

DOI: 10.17650/2222-1468-2023-13-1-65-74



# Морфологический и иммуногистохимический анализ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, M2-макрофагов, BCL6 и SOX10 в опухолевом микроокружении узловой меланомы кожи

К.С. Титов<sup>1,3</sup>, А.А. Маркин<sup>2</sup>, Е.И. Шурыгина<sup>2</sup>, Н.С. Карнаухов<sup>2</sup>, Д.А. Зарьянов<sup>2</sup>, Д.Н. Бубенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86, стр. 6;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

**Контакты:** Александр Андреевич Маркин [markinalexander1993@yandex.ru](mailto:markinalexander1993@yandex.ru)

**Введение.** Известно, что меланома кожи является одной из агрессивных злокачественных опухолей, а ее узловая форма с вертикальным ростом характеризуется неблагоприятным прогнозом. Однако благодаря достижениям фундаментальной онкологии в последние годы совершен прорыв в лекарственном лечении данной патологии. Во многом это связано с внедрением в практику новой иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Получены самые лучшие и длительные показатели ответа меланомы кожи на такое лечение по сравнению с другими онкологическими заболеваниями. Этот факт можно объяснить иммуногенностью меланомы кожи, высокой мутационной нагрузкой, а также особенностями ее опухолевого микроокружения, в котором в большинстве случаев определяется высокая инфильтрация иммунокомпетентными клетками. Однако иммунные клетки различны по своему составу и функциям. Некоторые из них могут даже стимулировать опухолевый рост. В связи с этим изучение клеточного состава, выраженности и распределения в опухоли иммунной инфильтрации может помочь выявить потенциальные факторы благоприятного и неблагоприятного прогноза меланомы кожи, что имеет значение в клинической практике.

**Цель исследования** — определить частоту экспрессии CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, CD163, BCL6 и SOX10 у пациентов с первичной узловой меланомой кожи, а также корреляцию экспрессии данных маркеров друг с другом и рядом стандартных морфологических параметров для данной неэпителиальной злокачественной опухоли.

**Материалы и методы.** В работе иммуногистохимическим методом изучена частота экспрессии CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, CD163, BCL6 и SOX10 на послеоперационном материале 20 пациентов с истинной узловой первичной меланомой кожи. Определена корреляция экспрессии данных маркеров друг с другом и рядом стандартных морфологических параметров.

**Результаты.** В большинстве случаев узловой меланомы кожи выявлена умеренная или выраженная степень лимфоидной (иммунной) инфильтрации (II–III степени), ее связь с толщиной опухоли по Бреслоу не наблюдалась. При изучении соотношения CD4-положительных Т-хелперов и CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолевом микроокружении количество последних нарастало с усилением выраженности иммунного инфильтрата. Выраженность макрофагальной инфильтрации прямо коррелировала с выраженностью лимфоидной инфильтрации. Экспрессия BCL6 в лимфоцитах выявлена во всех случаях наличия этой инфильтрации.

**Заключение.** Иммунный инфильтрат в узловой меланоме кожи — многокомпонентное, динамическое микроокружение, в котором одновременно присутствуют противоопухолевые и стимулирующие опухолевый рост компоненты со смещением баланса в ту или иную сторону. Их качественное, количественное и, вероятно, топографическое соотношения в первичном очаге узловой меланомы кожи имеют значение в развитии опухолевого процесса, влияют на эффективность лекарственных препаратов, а также на прогноз заболевания. Знание о преобладании в первичном очаге компонентов, негативно влияющих на прогноз, может помочь онкологу в выборе правильной тактики лечения или наблюдения заболевания.

**Ключевые слова:** узловая меланома кожи, Т-лимфоциты, CD163, BCL6, SOX10

**Для цитирования:** Титов К.С., Маркин А.А., Шурыгина Е.И. и др. Морфологический и иммуногистохимический анализ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, M2-макрофагов, BCL6 и SOX10 в опухолевом микроокружении узловой меланомы кожи. Опухоли головы и шеи 2023;13(1):65–74. DOI: 10.17650/2222-1468-2023-13-1-65-74

## Morphological and immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes, M2 macrophages, BCL 6 and SOX10 in the tumor microenvironment of nodular cutaneous melanoma

K.S. Titov<sup>1</sup>, A.A. Markin<sup>2</sup>, E.I. Schurygina<sup>2</sup>, N.S. Karnaukhov<sup>2</sup>, D.A. Zaryanov<sup>2</sup>, D.N. Bubenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>S.P. Botkin City Clinical Hospital Moscow Healthcare Department; 5<sup>2nd</sup> Botkinskii proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>2</sup>A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; Bld. 6, 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia;

<sup>3</sup>Peoples' Friendship University of Russia; Bld. 3, 6 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russia

**Contacts:** Alexander Andreevich Markin [markinalexander1993@yandex.ru](mailto:markinalexander1993@yandex.ru)

**Introduction.** Cutaneous melanoma is one of the most aggressive malignant tumors, and its nodular form with vertical growth is characterized by unfavorable prognosis. However, in the recent years due to advances in basic oncology, a breakthrough in drug therapy of this pathology was made. To a great extent, it is linked to implementation of new therapy with checkpoint inhibitors. The best and longest response rates of cutaneous melanoma to this treatment were achieved compared to other oncological diseases. This fact can be explained by immunogenicity of cutaneous melanoma, high mutational load, as well as features of its tumor microenvironment, where in most cases high infiltration by immunocompetent cell is observed. However, immune cells vary by their composition and functions. Some of them can even promote tumor growth. Therefore, study of cell composition, degree and distribution of immune infiltration in the tumor can help identify potential factors of favorable and unfavorable prognosis for cutaneous melanoma which is important in clinical practice.

**Aim.** To determine the frequency of CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-lymphocytes, CD163, BCL6 and SOX10 expression in patients with primary nodular cutaneous melanoma, as well as correlation of these markers with each other and standard morphological parameters for this non-epithelial malignant tumor.

**Materials and methods.** In the study, the expression frequency of CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-lymphocytes, CD163, BCL6 and SOX10 in the postoperative material of 20 patients with true primary nodular cutaneous melanoma was measured using immunohistological analysis. The correlation of these markers with each other and standard morphological parameters was determined.

**Results.** In most cases of nodular cutaneous melanoma, moderate and marked lymphocytic (immune) infiltration (grade II–III) was observed with no correlation with Breslow tumor thickness. Study of the ratio between CD4<sup>+</sup>-positive T helpers and CD8<sup>+</sup>-positive cytotoxic T lymphocytes in the tumor microenvironment showed that the number of the latter increased the higher was the degree of immune infiltrate. Markedness of macrophage infiltration directly correlated with markedness of lymphocytic infiltration. BCL6 expression in lymphocytes was observed in all cases of infiltration.

**Conclusion.** Immune infiltrate in nodular cutaneous melanoma is a multicomponent, dynamic microenvironment containing both antitumor and tumor-promoting components with balance shifting to one or other side. Their qualitative, quantitative and, possibly, topographic ratios in the primary lesion of cutaneous melanoma affect the effectiveness of drugs and disease prognosis. Knowledge on the predominance of components negatively affecting tumor growth in the primary lesion can help an oncologist in selection of correct treatment tactics and disease observation.

**Keywords:** nodular cutaneous melanoma, T lymphocytes, CD163, BCL6, SOX10

**For citation:** Titov K.S., Markin A.A., Schurygina E.I. et al. Morphological and immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes, M2 macrophages, BCL 6 and SOX10 in the tumor microenvironment of nodular cutaneous melanoma. *Opukholi golovy i shei* = Head and Neck Tumors 2023;13(1):65–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2023-13-1-65-74

### Введение

Меланома кожи является одной из агрессивных злокачественных опухолей, а ее узловая форма с вертикальным ростом характеризуется неблагоприятным прогнозом. Однако благодаря развитию и достижениям фундаментальной онкологии в последние годы совершен реальный прорыв в лекарственном лечении данной патологии. Во многом это связано с внедрением в практику новой иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Получены самые лучшие и длительные показатели ответа меланомы кожи на такое лечение по сравнению с другими онкологическими заболеваниями. Это можно объяснить ее иммуноген-

ностью и высокой мутационной нагрузкой, а также особенностью опухолевого микроокружения, в котором, по данным научных исследований, в большинстве случаев определяется высокая инфильтрация иммунокомпетентными клетками.

Анализ качественного и количественного состава опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrative lymphocytes, TILs) как маркера ответа опухоли на современные опции лекарственного лечения имеет прогностическое и предиктивное значение [1]. Известно, что иммунная инфильтрация опухоли В-лимфоцитами, цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами коррелирует с повышением показателей выживаемости,

тогда как клетки воспаления (макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки) и Т-регуляторные лимфоциты оказывают иммуносупрессивное действие и стимулируют рост опухоли [1, 2].

Еще одним иммунным звеном, влияющим на течение опухолевого процесса, могут быть В-лимфоциты. Так, по данным некоторых исследований, рецептор транскрипции BCL6, который в норме подавляет гены, участвующие в В-клеточной активации и терминальной дифференцировке лимфоцитов, имеет корреляционную связь с экспрессией CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и может являться предиктором низкой выживаемости пациентов с меланомой кожи [3].

Интересно изучение маркера SOX10 в меланоме кожи, который в спорных случаях может использоваться для иммуногистохимического (ИГХ) подтверждения диагноза «меланома кожи». По некоторым данным, роль SOX10 в развитии меланомы кожи многогранна, включает в себя инициацию, прогрессирование опухоли путем регулирования пролиферации и жизнедеятельности клеток [4].

Узловая меланома встречается в 15–20 % всех форм меланомы кожи и является относительно малоизученной опухолью, характеризуется быстрым вертикальным ростом и более ранним метастазированием. В связи с вышеизложенным изучение предиктивных морфологических и ИГХ-маркеров данной формы меланомы кожи имеет большую прогностическую ценность.

**Цель исследования** — определить частоту экспрессии CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, CD163, BCL6 и SOX10 у пациентов с первичной узловой меланомой кожи, а также корреляцию экспрессии данных маркеров друг с другом и рядом стандартных морфологических параметров для данной неэпителиальной злокачественной опухоли.

### Материалы и методы

Морфометрический анализ осуществлялся на первом этапе на рутинных гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Подсчет осуществлялся в соответствии с 7-уровневой шкалой,

предложенной группой специалистов Австралийского института меланомы (2012) и представляющей собой модифицированную систему Кларка (табл. 1).

Таким образом, выделяют 4 степени выраженности TILs-инфильтрации:

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

Однако в своем исследовании для упрощения оценки результатов мы объединили степени 0 и I, а также II и III. Получились группы отсутствия/слабой степени инфильтрации и умеренной/выраженной степени инфильтрации.

Для патоморфологического исследования были отобраны истинно узловые меланомы кожи с толщиной опухоли по Бреслоу от 0,6 до 13,0 мм (T1a–T4b).

Исследование проведено с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония). Иммуногистохимическое исследование выполнено на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, США) с использованием системы детекции ultraView Universal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems, США) и антител CD3 (2GV6), CD4 (sp35), CD8 (sp57), CD163 (polyclonal), BCL6 (G1191E/A8) и SOX10 (polyclonal).

Оценка качественного состава иммунного инфильтрата проводилась в соответствии с 4-уровневой системой градации: 0 — клетки отсутствуют/единичные; 1 — немногочисленные, дискретно расположенные клетки; 2 — немногочисленные клетки с формированием скоплений; 3 — многочисленные клетки.

Изучалось наличие перитуморальной инфильтрации, поскольку, по данным некоторых исследователей, плотный перитуморальный инфильтрат из CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов является положительным предиктивным маркером ответа на иммунотерапию [1]. Количественный

**Таблица 1.** Градация плотности и распределения иммунного инфильтрата

**Table 1.** Grade of density and location of immune infiltrate

Показатель Parameter	Степень выраженности иммунной инфильтрации Degree of severity of immune infiltration			
	0	I	II	III
Плотность иммунного инфильтрата The density of the immune infiltrate	Отсутствует Absent	Слабая Low	Умеренная Non-brisk	Выраженная Brisk
Распределение иммунного инфильтрата Location of immune infiltrate	Отсутствует Absent	Фокальный Focal	Мультифокальный Multifocal	Диффузный Diffuse

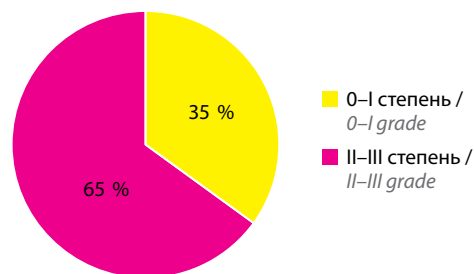
анализ субпопуляций TILs не проводился, так как не показал дополнительных преимуществ перед уровневой системой градации [1].

### Результаты

Результаты ИГХ- и морфологического исследований, проведенных в ходе ретроспективного анализа 20 образцов истинно узловой меланомы кожи, представлены в табл. 2.

При анализе плотности и распределения иммунного инфильтрата (рис. 1) в узловой меланоме кожи на светоптическом уровне выраженный лимфоидный инфильтрат (III степень) определялся в 10 % случаев (рис. 2).

В большинстве препаратов (55 %) обнаруживался умеренный инфильтрат (рис. 3), в 30 % – очаговый (I степень) (рис. 4). В 5 % случаев лимфоидный инфильтрат в опухоли отсутствовал (0 степень) (рис. 5).



**Рис. 1.** Степени иммунного инфильтрата в исследованных образцах меланомы кожи в соответствии со шкалой Австралийского института меланомы (2012)

**Fig. 1.** The grade of immune infiltrate in the explored skin melanomas according to the scale of the Australian Melanoma Institute (2012)

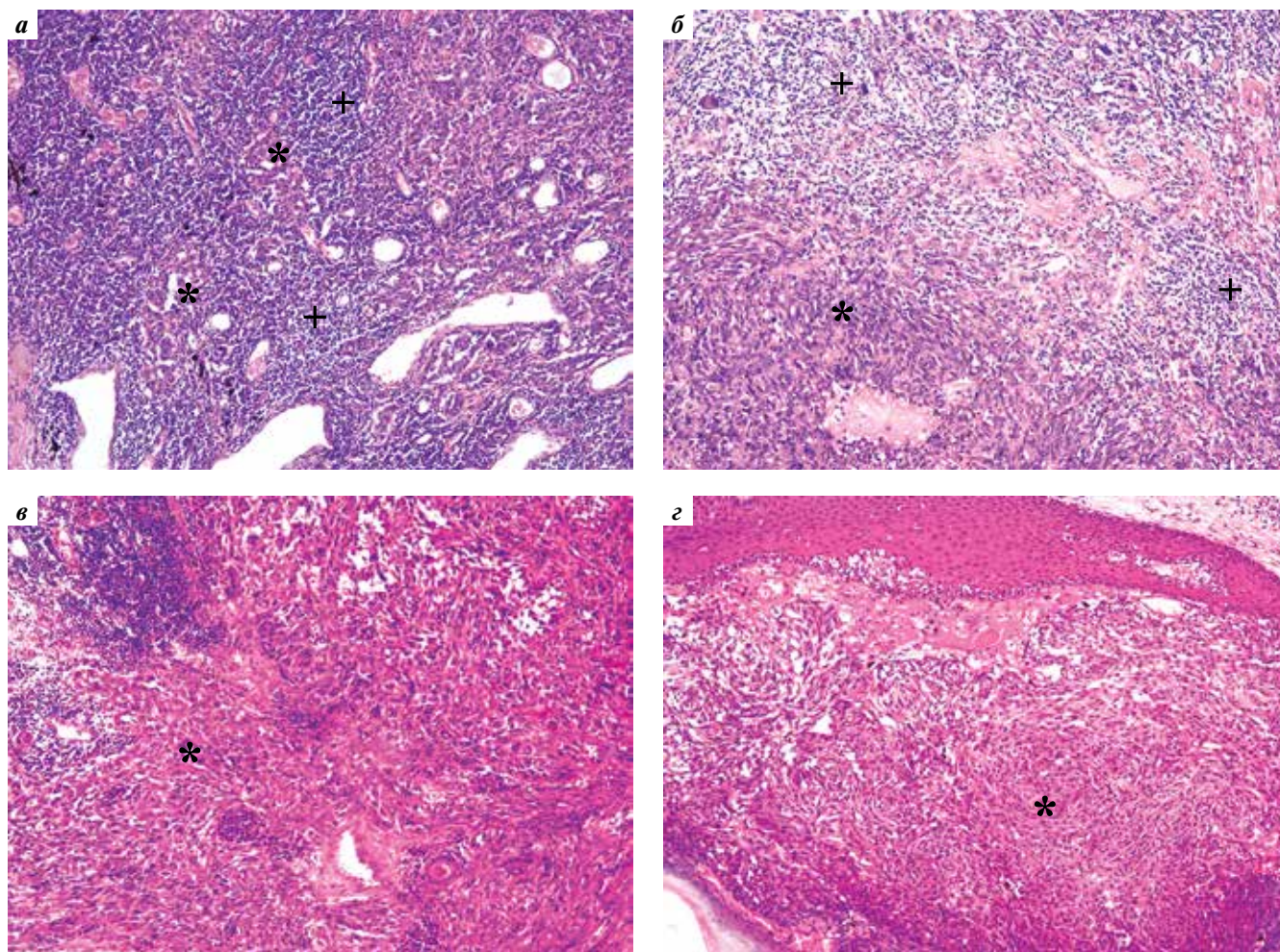
Осуществлена попытка найти ассоциацию толщины опухоли с выраженностью лимфоидной инфильтрации (см. рис. 2). Несмотря на то, что в тонких меланомах была

**Таблица 2.** Характеристика контрольных образцов и результаты экспрессии маркеров в них

**Table 2.** Characteristics of control samples and the results of marker expression

Образец Sample	Инвазия по Бреслоу, мм Invasion by Breslow, mm	Изъязвление Ulceration	Степень опухолевой инфильтрации лимфоцитами Degree of tumor infiltration by lymphocytes	CD3	CD4	CD8	CD163	BCL6	SOX10
1	1,0	—	0	0	0	0	0	-	+
2	5,0	+	II	3	1	3	3	+	+
3	7,0	+	I	1	1	1	2	+	+
4	5,0	+	I	1	1	1	2	+	+
5	2,0	—	II	2	2	2	3	+	+
6	7,5	+	III	3	2	3	3	+	+
7	13,0	+	II	2	2	2	2	+	+
8	4,0	+	II	2	2	2	1	+	+
9	1,2	—	I	1	1	1	1	+	+
10	4,0	+	II	2	2	2	2	+	+
11	4,6	+	III	3	3	3	3	+	+
12	4,0	+	II	2	2	2	3	+	+
13	6,0	+	I	2	2	2	2	+	+
14	4,3	+	II	2	2	2	2	+	+
15	11,0	+	I	1	1	1	1	+	+
16	1,8	+	II	2	2	2	1	+	+
17	4,7	+	II	2	2	2	2	+	+
18	11,0	+	I	1	1	1	1	+	+
19	0,6	—	II	2	2	2	1	+	+
20	3,7	+	II	2	2	2	3	+	+





**Рис. 2.** Гистологическое исследование узловой меланомы кожи: а — гнезда эпителиоидных опухолевых клеток (\*) разделены плотным диффузным лимфоидным инфильтратом (+) (III степень инфильтрации, выраженная), с большим количеством сосудов капиллярного типа; б — солидная эпителиоидноклеточная опухоль (\*) с очагами умеренно выраженного относительно рыхлого лимфоидного инфильтрата (+) (II степень инфильтрации, умеренная); в — солидная эпителиоидноклеточная опухоль (\*) с очаговым лимфоидным инфильтратом (+) (I степень инфильтрации, слабая); г — эпителиоидноклеточная опухоль (\*) без лимфоидной инфильтрации стромы (0 степень инфильтрации, инфильтрация отсутствует). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

**Fig. 2.** Histological examination of nodular skin melanoma: а — nests of epithelioid tumor cells (\*) are separated by a dense diffuse lymphoid infiltrate (+) (degree III of infiltration, marked), with a many capillary-type vessels; б — solid epithelioid cell tumor (\*) with foci of moderately expressed relatively loose lymphoid infiltrate (+) (degree II of infiltration, moderate); в — solid epithelioid cell tumor (\*) with focal lymphoid infiltrate (+) (degree II of infiltration, mild); г — subepithelial pigment epithelioid cell tumor (\*) without lymphoid infiltration of the stroma (0, absent). Hematoxylin and eosin staining.  $\times 200$

отмечена небольшая корреляционная связь между данными параметрами, при толщине опухоли  $>4$  мм группа этих злокачественных новообразований оказалась гетерогенной, с преимущественной низкой инфильтрацией лимфоцитами.

Также не отмечено корреляции между выраженностью лимфоидной инфильтрации и изъязвлением. Сначала можно подумать, что это отрицательный результат и он не дает никакой интересной закономерности. Однако перспектива нашего исследования — поиск независимых факторов прогноза, которые смогут предсказать поведение опухоли в тех случаях, когда стандартные патоморфологические факторы прогноза будут малоинформативны.

При более детальном изучении было отмечено, что во всех препаратах с лимфоидной инфильтрацией III степени и в 50 % случаев лимфоидной инфильтрации II степени TILs определялись как интра-, так и перитуморально (см. рис. 4). Перитуморальный лимфоидный инфильтрат наблюдался в 50 % образцов с инфильтрацией II степени и во всех образцах с инфильтрацией I степени (см. рис. 4).

Результаты ИГХ-исследования, проведенного с целью изучения качественного состава иммунного инфильтрата в узловой меланоме кожи с инфильтрацией TILs I, II и III степеней, представлены на рис. 5.

Установлено, что при выраженной (II–III) степени лимфоидной инфильтрации в 15 % случаев



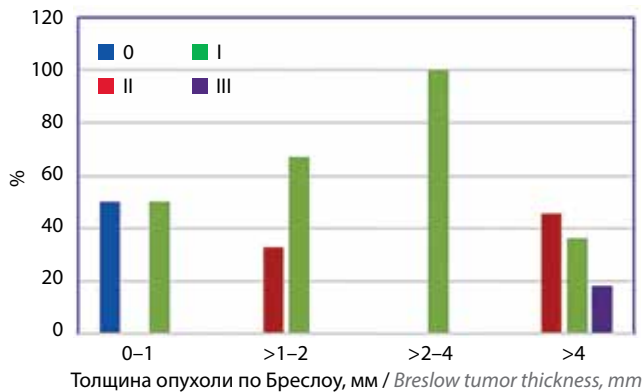


Рис. 3. Степень инфильтрации опухоли лимфоцитами в зависимости от ее толщины (по Бреслоу)

Fig. 3. The ratio of the level of lymphoid infiltration in the tumor and its thickness (according Breslow)

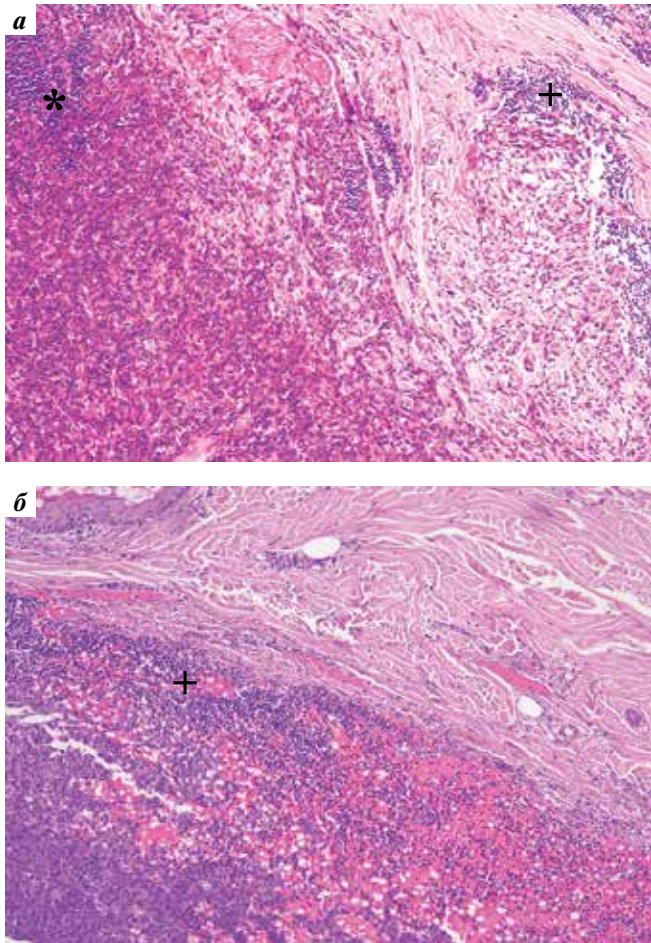


Рис. 4. Распределение иммунного инфильтрата в узловой меланоме кожи: а – опухоль с умеренно выраженным лимфоидным инфильтратом, определяющимся как интра- (\*), так и перитуморально (+); б – опухоль с умеренно выраженным перитуморальным лимфоидным инфильтратом (+) с кровоизлиянием. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Fig. 4. Histological examination of nodular melanoma of the skin: а – a tumor with a moderately pronounced lymphoid infiltrate, which is determined both intra- (\*) and peritumorally (+); б – tumor with moderate peritumoral lymphoid infiltrate (+) with hemorrhage. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 200$

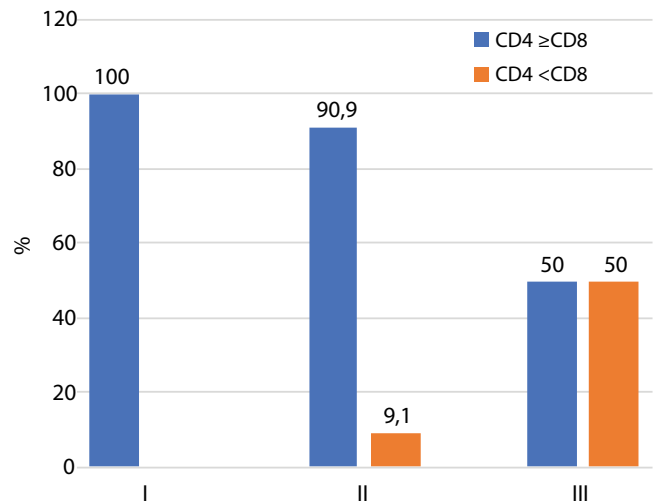


Рис. 5. Соотношение  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -Т-лимфоцитов в лимфоидном инфильтрате при инфильтрации I, II и III степеней в исследованных образцах меланомы кожи

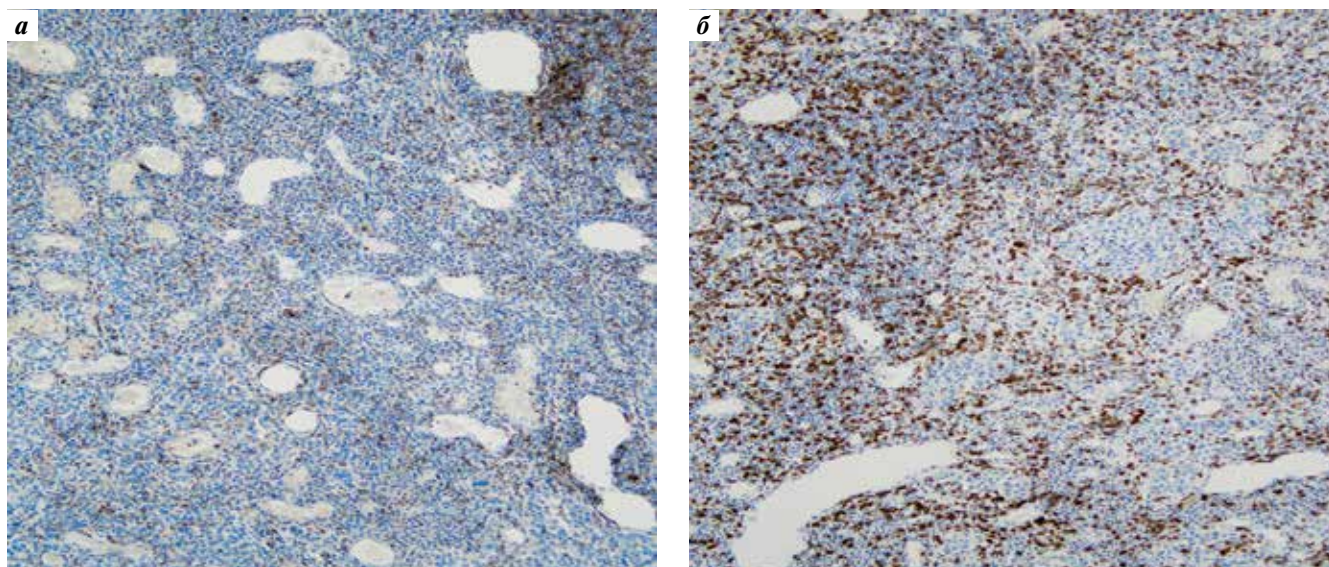
Fig. 5. The ratio of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T-lymphocytes in the lymphoid infiltrate for the grade I, II and III in the studied skin melanomas

$CD8^+$ -положительные цитотоксические Т-лимфоциты преобладали над  $CD4^+$ -Т-хелперами (рис. 6). Интересно, что во всех этих случаях отмечалась выраженная экспрессия М2-макрофагов. В 100 % образцов с лимфоидной инфильтрацией I степени  $CD4^+$ -хелперы преобладали над  $CD8^+$ -цитотоксическими лимфоцитами (рис. 7). И во всех случаях экспрессия  $CD3^+$ -лимфоцитов была той же интенсивности, что и  $CD8^+$ -лимфоцитов.

Вопрос о роли и значении разных популяций Т-лимфоцитов в иммунном инфильтрате при меланоме остается дискуссионным. Однако многочисленные исследования придают большее прогностическое и предиктивное значение  $CD8^+$ -Т-лимфоцитам, оказывающим прямое цитотоксическое действие путем экзоцитоза перфорина и гранзима в опухолевые клетки, а также за счет продукции фактора некроза опухоли и интерферона  $\gamma$  [5]. По данным ряда исследователей,  $CD4^+$ -Т-хелперы также проявляют противоопухолевое действие за счет выработки интерферона  $\gamma$ , оказывая регуляторное влияние на  $CD8^+$ -Т-лимфоциты и макрофаги [5]. Однако некоторые авторы не подтверждают их благоприятную роль в прогнозе заболевания [6]. Вероятно, это связано с тем, что  $CD4^+$ -Т-лимфоциты могут включать в себя субпопуляцию Т-регуляторных  $Foxp3^+$ -лимфоцитов, которые, по данным многих исследований, снижают показатели общей и безрецидивной выживаемости [7–9].

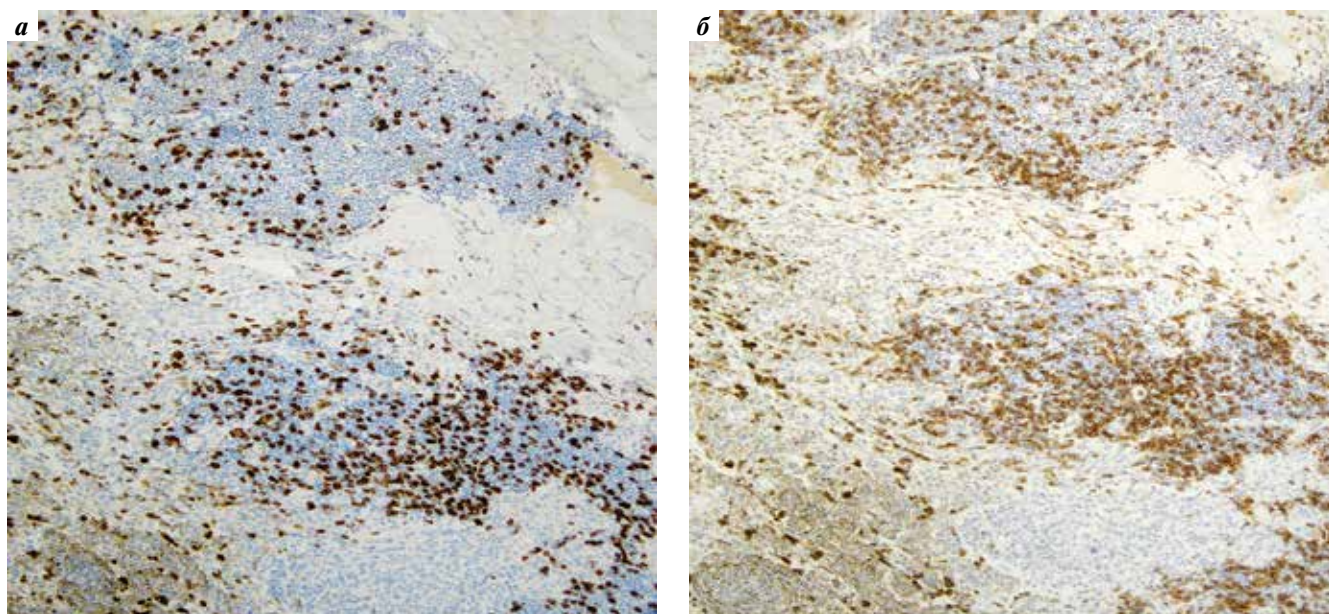
Во всех случаях лимфоидный инфильтрат имел примесь BCL6-положительных В- и Т-лимфоцитов, что противоречит исследованию, где данный маркер экспрессировался лишь в 8 % случаев меланомы кожи с вертикальными формами [3]. Экспрессия BCL6 не наблюдалась лишь в 1 тонкой меланоме с толщиной





**Рис. 6.** Иммуногистохимическое исследование иммунного инфильтрата в узловой меланоме кожи с антителами CD4 (а) и CD8 (б): опухоль с выраженным диффузным лимфоидным инфильтратом характеризуется преобладанием CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов над CD4-положительными хелперами.  $\times 200$

Fig. 6. Immunohistochemical study of the immune infiltrate in nodular skin melanoma with CD4 (a) and CD8 (b) antibodies: a tumor with a pronounced diffuse lymphoid infiltrate is characterized by a dominance of CD8-positive cytotoxic T-lymphocytes over CD4-positive helpers.  $\times 200$



**Рис. 7.** Иммуногистохимическое исследование иммунного инфильтрата в узловой меланоме кожи с антителами CD4 (а) и CD8 (б): опухоль с очаговым умеренным лимфоидным инфильтратом характеризуется преобладанием CD4-положительных хелперов над CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами.  $\times 200$

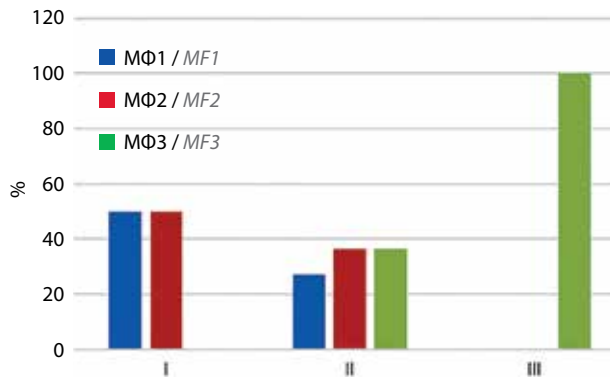
Fig. 7. Immunohistochemical study of the immune infiltrate in nodular melanoma of the skin with CD4 (a) and CD8 (b) antibodies: a tumor with focal moderate lymphoid infiltrate is characterized by a dominance of CD4-positive helpers over CD8-positive cytotoxic T-lymphocytes.  $\times 200$

опухоли по Бреслоу 1 мм, в которой отсутствовала лимфоидная инфильтрация.

Помимо вышеперечисленного также была проведена оценка содержания в воспалительном инфильтрате узловых форм меланомы кожи CD163-положительных M2-макрофагов (рис. 8). Как известно, макрофаги

могут активироваться в разные фенотипы, самыми распространенными из которых являются M1- и M2-макрофаги. Макрофаги M1 участвуют в фагоцитозе и стимулируют воспаление, секретируя цитокины. Макрофаги M2, наоборот, отвечают за разрешение воспаления и регенерацию тканей. Однако именно эти макрофаги





**Рис. 8.** Выраженность макрофагальной инфильтрации при различных степенях (I, II, III) лимфоидной инфильтрации в исследованных меланомах кожи: I — немногочисленные дискретные клетки; II — немногочисленные клетки, с формированием скоплений; III — многочисленные диффузные клетки. МФ — макрофаги

**Fig. 8.** The expressiveness of macrophage infiltration: I — a few discrete cells; II — a few cells with the formation of clusters; III — numerous diffuse cells with different grades (I, II, III) of immune infiltrate in the studied skin melanomas. MF — macrophages

в большинстве исследований показали себя как фактор неблагоприятного прогноза опухолей [2].

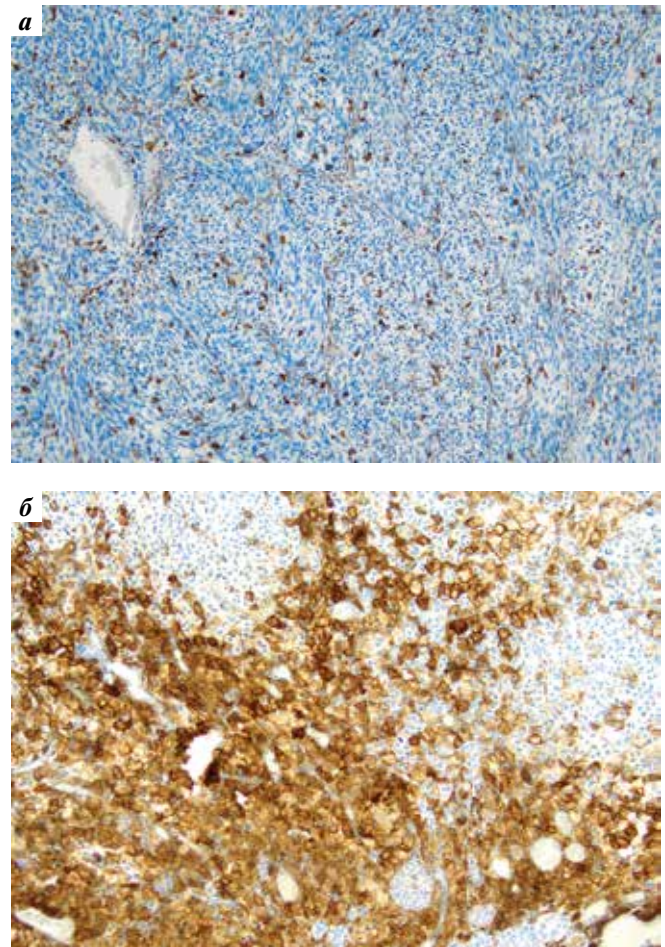
Мы выявили, что при выраженной лимфоидной инфильтрации (III степени) во всех исследованных случаях узловой меланомы определялись также многочисленные CD163-положительные M2-макрофаги (рис. 9, а). При лимфоидной инфильтрации II степени в 27,2 % образцах определялись немногочисленные дискретно расположенные макрофаги, в 36,4 % — немногочисленные, с формированием скоплений и в 36,4 % — многочисленные диффузно локализованные интра- и перитуморально (рис. 9, б).

При лимфоидной инфильтрации I степени в 50 % случаев узловой меланомы наблюдались немногочисленные, с формированием скоплений, дискретно расположенные CD163-положительные макрофаги. При этом выраженной диффузной макрофагальной инфильтрации в этой когорте выявлено не было (см. рис. 8).

Установлено, что на ранних стадиях опухолевого роста макрофаги играют мутагенную роль путем продукции свободных радикалов в меланоме кожи, а на более поздних стадиях оказывают иммуносупрессивное действие, привлекая регуляторные Т-лимфоциты, непосредственно ингибируя цитотоксические Т-лимфоциты и стимулируя опухолевый рост [10]. Возможно, такое их поведение связано с переактивацией макрофагов из M1 в M2, как было продемонстрировано в других исследованиях [2].

## Обсуждение

Патоморфологическое исследование качественно-го состава иммунного инфильтрата при узловой меланоме кожи T1a–4b выявило, что в большинстве случаев она характеризовалась выраженной фокальной/умеренной мультифокальной или диффузной лимфоидной



**Рис. 9.** Иммуногистохимическое исследование иммунного инфильтрата в узловой меланоме кожи с антителами CD163: а — определяется выраженная диффузная макрофагальная инфильтрация опухоли; б — определяются немногочисленные дискретно расположенные интратуморальные макрофаги. ×200

**Fig. 9.** Immunohistochemical study of the immune infiltrate in nodular melanoma of the skin with CD163 antibodies: а — a dominance diffuse macrophage infiltration of the tumor is determined; б — a few discretely located intratumoral macrophages are detected. ×200

инфильтрацией (II–III степени в соответствии со шкалой Австралийского института меланомы). В 30 % случаев наблюдалась слабая/умеренная фокальная или слабая мультифокальная лимфоидная инфильтрация (I степени). В 5 % образцов иммунная реакция отсутствовала, при этом все данные случаи относились к стадии T2a. В ходе изучения соотношения CD4-положительных Т-хелперов и CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов выявлено, что увеличение доли последних связано с усилением выраженности иммунного инфильтрата. При лимфоидной инфильтрации I степени во всех случаях преобладают CD4-положительные клетки, при II — в 9,1 % случаев CD8-положительные клетки преобладают над CD4-положительными, при III — в 50 % случаев отмечается преобладание CD8-положительных Т-лимфоцитов, играющих большую роль



в подавлении опухолевого роста и являющихся положительными прогностическими и предиктивными (в отношении иммунотерапии) маркерами. Интересно, что выраженность макрофагальной инфильтрации — неблагоприятного прогностического фактора — прямо коррелирует со степенью лимфоидной инфильтрации, которая считается благоприятным прогностическим фактором: при I степени во всех случаях отсутствуют многочисленные диффузно расположенные макрофаги, при II — они встречаются в 36,4 % случаев, при III — во всех случаях.

## Заключение

Таким образом, иммунный инфильтрат в узловой меланоме кожи — многокомпонентное динамическое микроокружение, в котором одни звенья играют противоопухолевую роль, а другие, возможно, прямо или косвенно усиливают опухолевый рост. Их качественное, количественное и, вероятно, топографическое соотношения в первичном очаге узловой меланомы кожи имеют значение в развитии опухолевого процесса, влияют на эффективность лекарственных препаратов, а также на прогноз заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hendry S., Salgado R., Gevaert T. et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immunooncology biomarkers working group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol* 2017;24(6):311–35. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000161
2. Fallén M., Savic F., Tosia D. et al. M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2017;27(3):200–10. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000352
3. Alonso S.R., Ortiz P., Pollán M. et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol* 2004;164(1):193–203. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63110-0
4. Cronin J.C., Watkins-Chow D.E., Incao A. et al. SOX10 ablation arrests cell cycle, induces senescence, and suppresses melanomagenesis. *Cancer Res* 2013;73(18):5709–18. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4620
5. Maibach F., Sadozai H., Morteza Seyed Jafari S. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and their prognostic value in cutaneous melanoma. *Front Immunol* 2020;11:2105. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02105
6. Erdag G., Schaefer J.T., Smolkin M.E. et al. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 2012;72(5):1070–80. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3218
7. Донецкова А.Д., Литвина М.М., Смирнов Д.С. и др. Сравнение экспрессии изоформ молекулы FOXP3 регуляторными Т-клетками периферической крови при аллергических и лимфопролиферативных заболеваниях. *РМЖ. Медицинское обозрение* 2020;4(1):4–9. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-4-9
8. Redzovic A., Laskarin G., Dominovic M. et al. Mucins help to avoid alloreactivity at the maternal fetal interface. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:542152. DOI: 10.1155/2013/542152
9. Plettenberg A., Ballaun C., Pammer J. et al. Human melanocytes and melanoma cell constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol* 1995;146(3):651–9.
10. Salmi S., Siiskonen H., Sironen R. et al. The number and localization of CD68+ and CD163+ macrophages in different stages of cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2019;29(3):237–47. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000522

## Вклад авторов

К.С. Титов: идея, разработка дизайна исследования, написание текста статьи;

А.А. Маркин, Е.И. Шурыгина: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи;

Н.С. Карнаухов, Д.А. Зарьянов, Д.Н. Бубенко: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

## Authors' contribution

K.S. Titov: idia, research design development, article writing;

A.A. Markin, E.I. Schurygina: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, article writing;

N.S. Karnaukhov, D.A. Zaryanov, D.N. Bubenko: research design development, article writing.

## ORCID авторов / ORCID of authors

К.С. Титов / K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>

А.А. Маркин / A.A. Markin: <https://orcid.org/0000-0002-9180-9264>

Е.И. Шурыгина / E.I. Schurygina: <https://orcid.org/0000-0002-0571-2803>

Н.С. Карнаухов / N.S. Karnaukhov: <https://orcid.org/0000-0003-0889-2720>

Д.А. Зарьянов / D.A. Zaryanov: <https://orcid.org/0000-0002-3177-1495>

Д.Н. Бубенко / D.N. Bubenko: <https://orcid.org/0009-0000-5611-7943>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено при спонсорской поддержке ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы».

**Funding.** The study was sponsored by the A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Московского клинического научного центра им. А.С.Логинова (протокол № 8 от 21.10.2020 г.).

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center (protocol No 8, 21.10.2020).

All patients signed an informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 03.03.2023. **Принята к публикации:** 26.03.2023.

**Article submitted:** 03.03.2023. **Accepted for publication:** 26.03.2023.