<sup>1</sup>, Olga P. Kolbatskaya<sup>1</sup>, Natalya A. Kupryshina<sup>1</sup>, Andrey V. Logachev<sup>1</sup>, Irina N. Mikhaylova<sup>1</sup>, Lev V. Demidov<sup>1</sup>, Nikolai T. Tupitsyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

## Abstract

**Background.** Melanoma of the skin is characterized by a rapid progression and early metastasis. It has been shown the disseminated tumor cells, which are often found in the bone marrow, has an important prognostic value. The study of disseminated tumor cells in melanoma might be one of the possible additional sources of information about the nature of the disease and potential application points for drug therapy.

**Aim.** To study the frequency of detection of disseminated tumor cells in the bone marrow in melanoma, depending on the clinical and morphological characteristics of the tumor.

**Materials and methods.** The study included 67 patients with a verified diagnosis of melanoma who were examined and treated at the Blokhin National Medical Research Center of Oncology from 2014 to 2019 years. Male patients accounted for 50.7% (n=34), female patients 49.3% (n=33). The average age of patients: 50.1±1.6 years. Immunological and morphological examination of the bone marrow were performed. Morphological examination was performed by two independent morphologists. Disseminated tumor cells were evaluated by flow cytometry among all nucleated cells (Syto41+) based on the expression of the HMB-45 antigen and the absence of expression of the CD45 panleukocyte antigen (FACS Canto II, USA, Kaluza Analysis v2.1). Statistical data processing was performed using the IBM-SPSS Statistics v.21

**Results.** Morphologically bone marrow damage was not detected in any case. Disseminated tumor cells (CD45-HMB-45+) in the bone marrow of melanoma patients were detected in 62.7% (n=42) of cases by flow cytometry. The frequency of bone marrow damage in the early stages is not lower than in advanced ones (p=0.029). This is clearly seen in the enlarged analysis. The percentage of DTC detection. At stages I and II was 60.0% (6/10) and 84.6% (11/13), respectively, at stages III and IV – 44.4% (8/18) and 65.4% (17/26). In addition, the frequency of detection of disseminated tumor cells in the bone marrow was higher in young patients (p=0.02). There was no correlation between the frequency of bone marrow damage depending on BRAF status.

**Conclusion.** The connection of disseminated tumor cells with the clinical and morphological characteristics of the melanoma has been established. Melanoma is characterized by frequent bone marrow damage, even in the early stages, in young patients.

**Keywords:** disseminated tumor cells, melanoma, bone marrow, flow cytometry, morphology

**For citation:** Krylovetskaya MA, Chulkova SV, Markina IG, Chernysheva OA, Komarov IG, Kolbatskaya OP, Kupryshina NA, Logachev AV, Mikhaylova IN, Demidov LV, Tupitsyn NT. Immunological detection of bone marrow lesions in skin melanoma and its clinical significance: Observational study. *Journal of Modern Oncology*. 2023;25(1):28–34. DOI: 10.26442/18151434.2023.1.202090

## Введение

Меланома – одна из злокачественных опухолей, рефрактерная к традиционной химиотерапии, обладающая высоким потенциалом местного роста, регионарного метастазирования, способностью к диссеминации по коже, множественному метастазированию [1]. Данная патология составляет 1–4% всех онкологических заболеваний. Рост заболеваемости меланомой кожи отмечен многими российскими и зарубежными исследователями – такая тенденция наблюдается повсеместно в мире [2].

Меланома кожи отличается чрезвычайным разнообразием клинической картины. Часто заболевание характеризуется быстрым прогрессированием, реже – относительно благоприятным течением с продолжительным интервалом от момента возникновения первичной опухоли до клинической манифестации метастазов [3–5].

Наиболее важным прогностическим фактором является распространенность болезни. Практически все исследователи отмечают резкое снижение уровня выживаемости при развитии метастазов у больных с 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-диссеминированная опухоль. Лимфогенный путь – главный при метастатическом прогрессировании меланомы кожи. У каждого 3-го больного, впервые обратившегося к врачу, уже имеются клинические признаки метастатического поражения регионарных лимфатических узлов [6–9].

Несмотря на то что визуальная локализация меланомы делает ее легкодоступной для диагностики, часто опухоль выявляют на распространенных стадиях. Следует отметить, что одним из перспективных направлений в настоящее вре-

## Информация об авторах / Information about the authors

**Михайлова Ирина Николаевна** – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния хирургических методов лечения №12 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: irmikhaylova@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7659-6045

**Демидов Лев Вадимович** – д-р мед. наук, проф., рук. отд-ния хирургических методов лечения №12 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: demidov.lev@gmail.com

**Тупицын Николай Николаевич** – д-р мед. наук, проф., рук. лаб. иммунологии гемопоза Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

**Irina N. Mikhaylova** – D. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: irmikhaylova@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7659-6045

**Lev V. Demidov** – D. Sci. (Med.), Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: demidov.lev@gmail.com

**Nikolai N. Tupitsyn** – D. Sci. (Med.), Prof., Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

мя является диагностика гематогенного микрометастазирования в костный мозг – КМ (диссеминированных опухолевых клеток – ДОК), что позволяет иметь более точное представление о распространенности опухолевого процесса и, следовательно, придерживаться необходимой лечебной тактики [10, 11]. ДОК могут являться единственным проявлением болезни, они считаются предвестниками метастазирования, оставаясь в течение длительного периода в покоем состоянии [12]. ДОК обнаруживаются в КМ при многих злокачественных опухолях [13–18].

Выявлен ряд особенностей, характеризующих ДОК как отдельную популяцию клеток, экспрессирующих разнообразные маркеры, отличающихся от первичной опухоли и обладающих эпигенетическими и генетическими преимуществами [19–21]. Установлено, что ДОК, колонизирующие КМ, приобретают новые биологические свойства и имеют больший метастатический потенциал. Интересно, что ДОК по своим характеристикам схожи со стволовыми опухолевыми клетками: могут экспрессировать стволовыхклеточные антигены, обладают пластичностью, способны к самоподдержанию и обратимому состоянию покоя, а также проявляют устойчивость к химиолучевому лечению [22–24].

Следует отметить, что КМ имеет хорошее кровоснабжение, а также развитую сеть мелких фенестрированных кровеносных сосудов-синусоидов. Это создает повышенную проницаемость и оптимальные условия для экстравазации опухолевых клеток в КМ в отличие от других органов [25].

Информативность исследования КМ при различных опухолях негемопоэтической природы доказана неоднократно. В многочисленных клинических исследованиях выявлена достоверная корреляция между наличием ДОК в КМ и ухудшением выживаемости больных при раке молочной железы [26], предстательной железы [16], легкого [27], толстой кишки [17], а также при злокачественных новообразованиях других локализаций. В свою очередь проблема микрометастазирования в КМ при меланоме требует дальнейшего анализа.

Основной целью данного исследования является изучение частоты обнаружения ДОК в КМ при меланоме кожи в зависимости от клинических и морфологических характеристик опухоли.

## Материалы и методы

В настоящее исследование включены 67 больных с верифицированным диагнозом меланомы: мужчин – 50,7% (n=34), женщин – 49,3% (n=33). Больные находились на обследовании и получили лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в 2018, 2019 г. Средний возраст больных составил 50,1±1,5 года. В возрасте от 20–39 лет наблюдались 14 (20,4%) больных, в возрасте 40–59 лет – 34 (50,1%) больных и в интервале 60–79 лет – 20 (29,4%) больных (рис. 1).

Первичный очаг у 7 (10,2%) был локализован в области головы и шеи, у 9 (13,4%) – в области верхних конечностей, у 20 (29,9%) больных первичная опухоль локализовалась в области нижних конечностей и в 31 (46,3%) случае – в области туловища.

До визита в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» 61 больному с меланомой кожи проводилось лечение в разном объеме. В соответствии с распространенностью опухолевого процесса 51 больному выполнено хирургическое вмешательство в объеме иссечения первичного очага. Операция в комбинации с иммунотерапией проведена 9 больным.

По данным первичной документации, 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 3 случаях отсутствовали данные о характеристике 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. Стадия N1 установлена у 5 (7,5%) больных. В равном

Рис. 1. Распределение больных с меланомой в зависимости от возраста.  
Fig. 1. Distribution of patients with melanoma by age.

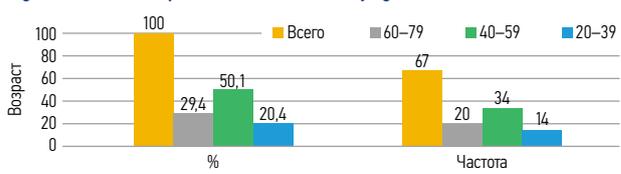


Рис. 2. Частота выявления ДОК в КМ больных с меланомой.  
Fig. 2. The detection rate of disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow of patients with melanoma.



числе случаев установлены стадии N2 и N3: 3 (4,5%). Nx – 3,0%. Метастатическое поражение отдаленных органов (M1) выявлено в 2 (2,9%) случаях.

Однако следует отметить, что часть больных с ранними стадиями поступили на лечение в наше учреждение, уже имея прогрессирование, поэтому мы сочли целесообразным провести стадирование согласно распространенности опухолевого процесса на момент пункции КМ. Информация по данному больным представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, большинство больных на момент исследования КМ имели распространенные стадии болезни. Данный факт подчеркивает необходимость исследования КМ у больных с меланомой. Таким образом, на момент пункции КМ представлены следующие стадии: IA – 7,4%, IB – 7,4%, IIA-C – 19,4%, IIIA-C – 27,0%, IV – 38,8%.

В лаборатории иммунологии гемопоэза клинико-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» всем больным выполнены морфологическое и иммунологическое исследования КМ. КМ для исследования получен при пункции задней верхней ости подвздошной кости (spina iliaca posterior superior). Морфологическое исследование (миелограмма) выполнялось на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток осуществлялись параллельно двумя независимыми экспертами-морфологами.

Иммунологическое исследование проводилось методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, напрямую меченных различными флуорохромами. Используемые в работе моноклональные антитела представлены в табл. 2.

Нативный КМ отмывали буферным раствором PBS Cell Wash (BD), осаждали. Клеточный осадок ресуспензировали, добавляли лизирующий раствор FACS Lysing Solution (BD) на 5 мин. Затем суспензию клеток отмывали, переносили в пробирки и инкубировали с моноклональными антителами 20 мин при комнатной температуре. После инкубации отмывали дважды раствором PBS. Сбор клеток проводили на 8-цветном проточном цитометре FACSCanto II (США). Оценка экспрессии антигенов выполнялась с помощью программы Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, США). ДОК выявлялись по отсутствию экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией HMB-45 (антиген клеток меланомы gp100) среди всех ядродержащих клеток (Syto41+). Анализировали 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца), при этом положительными считались случаи при обнаружении не менее 1 клетки на 10 млн миелокариоцитов. Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v.21. Осуществляли анализ корреляций по Пирсону или Спирмену, под-

**Таблица 1. Распространенность опухолевого процесса на момент исследования КМ у больных с меланомой**  
**Table 1. The prevalence of the tumor at the time of bone marrow examination in patients with melanoma**

Пациент №	Исходная стадия	Дата исследования КМ	Стадия на момент исследования	Локализация метастазов
1	2	02.10.2018	4	**
2	1	03.06.2019	1B	*
3	3	01.04.2019	3C	*
4	1	01.03.2019	3B	*
5	2	23.04.2019	2B	
6	н/д	25.09.2019	4	**
7	2	26.02.2019	4	**
8	2	28.01.2019	2A	
9	3	05.12.2018	3C	*
10	2	20.02.2019	4	**
11	2	30.01.2019	3C	*
12	1	17.12.2018	1A	
13	1	25.06.2019	4	**
14	2	06.05.2019	4	**
15	2	09.04.2019	2C	
16	3	07.02.2019	3C	*
17	2	18.07.2018	4	**
18	1	08.09.2019	4	**
19	3	22.01.2019	3C	*
20	2	12.12.2018	3C	*
21	3	06.12.2018	3C	*
22	1	17.01.2019	1B	
23	2	18.03.2019	4	*
24	2	12.02.2019	2B	
25	4	05.03.2019	4	**
26	2	04.03.2019	2A	
27	1	13.05.2019	1B	
28	1	19.07.2018	1A	
29	3	28.02.2019	4	*
30	2	16.07.2018	3C	*
31	2	19.12.2018	4	**
32	1	19.02.2019	4	**
33	1	16.07.2018	4	**
34	1	21.03.2019	1A	
35	4	26.02.2019	4	**
36	н/д	08.10.2018	4	**
37	3	20.09.2018	4	**
38	1	10.04.2019	1A	**
39	2	09.10.2018	2C	
40	1	06.12.2018	1B	
41	3	21.05.2019	3C	***
42	1	29.04.2019	3B	*
43	2	18.02.2019	2C	
44	2	10.12.2018	4	***
45	2	04.12.2018	4	**
46	1	10.04.2019	3B	*
47	2	27.05.2019	4	**

**Таблица 1. Распространенность опухолевого процесса на момент исследования КМ у больных с меланомой. Окончание**  
**Table 1. The prevalence of the tumor at the time of bone marrow examination in patients with melanoma. The ending**

Пациент №	Исходная стадия	Дата исследования КМ	Стадия на момент исследования	Локализация метастазов
48	2	04.12.2018	2B	
49	2	11.03.2019	4	**
50	2	11.02.2019	4	**
51	2	02.07.2019	2B	
52	2	18.12.2018	2A	
53	н/д	14.01.2020	4	*
54	1	15.10.2018	3B	*
55	2	11.10.2018	3C	*
56	2	19.06.2019	4	**
57	2	02.10.2018	2C	
58	2	29.07.2019	3C	*
59	2	04.10.2018	3C	*
59	2	04.10.2018	3C	*
60	1	16.04.2019	1B	
61	3	03.04.2019	3C	*
62	3	19.03.2019	3A	
63	1	16.04.2019	1A	
64	2	24.12.2018	4	**
65	2	21.01.2019	4	**
66	2	20.05.2019	2A	
67	2	26.06.2019	2A	

\*Лимфогенные метастазы, \*\*гематогенные метастазы (головной мозг, печень, кости), \*\*\*метастазы в мягкие ткани.

**Таблица 2. Использованные в работе моноклональные антитела**  
**Table 2. Monoclonal antibodies**

Антитело	Флуоресцентная метка	Производитель
CD45	V500-A, V450, PerCP	Becton Dickinson, США
HMB-45	APC-A	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Tx, USA
Syto41	APCH7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

счет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и  $\chi^2$  по Пирсону). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты**

Первым этапом выполнялось морфологическое исследование КМ. При микроскопии препаратов КМ метастатическое поражение не обнаружено ни в одном случае. Следующим этапом проводилось иммунофенотипирование КМ с использованием проточной цитометрии. На основании экспрессии HMB-45 и отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в КМ больных с меланомой ДОК выявлены в 62,7% (n=42) случаев. Результаты приведены на рис. 2.

Пример выявления ДОК приведен на рис. 3. На цитограмме А по оси Y представлен маркер HMB-45, по оси абсцисс – экспрессия панлейкоцитарного антигена CD45. Клетки с фенотипом HMB-45+ CD45- определяются в гейте В. На цитограмме Б по оси Y представлен параметр бокового светорассеяния SSC, по оси абсцисс – экспрессия панлейкоцитарного антигена CD45. ДОК меланомы отличаются высокими характеристиками бокового светорассеяния, не экспрессируют антиген CD45.

Связи частоты поражения КМ с полом не выявлено. Установлено, что частота ДОК-положительных случаев выше в груп-

пе пациентов молодого возраста (20–39 лет): 92,9% (n=13;  $p=0,02$ ), что представлено в табл. 3.

Изучение поражения КМ в зависимости от локализации ДОК первичного очага показало, что частота выявления ДОК выше, если опухоли находятся в области верхних конечностей или в области туловища: 100 и 77,8% соответственно ( $p=0,024$ ); рис. 4. Результаты анализа представляются любопытными, и стоит обратить на них внимание. Возможно, дальнейшее исследование по мере накопления материала позволит расширить представления об особенностях метастазирования изучаемой опухоли.

Как мы указали выше, на момент пункции КМ у части больных установлено прогрессирование меланомы. Важным являлось изучить частоту поражения КМ в зависимости от стадии опухолевого процесса, учитывая эти данные. Результаты анализа представлены в табл. 4. Как видно из нее, ДОК в КМ выявлялись на всех стадиях меланомы. Обращает внимание, что частота поражения КМ при ранних стадиях не ниже, чем при распространенных ( $p=0,029$ ). Это хорошо видно при укрупненном анализе, что представлено на рис. 5.

Представленные данные демонстрируют, что при I и II стадиях процент выявления ДОК составляет 60,0% (6/10) и 84,6% (11/13) соответственно, при III и IV стадиях – 44,4% (8/18) и 65,4% (17/26). Вместе с тем статистически значимого различия не достигнуто. Тем не менее на это стоит обратить внимание, поскольку частота поражения КМ при стадиях 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 [28, 29]. Они способны к стимулированию роста и метастазирования опухолей, тогда как большинство опухолевых клеток имеют ограниченный пролиферативный потенциал [30].

Поскольку у части больных на момент пункции КМ установлено прогрессирование меланомы, то факт поражения КМ 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 КМ на момент первичной постановки диагноза у этих больных. Во-вторых, хорошо известен факт персистенции ДОК в КМ на ранних стадиях, что показано при целом ряде злокачественных опухолей [10–18]. Также известно, что они имеют биологические характеристики, отличающие их от первичной опухоли, могут поступать в циркуляторное русло и метастатически поражать отдаленные органы [12, 26].

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* выявлены в 64% первичных опухолей [31]. При этом с наибольшей распространенностью мутации *BRAF* отмечены среди пациентов молодого и среднего возраста [31].

В 49 случаях мы располагали данными *BRAF*-статуса пациентов. Мы решили сравнить частоту выявления ДОК у таких больных. Анализ частоты выявления ДОК в КМ в зависимости от *BRAF*-статуса не установил значимых различий. При отсутствии или наличии мутаций целевого гена процент позитивных случаев ДОК оказался в равной степени высоким (табл. 5). Однако следует отметить, что позитивные случаи *BRAF* характеризовались более высокой частотой поражения КМ (78,6% против 61,9%). Последнее подчеркивает высокий метастатический потенциал меланомы кожи *BRAF*+

Резюмируя результаты проведенного анализа взаимосвязи ДОК-статуса с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, следует обратить внимание, что поражение КМ при меланоме выявляется в 62,7% случаев, при этом даже у больных с локализованным опухолевым процессом.

Рис. 3. Детекция ДОК в КМ больных с меланомой кожи методом проточной цитометрии.  
Fig. 3. Detection of DTC in the bone marrow of patients with skin melanoma using flow cytometry.

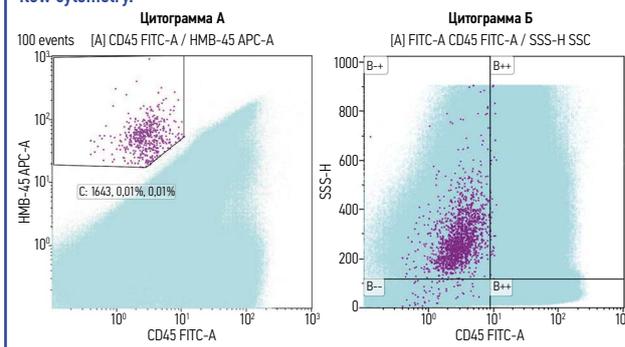
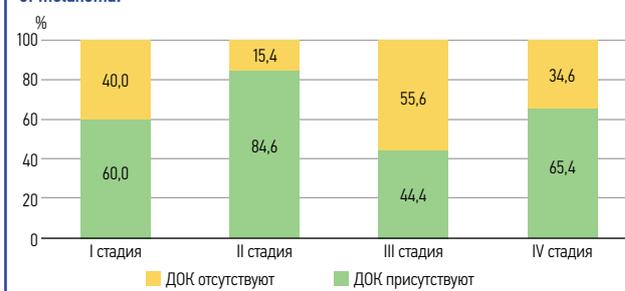


Рис. 4. Частота выявления ДОК в КМ в зависимости от локализации первичного очага.  
Fig. 4. The detection rate of DTC in the bone marrow depending on the primary tumor site.



Примечание. Т – туловище, НК – нижние конечности, ВК – верхние конечности, ГШ – голова/шея.

Рис. 5. Частота поражения КМ при ранних и распространенных стадиях меланомы.  
Fig. 5. Bone marrow involvement rate in the early and advanced stages of melanoma.



Результаты изучения частоты поражения КМ при других видах злокачественных опухолей демонстрируют, что метастазы в КМ – событие частое, и ранние стадии не являются исключением. Это показано при раке молочной железы, раке легкого, раке предстательной железы, раке желудка, раке яичников [10–18].

Интересным является факт взаимосвязи частоты поражения КМ и локализации первичного очага, установленный в данном исследовании. Необходимо отметить, что в молодом возрасте при малых размерах опухоли гематогенная диссеминация также отмечена. Последнее может отражать агрессивность опухоли именно на начальных этапах ее развития. Полагаем, что дальнейшее накопление материала позволит в большей когорте больных более детально изучить связь между интересующими признаками. Не менее важно подчеркнуть, что некоторые больные, у которых в КМ обнаружены ДОК, ранее получали лекарственное лечение. На наш взгляд, этот факт дополнительно свидетельствует, что опухолевые клетки, персистирующие в КМ, отличаются своими биологическими свойствами, проявляя устойчивость к лекарственной терапии. Таким образом, встает вопрос о дальнейших исследованиях, направленных на поиск возможно-

**Таблица 3. Частота выявления ДОК в КМ в зависимости от возраста**  
Table 3. The detection rate of DTC in the bone marrow depending on age

Возраст, лет		ДОК		Всего
		отсутствуют	присутствуют	
20–39	Абс.	1	13	15
	%	7,1	92,9	100,0
40–59	Абс.	15	18	31
	%	45,5	54,5	100,0
60–79	Абс.	9	11	21
	%	45,0	55,0	100,0
Всего	Абс.	25	42	67
	%	37,3	62,7	100,0

**Таблица 4. Частота выявления ДОК в КМ в зависимости от стадии меланомы**  
Table 4. The detection rate of DTC in the bone marrow depending on the melanoma stage

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

сти эрадикации этих клеток. Это представляет собой особую и чрезвычайно сложную область не только иммунологических, но и молекулярно-генетических исследований.

Таким образом, определение ДОК в КМ при меланоме имеет важное значение, и данный метод, возможно, следует рассмотреть как дополнительный инструмент для уточнения распространенности опухолевого процесса, что в конечном итоге может влиять на лечебную тактику.

**Таблица 5. Частота выявления ДОК в КМ в зависимости от статуса BRAF**  
Table 5. The detection rate of DTC in the bone marrow depending on the BRAF status

Статус BRAF		ДОК	Всего
Нет мутации	Абс.	13	21
	%	61,9	100,0
Есть мутация	Абс.	22	28
	%	78,6	100,0
$p=0,203$		Абс.	35
		%	71,4

## Заключение

В данной работе проанализированы частота ДОК у больных с меланомой кожи, взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Методом проточной цитометрии в КМ больных с меланомой ДОК выявлены в 62,7% случаев. Установлено, что поражение КМ наблюдается в том числе на начальных стадиях меланомы, при небольших размерах опухоли. Кроме того, в молодом возрасте частота обнаружения ДОК в КМ оказалась выше. Изложенные факты представляются интересными и требуют дальнейшего изучения с целью оценки прогностической значимости ДОК при меланоме и совершенствования подходов лекарственной терапии.

**Раскрытие интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Disclosure of interest.** The authors declare that they have no competing interests.

**Вклад авторов.** Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. М.А. Крыловская – написание текста рукописи, перевод, оформление рукописи; С.В. Чулкова – получение и анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи; О.П. Колбацкая, Н.А. Купрышина, О.А. Чернышева – получение данных; И.Г. Маркина, И.Н. Михайлова, А.В. Логачев – получение и анализ данных; И.Г. Комаров, Л.В. Демидов, Н.Н. Тупицын – дизайн исследования, анализ данных, анализ рукописи.

**Authors' contribution.** The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. MA Krylovetskaya – manuscript writing, translation, manuscript design; SV Chulkova – data acquisition and analysis, manuscript writing, manuscript design; OP Kolbatskaya, NA Kupryshina, OA Chernysheva – data acquisition; IG Markina, IN Mikhaylova, AV Logachev – data acquisition and analysis; IG – Komarov, LV – Demidov, NN – Tupitsyn – study design, data analysis, manuscript review.

**Источник финансирования.** Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

**Funding source.** The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

**Информированное согласие на публикацию.** Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

**Consent for publication.** Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Блинов Н.Н., Константинова М.М. Меланома кожи. Факторы риска и прогноза. *Oncotrends*. 2004;4:2-4 [Blinov NN, Konstantinova MM. Melanoma kozhi. Faktory riska i prognoza. *Oncotrends*. 2004;4:2-4 (in Russian)].
- Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). Под ред. О.В. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России, 2019 [Zlokachestvennyie novoobrazovaniia v Rossii v 2019 godu (zabolevaiemost' i smertnost'). Pod red. OV Kaprina, VV Starinskogo, GV Petrovoi. Moscow: MNIIOI im. PA Gertsena – filial FGBU NMIRTS Minzdrava Rossii, 2019 (in Russian)].
- Анисимов В.В. Содержание понятия «местный рецидив» после хирургического лечения злокачественной меланомы кожи. *Вопросы онкологии*. 1985;31(1):32-7 [Anisimov VV. Soderzhanie ponyatiia "mestnyi retsidiv" posle khirurgicheskogo lecheniia zlokachestvennoi melanomy kozhi. *Voprosy onkologii*. 1985;31(1):32-7 (in Russian)].
- Фрадкин С.З., Залуцкий И.В. Меланома кожи. Минск: Беларусь, 2000 [Fradkin SZ, Zalutskii IV. Melanoma kozhi. Minsk: Belarus', 2000 (in Russian)].
- Nambiar S, Mirmohammadsadeh A, Doroudi R, et al. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays. *Arch Dermatol*. 2005;141(2):165-73.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3635-48.
- Balch CM, Soong SJ, Shaw HM, et al. An analysis of prognostic factors in 8,500 patients with cutaneous melanoma. Eds CM Balch, AN Houghton, GW Milton, et al. *Cutaneous Melanoma*, 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992; p. 165.
- MacKie RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer*. 1998;34(Suppl. 3):S3-6.
- Nambisan N. Early metastatic patterns and survival in malignant melanoma. *J Surg Oncol*. 1987;34(4):248-52.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(8):793-802. DOI:10.1056/NEJMoa050434
- Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(6):558-63. DOI:10.1097/CCO.0b013e3282f0ad79
- Тупицын Н.Н. Костный мозг онкологического больного: стадирование опухоли, гемопоэз, иммунная система. *Иммунология гемопоэза*. 2018;16(2):10-54 [Tupitsyn NN. Kostnyi mozg onkologicheskogo bol'nogo: stadirovaniie opukholei, gemopoez, immunnaia sistema. *Immunologiya gemopoeza*. 2018;16(2):10-54 (in Russian)].
- Тупицын Н.Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников. *Онкогинекология*. 2013;1:12-8 [Tupitsyn NN. Circulating and disseminated tumor cells in breast cancer and ovarian cancer. *Onkoginekologiya*. 2013;1:12-8 (in Russian)].
- Бесова Н.С., Обаревич Е.С., Давыдов М.М., и др. Прогностическое значение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка до начала противоопухолевой терапии. *Фарматека*. 2017;17(350):62-6 [Besova NS, Obarevich YeS, Davydov MM, et al. Prognosticheskoe znachenie disseminirovannykh opukholevykh kletok v kostnom mozge bol'nykh disseminirovannym rakom zheludka do nachala protivooopukholevoi terapii. *Farmateka*. 2017;17(350):62-6 (in Russian)].
- Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А., и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(1):53-7 [Ryabchikov DA, Bezno OA, Dudina IA, et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Russian Biotherapeutic Journal*. 2018;17(1):53-7 (in Russian)]. DOI:10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
- Lilleby W, Stensvold A, Mills IG, Nesland JM. Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients. *Int J Cancer*. 2013;133(1):149-55.
- Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, et al. Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(9):1434-9.
- Чулкова С.В., Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., и др. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого. *Российский биотерапевтический журнал*. 2020;19(3):29-37 [Chulkova SV, Tupitsyn NN, Djumanazarov TM, et al. Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Russian Journal of Biotherapy*. 2020;19(3):29-37 (in Russian)].
- Маркина И.Г., Тупицын Н.Н., Михайлова И.Н., Демидов Л.В. Гематогенное метастазирование опухолей: ключевые моменты и эволюционирующие парадигмы. *Иммунология гемопоэза*. 2018;6(1):109-32 [Markina IG, Tupitsyn NN, Mikhailova IN, Demidov LV. Gematogennoe metastazirovaniie opukholei: kliuchevye momenty i evoliutsioniruiushchie paradigmy. *Immunologiya gemopoeza*. 2018;6(1):109-32 (in Russian)].
- Bartkowiak K, Effenberger KE, Harder S, et al. Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients. *J Proteome Res*. 2010;9(6):3158-68.
- Chernysheva O, Markina I, Demidov L, et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells*. 2019;8(6):627. DOI:10.3390/cells8060627
- Чулкова С.В., Чернышева О.А., Маркина И.Г., и др. Стволовые опухолевые клетки меланомы. Поражение костного мозга. Обзор и представление собственных данных. *Вестник Российского научного центра рентгенрадиологии*. 2019;19(4):182-97 [Chulkova SV, Chernysheva OA, Markina IG, et al. Stem tumor cells of melanoma. Bone marrow involvement. Review and own data. *Vestnik Rossiiskogo nauchnogo tsentra rentgenradiologii*. 2019;19(4):182-97 (in Russian)].
- Sai B, Xiang J. Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med*. 2018;22(12):5776-86.
- Чулкова С.В., Маркина И.Н., Антипова А.С., и др. Роль опухолевых стволовых клеток в прогнозе и канцерогенезе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгенрадиологии Минздрава России*. 2018;18(4):100-16 [Chulkova SV, Markina IG, Antipova AS, et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and the forecast of melanoma. *Vestnik Rossiiskogo nauchnogo tsentra rentgenradiologii Minzdrava Rossii*. 2018;18(4):100-16 (in Russian)].
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274-84.
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2967-76.
- Pantel K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*. 1996;347(9002):649-53.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Schatton T, Frank MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21(1):39-55. DOI:10.1111/j.1755-148X.2007.00427.x
- Wang Z, Ouyang G. Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. *Cells Stem Cells*. 2012;10(2):111-2. DOI:10.1016/j.stem.2012.01.002
- Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Кекеева Т.В., и др. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF. *Архив патологии*. 2014;76(3):65-73 [Frank GA, Zavalishina LE, Kekeeva TV, et al. First Russian nationwide molecular epidemiological study for melanoma: results of BRAF mutation analysis. *Arkhiv Patologii*. 2014;76(3):65-73 (in Russian)].

Статья поступила в редакцию / The article received: 12.01.2023

Статья принята к печати / The article approved for publication: 27.03.2023