

ГБОУ ДПО «КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МУХАМАТГАЛЕЕВА

Луиза Хамбалева

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФАКТОРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗА
ТЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

14.01.12 – Онкология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Казань - 2016

Работа выполнена на кафедре онкологии, радиологии и паллиативной медицины ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Зинаида Александровна Афанасьева

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Московский научно - исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2016 г. в ____ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.052.01 ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Учёный секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
доктор медицинских наук

Елена Вилльевна Бахидзе

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Клинико-патоморфологические факторы прогноза течения меланомы кожи.....	13
1.2. Современные взгляды на роль нейротрансмиттеров при меланоме.....	15
1.2.1. Меланома как представитель нейроэндокринных опухолей или опухоль с нейроэндокринной дифференцировкой.....	15
1.2.2. Нейротрансмиттеры симпатической нервной системы в процессах онкогенеза при меланоме.....	18
1.2.3. Хронический стресс, нейротрансмиттеры и злокачественные опухоли.....	29
1.3. Белок S100B и хромогранин А в диагностике меланомы кожи.....	32
1.3.1. Биохимическая структура, функции белка S100 и его применение в клинической практике.....	34
1.3.2. Хромогранин в диагностике нейроэндокринных опухолей...	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Характеристика клинических наблюдений.....	45
2.2. Методы исследования.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1. Клинико-морфологическая характеристика больных меланомой кожи.....	53
3.1.1. Клинико-морфологическая характеристика больных первичной меланомой кожи.....	53

3.1.2. Клинико-морфологическая характеристика больных с рецидивом заболевания.....	56
3.1.3. Клинико-морфологическая характеристика больных диспансерной группы.....	60
3.2. Молекулярные факторы у больных меланомой кожи.....	61
3.2.1. Содержание нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи.....	62
3.2.2. Содержание белка S100B и хромогранина А в сыворотке крови больных меланомой кожи.....	67
3.3. Математические диагностическая и прогностическая модели с учетом молекулярных факторов при меланоме кожи.....	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	81
ВЫВОДЫ.....	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Меланома кожи многие годы остается одной из актуальных проблем онкологии, значимость которой определяется стремительными темпами роста заболеваемости, высокой агрессивностью опухоли, ранним метастазированием, большой долей лиц молодого и среднего трудоспособного возраста (35% в возрасте от 35 до 54 лет) и отсутствием удовлетворительных результатов лечения [Фрадкин С.З. и соавт., 2000; Барчук А.С., 2001; Белякова Н.И. и соавт., 2008; Кудрявцев Д.В. и соавт., 2008; Демидов Л.В. и соавт., 2012; Tsao H. et al., 2004; Markovic S.N. et al., 2007; Vereecken P. et al., 2012; Varughese B.E. et al., 2013]. По данным Национального Института Рака (США), ежегодный прирост заболеваемости составляет 3-5% в год, т.е. больше, чем при других злокачественных опухолях [Белякова Н.И. и соавт., 2008; Armstrong B.K. et al., 1994; Jemal A. et al., 2004]. В Австралии и Новой Зеландии прирост заболеваемости составляет 7% в год [Little J.W., 2006]. В США заболеваемость меланомой ежегодно увеличивается на 4-6% [Rigel D.S. et al., 2010; Leclerc E., 2011; Rodriguez-Cerdeira C. et al., 2011; Bannassar A. et al., 2012]. В Российской Федерации также отмечается стойкая тенденция к увеличению заболеваемости меланомой кожи. Так за десятилетие с 2005 по 2014 год заболеваемость в расчете на 100 тыс. населения выросла в Российской Федерации с 3,54 до 4,13, и прирост составил 29,96% [Чиссов В.И. и соавт.; 2007; Аксель Е.М., 2009; Каприн А.Д. и соавт., 2016]. Среди других злокачественных новообразований кожи меланома встречается относительно редко (менее 5%), но на её долю приходится около 80% летальных исходов, связанных с опухолями кожи [Демидов Л.В. и соавт., 2001; Демидов Л.В. и соавт., 2007; Miller A.J. et al., 2006; Liu S. et al., 2008; Sladden M.J. et al., 2010; Rodriguez-Cerdeira C. et al., 2011; Varughese B.E. et al., 2013].

По данным литературы, у 27-58% больных меланомой кожи при I и II стадии к началу лечения могут быть клинически скрытые микрометастазы в

регионарных лимфатических узлах и отдаленных органах [Леончук А.Д., 1990; Вагнер Р.И. и соавт., 1996; Курдина М.И. и соавт., 1996; Анищенко И.С. и соавт., 2003; Кукушкина М.Н. и соавт., 2012; Ranieri J.M. et al., 2006; Ellis M.S. et al., 2010]. При этом в 20-28% случаев разовьется местный рецидив, у 26-60% пациентов произойдет метастазирование в регионарные лимфатические узлы и у 15-50% возникнут отдаленные метастазы [Roos H. et al., 2009]. Поэтому лимфаденэктомия клинически поражённых метастазами лимфатических узлов, как правило, оказывается запоздалой.

Таким образом, в настоящее время актуальным является определение молекулярных факторов ранней диагностики и прогноза течения меланомы кожи, как со стороны опухоли, так и со стороны макроорганизма. Молекулярные маркеры могут помочь диагностировать первичную опухоль, микрометастазы и рецидив на доклиническом этапе, что позволит предпринять адъювантную терапию у этих больных, определить устойчивость к химио- и иммунотерапии, а также провести мониторинг эффективности проводимой терапии.

Актуальным в настоящее время является исследование роли симпатико-адреналовой системы в патогенезе заболевания. Согласно данным литературы, стресс-ассоциированные нейротрансмиттеры могут существенно модулировать пролиферацию, апоптоз трансформированных клеток, неоангиогенез в опухоли и тем самым вносить вклад в формирование и прогрессию злокачественных новообразований [Балицкий К.П. и соавт., 1987; Абрамов В.В. и соавт., 1998; Guo K. et al., 2009; Tilan J. et al., 2010] или напротив, могут выступать ингибиторами роста опухоли [Wick M.M., 1980; Kubota R. et al., 1992; Entschladen F. et al., 2005]. С другой стороны, медиаторы влияют на функционирование иммунной системы, в регулировании миграции лейкоцитов и опухолевых клеток, т.е. при дисфункции нейроэндокринной системы подавляется цитотоксическая активность Т-клеток, NK – клеток и нарушается презентация антигена

[Репина В.П., 2008; Меерсон Ф.З. и соавт., 1985; Ben-Elliyahu S. et al., 2000; Elenkov I.J., 2000; Moreno-Smith M. et al., 2010; Li S. et al., 2013].

В доступной литературе отсутствуют работы, посвященные изучению нейромедиаторного обмена в крови при меланоме кожи, влияние нейромедиаторов на прогноз и течение болезни. Но имеются данные о том, что меланоциты производят классические нейротрансмиттеры стресса, нейропептиды и гормоны, и этот процесс изменяется и регулируется ультрафиолетовым излучением, биологическими факторами и стрессом [Смирнов И.О. и соавт., 2005; Slominski A. et al., 2009]. Таким образом, можем говорить о том, что меланома имеет нейроэндокринную дифференцировку [Eyden B. et al., 2005; Slominski A. et al., 2009]. Поэтому изучение нейромедиаторного обмена и хромогранина - одного из специфичных для нейроэндокринных опухолей маркеров, является актуальным для возможного раскрытия новых механизмов патогенеза болезни и, следовательно, новых методов диагностики и лечения столь агрессивной опухоли.

В настоящее время перспективным прогностически значимым маркером меланомы кожи рассматривается опухолеассоциированный сывороточный маркер белок S100B [Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Guo H.B. et al., 1995; von Schoutz E. et al., 1996; Gogas H. et al., 2009]. Тем не менее, не существует единого мнения о зависимости уровня S100B от стадии меланомы, ее клиничко-морфологических характеристик, а также по внедрению белка S100B в клиническую практику [Mocellin S. et al., 2008; Palmer S.R. et al., 2011].

Одной из важнейших задач в диагностике и лечении меланомы кожи является поиск такого метода исследования, который позволил бы диагностировать на начальных этапах введения больного ранние метастазы и рецидивы меланомы ещё до их клинических проявлений. Поэтому изучение уровня нейротрансмиттеров, белка S100B и хромогранина А в крови больных меланомой кожи с учетом стадии, клиничко-морфологических особенностей

заболевания и их пригодности в прогнозировании течения заболевания является актуальным.

Цель исследования - определить прогностическое значение нейротрансмиттеров, белка S100B и хромогранина А при меланоме кожи.

Задачи исследования

1. Изучить содержание нейротрансмиттеров (адреналина, норадреналина, серотонина и дофамина) в плазме крови больных меланомой кожи и определить их значимость при прогнозе.
2. Изучить соотношения нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи.
3. Оценить значимость сывороточного белка S100B в качестве молекулярного маркера прогноза течения меланомы кожи.
4. Исследовать в сыворотке крови больных меланомой кожи в качестве диагностического и прогностического молекулярного маркера хромогранин А.
5. Разработать диагностическую и прогностическую математические модели с учетом молекулярных факторов при меланоме кожи.

Научная новизна

Впервые:

- изучены нейромедиаторы (адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин) и их соотношения в плазме крови у пациентов с меланомой кожи, определена их роль в прогнозе заболевания;
- определено значение сывороточного белка S100B в качестве молекулярного маркера при меланоме кожи;
- изучено содержание онкомаркера нейроэндокринных опухолей – хромогранина А в плазме крови больных меланомой кожи и его

значение в качестве диагностического маркера при данном заболевании;

- разработаны диагностическая и прогностическая математические модели с учетом молекулярных факторов при меланоме кожи.

Личный вклад автора

Автором обоснована тема исследования, поставлены цель и задачи, определены этапы работы и их дизайн, проведена выборка пациентов меланомой кожи. Проанализированы амбулаторные карты, истории болезни, результаты клинико-лабораторных обследований пациентов, созданы компьютерные базы данных больных, проведено диспансерное наблюдение за больными в процессе исследования. Автор принимал непосредственное участие в заборах и подготовке крови для исследования. Осуществлена статистическая обработка полученных результатов, оформлены результаты диссертации, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Практическая значимость

На основании полученных результатов предложена диагностическая модель и модель течения меланомы кожи с учетом молекулярных факторов.

Выявленные нарушения в симпатико-адреналовой системе на этапе диагностики и лечения дают возможность внедрения в процесс ведения больных меланомой кожи нейрофармакологической терапии и психологического тренинга как одного из методов реабилитации.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования и основные рекомендации используются в практической работе ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ, ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» Республики Марий Эл, а также в учебном процессе на кафедре онкологии, радиологии и паллиативной медицины ГБОУ ДПО «Казанская

государственная медицинская академия» МЗ РФ, на кафедре онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. У больных меланомой кожи имеют место нарушения в содержании нейротрансмиттеров и в их соотношениях, что может быть использовано в комплексной оценке течения заболевания.
2. Найденные нарушения в медиаторном обмене делают целесообразным использование нейрофармакологических препаратов в лечении больных меланомой кожи.
3. Сывороточный белок S100B и хромогранин А могут быть молекулярными диагностическими и прогностическими маркерами меланомы.
4. Изучение молекулярных факторов позволяет создать диагностическую и прогностическую математические модели при меланоме кожи.

Апробация диссертации

Материалы диссертации доложены на IV Международном конгрессе «Опухоли головы и шеи» Байкал – 2011, г. Иркутск, 2-4 сентября 2011 г.; на Научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фундаментальной и клинической медицины», г. Ханты-Мансийск, 27-28 ноября 2014 г.; на IX Международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков, организуемой Казанским, Воронежским и Курским медицинскими образовательными учреждениями, посвященной 95-летию Казанской государственной медицинской академии, г. Казань, 14-15 апреля 2015 г.; на Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Томск, 22 мая 2015 г.; на V Международной научно-практической конференции «Новые

концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли», г. Казань, 1-2 октября 2015 г.; на VII Конференции молодых ученых РМАПО с международным участием «ШАГ В ЗАВТРА», г. Москва, 20-21 апреля 2016г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатных работ, из них 4 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ и 1 учебно-методическое пособие.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиография включает: 86 отечественных и 186 зарубежных источников. Объем диссертации 130 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 4 рисунками.

ГЛАВА 1

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Меланома кожи представляет реальную угрозу для населения всего мира, поэтому не случайно её называют «тихой» эпидемией [De Giorgi V. et al., 2012; Tandler N., 2012]. На сегодня не существует эффективной терапии для ингибирования активности метастатической меланомы. Меланома кожи развивается при злокачественной трансформации меланоцитов, пигмент-продуцирующих клеток, происходящих из нейроэктодермы. Меланома остается актуальной и важной проблемой общественного здравоохранения многих стран, поскольку особенности её клинического течения отличаются высоким потенциалом местного роста, ранним регионарным метастазированием, диссеминацией по коже и отдаленным метастазированием [Фрадкин С.З. и соавт., 2000; Соколов Д.В. и соавт., 2008; Демидов Л.В. и соавт., 2012; Tsao H. et al., 2004; Rigel D.S. et al., 2010; Leclerc E., 2011; Varughese B.E. et al., 2013].

Показатели своевременной диагностики в России в настоящее время трудно признать удовлетворительными, хотя по данным В.В. Анисимова чувствительность клинической диагностики первичной меланомы кожи на основании только анамнестических, визуальных и физикальных данных составляет 90,2%. Диагностика меланомы кожи врачами первичного звена при первичном обращении составляет только 30%, за рубежом - 37%, а врачами специализирующиеся в онкодерматологии составляет 65% [Анисимов В.В., 2001; Демидов Л.В. и соавт., 2007; Соколов Д.В. и соавт., 2008]. Из них 33,5% больных выявляется в III-IV стадии, что резко ухудшает прогноз заболевания и не позволяет надеяться на успешное излечение [Лемехов В.Г., 2001].

1.1. Клинико-патоморфологические факторы прогноза течения меланомы кожи

На сегодняшний день прогноз первичной меланомы определяется клиническими и патоморфологическими особенностями [Демидов Л.В., 1998; Вишневская Я.В. и соавт., 2011; Leong S.P.L. et al., 2011]. Больные первичной кожной меланомой по данным литературы, имеют широкий диапазон стойкого излечения - от 40% до 90%, в зависимости от клинико-патоморфологических признаков опухоли [Демидов Л.В. и соавт., 2012]. В течение десятилетий исследователи ищут клинические и патоморфологические характеристики меланомы кожи, обладающие прогностическим значением для предопределения течения заболевания [Семенова А.И., 2012].

По данным классификации меланомы кожи, разработанной совместно American Joint Committee on Cancer (AJCC) и International Union Against Cancer (UICC) и опубликованной в 2009 году, выделены основные прогностические факторы [Семенова А.И., 2012; Balch C.M. et al., 2009; Dickson P.V. et al., 2011]. Наиболее мощным независимым прогностическим фактором исхода заболевания является толщина первичной опухоли по Бреслоу. При адекватной хирургии меланомы кожи глубиной инвазии менее 0,75мм пациенты имеют 5-летнюю выживаемость 95-99%. Чем глубже инвазия опухоли, тем хуже прогноз [Семилетова Ю.В. и соавт., 2012; Imonen S. et al., 2002; Luke C.G. et al., 2003; Medic S. et al., 2007]. По данным некоторых исследователей, при меланоме тоньше, чем 0,75мм лимфатические узлы всегда были отрицательными на метастазы [Doumas A. et al., 2010; Fernandez-Flores A., 2012], но D. Becker и соавторы указали, что толщина опухоли по Бреслоу в некоторых случаях не является точным индикатором биологического поведения меланомы, т.е. при толщине опухоли менее 1мм может происходить метастазирование [Becker D. et al., 2006].

Вторым сильным независимым прогностическим фактором является митотический индекс. Увеличение частоты митозов (≥ 1 митоз/1мм²) строго коррелирует с уменьшением общей выживаемости больных [Семенова А.И., 2012; Barnhill R.L. et al., 2005; Dickson P.V. et al., 2011; Thompson J.F. et al., 2011; Fernandez-Flores A., 2012; Mervic L., 2012]. С течением времени прогностическое значение уровня инвазии по Кларку становится все менее надежным и по данным зарубежных исследователей не является прогностическим предиктором выживаемости. Однако если нет данных о митозах, и митотический индекс не может быть точно оценен в группе меланом менее 1мм, уровень инвазии по Кларку обеспечивает дополнительную прогностическую информацию [Balch C.M. et al., 2009; Fernandez-Flores A., 2012; Mervic L., 2012].

Изъязвление первичной опухоли является отрицательным прогностическим фактором, являясь отражением быстрого роста опухоли. При этом изъязвлением считается только язва шириной более 0,1мм; язва менее 0,1мм относится к категории эрозий [Spatz A. et al., 2003; Fernandez-Flores A., 2012; Mervic L., 2012].

Метастазы в регионарных лимфатических узлах значительно ухудшают прогноз течения меланомы кожи, общая 5-летняя выживаемость составляет только 30-40% [Яковцова И.И. и соавт., 2012; Ilmonen S. et al., 2002]. Доказано, что наличие микрометастазов в лимфатических узлах имеет большое прогностическое значение по сравнению с их размерами в отношении выживаемости больных [Семенова А.И., 2012; Mangas C. et al., 2008].

Образование вокруг опухоли микросателлитов в фазу вертикального роста имеет отрицательное прогностическое значение. Их наличие предполагает наличие сосудистой инвазии, увеличение частоты метастазов в лимфатические узлы и снижение выживаемости больных [Яковцова И.И. и соавт., 2012; Nagore E., 2005; Shaikh L., 2005].

Клинико-анатомический тип меланомы, её клеточный вариант, степень пигментообразования, проявление спонтанной регрессии опухоли, выраженность лимфацитарной инфильтрации, анатомическое расположение первичной опухоли, возраст и пол в качестве прогностических факторов на сегодня дискуссионны [Яковцова И.И. и соавт., 2012; Homsy J., 2005; Taylor R.C., 2007; Whiteman D.C. et al., 2011; Mervic L., 2012].

Таким образом, более глубокий и подробный анализ всех клинико-патоморфологических факторов и молекулярных факторов прогноза меланомы позволит оптимизировать первичную диагностику и обнаружить метастазы, а значит более точно прогнозировать течение меланомы и провести более эффективную терапию для этих пациентов. В этом контексте особую роль приобретают новые разработки и исследования в молекулярной биологии меланоцитов, генетике меланомы и иммунологии опухоли, которые позволят дать ответ на множество вопросов и, главное, надежду на излечение [Fernandez –Flores A., 2012].

1.2. Современные взгляды на роль нейротрансмиттеров при меланоме

1.2.1. Меланома как представитель нейроэндокринных опухолей или опухоль с нейроэндокринной дифференцировкой

По данным М. Pons и соавт. (2008), Н. Gogas и соавт. (2009), в зарубежной литературе опубликовано более 100 экспериментальных работ с использованием ДНК-микрочипов для изучения экспрессии генов, найденных в меланоме. Исследования раскрыли сложную модель различных молекулярных aberrаций, лежащих в основе онкогенеза при меланоме [Pons M., 2008; Gogas N. et al., 2009]. Результаты молекулярных исследований показали, что меланому следует рассматривать как гетерогенное заболевание с различными молекулярными дефектами в важных клеточных и биохимических процессах, таких как регуляция

клеточного цикла, адгезия, дифференцировка, биосинтез меланина и гибель клетки. В связи с этим, можно выделить важные моменты: во-первых, необходима индивидуализация диагноза меланомы, во-вторых, открывается ряд новых потенциальных молекулярных веществ в роли биомаркеров и, возможно, мишеней для новых целенаправленных препаратов для достижения индивидуализации лечения [Liu S. et al., 2008].

Меланома - это великий имитатор. По данным литературы, меланома может имитировать гистологические особенности широкого спектра опухолей, например: лимфомы, саркомы, низкодифференцированные нейроэндокринные опухоли, доброкачественные опухоли стромы, плазмацитому, опухоли половых клеток и опухоли нервной системы. И правильная интерпретация имеет важное значение как в прогнозе, так и в назначении целенаправленного лечения [Zelger B.G. et al., 1997; Banerjee S.S. et al., 2000; De Wit N.J. et al., 2004; Banerjee S.S. et al., 2008; Nonaka D., 2008; Ohsie S.J. et al., 2008; Shinohara M.M., 2009; Viray H. et al., 2013].

Эндокринные нарушения играют немало важную роль в этиологии и патогенезе развития, течения меланомы [Лабунец И.Ф. и соавт., 1984; Герштейн Е.С. и соавт., 1991]. Согласно данным литературы, на клетках злокачественной меланомы имеются рецепторы к гормонам эндокринных желез [Герштейн Е.С. и соавт., 1991; Гриневич Ю.А., 1998; Bhakoo H. et al., 1989], и активность меланоцитов регулируется нейроэндокринными факторами [Шанин А.П., 1957; Смирнов И.О. и соавт., 2005]. Нейроэндокринная природа меланомы исследовалась группой ученых из США в начале XXI века. В своей работе они доказали наличие экспрессии подтипов рецептора соматостатина в клетках меланомы и изучили их физиологическое значение при злокачественной меланоме [Lum S.S. et al., 2001]. В 2005 году коллектив авторов из Великобритании впервые опубликовал данные с подробным клиническим, гистологическим, иммуногистохимическим и ультраструктурным описанием меланомы с

нейроэндокринной дифференцировкой у трех пациентов [Eyden B. et al., 2005].

Патогенетическими представляются работы зарубежных авторов по изучению нейроэндокринной системы кожи, особенностей биологии меланоцитов, биосинтеза меланина и биохимических процессов при злокачественной меланоме. Известно, что система меланоцитов аналогична хромоаффинной системе, которая также является производной нервного гребня, а предшественником меланина и катехоламинов является тирозин. Только меланин образуется при окислении тирозина ферментом тирозиназой в дигидроксифенилаланин (ДОФА) в меланоцитах, а катехоламины – ферментом тирозингидроксилазой [Островский М.А. и соавт., 1985; Марри Р. И. соавт., 1993; Борщевская М.И. и соавт., 1999; Slominski A. et al., 1990; Slominski A. et al., 2000; Slominski A. et al., 2007].

Научные работы по исследованию меланоцитов на молекулярном уровне в норме и при патологии помогли предположить, что меланоциты – чувствительные и регулирующие клетки эпидермиса, и определить меланоцит как уникальную нейроэндокринную клетку с определенными функциями [Смирнов И.О. и соавт., 2005; Slominski A., 1993; Slominski A., 2001; Slominski A., 2009]. А. Slominski с коллегами в экспериментальных работах доказали, что меланоциты и меланобласты производят классические нейротрансмиттеры стресса, нейропептиды и гормоны при стимуляции ультрафиолетовым излучением, биологическими факторами и другими агентами, а также имеют возможность превратить L-триптофан в серотонин, N-ацетилсеротонин и мелатонин, которые действуют в пределах нейроэндокринной системы кожи, и что синтез данных молекул в пигментных клетках является иерархичной и следует алгоритмам классической нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [Смирнов И.О. и соавт., 2005; Slominski A. et al., 2000; Slominski A. et al., 2002; Slominski A. et al., 2007; Slominski A., 2009]. И учитывая тот факт, что по данным литературы отсутствуют адекватные методы ранней

диагностики меланомы, разработка последовательных количественных лабораторных анализов общего или индивидуального биосинтеза меланина и катехоламинов, их промежуточных метаболитов в плазме крови или в моче, могут быть полезны в разработке индивидуального плана ведения и лечения больных меланомой [Schwartz M.K., 1976; Scott R.E. et al., 1984; Matous V. et al., 1994].

Таким образом, злокачественная меланома с нейроэндокринной дифференцировкой должна быть признана в числе других, более известных вариантов злокачественной меланомы, т.к. это требует совершенно другой подход в диагностике и лечении заболевания. Поэтому требуется дальнейшее изучение онкогенеза меланомы кожи.

1.2.2. Нейротрансмиттеры симпатической нервной системы в процессах онкогенеза при меланоме

Обмен адреналина и норадреналина при злокачественных опухолях

Учитывая немногочисленность научных работ по изучению нейротрансмиттеров симпатической нервной системы при меланоме, целесообразно рассмотреть роль адреналина, норадреналина, дофамина и серотонина в процессах канцерогенеза при опухолях различной локализации.

Развитие и прогрессирование злокачественных опухолей зависит не только от биологических свойств опухоли, но и от функционального состояния определенных систем организма [Кавецкий Р.Е., 1977; Балицкий К.П., 1985; Лабунец И.Ф. и соавт., 1989; Балицкий К.П., 1991; Абрамов В.В. и соавт., 1996; Elenkov I.J. et al., 2000]. Участие нейроэндокринной системы в патогенезе опухолевого процесса интересовало ученых. Интерес к изучению нейротрансмиттеров обусловлен тем, что они принимают участие в большинстве физиологических и патофизиологических функциях организма, в адаптационных реакциях, принимают участие в формировании иммунной, антиоксидантной, антиметастатической

противоопухолевой резистентности организма [Балицкий К.П., 1983; Терещенко И.П., 1987; Уманский В.Ю. и соавт., 1990; Корнева Е.А., 1993; Fitzgerald P.J., 2012]. В последние годы в научной литературе публикуются доказательства, подтверждающие гипотезу, что дисбаланс в системе возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров влияет на развитие, прогрессирование и на результат проводимых профилактических мероприятий и терапии наиболее распространенных злокачественных опухолей [Schuller H.M., 2008; Fitzgerald P.J., 2012; Li S. et al., 2013]. Нейротрансмиттеры вегетативной нервной системы действуют как мощные регуляторы многочисленных функций клеток по выработке факторов роста, факторов ангиогенеза, факторов, способствующих метастазированию, а также провоспалительных цитокинов, нейротрансмиттеров опухолевыми клетками и окружающей опухоль микросредой. Они модулируют также пролиферацию, миграцию, апоптоз трансформированных клеток, неоангиогенез в опухоли, и тем самым вносят вклад в формирование и прогрессию злокачественных новообразований [Абрамов В.В. и соавт., 1998; Берштейн Л.М., 2000; Соловьева И.Г. и соавт., 2011; Франциянц Е.М. и соавт., 2013; Schuller H.M., 2008; Guo K. et al., 2009; Moreno-Smith M. et al., 2010; Tilan J. et al., 2010].

Функциональная активность внутренних органов и систем организма находятся под постоянным регулирующим влиянием центральной и вегетативной нервной системы, в том числе и при развитии злокачественных новообразований. Опухоли так же, как и органы, иннервируются нервными волокнами симпатической нервной системы. В ответ на физиологические, психологические факторы и факторы окружающей среды высвобождаются микромолярные концентрации нейротрансмиттеров в окружающие ткани, которые модулируют биологическое поведение новообразований [Меньшиков В.В., 1963; Остроумова М.Н., 1989; Абрамов В.В. и соавт., 1998; Егоров Д.Н. и соавт., 2006; Yang E.V. et al., 2006; Schuller H.M., 2008; Guo K. et al., 2009; Li S. et al., 2013]. Чрезмерный психический стресс вызывает у

человека высокое психоэмоциональное напряжение, которое сопровождается развитием депрессии. Депрессия предшествует и обуславливает возникновение новообразований [Балицкий Е.К. и соавт., 1987; Miller D.R., 1982]. По данным литературы, стресс и психосоциальное неблагополучие оказывают отрицательное влияние на работу и функциональное состояние нервной, эндокринной и иммунной систем [Miller D.R., 1982; Miller A.H. et al., 1991; Pennix V.W. et al., 1998; Lechin F. et al., 2002], что приводит к хроническому стрессу, преждевременному старению, нарушению эмоционально-психической сферы и иммунносупрессии, тем самым приводит к снижению противоопухолевой резистентности организма, способствует злокачественной трансформации, прогрессированию и худшим результатам лечения онкологических больных [Кавецкий Р.Е., 1977; Дильман В.М., 1983; Шапот В.С. и соавт., 1983; Остроумова М.Н., 1989; Харкевич Д.Д. и соавт., 1990; Терещенко И.П. и соавт., 1995; Абрамов В.В. и соавт., 1998; Акмаев И.Г., 1997; Берштейн Л.М., 2000; Li S. et al., 2013].

Наиболее лабильным элементом регуляции защитно-адаптационных процессов при развитии злокачественных новообразований является симпатико-адреналовая система, которая представляет собой эффекторное звено нейрогуморальной модуляции неспецифических противоопухолевых реакций [Уманский В.Ю. и соавт., 1990; Егоров Д.И. и соавт., 2006; Sloan E.K. et al., 2010]. Регулирующая функция симпатико-адреналовой системы осуществляется посредством выделения катехоламинов. Адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются в мозговом веществе надпочечников, симпатической и центральной нервной системе. Их биологическая активность заключается в способности воздействовать на функциональное состояние органов и систем, а также на интенсивность метаболических процессов в тканях [Меньшиков В.В., 1963; Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Самунджан Е.М., 1973; Смиронов В.М., 2001; Goldstein D.S., 2010]. Физиологические эффекты этих нейромедиаторов обусловлены их способностью связываться с адренорецепторами и через них воздействовать

на адренореактивные системы клеток [Смирнов В.М., 2001]. Адреналин (эпинефрин) является гормоном мозгового вещества надпочечников, синтезируется в хромоаффинных клетках из дофамина и норадреналина, проявляет преимущественно метаболические эффекты [Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Смирнов В.М., 2001]. Норадреналин (норэпинефрин) является вторым гормоном хромоаффинной ткани и медиатором симпатического отдела нервной системы. Плазменный норадреналин происходит из симпатических нервных окончаний, значительная его часть поглощается нейронами, а 10-20% норадреналина попадает в кровь. Только небольшая часть норадреналина в крови происходит из мозгового слоя надпочечников. Уровень норадреналина характеризует активность нейронов симпатической нервной системы [Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Самунджан Е.М., 1973; Косицкий Г.И., 1985; Смирнов В.М., 2001].

Научный интерес к медиаторам симпатической нервной системы в процессах канцерогенеза прослеживается в ранних работах отечественных ученых, которые выполнялись в 70-80-х годах XX века, о которых важно упомянуть.

В 70-80-х годах прошлого столетия отечественные исследователи для более полного представления о характере нарушения тонуса симпатико-адреналовой системы у онкологических больных изучали содержание катехоламинов в крови, в моче, в тканях опухоли и непораженной части этих органов, а также оценивали тонус симпатико-адреналовой системы у больных с использованием функциональных проб. Они отметили, что в процессе развития и распространения злокачественного роста происходит изменение в соотношении медиаторного и гормонального звеньев симпатико-адреналовой системы, нарушается внутриклеточный обмен. Это создает условия для развития функциональной десимпатизации ткани опухоли и организма в целом, что находит отражение в изменении тонуса симпатико-адреналовой системы у онкологических больных [Ойфе Г.Р., 1971; Шевелева В.С. и соавт., 1980; Шульга Н.И., 1980; Мельников Р.А. и

соавт., 1981; Филатова Н.А. и соавт., 1982; Клименко Е.В. и соавт., 1983; Тарутинов В.И. и соавт., 1984; Сафина М.Р., 1986]. По данным морфологических исследований установлено, что и нервные волокна, и их окончания при злокачественных опухолях претерпевают дистрофические изменения не только в области разрастания опухолевой ткани, но и вдали от нее. Это приводит к нарушению высвобождения нейротрансмиттеров. Кроме того, денервированная ткань поглощает катехоламины менее интенсивно, чем нормальная [Меньшиков В.В., 1963; Клименко Е.М. и соавт., 1983].

По результатам исследований Г.Р. Ойфе подчеркивает, что с прогрессированием ракового процесса происходят не только количественные изменения содержания адренолиноподобных веществ в периферической крови, но и в большей степени нарушается их соотношение [Ойфе Г.Р., 1971]. Соотношению адреналина и норадреналина придается большое значение в регулирующей роли симпатико-адреналовой системы. Известно, что избыточная часть катехоламинов экскретируется с мочой. Однако не всегда содержание катехоламинов в крови соответствует уровню их экскреции с мочой, что трактуется не только как повышенное выделение, но и как повышение потребления их тканями [Меньшиков В.В., 1963; Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Ойфе Г.Р., 1971; Lechin F. et al., 2002].

Д.М. Фатеев (2013) наблюдал повышение уровня адреналина и практически неизменный уровень норадреналина в крови больных раком почки. По его данным норадреналин-адреналиновый и дофаминовый коэффициенты больных раком почки достоверно не изменены от таковых здоровых людей. Это позволило сделать вывод о достаточной сбалансированности гормонального и медиаторного звена у данных больных [Фатеев Д.М., 2013]. При раке толстого кишечника Д.А. Харагезов (2006) наблюдал снижение уровня адреналина в плазме крови [Харагезов Д.А., 2006]. В отличие от этих авторов при меланоме кожи О.К. Трегулова отмечает у 85% больных дефицит норадреналина по концентрации его в суточной моче [Трегулова О.К., 2009].

Таким образом, данные ранних и современных работ отечественных исследователей об изменении содержания катехоламинов в опухоли, в крови и в моче у онкологических больных немногочисленны и, порой, противоречивы, но они свидетельствуют о нарушении их обмена.

По данным современной литературы, роль симпатической нервной системы в канцерогенезе или в опухолевой прогрессии изучалась на моделях рака молочной железы, желудка, поджелудочной железы, легкого, яичников, носоглотки и меланомы. Зарубежные исследователи пытаются на молекулярном уровне *in vitro* и *in vivo* на клеточных моделях проанализировать роль нейротрансмиттеров в патогенезе опухолевой прогрессии. Исследования в пробирке, проведенные коллективами ученых [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Sood A.K. et al., 2006; Thaker P.H. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2006] показали на примере рака яичников и рака носоглотки, что катехоламины (норадреналин и адреналин) могут влиять на прогрессирование опухоли путем модуляции экспрессии матриксных металлопротеиназ, ангиогенных цитокинов, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в опухолевых клетках, тем самым стимулируя инвазивность. В исследованиях на моделях рака молочной железы и рака легких у животных было показано увеличение метастазов при активации β -адренорецепторов, что приводило к усилению васкуляризации опухоли, то есть повышался уровень фактора роста эндотелия сосудов и других ангиогенных факторов [Ben-Eliyahu S. et al., 1991; Melamed R. et al., 2005; Armaiz-Pena G.N. et al., 2009; Guo K. et al., 2009].

Ангиогенез является сложным и строго регулируемым процессом, который имеет решающее значение для роста опухоли и метастазирования. Исследования, проведенные учеными на животных моделях меланомы, показывают, что процесс неоваскуляризации меланомы связан с высвобождением проангиогенных факторов, таких как: фактор роста эндотелия сосудов, интерлейкин-6, трансформирующий ростовой фактор (TGF- α и β) и фактор некроза опухоли (TNF- α) опухолевыми клетками,

которые вызывают активацию эндотелия, рост кровеносных сосудов и последующее распространение опухоли [Франциянц Е.М. и соавт., 2013; Mahabeleshwar G.H. et al., 2007; Li S. et al., 2013]. Ангиогенез также может быть стимулирован нарушением баланса между про- и антиангиогенными факторами. Фактор роста эндотелия сосудов является прямым фактором, который играет важную роль в эмбриогенезе, физиологическом ангиогенезе и неоваскуляризации злокачественных опухолей, стимулируя миграцию эндотелиальных клеток, пролиферацию и протеолитическую активность [Moreno-Smith M. et al., 2010]. Несмотря на успехи в понимании молекулярных механизмов канцерогенеза и наличия современных технологий для диагностики и лечения различных опухолей, наши знания о механизмах, лежащие в основе ангиогенеза меланомы и её метастазирования остаются в зачаточном состоянии [Mahabeleshwar G.H. et al., 2007].

Работы по исследованию нейротрансмиттеров при злокачественной меланоме активно начали появляться в публикациях последние 5-10 лет, однако данных определения нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи мы не встретили. Единственную работу по определению нейротрансмиттеров в моче больных меланомой кожи встретили в отечественной литературе в работе О.К. Тригуловой (2009). Зарубежные исследователи изучили на моделях клеточной линии человеческой меланомы влияние норадреналина через β_1 - и β_2 – адренорецепторы на экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкина-8 и интерлейкина-6, т.е. факторов, которые способствуют ангиогенезу и метастазированию. Бета - адренорецепторы служат связующим звеном в продуцировании ангиогенных факторов. В результате модуляции фактора роста эндотелия сосудов, матриксных металлопротеиназ (MMP-2 и MMP-9) и циклооксигеназы происходит инвазия опухолевых клеток и диссеминация процесса [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Yang E.V. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2009; Yang E.V., 2010].

S. Moretti с соавторами (2013) изучал экспрессию β - адренорецепторов в кожной меланоме на человеческой A375 первичной и Hs29-4T клеточных линиях метастатической меланомы и влияние на них эндогенных агонистов норадреналина и адреналина. Используя иммуногистохимию, они обнаружили, что оба β 1- и β 2- адренорецепторы выражены в тканях доброкачественных меланоцитарных невусах, атипичных невусах и значительно выражены в злокачественной меланоме. Доказали, что адреналин и норадреналин увеличивают выброс факторов ангиогенеза, и этот эффект был заторможен введением неселективного антагониста β -адренорецепторов - пропранололом. Их результаты показали, что норадреналин и адреналин модулируют в пробирке через активацию β -адренорецепторов ряд биологических реакций, которые могут оказать проонкогенный эффект в клеточных линиях меланомы. Эти наблюдения подтверждают гипотезу, что катехоламины норадреналин и адреналин путем активации ими рецепторов, способствуют прогрессии меланомы в естественных условиях [Moretti S. et al., 2013].

Таким образом, выше описанное дает право говорить о том, что нейротрансмиттеры норадреналин и адреналин играют немаловажную роль в канцерогенезе опухолей, в том числе и меланомы. Исходя из этого, зарубежные исследователи обратили внимание на то, что при хроническом использовании бета-блокаторов наблюдается снижение рецидивов, частоты прогрессирования и смертности от злокачественных новообразований на примере рака молочной железы, предстательной железы и злокачественной меланомы [Palm D. et al., 2006; Fitzgerald P.J. et al., 2012; Schuller H.M. et al., 2012]. Тем самым, β -блокаторы могут считаться новым адъювантом в существующей терапевтической стратегии [Li S. et al., 2013], т.е. это позволяет подумать о репозиционировании бета - блокаторов в онкологическую практику.

Обмен дофамина при злокачественных новообразованиях

Дофамин - медиатор симпатико-адреналовой системы, один из медиаторов возбуждения в синапсах центральной нервной системы, биосинтетический предшественник норадреналина и адреналина. Дофамин синтезируется в хромаффинных клетках тканей человека из диоксифенилаланина – ДОФА, действует через два типа рецепторов - D1 и D2. В периферических частях симпатического отдела нервной системы он составляет около половины общих катехоламинов [Меньшиков В.В., 1963; Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Смирнов В.М., 2001; Tilan J. et al., 2010]. Кроме того, дофамин обнаруживается в различных органах – печени, легких, кишечнике и имеет самостоятельное значение как биологически активное вещество, способное регулировать в организме трофические процессы на клеточном уровне [Утевский А.М. и соавт., 1977, по цит. Клименко Е.М. и соавт., 1983]. Исследование дофамина в плазме крови больных меланомой кожи в литературе мы не встретили, поэтому приведем результаты экспериментальных работ при других злокачественных опухолях.

Дофамин имеет противоположное, чем норадреналин и адреналин, воздействие на рост опухоли. Было показано, что введение дофамина тормозит рост различных опухолей, например: рака желудка, толстой кишки, рака молочной железы, нейробластомы, в том числе и меланомы [Wick M.M., 1980; Kubota R. et al., 1992; Chakroborty D. et al., 2004; Sarkar C. et al., 2008; Thaker P.H. et al., 2008; Armaiz-Pena G.N. et al., 2009; Tilan J. et al., 2010]. В опытах на мышах, которые были лишены транспортера дофамина, было показано, что в результате повышения уровня дофамина наблюдается снижение роста карциномы легких [Asada M. et al., 2008; Tilan J. et al., 2010]. По данным литературы имеются противоречивые данные о содержании дофамина в тканях опухоли. Отечественные авторы отмечают некоторое повышение содержания дофамина в опухолевой ткани желудка и уменьшение его в опухолевой ткани кишечника [Клименко Е.М. и соавт.,

1983]. Но по данным зарубежных авторов при раке желудка уровень эндогенного дофамина в опухоли ниже, чем в окружающих здоровых тканях, что дало им основание предположить, что медиатор выступает в качестве эндогенного подавления роста опухоли [Chakroborty D. et al., 2004; Tilan J. et al., 2010]. Так при раке толстого кишечника исходно снижен уровень дофамина в плазме крови [Харагезов Д.А., 2006], при раке почки, напротив, уровень дофамина - повышен [Фатеев Д.М., 2013]. При раке желудка, пищевода и меланомы кожи с прогрессированием процесса угнетается функция симпатико-адреналовой системы, которая проявляется снижением суточной экспрессии диоксифенилаланина (ДОФА), дофамина [Тарутинов В.И. и соавт., 1984; Тригулова О.К., 2009]. Ингибирующее влияние на опухоль дофамин реализует через прямое антиангиогенное действие на эндотелиальные клетки. И во всех моделях рака на животных применение дофамина показало значительное снижение васкуляризации опухоли [Chakroborty D. et al., 2004; Asada M. et al., 2008; Sarkar C. et al., 2008; Armaiz-Pena G.N. et al., 2013]. Дофамин блокирует фактор роста эндотелия сосудов - индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников, миграцию и проницаемость сосудов. Следовательно, можно говорить об участии дофамина в процессах неоваскуляризации опухоли [Tilan J. et al., 2010; Armaiz-Pena G.N. et al., 2013]. В отличие от норадреналина и адреналина, действующие на конкретные опухоли, эффекты дофамина более универсальны. Он влияет на различные типы опухолей через прямое действие на эндотелиальные клетки и эндотелиальные клетки-предшественники [Tilan J. et al., 2010]. Таким образом, дофамин и агонисты рецепторов дофамина могут стать привлекательными антиангиогенными препаратами в терапии злокачественных новообразований.

Роль серотонина при злокачественных опухолях

Серотонин (5-окситриптамин) – это биогенный амин, производный аминокислоты триптофана, один из основных нейромедиаторов в ЦНС, участвует в формировании поведенческих актов, самообладании и эмоциональной устойчивости, контролирующий аппетит, сон [Смирнов В.М., 2001; Изаате-Заде К.Ф. и соавт., 2004; Nemeroff С. et al., 2009]. Наибольший интерес к серотонину был в 60-70-е годы прошлого века, о чем свидетельствуют научные публикации. Сообщения отечественных и зарубежных ученых, посвященные изучению влияния серотонина на опухолевый рост и его содержанию в крови и в опухолевой ткани при раке различных локализаций немногочисленны и противоречивы. Так, при раке легких отмечается как увеличение серотонина в крови [Дубилей П.В и соавт. 1971, цит. по Филатовой Н.А., 1986], так и отсутствие достоверных различий по сравнению со здоровыми донорами [Crowford N. 1965, цит. по Филатовой Н.А., 1986]. При раке желудка наблюдали как увеличение [Подильчак М.Д. и соавт. 1970, цит. по Филатовой Н.А. 1986], так и уменьшение содержания серотонина в крови [Агаев Б.А. и соавт., 1977]. Б.А. Агаев (1977) не нашел четкой зависимости уровня серотонина в крови со стадией заболевания, а также структурой опухоли [Агаев Б.А. и соавт., 1977]. Содержание серотонина в периферической крови больных раком легкого повышено по сравнению со здоровыми лицами в 2,5 раза, после радикальной операции на легком уровень серотонина в крови снизился в 2 раза, приближаясь к норме [Булыгина А.В. 1973]. На большом экспериментальном материале доказано, что серотонин обладает выраженным противоопухолевым действием, изменяя кислородный режим нормальных и опухолевых клеток, т.е. создает условия аноксии в ткани опухоли в течение длительного времени [Пухальская Е.Ч., 1960; Винницкий В.Б., 1970], а также влияет на функции некоторых эндокринных желез не только прямым

действием, но и через центральные механизмы [Иззати-Заде К.Ф. и соавт., 2004].

Первая публикация о выработке серотонина в злокачественной меланоме появилась в зарубежной литературе в конце 70-х годов, когда Horai T. (1979) с соавторами опубликовал данные о высокой концентрации серотонина в опухолевой ткани метастаза злокачественной меланомы в легком [Horai T. et al., 1979]. Встретили единичные работы современных авторов. По их данным клетки меланомы человека синтезируют и метаболизируют широкий спектр биогенных аминов, в том числе и серотонин [Mc Ewan M. et al., 1987; Slominski A., 2002].

На сегодня в клинической практике определение уровня серотонина в периферической крови наиболее информативно при злокачественных новообразованиях желудка, кишечника и легких, при которых данный показатель превышает норму в 5-10 раз [Горбунова В.А. и соавт., 2007]. Исследований по определению концентрации серотонина в периферической крови больных меланомой на сегодня в литературе не встретили.

Анализируя данные научной литературы, прослеживаем идею, что при опухолевом процессе происходит дисбаланс нейротрансмиттеров и их метаболитов. Это заставляет подробно изучать все механизмы стимулирующего и тормозного влияния нейротрансмиттеров на онкогенез меланомы, что в будущем позволит использовать их как в качестве диагностических биомаркеров, так и мишеней для терапии.

1.2.3. Хронический стресс, нейротрансмиттеры и злокачественные опухоли

Исследование нейротрансмиттеров в периферической крови больных меланомой, так или иначе, затрагивает вопросы стресса, а именно хронического стресса в развитии и прогрессировании злокачественного процесса.

Стресс является неизбежным элементом нашей жизни. Стрессовые события активируют симпатическую нервную систему и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, что приводит к высвобождению биохимических медиаторов стресса, таких как, катехоламины, нейропептиды, глюкокортикоиды [Селье Г., 1979; Saul A.N. et al., 2005; Thaker P.H. et al., 2008; Tilan J. et al., 2010]. Работы американских ученых на клеточных моделях рака предстательной железы и рака молочной железы доказали, что адреналин, выделяемый надпочечниками и нервными окончаниями симпатической нервной системы в ответ на стресс, снижает чувствительность раковых клеток к апоптозу, через взаимодействие с β_2 -адренорецепторами, тем самым способствует развитию опухоли и терапевтической резистентности. Этот антиапоптотический эффект может быть активирован в диапазоне уровня адреналина, наблюдаемого в ответ на эмоциональный стресс [Sastry K.S. et al., 2007]. В своих исследованиях Е.К. Sloan с соавт. показал, что стресс активизирует процесс метастазирования в отдаленные органы, но мало влияет на первичную опухоль [Sloan E.K. et al., 2010].

Хронический стресс сопровождает онкологических больных и часто вызывает депрессию и плохое настроение. Еще в XIX веке Г. Селье писал о том, что рак - это хронический некомпенсированный стресс [Селье Г., 1972, Селье Г., 1979]. В экспериментах на животных было показано влияние хронического стресса на развитие и прогрессирование опухоли через ослабление иммунной реакции, т.е. был предложен стресс-индуцированный механизм подавления иммунитета [Saul A.N. et al., 2005; Godbout J.P., 2006; Dhabhar F.S., 2009; Dhabhar F.S. et al., 2010]. Согласно данным многочисленных исследований, хронический стресс повышает ангиогенез путем активации симпатической нервной системы и высвобождения нейротрансмиттеров, которые регулируют экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и интерлейкина-6 [Thaker P.H. et al., 2008;

Armaiz-Pena G.N. et al., 2009; Moreno-Smith M. et al., 2010; Tilan J. et al., 2010; Li S. et al., 2013].

Стресс - это сложный процесс, способствующий прогрессии опухоли через активацию симпатико-адреналовой системы, путем модуляции экспрессии проангиогенных и прометастатических факторов [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Sood A.K. et al., 2006; Thaker P.H. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2008]. L. Temoshok с соавт. (1985) в своих клинических испытаниях определили, что стресс как ко-фактор способствует опухолевой прогрессии меланомы [Temoshok L. et al., 1985]. Такую связь между поведением и прогрессией меланомы были описаны F.L. Fawzy и его коллегами [Fawzy F.L. et al., 1993; Fawzy F.L. et al., 2003]. Они обнаружили, что психологическая помощь, оказанная больным меланомой, уменьшает эмоциональное волнение, повышает эффективность проводимой терапии, тем самым благотворно влияет на течение меланомы и повышает выживаемость [Cohen S. et al., 1998; Yang E.V. et al., 2009]. Следует отметить, что гипотеза влияния психологического стресса на прогрессию меланомы подкрепляется исследованиями на опухолевой модели меланомы B16 у мышей. У мышей, которые находились в переполненном пространстве или в изоляции, наблюдалось увеличение роста опухоли, который был полностью остановлен пероральным введением β -адреноблокатора - пропранолола [Yang E.V. et al., 2009].

Исследования в области психонейроиммунологии показали, что психологический стресс и депрессия могут повлиять на многие аспекты клеточного иммунного ответа. Известно, что при дисфункции нейроэндокринной системы подавляется цитотоксическая активность Т-клеток, НК – клеток и нарушается презентация антигена [Меерсон Ф.З. и соавт., 1985; Ben-Ellyahu S. et al., 2000; Moreno-Smith M. et al., 2010; Li S. et al., 2013]. Также в литературе появляются работы по изучению влияния медиаторов на функционирование иммунной системы в регулировании миграции лейкоцитов и опухолевых клеток, влияют на формирование

T-хелперов, стимулирую их функциональную активность [Репина В.П., 2008; Elenkov I.J., 2000; Drell T.L. et al., 2003]. Миграция лейкоцитов имеет первостепенное значение для противоопухолевого иммунного ответа, в то время миграция опухолевых клеток является необходимым условием для распространения и развития метастазов [Entschladen F. et al., 2004; Yang E.V. et al., 2009; Moreno-Smith M. et al., 2010].

Согласно данным литературы, многие типы рецепторов нейромедиаторов имеются на опухолевых клетках, а при хроническом стрессе происходит активация рецепторов в злокачественно трансформированной клетке и её микроокружении через специфические сигнальные пути, что приводит к росту и прогрессии опухоли. Все это поддерживает теорию о роли психологических факторов в прогрессировании рака, поэтому в последние годы развиваются такие направления в медицине как психоонкология и онкопсихология.

Разработка новых подходов к проблеме стресса, изучение его влияния на биологию роста и метастатический процесс позволят открыть новые подходы в лечении злокачественной меланомы, что будет иметь важное клиническое значение [Entschladen F. et al., 2004; Yang E.V. et al., 2009; Li S. et al., 2013]. Поэтому актуальной задачей на сегодня является изучение обмена нейротрансмиттеров у больных меланомой.

1.3. Белок S100B и хромогранин А в диагностике меланомы кожи

По данным отечественных и зарубежных авторов, пациенты с начальной стадией заболевания без клинически значимых метастазов уже имеют микрометастазы и риск раннего рецидива [Леончук А.Д., 1990; Вагнер Р.И. и соавт., 1996; Курдина М.И. и соавт., 1996; Анищенко И.С. и соавт., 2003; Кукушкина М.Н. и соавт., 2012; Ranieri J.M. et al., 2006; Ellis M.S. et al., 2010], поэтому важно выделить этих пациентов для адъювантной терапии. Таким образом, существует потребность в серологических маркерах, которые могли

бы указать, имеются ли у первичной меланомы метастазы в регионарных лимфатических узлах или отдаленных органах, и принять правильное решение о тактике проводимой терапии [Liu S. et al., 2008; Haass N.K. et al., 2009].

В клинической практике используют около двух десятков онкомаркеров, обладающих достаточной диагностической значимостью и рекомендованных к использованию группами экспертов различных стран. Но даже такие рекомендации по использованию маркеров остаются иногда противоречивыми [Сергеева Н.С. и соавт., 2011].

Без использования чувствительных инструментов мониторинга крайне тяжело предсказать характер развития рецидивов и устойчивость к химио-, иммуно- и лучевой терапии, что является наиболее актуальным при злокачественной меланоме.

Меланома является метаболически активной опухолью, экспрессирующей различные ферменты, цитокератины и другие биологически активные молекулы, поступающие в кровоток. В зарубежной литературе нет единого мнения об эффективности того или иного биомаркера злокачественной меланомы. Все они являются взаимодополняющими [Li N. et al., 2002; Faries M.V., 2007].

Перспективным прогностическим онкомаркером при меланоме в настоящее время рассматривается белок S100B, при нейроэндокринных опухолях – хромогранин А. В диагностике меланомы содержание хромогранина определяют в патоморфологической практике при проведении дифференциальной диагностики. Белок S100B и хромогранин А, с морфологической и серологической точки зрения, представляют большой научный интерес, в связи с дифференцированной экспрессией в нормальных и опухолевых тканях, участием в метастатическом процессе, во внутриклеточных и внеклеточных функциях клетки, а также, в связи с взаимодействием с нейротрансмиттерами, влияя на весь организм в целом [Шг Е.С. et al., 1996].

1.3.1. Биохимическая структура, функции белка S100 и его применение в клинической практике

Белок S100 – это группа уникальных кислых кальций-связывающих белков (молекулярная масса 21 кДа), содержащихся в клетках и тканях нейроэктодермального происхождения [Abraha H.D. et al., 1997; Miwa N. et al., 2008; Smit L.H.M. et al., 2008]. Впервые выделен из мозга крупного рогатого скота в 1965 году В.W. Moore, и назван «S100» из-за растворимости в 100% насыщенном растворе сульфата аммония при нейтральном значении pH [Сергеева Н.С. соавт., 2008; Fritz G. et al., 2010].

Высокая экспрессия S100 установлена в глиальных, шванновских клетках, меланоцитах, и эта экспрессия усиливается в опухолях, развивающихся из этих клеток: астроцитоме, параганглиоме, шванноме и при злокачественной меланоме [Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Evelen C.I. et al., 1996; Mocellin S. et al., 2008; Ohsie S.J. et al., 2008; Smit L.H.M. et al., 2008; Petersson S. et al., 2009]. В клетке белок S100 находится в виде димеров, преимущественно диффузно в цитоплазме, а также в синаптической мембране и хроматине [Jackel A., 1999; Santamaria-Kisiel L. et al., 2006; Fritz G. et al., 2010]. По меньшей мере, 25 различных белков, относящихся к семейству S100, образуют самую большую группу EF-hand сигнальных белков. Из них гены 21 (S100A1-S100A18, trichohylin, filaggrin, repetin) сгруппированы в хромосоме 1g21, который часто подвержен удалению и перестановке [Evelen C.I. et al., 1996; Santamaria-Kisiel L. et al., 2006; Miwa N., 2008; Fritz G. et al., 2010; Leclerc E., 2011].

Изучением физиологических функций белков S100 более активно занимаются зарубежные ученые, в основном *in vitro*, на клеточных и животных моделях, но до сих пор знания о них ограничены. Не до конца ясна роль белков S100 в процессах канцерогенеза, в опухолевой прогрессии и метастазировании при меланоме и других типах опухолей [Weterman M.A., 1993].

Проведенные исследования позволили рассматривать белки S100 в качестве одного из узловых молекулярных компонентов сложных внутриклеточных систем, обеспечивающих функциональный гомеостаз клеток путем участия в регуляции практически всех основных мембранных, цитоплазматических и ядерных метаболических процессов, а также в реализации генетических программ апоптоза и антиапоптозной защиты [Maeldansmo G.M., 1997; Miwa N., 2008]. По данным литературы, белок S100 участвует в разнообразных внутриклеточных и внеклеточных процессах, таких как: регуляция пролиферации, контроль клеточного цикла, энергетический обмен, гомеостаз кальция, активность ферментов, клеточный рост, апоптоз, подвижность и дифференцировка, фосфорилирование белков, участие в механизмах врожденного и приобретенного иммунного ответа, в миграции клеток и хемотаксисе лейкоцитов, активации макрофагов и модуляции пролиферации клеток, связывая их с процессами воспаления и канцерогенеза [Donato R., 2003; Banfalvi T. et al., 2004; Santamaria-Kisiel L. et al., 2006; Bolandera A. et al., 2008; Fritz G. et al., 2010; Palmer S.R. et al., 2011; Donato R. et al., 2013; Halawi A., 2014]. Кроме того, в экспериментах на культуре клеток меланомы было показано, что функциональная роль белка S100 при меланоме осуществляется благодаря способности взаимодействовать с белком p53 и активации ядерных протеинкиназ, участвующих в выживании и пролиферации клеток [Donato R., 2001; Mocellin S. et al., 2008; Weide B., 2012]. В настоящее время научные работы ведутся по исследованию и разработке ингибиторов S100-p53 взаимодействия [Mocellin S. et al., 2008; Leclerc E., 2011].

В 1988 году в качестве потенциального онкомаркера при меланоме белок S100B впервые был описан O.C. Fagnart и соавт., которые обнаружили аномально высокий уровень белка у 9 из 11 пациентов с метастатической меланомой [Fagnart O.C. et al., цит. по Gogas H. et al., 2009]. Первое исследование клинической значимости сывороточного S100B при меланоме было опубликовано только в 1995 году. В данном исследовании оценивали

126 пациентов и диагностировали в сыворотке S100B у 1,3%, 8,7% и 73,9% пациентов с I - II, III и IV стадиями заболевания соответственно. В четырех крупных исследованиях также было продемонстрировано повышение белка S100B у 4-9% пациентов с I – II стадией, 8-9% пациентов с III и у 48-89% с IV стадией заболевания [Von Schoultz E., 1996; Berking C., 1999; Kaskel P., 1999; Ghanem G., 2001], предполагая положительную корреляцию со стадией заболевания [Bonfrer J.M., 1997; Hamberg A.P., 2003]. Таким образом, с 90-х годов XX века начался период активного изучения белка S100B в качестве диагностического и прогностического маркера для меланомы.

В большинстве научных отчетов зарубежных исследователей поддерживается прогностический потенциал белка S100B при меланоме. Накопленные результаты свидетельствуют о потенциальной роли сывороточного белка S100B как перспективного прогностического маркера для ранней диагностики рецидива и метастатического процесса [Сергеева Н.С. и соавт., 2007; Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Martenson E.D. et al., 2001; Banfalvi T. et al., 2002; Bottoni U. et al., 2003; Andres R. et al., 2004; Domingo-Domenech J. et al., 2005; Mocellin S. et al., 2008; Tarhini A.A. et al., 2008; Wevers K.P. et al., 2013]. В большинстве исследований сообщается о значимой корреляции между значением S100B и выживаемостью пациентов, и большинство из них продемонстрировало, что S100B является независимым прогностическим фактором при многофакторном анализе [Bolander A. et al., 2008; Mocellin S. et al., 2008; Tarhini A.A. et al., 2008].

Клинические исследования показали, что значение белка S100B в сыворотке может играть большую роль при диспансеризации пациентов с меланомой [Domingo-Domenech J., 2007; Peric B., 2011]. Устойчивый рост концентрации белка S100B в сыворотке крови свидетельствует о прогрессировании меланомы, особенно при III и IV стадиях [Сергеева Н.С., 2008; Brochez L. et al., 2000; Bottoni U. et al., 2003; Andres R. et al., 2004; Wevers K.P. et al., 2013]. При регулярном его определении в сыворотке крови у больных меланомой он может быть полезным диагностическим

инструментом для обнаружения на ранних этапах больных с бессимптомным течением метастатического процесса, а также позволяет, как можно раньше провести инструментальную диагностику метастатического очага. Повышение концентрации в сыворотке S100B предшествует обнаружению метастазов меланомы на несколько недель [Jury C.S., 2000]. Существует очень сильная корреляция между значениями сывороточного S100B и общей опухолевой нагрузкой [Buer J., 1997; Henze G., 1997; Ghanem G. et al., 2001; Tarhini A.A. et al., 2009], что послужило толчком включить в качестве прогностического маркера S100B в AJCC систему стадирования меланомы при IV стадии [Andres R., 2004; Balch C.M. et al., 2009; Gogas H. et al., 2009; Leclerc E., 2011]. Также в литературе встречаются данные, что концентрация S100B коррелирует с толщиной опухоли по Бреслоу [Abraha H.D. et al., 1997; Bolandera A. et al., 2008], и существуют рекомендации определения сывороточного белка S100B у пациентов с меланомой толщиной инвазии по Бреслоу более 1 мм каждые 3-6 месяцев [Dummer R., 2005; Garbe C., 2007; Garbe C. 2008; Kluger H.M. et al., 2011]. Повышение уровня S100B в сыворотке периферической крови является специфичным (91%) и чувствительным (82%) т.е. клинически значимым маркером прогрессирования меланомы [Abraha H.D., 1997; Jury C.S. et al., 2000; Andres R., 2008; Oberholzer P.A. et al., 2008]. При оценке комбинации сывороточного S100B и других прогностических факторов, например толщина по Бреслоу, повышается чувствительность и специфичность на наличие метастатического процесса соответственно до 91% и 95%, [Abraha H.D., 1997].

Важно отметить, что ученые продолжают доказывать диагностическую роль белка S100B и определять ценность при прогнозе меланомы и мониторинге эффективности проводимой терапии. В проводимых исследованиях все чаще констатируется, что S100B является независимым прогностическим фактором. По мнению ряда исследователей, S100B дает возможность предсказать продолжительность жизни пациентов с меланомой,

а также при неэффективности лечения сменить тактику лечения, что важно как для больного, так и с экономической точки зрения [Harpio R., 2004; Domingo-Domenech J., 2007; Schiltz P.M., 2008; Smit L.H.M., 2008].

Несмотря на многочисленные работы по потенциальной ценности определения белка S100B при меланоме, он до сих пор не внедрен в рутинную клиническую практику для диагностики и мониторинга эффективности терапии меланомы. Возможно, это связано, во-первых, с тем, что повышенный уровень белка является неспецифическим, т.к. аномально повышенный уровень белка S100 диагностируется при различных онкологических заболеваниях: колоректальном раке, раке желудка и поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме и раке легкого, астроцитоме и глиобластоме, а также при нейродегенеративных расстройствах (болезнь Альцгеймера), черепно-мозговой травме и инсульте головного мозга, при воспалительных и аутоиммунных, почечных, печеночных заболеваниях, остром инфаркте миокарда и ишемической болезни сердца [Banfalvi T., 2004; Petersson S. et al., 2009; Fritz G. et al., 2010]. Во-вторых, исследования проводились на небольших выборках и при неоднородности стадий заболевания [Mocellin S. et al., 2008]. В-третьих, концентрация S100B не предсказывает наличие микрометастазов в сторожевых лимфатических узлах первичной меланомы [Andres R. et al., 2004; Palmer S.R. et al., 2011].

Несмотря на противоречивые данные, белок S100B является основным и наиболее изучаемым биомаркером при меланоме. Возможно, его диагностическая ценность возрастет при совместном определении комплекса биомаркеров.

1.3.2. Хромогрин в диагностике нейроэндокринных опухолей

Хромогрин А (CgA) - белок, присутствующий в различных количествах в крови онкологических больных [Colombo V. et.al., 2002; Borges R. et.al., 2010; Dondossola E. et.al., 2012].

Семейство хромогранина (или гранины) представляют собой водорастворимые кислые гликопротеины, хранящиеся в секреторных гранулах вместе с гормонами и нейропептидами в эндокринных и нейроэндокринных клетках [Hendy G.N. et al., 1995; Nobels F.R. et al., 1998; Taupenot L., et al. 2003; Corti A., 2010; Elias S. et al., 2010; Louthan O., 2011; Giovinazzo F., 2013]. Хромогранин А является основным членом семейства гранинов, был обнаружен Р. Banks and К. Helle в середине 60-х годов XX века совместно с катехоламинами в адреномедулярных клетках [O'Connor D.T. et al., 2002; Borges R. et al., 2010]. Хромогранин А – белок с молекулярной массой 48 кДа, термостойкий, в физиологических условиях концентрируется и хранится в матрице больших плотных секреторных гранул хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечника, которые хранят пептидные гормоны, а также в секреторных пузырьках симпатических нервов, содержащих катехоламины [Colombo V. et al., 2002; Louthan O., 2011; Giovinazzo F. et al., 2013]. Хромогранин является предшественником для биологически активных пептидов, таких как pancreastatin, vasostatin-1, vasostatin-2, parastatin, catestatin, chromostatin и другие [Сивков А.В. и соавт., 2012; Borges R. et al., 2010; Louthan O., 2011; Giovinazzo F. et al., 2013], контролирующих спектр физиологических процессов соответствующих эндокринных органов.

Хромогранины участвуют в многочисленных внутриклеточных и внеклеточных биологических процессах, хотя их биологическая роль еще не полностью выяснена [Сивков А.В. и соавт., 2012; Colombo V. et al., 2002; Ferrero E. et al., 2004; Louthan O., 2011]. По данным зарубежных и отечественных авторов, внеклеточная биологическая активность хромогранина проявляется в виде: аутокринно-паракринного регулятора в секреторных процессах, модулятора процессинга гормональных пептидов, т.е. оказывает влияние на синтез, комплектацию и секрецию пептидных гормонов и их предшественников, нейротрансмиттеров и факторов роста, в связывании кальция и регулировании потока кальция, а также в связывании

катехоламинов [Липатенкова А.К. и соавт., 2013; Hendy G.N. et al., 1995; Colombo B. et al., 2002; Helle K.B. et al., 2007; Louthan O., 2011]. Хромогранины ингибируют секрецию катехоламинов в мозговом веществе надпочечников [Elias S., 2010; Louthan O. 2011]. При активации симпатико-адреналовой системы хромогранин А высвобождается совместно с катехоламинами путём экзоцитоза из пузырьков клеток мозгового вещества надпочечника и симпатических нервных окончаний. Уровень хромогранина А коррелируется с уровнем норадреналина при симпатической стимуляции и с уровнем адреналина во время стимуляции мозгового вещества надпочечника, однако эта корреляция не имеет значения в состоянии покоя. Хромогранин А увеличивается во время интенсивных стимуляций, например, физических нагрузок или стресса, но значения не превышают верхней границы нормы. По данным R. Borges и соавт., хромогранины функционально взаимодействуя с катехоламинами, моделируют ключевые физиологические функции, такие, как липолиз и артериальное давление [Borges R., 2013]. Таким образом, образуемые при внеклеточном и внутриклеточном протеолитическом процессинге хромогранина А пептиды принимают участие во многих физиологических реакциях организма, и тщательное изучение взаимодействия хромогранина с катехоламинами поможет раскрыть новые механизмы влияния нейротрансмиттеров на различные процессы в организме и, тем самым, разработать новые подходы к диагностике и лечению онкологических заболеваний.

Хромогранин А рассматривается в качестве основного неспецифического маркера нейроэндокринных опухолей. На уровень хромогранина в крови могут влиять различные факторы или патологические состояния. Существенное повышение наблюдается при раке молочной железы, медуллярном раке щитовидной железы, мелкоклеточном раке легкого, феохромоцитоме, а также при лечении ингибиторами протонной помпы или блокаторами H₂ - рецепторов, при хроническом атрофическом гастрите (тип А), нарушении функции почек, при раке предстательной

железы и аденоме простаты, ревматоидном артрите с высоким уровнем ревматоидного фактора. Изменение концентрации хромогранина А наблюдается при воспалительных заболеваниях кишечника (болезнь Крона), нарушении функции печени, лечении гипертонической болезни, при сердечной недостаточности, беременности [Сайнога Т.В. и соавт., 2011; Glinicki P. et al., 2010; Louthan O. 2011; Corti A., 2012; Dondossola E. et al., 2012; Giovinazzo F. et al., 2013].

Содержание хромогранина А в нейроэндокринной ткани варьирует в зависимости от типа ткани. Богаты хромогранином А центральная и периферическая нервная система, гипофиз и парашитовидные железы [Louthan O., 2011]. Хромогранин А принимает участие в развитии некоторых психических и неврологических заболеваний, таких как: шизофрения, эпилепсия, нейродегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофической склероз и др.) [Borges R., 2013].

Определение хромогранина А имеет большое значение в дифференциальной диагностике нейроэндокринных опухолей, особенно если опухоль не может синтезировать достаточное количество других гомонов или уровень других маркеров, например катехоламинов и серотонина, при различных состояниях организма быстро меняются и постоянно колеблются [Colon J.M., 2009]. Чувствительность и специфичность плазматических уровней хромогранина А при различных нейроэндокринных заболеваниях варьирует от 70 до 95%. Наиболее высокие уровни гранинов наблюдаются при опухолях с выраженной секреторной активностью. Однако хромогранины обнаруживаются и при несекретирующих нейроэндокринных опухолях, что особенно важно для ранней диагностики их скрытой функциональной активности [Липатенкова А.К. и соавт., 2013]. Таким образом, хромогранин достаточно надежный опухолевый маркер нейроэндокринных новообразований по нескольким причинам: удовлетворительная чувствительность и специфичность, увеличение при функционально и нефункционально активных опухолях и их метастазах,

независим от их расположения, и уровень хромогранина коррелирует с общей массой опухоли [Corti A., 2010; Louthan O., 2011].

Аномальная секреция хромогранина А нейроэндокринными опухолями, по данным В. Colombo и соавт. (2002), может влиять на опухолевый рост и морфогенез [Colombo V. et al., 2002]. Хромогранин А и его фрагменты принимают участие в регулировании клеточной адгезии [Ratti S. et al., 2000], т.е. хромогранин так или иначе участвует в процессе прогрессирования нейроэндокринных опухолей [Louthan O., 2011]. Потенциал опухолевой клетки к метастазированию зависит от его взаимодействия с гомеостатическими факторами, которые способствуют росту опухолевой клетки, ангиогенезу, инвазии и метастазированию [Fidler I.J., 2003]. На основании результатов исследований, проведенных в пробирке, в естественных условиях и на животных моделях рака молочной железы, рака толстой кишки и меланомы было показано, что опухолевые клетки после экскурсии за пределами их места происхождения приобретают более агрессивный фенотип, который способствует ускорению роста опухоли, ангиогенезу и метастатическому процессу [Kim M.Y. et al., 2009; Corti A., 2010; Comen E. et al., 2012; Dondossola E. et al., 2012]. Кроме того, по данным Р. Khanna и соавторов (2010), опухолевые клетки секретируют факторы, облегчающие их миграцию через эндотелиальные клетки [Khanna P. et al., 2010]. На основе этих данных, Е. Dondossola и соавторы (2012) предположили, что факторы, которые регулируют эндотелиальный барьер в опухоли и в нормальных тканях также могут регулировать самосев и распространение опухоли [Dondossola E et al., 2012].

В экспериментальных работах разного времени зарубежные исследователи показали, что хромогранин А улучшает барьерную функцию эндотелия в нормальных тканях и уменьшает проницаемость кровеносных сосудов, которая имеет большое значение для миграции опухолевых клеток от опухоли в кровь и наоборот [Ferrero E. et al., 2000; Helle K.B. et al., 2007; Dondossola E. et al., 2012]. По данным исследований, проведенных *in vitro*,

хромогранин А и его NH₂ – концевые фрагменты (вазостатин-1) регулируют адгезию фибробластов и гладкомышечных клеток, тем самым ингибируют образование зазора в эндотелиальных клетках и проницаемость для макромолекул. Другие фрагменты ингибируют секрецию гормонов, таких, как: инсулин, паратгормон и катехоламины из нейроэндокринных клеток [Colombo B. et al., 2002; Ferrero E. et al., 2004; Blois A. et al., 2006; Corti A., 2010; Corti A. et al., 2012]. Таким образом, в экспериментальных работах *in vitro* и на моделях аденокарциномы молочной железы и меланомы B16-F10 наблюдали ухудшение трансэндотелиальной миграции опухолевых клеток за счет прямого воздействия хромогранина на эндотелиальные клетки и косвенно, за счет снижения уровня воспалительных цитокинов и хемокинов в опухолевой ткани [Dondossola E. et al., 2012].

Таким образом, результатом экспериментального исследования, проведенного E. Dondossola и соавторами (2012), является то, что хромогранина А может играть роль в регуляции ангиогенеза опухоли, в формировании структуры сосудистой системы и проницаемости, т.е. регулировать рост и распространение опухолевых клеток, а также влиять на результаты проводимой специализированной терапии. Эти результаты показывают, что разработка и применение препаратов, которые прямо или косвенно будут улучшать барьерную функцию эндотелия, снижать разнонаправленную миграцию злокачественных клеток в опухолях и в нормальных тканях, будут способствовать снижению прогрессирования заболевания у онкологических больных [Dondossola E. et al., 2012].

Таким образом, благодаря развитию молекулярно-генетических и инновационных технологий в медицине ученые все глубже пытаются проникнуть в сложнейшие механизмы канцерогенеза, в том числе меланомы, раскрыть причины её возникновения, развития и прогрессирования, а также понять малую эффективность лечения, а иногда и толерантность к проводимой химио-, иммуно- и лучевой терапии.

Меланома кожи - гетерогенное заболевание, морфологически и клинически примеряющая маски различных опухолей, поэтому характеризуется непредсказуемостью клинического течения, агрессивностью и высокой смертностью. Нейротрансмиттеры, S100 кальций связывающие белки и хромогранин А все больше становятся потенциально важными молекулами в ключевых молекулярных процессах, а значит, в этиологии и патогенезе, а также в механизмах прогрессии меланомы. Возможно, они станут и новыми мишенями терапевтического воздействия. Поэтому актуальность исследования нейротрансмиттеров, белка S100B и хромогранина А не вызывает сомнений.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика клинических наблюдений

Мы располагаем наблюдениями над 126 больными меланомой кожи (МК), поступившими в хирургическое отделение №3 ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» Республики Марий Эл и онкологическое отделение №3 ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Республики Татарстан, до начала специализированного противоопухолевого лечения. Критерии включения в исследование были следующие: пациенты с диагнозом меланома кожи, выявленные впервые, пациенты с верифицированным диагнозом меланома кожи без рецидива и с рецидивом заболевания, пациенты обоих полов в возрасте старше 18 лет, информированное письменное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из исследования: пациенты в период обострения хронических воспалительных заболеваний, наличие тяжелой соматической патологии (декомпенсированные цирроз печени, сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания; аутоиммунные заболевания, хроническая почечная недостаточность и т.д.), пациенты с первично-множественными злокачественными опухолями, прием лекарственных средств, действующих преимущественно на ЦНС и на периферические нейромедиаторные процессы.

Больные были разделены на три группы. Распределение больных меланомой кожи представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение больных меланомой кожи

Число больных	Группы больных меланомой кожи			
	Первичные больные МК (I группа)	Больные с рецидивом МК (II группа)	Больные без рецидива МК (III группа)	Всего
Абс.	53	30	43	126
%	42,1	23,8	34,1	100

Распределение больных меланомой кожи по полу представлено в таблице 2.

Таблица 2

Распределение больных меланомой кожи по полу

Группа больных	Мужчины		Женщины		Оба пола	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I группа	18	34	35	66	53	42,1
II группа	10	33,3	20	66,7	30	23,8
III группа	16	37,2	27	62,8	43	34,1
Всего	44	34,9	82	65,1	126	100

Из таблицы следует, что большую часть пациентов в трех исследуемых группах составили женщины (65,1%), что объясняется более высокой частотой встречаемости меланомы кожи среди женщин, соотношение - 1,9:1.

Распределение больных меланомой кожи по возрасту, представлено в таблице 3.

Как видно из таблицы, наибольшее число заболевших приходилось на пятую и шестую декаду жизни (50 лет и старше).

Таблица 3

Распределение больных меланомой кожи по возрасту

Группа больных	Возраст (лет) и количество больных							
	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	>80	всего
I группа	$\frac{2}{3,8}$	$\frac{5}{9,4}$	$\frac{4}{7,5}$	$\frac{17}{32,1}$	$\frac{14}{26,4}$	$\frac{11}{20,8}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{53}{100}$
II группа	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{5}{16,7}$	$\frac{3}{10}$	$\frac{8}{26,7}$	$\frac{8}{26,7}$	$\frac{3}{10}$	$\frac{2}{6,7}$	$\frac{30}{100}$
III группа	$\frac{0}{0}$	$\frac{7}{16,3}$	$\frac{3}{7}$	$\frac{13}{30,2}$	$\frac{16}{37,2}$	$\frac{4}{9,3}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{43}{100}$
Итого	$\frac{3}{2,4}$	$\frac{17}{13,5}$	$\frac{10}{7,9}$	$\frac{38}{30,2}$	$\frac{38}{30,2}$	$\frac{18}{14,3}$	$\frac{2}{1,6}$	$\frac{126}{100}$

Примечание: числитель – абсолютные значения, знаменатель – проценты.

Распределение больных меланомой кожи по полу и возрасту представлено в таблице 4.

Таблица 4

Распределение больных меланомой кожи по полу и возрасту

Гр. б-ых	Возраст (лет), пол и количество больных															
	20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		70-79		>80		Всего	
	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м
I	$\frac{0}{0}$	$\frac{2}{3,8}$	$\frac{3}{5,7}$	$\frac{2}{3,8}$	$\frac{3}{5,7}$	$\frac{1}{1,9}$	$\frac{9}{17}$	$\frac{8}{15}$	$\frac{9}{17}$	$\frac{5}{9,4}$	$\frac{11}{20,8}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{35}{66}$	$\frac{18}{34}$
II	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{4}{13,3}$	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{2}{6,7}$	$\frac{7}{23,3}$	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{3}{10}$	$\frac{5}{16,7}$	$\frac{2}{6,7}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{6,7}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{20}{66,7}$	$\frac{10}{33,3}$
III	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{6}{14}$	$\frac{1}{2,3}$	$\frac{3}{7}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{7}{16,3}$	$\frac{6}{14}$	$\frac{9}{20,9}$	$\frac{8}{18,6}$	$\frac{3}{7}$	$\frac{1}{2,3}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{27}{62,8}$	$\frac{16}{37,2}$
Итого	$\frac{1}{0,8}$	$\frac{2}{1,6}$	$\frac{12}{9,5}$	$\frac{4}{3,2}$	$\frac{7}{16,3}$	$\frac{3}{2,4}$	$\frac{23}{18,3}$	$\frac{15}{11,9}$	$\frac{21}{16,7}$	$\frac{18}{14,3}$	$\frac{16}{12,7}$	$\frac{2}{1,6}$	$\frac{2}{1,6}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{82}{65,1}$	$\frac{44}{34,9}$

Примечание: числитель – абсолютные значения, знаменатель – проценты

Из таблицы следует, что большая часть пациентов – женщины старше 50-60 лет.

Максимальное число случаев заболевания (таблица 3) приходилось на возрастные группы: 50-59 лет (30,2%) и 60-69 лет (30,2%). Среди больных лица трудоспособного возраста (до 60 лет) составили 54% (68 пациентов).

Группа контроля представлена 38 условно здоровыми добровольцами обоего пола в возрасте от 24 до 74 лет.

2.2. Методы исследования

Методы клинико-инструментальных исследований

Все больные, поступившие в хирургическое отделение №3 ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» Республики Марий Эл и онкологическое отделение №3 ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Республики Татарстан, подверглись общепринятому обследованию, включавшему физикальное обследование, клиническое и биохимическое исследование крови, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, УЗИ регионарных лимфатических узлов, УЗИ органов брюшной полости и органов малого таза. При необходимости применялись РКТ и МРТ исследования.

Морфологическая верификация диагноза у больных проводилась путем цитологического, гистологического и иммуногистохимического исследований специалистами патологоанатомических отделений РКОД МЗ РТ (заведующий, врач высшей категории - Н.В. Балатенко) и ГБУ РКБ РМЭ (заведующий - А.Ю. Зуев) и лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей РКОД МЗ (заведующий - профессор С.В.Петров). При гистологическом исследовании определяли глубину инвазии по Кларку и толщину опухоли по Бреслоу. Иммуногистохимические исследования проводились при трудностях морфологической верификации опухоли. Использовались моноклональные антитела к НВМ-45, тирозиназе, Melan A, S-100 и виментину. Иммуногистохимические исследования проведены у 15 пациентов.

Методика определения нейротрансмиттеров в плазме крови

Концентрацию адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА) и серотонина (С) в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Для определения адреналина, норадреналина и дофамина использовался набор реагентов - 5000 Catecholamines in plasma, Reagent kit for HPLC analysis, для определения серотонина – набор реагентов - 3030 Serotonin in serum/plasma/whole blood, Reagent kit for HPLC analysis.

Пробы размораживались однократно в момент проведения анализа. Методика пробоподготовки включала в себя несколько этапов: твердофазную экстракцию, разбавление, осаждение, центрифугирование. Комплекс хроматографического оборудования состоял из бинарного насоса, автосемплера, электрохимического детектора Chromsystems CLC 100 (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Германия). Концентрация нейротрансмиттеров выражалась в пг/мл.

Для исключения влияния нежелательных факторов (стресса и физических нагрузок) на показатели нейротрансмиттеров, забор крови у больных производили через сутки после поступления в стационар или в поликлинику на следующий день приема, утром натощак, в положении лежа. Забор венозной крови для получения плазмы производили в вакутейнер с этилендиаминтетрауксусной кислотой для предотвращения окисления катехоламинов. После взятия кровь аккуратно перемешивалась. Пробы крови центрифугировали не позднее 30 минут после взятия при 2700 об/мин в течении 5 мин. Полученная плазма отделялась и немедленно замораживалась при -20°C в пластиковых пробирках и хранилась при той же температуре. Пробы для исследования в замороженном виде в термоконтейнерах отправлялись в лабораторию ООО «МедиаЛаб» (город Уфа, Республика Башкортостан, заведующий к.м.н. Ф.С. Билалов).

Методика определения белка S100B

Уровень сывороточного белка S100B определяли набором тест-системы «CanAg S100 EIA» (CanAg Diagnostics, Швеция). Набор предназначен для количественного определения белка S100B (S100A1B+S100BB) в образцах сыворотки иммуноферментным методом.

Настоящий метод является твердофазным, неконкурентным, основанным на использовании двух видов мышинных моноклональных антител, специфически распознающих два разных эпитопа молекулы S100B. Метод определяет S100A1B и S100BB, без перекрестной реакции с другими формами S100. Диапазон измерения 10-3500 нг/л. Чувствительность 10 нг/л.

Забор венозной крови производили через сутки после поступления в стационар или в поликлинику утром натощак, в положении лежа в вакутейнер, содержащий активатор свертывания кремнезём. Пробы крови центрифугировали не позднее 30 минут после взятия при 1500 об/мин в течении 10 мин. Полученная сыворотка отделялась и немедленно замораживалась при -20°C в пластиковых пробирках, образцы хранились при той же температуре.

Пробы отправлялись в замороженном виде в термоконтейнерах в иммунологическую лабораторию ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ (заведующая Г.А.Усманова). Пробы размораживались однократно в момент проведения анализа.

Методика определения хромогранина А

Концентрацию хромогранина определяли набором тест-системы «NEOLISA Chromogranin A» (EURO-DIAGNOSTICA, США) для количественного определения хромогранина А в сыворотке крови. Метод представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ типа «сэндвич». Метод «NEOLISA Chromogranin A» основан на использовании двух типов моноклональных антител.

Забор венозной крови производили через сутки после поступления в стационар или в поликлинику утром натощак, в положении лежа в вакутейнер, содержащий активатор свертывания кремнезём. Пробы крови центрифугировали не позднее 30 минут после взятия при 1500 об/мин в течении 10 мин. Полученная сыворотка отделялась и немедленно замораживалась при -20°С в пластиковых пробирках и хранилась при той же температуре. Пробы отправлялись в замороженном виде в термоконтейнерах в иммунологическую лабораторию ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ. Пробы размораживались однократно в момент проведения анализа.

При расчете диагностической информативности маркеров S100В и хромогранина А руководствовались дискриминационными уровнями, принятыми в тест-системах. Дискриминационный уровень S100В составил 90 нг/л, хромогранина А – 100 нг/мл.

Диагностическая информативность молекулярного маркера оценивалась путем расчета чувствительности, специфичности и точности.

Число исследований молекулярных факторов в группах больных меланомой кожи и в контрольной группе представлены в таблице 5

Таблица 5

Число исследований молекулярных факторов в группах больных меланомой кожи и контрольной группе

Группы больных	Молекулярные факторы и число исследований						
	Адреналин	Норадреналин	Дофамин	Серотонин	S100В	Хромогранин	Всего
I группа	47	47	47	47	52	52	292
II группа	27	27	27	27	29	29	166
III группа	37	37	37	37	34	34	216
Контрольная группа	38	38	38	38	38	38	228
Итого	149	149	149	149	155	155	902

Как видно из таблицы, было выполнено 902 анализа по определению молекулярных факторов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 8, BIOSTATISTICA 4.03 [Glantz S.A., 1999], MedCalc Software 11.4 [Sheskin D.J., 2004]. Рассчитывали среднюю арифметическую, ошибку средней арифметической. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий показателей в сравниваемых группах определяли по критериям Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Математические модели расчета

Для дифференциальной диагностики и прогноза меланомы кожи были отобраны информативные математические модели: логистическая модель, которая моделирует логарифм шансов заболевания и для моделирования прогноза выживаемости выбрана математическая модель «ускорения времени» (accelerated failure time (AFT) model) - распределения gengamma и модель пропорционального ущерба Кокса (PH) – распределение gompertz, так как прогностическая выживаемость по средним значениям переменных совпадает с реальной выживаемостью по Каплан-Майеру. Для анализа использовалась функция `flexsurvreg` [<https://cran.r-project.org/web/packages/flexsurv/flexsurv.pdf>].

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-морфологическая характеристика больных меланомой кожи

3.1.1. Клинико-морфологическая характеристика больных первичной меланомой кожи

Группа с первичной меланомой кожи (I группа) представлена 53 пациентами, из них у 41 больного выполнено широкое иссечение, у 7- широкое иссечение с лимфодиссекцией, у 2 – экзартикуляция, у 2 - реиссечение рубца и 1 пациенту проведена химиотерапия. Средний возраст составил $57,8 \pm 1,8$ лет. Женщин - 35 человек (средний возраст $60,7 \pm 2,1$ лет), мужчин - 18 человек (средний возраст $52,2 \pm 2,98$ лет), соотношение - 1,9:1.

Распределение больных I группы по анатомической локализации первичной опухоли представлено в таблице 6.

Таблица 6
Распределение больных I группы по локализации первичной опухоли

Локализация меланомы	Все больные		Мужчины		Женщины	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Туловище:	30	56,6	14	26,4	16	30,2
спина	17	32,1	7	13,2	10	18,9
грудная клетка	5	9,4	4	7,5	1	1,9
живот	8	15,1	3	5,7	5	9,4
Верхние конечности:	8	15,1	0	0	8	15,1
плечо	4	7,5	0	0	4	7,5
предплечье	3	5,7	0	0	3	5,7
кисть	1	1,9	0	0	1	1,9
Нижние конечности:	10	18,9	2	3,8	8	15,1
бедро	2	3,8	0	0	2	3,8
голень	5	9,4	1	1,9	4	7,5
стопа	3	5,7	1	1,9	2	3,8
Голова-шея:	5	9,4	2	3,8	3	5,7
лицо	3	5,7	1	1,9	2	3,8
волосистая часть головы	0	0	0	0	0	0
шея	2	3,8	1	1,9	1	1,9
Итого	53	100%	18	34%	35	66%

Как следует из таблицы, у 56,6 % пациентов опухоль располагалась на коже туловища, у 18,9 % — нижних конечностях, у 15,1% — верхних конечностях, у 9,4% — на коже лица, волосистой части головы и на шее. Для мужчин и женщин характерна локализация опухоли на коже туловища (26,4% и 30,2% соответственно), с преимущественным расположением на коже спины (13,2% и 18,9% соответственно).

Распределение больных с первичной меланомой кожи по содержанию пигмента в опухоли представлено в таблице 7.

Таблица 7

Распределение больных с первичной меланомой кожи по содержанию пигмента в опухоли

Содержание пигмента	Все больные		Мужчины		Женщины	
	Абс.	%	Абс.	%	абс	%
Наличие пигмента	49	92,5	16	30,2	33	62,3
Отсутствие пигмента	4	7,5	2	3,8	2	3,8
Итого	53	100%	18	34%	35	66%

Как следует из таблицы, у большей части больных (92,5%) опухоль содержала пигмент.

Распределение больных по уровню инвазии по Кларку представлено в таблице 8.

Таблица 8

Распределение больных по уровню инвазии по Кларку

Уровень инвазии по Кларку	Женщины		Мужчины		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I уровень	1	1,9	0	0	1	1,9
II уровень	14	26,4	7	13,2	21	39,6
III уровень	7	13,2	5	9,4	12	22,6
IV уровень	7	13,2	4	7,5	11	20,8
V уровень	3	5,7	1	1,9	4	7,5
Неизвестно	3	5,7	1	1,9	4	7,5
Итого	35	66	18	34	53	100

Как видно из таблицы, среди пациентов с известным уровнем инвазии по Кларку преобладали больные с II уровнем.

Распределение больных первичной меланомой кожи по толщине опухоли по Бреслоу представлено в таблице 9.

Таблица 9

Распределение больных первичной меланомой кожи по толщине опухоли по Бреслоу

Толщина опухоли по Бреслоу	Женщины		Мужчины		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
≤ 0,75 мм	5	9,4	1	1,9	6	11,3
От 0,75 до 1,5 мм	5	9,4	3	5,7	8	15,1
От 1,5 мм до 4 мм	12	22,6	2	3,8	14	26,4
> 4 мм	5	9,4	3	5,7	8	15,1
Неизвестно	8	15,1	9	17	17	32,1
Итого	35	66	18	34	53	100

Из таблицы следует, среди пациентов с известной толщиной опухоли (36 пациентов) большую часть составили пациенты с толщиной от 1,5 мм до 4 мм (38,9%).

Распределение больных меланомой кожи по клинико-биологическим особенностям гистологических форм меланомы представлено в таблице 10.

Таблица 10

Распределение больных меланомой кожи по клинико-биологическим особенностям гистологических форм меланомы кожи

Морфологический тип опухоли	Поверхностно-распространяющаяся МК	Узловая МК	Лентиго-меланома	Акрально-лентигозная	Всего
Абс. число больных	25	26	1	1	53
%	47,2	49,1	1,9	1,9	100

Как видно из таблицы, у пациентов преобладала узловая и поверхностно-распространяющаяся форма меланомы кожи (49,1% и 47,2% соответственно).

Распределение больных меланомой кожи по TNM (1997г.) и стадии заболевания с учетом пола представлено в таблице 11.

Таблица 11

Распределение больных первичной меланомой кожи по TNM (1997г.) и стадии заболевания с учетом пола

Стадии заболевания и TNM (1997г.)	Женщины		Мужчины		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
IA (T1N0M0)	10	18,9	4	7,5	14	26,4
IB (T2N0M0)	5	9,4	6	11,3	11	20,8
IIA (T3N0M0)	10	18,9	2	3,8	12	22,6
IIB (T4N0M0)	6	11,3	3	5,7	9	17
III (T1-4N1-3M0)	2	3,8	3	5,7	5	9,4
IV (T1-4N1-3M1)	1	1,9	0	0	1	1,9
Неизвестно	1	1,9	0	0	1	1,9
Итого	35	66	18	34	53	100

Как следует из таблицы, преобладают пациенты с T1N0M0, T2N0M0 и T3N0M0, т.е. IA, IB, IIA стадиями заболевания, при этом у женщин преобладала IA и IIA стадии, у мужчин – IIB стадия заболевания.

3.1.2. Клинико-морфологическая характеристика больных с рецидивом заболевания

Вторая группа пациентов меланомой кожи представлена пациентами с рецидивом заболевания в количестве 30 человек. Средний возраст пациентов на момент диагностики рецидива опухоли составил $56,1 \pm 2,8$ лет. Среди больных с рецидивом заболевания женщины составили 66,7% (20 человек, средний возраст – $55,6 \pm 3,8$ лет), мужчины – 33,3 % (10 человек, средний

возраст $57,3 \pm 3,96$ лет), у которых в различные сроки (от 2 месяцев до 10 лет) появились рецидивы заболевания.

Распределение больных с рецидивом меланомы с учетом локализации первичного очага представлено в таблице 12.

Таблица 12

Распределение больных с рецидивом меланомы с учетом локализации первичного очага

Локализация меланомы	Все больные		Мужчины		Женщины	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Туловище:	11	36,7	7	23,3	4	13,3
спина	8	26,7	5	16,7	3	10
грудная клетка	1	3,3	0	0	1	3,3
живот	2	6,7	2	6,7	0	0
Верхние конечности:	7	23,3	2	6,7	5	16,7
плечо	3	10	1	3,3	2	6,7
предплечье	1	3,3	1	3,3	0	0
кисть	3	10	0	0	3	10
Нижние конечности:	10	33,3	0	0	10	33,3
бедро	1	3,3	0	0	1	3,3
голень	5	16,7	0	0	5	16,7
стопа	4	13,3	0	0	4	13,3
Голова-шея:	2	6,7	1	3,3	1	3,3
лицо	0	0	0	0	0	0
волосистая часть головы	2	6,7	1	3,3	1	3,3
шея	0	0	0	0	0	0
Итого	30	100%	10	33,3%	20	66,7%

Рецидив меланомы преимущественно диагностировался у пациентов с локализацией первичного очага опухоли на коже спины (26,7%), голени и стопы (16,7% и 13,3% соответственно).

Распределение больных с рецидивом заболевания по TNM (1997г.) и стадии первичной меланомы кожи представлено в таблице 13.

Таблица 13

Распределение больных с рецидивом заболевания по TNM (1997г.) и
стадии первичной меланомы кожи

Стадия и TNM	I		II		III T1-4N1- 3M0	Неизвест но	Всего
	IA T1N0 M0	IB T2N0 M0	IIA T3N0 M0	IIB T4N0 M0			
Абс. число больных	2	9	5	4	5	5	30
%	6,7	30	16,7	13,3	16,7	16,7	100

С учетом полученных данных, как следует из таблицы, у пациентов начиная с IB стадии, повышается риск рецидива заболевания.

Распределение больных с рецидивом заболевания по виду рецидива представлено в таблице 14.

Таблица 14

Распределение больных с рецидивом заболевания по виду рецидива

Локализация рецидива	Женщины		Мужчины		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Местный рецидив	1	3,3	1	3,3	2	6,7
Транзитные метастазы	0	0	0	0	0	0
Регионарные метастазы	9	30	4	13,3	13	43,3
Регионарные метастазы + местный рецидив	3	10	0	0	3	10
Отдаленные метастазы	8	26,7	4	13,3	12	40
Итого	20	66,7	10	33,3	30	100

Как видно из таблицы, независимо от пола больных самым частым видом прогрессирования меланомы кожи явилось регионарное

метастазирование - 43,3% и диссеминированный процесс – 40%, который диагностировался в виде метастазов в отдаленные лимфатические узлы, мягкие ткани и отдаленные органы (головной мозг, легкие, печень). В нашем исследовании не было наблюдений с транзитных метастазов.

Вид рецидива меланомы кожи, сроки и частота его развития представлены в таблице 15.

Таблица 15

Вид рецидива меланомы кожи, сроки и частота его развития

Вид рецидива	Сроки развития рецидива					Всего
	от 2 мес. до 11 мес.	от 1 года до 3 лет	>3 лет до 5 лет	>5 лет до 10 лет	> 10 лет	
Местный рецидив	1 (50%)	1(50%)	-	-	-	2(6,7%)
Регионарные метастазы	7(53,8%)	4(30,8%)	1(7,7%)	-	1(7,7%)	13(43,3%)
Регионарные метастазы+местный рецидив	1(33,3%)	1(33,3%)	1(33,3%)	-	-	3(10%)
Отдаленные метастазы	7(58,3%)	3(25%)	2(16,7%)	-	-	12(40%)
Итого	16(53,3%)	9(30%)	4(13,4)	-	1(3,3%)	30(100%)

Как видно из таблицы, у 53,3% больных рецидивы возникают до года после лечения, у 30% в период от 1 года до 3 лет. Поэтому значимым для диспансеризации являются первые 3 года наблюдения. При этом у 53,8% из больных с регионарными метастазами, последние также возникают до года. Это может свидетельствовать о недиагностированных микрометастазах в лимфатических узлах и вследствие этого непредпринятой лимфодиссекции. У 58,3% больных из числа больных с отдаленными метастазами последние возникли во временном промежутке до года после лечения, что свидетельствует о неадекватности диагностики распространенного процесса

до оперативного лечения. Следовательно, актуально применение молекулярных маркеров для реальной оценки распространенности меланомы кожи до начала лечения и определения тактики последнего.

3.1.3. Клинико-морфологическая характеристика больных диспансерной группы

Диспансерная группа пациентов без рецидива меланомы кожи представлена в количестве 43 человек, состоящих на учете от 2 и более 10 лет. Средний возраст пациентов на момент исследования составлял $56,5 \pm 1,8$ лет. Женщины составили – 62,8% (средний возраст – $54,4 \pm 2,56$ лет), мужчины – 37,2% (средний возраст - $60,2 \pm 2,07$ лет).

Распределение пациентов меланомой кожи III группы по локализации первичного очага опухоли представлено в таблице 16.

Таблица 16

Распределение пациентов меланомой кожи III группы по локализации первичного очага опухоли

Локализация меланомы	Все больные		Мужчины		Женщины	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Туловище:	22	51,2	8	18,6	14	32,6
спина	16	37,2	5	11,6	11	25,6
грудная клетка	5	11,6	2	4,7	3	7
живот	1	2,3	1	2,3	0	0
Верхние конечности:	7	16,3	4	9,3	3	7
плечо	6	14	3	7	3	7
предплечье	1	2,3	1	2,3	0	0
кисть	0	0	0	0	0	0
Нижние конечности:	11	25,6	2	4,7	9	20,9
бедро	5	11,6	0	0	5	11,6
голень	3	7	0	0	3	7
стопа	3	7	2	4,7	1	2,3
Голова-шея:	3	7	2	4,7	1	2,3
лицо	2	4,7	1	2,3	1	2,3
волосистая часть головы	1	2,3	1	2,3	0	0
шея	0	0	0	0	0	0
Итого	43	100%	16	37,2%	27	62,8%

Первичный очаг у мужчин и женщин, как следует из таблицы, преимущественно локализовался на коже спины – 37,2% (16 человек).

Распределение больных диспансерной группы по содержанию пигмента в опухоли представлено в таблице 17.

Таблица 17

Распределение больных диспансерной группы по содержанию пигмента в опухоли

Содержание пигмента	Все больные		Мужчины		Женщины	
	Абс.	%	Абс.	%	абс	%
Наличие пигмента	41	95,3	15	34,9	26	60,5
Отсутствие пигмента	2	4,7	1	2,3	1	2,3
Всего	39	100%	16	37,2%	27	62,8%

У 95,3% пациентов меланомой кожи, состоящих на диспансерном учете без рецидива заболевания, опухоль содержала пигмент.

Распределение больных диспансерной группы по уровню инвазии по Кларку представлено в таблице 18.

Таблица 18

Распределение больных диспансерной группы по уровню инвазии по Кларку

Уровень инвазии по Кларку	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	неизвестно	всего
Абс. число больных	2	14	13	7	2	5	43
%	4,7	32,6	30,2	16,3	4,7	11,6	100

Как видно из таблицы, среди пациентов с известным уровнем инвазии преобладали больные с 2-ым и 3-им уровнем инвазии по Кларку.

Распределение больных меланомой кожи по TNM (1997г.) и стадии представлено в таблице 19.

Распределение больных первичной меланомой кожи по TNM (1997г.) и стадии

Стадия и TNM	I		II		III T1-4N1-3M0	Неизвестно	Всего
	IA T1N0 M0	IB T2N0 M0	IIA T3N0 M0	IIB T4N0 M0			
Абс. число больных	15	14	9	1	3	1	43
%	34,9	32,6	20,9	2,3	7	2,3	100

Среди диспансерной группы больных меланомой кожи большую часть, как видно из таблицы, составили пациенты с IA (T1N0M0) и IB (T2N0M0) стадиями заболевания (34,9% и 32,6% соответственно).

3.2. Молекулярные факторы у больных меланомой кожи

3.2.1 Содержание нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи

Нейротрансмиттеры и их концентрация (пг/мл) в плазме крови больных меланомой кожи представлены в таблице 20.

По результатам исследования, как следует из таблицы 20, выявлено достоверно значимое снижение по сравнению с группой контроля уровня адреналина во всех трех исследуемых группах. Уровень норадреналина достоверно снижен только в группе первичных больных меланомой кожи. В первой и во второй группе больных выявлено достоверное повышение уровня дофамина в плазме крови, по сравнению с группой контроля.

Таблица 20

Нейротрансмиттеры и их концентрация (пг/мл) в плазме крови больных меланомой кожи

Нейротрансмиттеры и их концентрация	Адреналин (А) M±m	Норадреналин (НА) M±m	Дофамин (ДА) M±m
Первичные больные (I группа) n=47	48,36±4,04 p=0,000	284,6±24,7 p=0,000	42,98±1,96 p=0,048
Больные с рецидивом (II группа) n=27	51,74±6,82 p=0,002	368,6±36,6 p=0,332	47,59±4,95 p=0,037
Больные без рецидива (III группа) n=37	50,3±4,44 p=0,000	346,7±26,14 p=0,079	42,51±2,71 p=0,120
Контрольная группа n=38	77,58±4,54	409,1±23,3	36,84±2,39

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего.

Соотношения нейротрансмиттеров в исследуемых группах больных меланомой кожи представлены в таблице 21.

Таблица 21

Соотношения нейротрансмиттеров в исследуемых группах больных меланомой кожи

Соотношения нейротрансмиттеров	Норадреналин / Адреналин НА/А M±m	Норадреналин / Дофамин НА/ДА M±m	(Норадреналин+ Адреналин)/ Дофамин (НА+А)/ДА M±m
Первичные больные (I группа) n=47	7,8±0,89 p=0,032	6,8±0,58 p=0,000	7,97±0,59 p=0,000
Больные с рецидивом (II группа) n=27	10,34±1,51 p=0,000	8,45±0,77 p=0,009	9,74±0,82 p=0,004
Больные без рецидива (III группа) n=37	8,96±1,03 p=0,002	8,81±0,67 p=0,005	10,05±0,67 p=0,002
Контрольная группа n=38	5,58±0,27	13,8±1,57	16,29±1,77

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего.

Анализируя коэффициент норадреналин-адреналиновый (НА/А) в исследуемых группах больных, мы отметили достоверную однонаправленность изменений в виде усиления норадренергического и ослабления адренергического звена симпатико-адреналовой системы, т.е. у больных меланомой кожи имеет место преобладание медиаторного звена над гормональным. При оценке норадреналин-дофаминового (НА/ДА) и дофаминового ((НА+А)/ДА) коэффициентов выявлено, что при нормальном или даже повышенном уровне дофамина - субстрат для синтеза норадреналина и адреналина, - уровень последних ниже нормы, что может свидетельствовать о дисфункции ферментных систем, задействованных в обмене нейротрансмиттеров. Максимальные нарушения нейротрансмиттерного обмена наблюдается в группе больных с рецидивом заболевания.

Концентрация катехоламинов и их соотношения в группе первичных больных меланомой кожи с учетом стадии заболевания представлена в таблице 22.

Таблица 22

Концентрация катехоламинов и их соотношения в группе первичных больных меланомой кожи с учетом стадии заболевания (пг/мл)

Концентрация КА	А M±m	НА M±m	НА/А M±m	ДА M±m	НА/ДА M±m	(НА+А) /ДА M±m
I n=22	42,05±5,9 p=0,000	287,7±34,0 p=0,004	8,82±1,3 p=0,004	44,41±3,2 p=0,062	6,57±0,7 p=0,001	7,53±0,74 p=0,000
II n=19	53,68±5,9 p=0,003	267,8±37,2 p=0,001	6,7±1,24 p=0,243	42,53±3,0 p=0,161	6,99±1,1 p=0,005	8,34±1,1 p=0,004
III n=5	55,6±16,2 p=0,118	336,6±99,1 p=0,000	8,73±3,6 p=0,031	40±3,58 p=0,643	8,07±1,9 p=0,202	9,44±1,78 p=0,175
Контр. группа n=38	77,58±4,5 4	409,1±23,3	5,58±0,2 7	36,84±2,3 9	13,8±1,5 7	16,29±1,7 7

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего

Как следует из таблицы, в группе первичных больных с учетом стадии заболевания выявлено достоверно значимое снижение уровня адреналина при I и II стадиях заболевания, уровень норадреналина достоверно снижен при всех стадиях, по уровню дофамина достоверно значимых различий не получено. Наблюдается повышение норадреналин-адреналинового коэффициента при всех стадиях заболевания, но достоверно значимое отличие получено при I и III стадии заболевания. При оценке норадреналин-дофаминового и дофаминового коэффициентов выявлено их снижение при всех стадиях заболевания, но достоверность результатов получена при I и II стадиях. Таким образом, имеет место некая фазность в обмене катехоламинов в зависимости от стадии заболевания.

Концентрация катехоламинов и их соотношения в группе больных с рецидивом заболевания с учетом локализации рецидива представлены в таблице 23.

Таблица 23

Концентрация катехоламинов (пг/мл) и их соотношения в группе больных с рецидивом заболевания с учетом локализации рецидива

Концентрация КА и их соотношения	А M±m	НА M±m	НА/А M±m	ДА M±m	НА/ДА M±m	(НА+А/ ДА M±m
Рецидив в регионар. л/узлы n=12	53,83±10,19 p=0,019	403,2±54,17 p=0,909	10,52±2,34 p=0,000	50,08±9,67 p=0,058	9,51±1,35 p=0,147	10,78±1,47 p=0,099
Диссемин. процесс n=11	41,91±9,74 p=0,000	290,2±50,14 p=0,024	10,33±2,53 p=0,002	43,73±5,32 p=0,198	6,84±0,86 p=0,024	7,85±0,87 p=0,015
Контроль. группа n=38	77,58±4,54	409,1±23,3	5,58±0,27	36,84±2,39	13,8±1,57	16,29±1,77

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего.

Итак, как следует из таблицы, достоверно значимые различия с группой контроля и выраженные изменения в концентрации нейротрансмиттеров и их соотношениях наблюдается у больных с диссеминированным процессом.

Концентрация серотонина в плазме крови больных меланомой кожи, представлена в таблице 24.

Таблица 24

Концентрация серотонина в плазме крови больных меланомой кожи
(пг/мл)

Группа и число больных (n)	Первичные больные (I группа) n=47	Больные с рецидивом (II группа) n=27	Больные без рецидива (III группа) n=37	Контрольная группа n=38
Серотонин M±m	78,46±9,58 p=0,03	91,78±12,67 p=0,283	78,16±11,17 p=0,04	108,5±9,42

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего.

По результатам исследования получено достоверно значимое снижение уровня серотонина в первой и в третьей группе по сравнению с группой контроля, что может привести к развитию психодезадаптации состояния с преобладанием депрессивной симптоматики. Отсутствие достоверности в содержании серотонина в группе больных с рецидивом заболевания, возможно, связано с меньшим количеством исследуемых. Найденные изменения в нейротрансмиттерном и серотониновом обмене у больных меланомой кожи ставит вопрос о индивидуализации нейрофармакологической коррекции у данных больных.

Концентрация серотонина в плазме крови в группе первичных больных с учетом стадии заболевания представлена в таблице 25.

Концентрация серотонина в плазме крови в группе первичных больных меланомой кожи с учетом стадии заболевания (пг/мл)

Стадия и число больных (n)	I n=22	II n=19	III n=5	Контрольная группа n=38
Серотонин M±m	87,27±15,21 p=0,215	66,83±14,87 p=0,017	71,6±19,16 p=0,179	108,5±9,42

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. M – среднее значение, m – ошибка среднего.

Как следует из таблицы, снижение уровня серотонина наблюдали при всех стадиях заболевания, достоверно значимое отличие получено только при II стадии.

Таким образом, у больных меланомой кожи имеет место нарушение нейротрансмиссивного обмена с преобладанием медиаторного звена над гормональным, при снижении концентрации серотонина, что требует нейрофармакологической коррекции, которая должна быть персонализирована с учетом индивидуальных нарушений нейротрансмиссивного обмена.

3.2.2. Содержание белка S100B и хромогранина А в сыворотке крови больных меланомой кожи

Концентрация S100B в сыворотке крови больных меланомой кожи представлена в таблице 26.

Концентрация S100B в сыворотке крови больных меланомой кожи
(нг/л)

Группа больных и число больных	S100B M±m	P	Диапазон уровня S100B	Медиана	Доля больных с повышенным уровнем S100B, %
Первичные больные n=50	112,4±8,99	p1=0,000	34,5-280,9	86,21	46
Больные с рецидивом n=26	236,1±44,75	p1=0,000 p2=0,000	55,1-953,9	174,1	73,1
Больные без рецидива n=31	77,29±6,35	p1=0,114 p3=0,006 p4=0,000	28,2-154,3	66,44	32,2
Контрольная группа n=38	64,86±4,72		11-123	67,35	15,8

Примечание: p1 – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. p2- достоверность различий между I и II группами больных с меланомой. p3-достоверность различий между I и III группами. p4- достоверность различий между II и III группами больных меланомой кожи. M-среднее значение, m- ошибка среднего

Из таблицы следует, что пациентов в группе первичных больных и пациентов в группе с рецидивом заболевания наблюдается повышение уровня S100B в сыворотке крови по сравнению с группой контроля. При этом содержание белка S100B в группе больных с рецидивом заболевания выше такового в группе больных с первичной меланомой и группе диспансерных больных. При анализе уровня S100B в исследуемых группах видно, что маркер проявил себя лучше в качестве маркера диагностики рецидива заболевания. Было выявлено, что S100B был повышен у 46% пациентов в группе первичных больных и у 73,1% в группе с рецидивом заболевания.

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе первичных больных меланомой кожи с учетом стадии заболевания представлена в таблице 27.

Таблица 27

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе первичных больных меланомой кожи с учетом стадии заболевания (нг/л)

Стадия и число больных (n)	I n=25	II n=19	III n=5	IV n=1	Контрольная группа n=38
S100B M±m	95,3±11,98	129,6±14,95	142±28,17	>3250	64,86±4,72
p	p1=0,009	p1=0,000 p2=0,077	p1=0,000		
Доля больных с повышенным уровнем S100B, %	40	52,6	60		

Примечание: p1 – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля. p2- достоверность различий между I и II стадией. M-среднее значение, m- ошибка среднего

Как следует из таблицы, наблюдается повышение уровня маркера по средним концентрациям с ростом стадии заболевания, но из-за малого количества наблюдений, достоверность различий не получена, и говорить о стадиоспецифичности не представляется возможным.

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе первичных больных с учетом уровня инвазии по Кларку представлена в таблице 28.

Таблица 28

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе первичных больных с учетом уровня инвазии по Кларку (нг/л)

Уровень инвазии по Кларку и число больных (n)	I n=1	II n=20	III n=12	IV n=11	V n=4	Контрольная группа n=38
S100B M±m	116, 1	110,1±15, 2	90,77±11, 5	121,7±18, 5	186,7±41, 9	64,86±4,72
p		p=0,000	p=0,018	p=0,000	p=0,000	
Доля больных с повышенным уровнем S100B, %		35	41,7	45,5	75	

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля; M-среднее значение, m- ошибка среднего

Как следует из таблицы, даже при небольшой выборке первичных больных имеет тенденция к повышению уровня сывороточного маркера S100B с глубиной инвазии по Кларку.

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе больных с рецидивом заболевания с учетом локализации рецидива представлена в таблице 29.

Таблица 29

Концентрация S100B в сыворотке крови в группе больных с рецидивом заболевания с учетом локализации рецидива (нг/л)

Локализация рецидива	Местный рецидив n=2	Регионарные л/узлы n=13	Местный рецидив +Регионарные л/узлы n=3	Отдаленные метастазы n=8	Контрольная группа n=38
S100B M±m	118,2±16, 4	200±47,68	418,3±269,1	255,9±80, 67	64,86±4,72
p	p=0,015	p=0,000	p=0,000	p=0,000	

Примечание: p– достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля; M-среднее значение, m- ошибка среднего

Как видно из таблицы, с нарастанием диссеминации наблюдается тенденция к росту уровня маркера.

При оценке информативности маркера S100B при меланоме кожи мы получили следующие данные, которые представлены в таблице 30.

Таблица 30

Информативность S100B при меланоме кожи

Группы больных	Чувствительность	Специфичность	Точность
I группа	46%	84,2%	62,5%
II группа	73,1%	84,2%	79,7%
III группа	32,2%	84,2%	60,9%
Все больные	48,6%	84,2%	57,9%

Наибольшую информативность наблюдали во II группе больных, т.е. его применение целесообразно для диагностики рецидива меланомы.

Таким образом, маркер S100B показан для диагностики рецидива заболевания, что согласуется с данными литературы. Учитывая, что у половины (46%) первичных больных он был выше дискриминационного уровня, возможно, его применение в комплексной диагностики первичного заболевания.

Концентрация хромогранина А в сыворотке крови больных меланомой кожи представлена в таблице 31.

Концентрация хромогранина А в сыворотке крови больных меланомой кожи (нг/мл)

Группа и число больных (n)	Первичные больные (I группа) n=40	Больные с рецидивом (II группа) n=24	Больные без рецидива (III группа) n=27	Контрольная группа n=37
Хромогранин А M±m	56,92±8,09	44,67±12,44	37,86±7,14	41,99±5,06
p	p=0,129	p=0,821	p=0,629	

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателями в группе контроля; M-среднее значение, m- ошибка среднего

Из таблицы следует, что достоверных различий в содержании хромогранина А у больных меланомой и здоровых нет, поэтому данный маркер не может рассматриваться в качестве диагностического. Учитывая, что у части больных (14%) хромогранин А был выше дискриминационного уровня, можно предположить, что у них меланома носила нейроэндокринный характер. Таким образом, хромогранин А не может рассматриваться маркером диагностики меланомы.

3.3. Математические диагностическая и прогностическая модели с учетом молекулярных факторов при меланоме кожи

С учетом молекулярных факторов выбран ряд математических моделей для диагностики и прогноза меланомы кожи. Далее из них были отобраны информативные модели для дифференциальной диагностики наличия или отсутствия заболевания и для его прогноза.

Использовалась логистическая модель вероятности заболевания, которая моделирует логарифм шансов заболевания. Если p – вероятность наличия болезни, то используется логит-функция $\ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$ для отношения шансов иметь болезнь к шансам не иметь. Константа модели равна -2.236007, т.е. при нулевых значениях всех переменных логарифм отношения шансов равен этому числу, а само отношение шансов 0.1068844 (примерно 1:10, 1

один заболевший на 10 здоровых). Таким образом, если для возраста (Age) значение коэффициента модели равно 0.052, то на каждый год эта функция увеличивается на 0.052, т.е. для возраста 30 отношение увеличивается в $\exp(0.052*30)=4.764678$ раза. Зная все переменные, можно вычислить отношение шансов для любых сочетаний переменных, учтенных в модели.

Вероятность p вычисляется как:

$$p = \frac{\exp(a_0 + a_1X_1 + \dots + a_nX_n)}{1 + \exp(a_0 + a_1X_1 + \dots + a_nX_n)},$$

где a_0, a_1, \dots, a_n , коэффициенты модели, X_1, X_2, \dots, X_n - значения переменных.

Использовали пол, возраст и маркеры. Выполнялся автоматический выбор переменных. Определены значимые коэффициенты модели (пол, возраст (Age), S100B (S100), норадреналин-адреналиновый (Nad-Ad) и норадреналин-дофаминовый (Nad-Dad) коэффициенты):

Коэффициенты:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-2.236007	0.988851	-2.261	0.023746
NAd_A	0.108107	0.045410	2.381	0.017281
NAd_Dad	-0.242400	0.064565	-3.754	0.000174
S100	0.008065	0.003366	2.396	0.016585
Age	0.052041	0.016050	3.242	0.001185

Поставлена задача: по набору маркеров определить вероятность принадлежности к группам - первичных больных меланомой кожи (1) + больные с рецидивом меланомы кожи (2) – это условно больные (1+2), против группы – больные без рецидива заболевания (3) + контрольная группа (4) – это условно здоровые (3+4).

Распределение модельных вероятностей для здоровых (3+4) и больных (1+2), а также ROC-анализ представлен на рисунке 1.

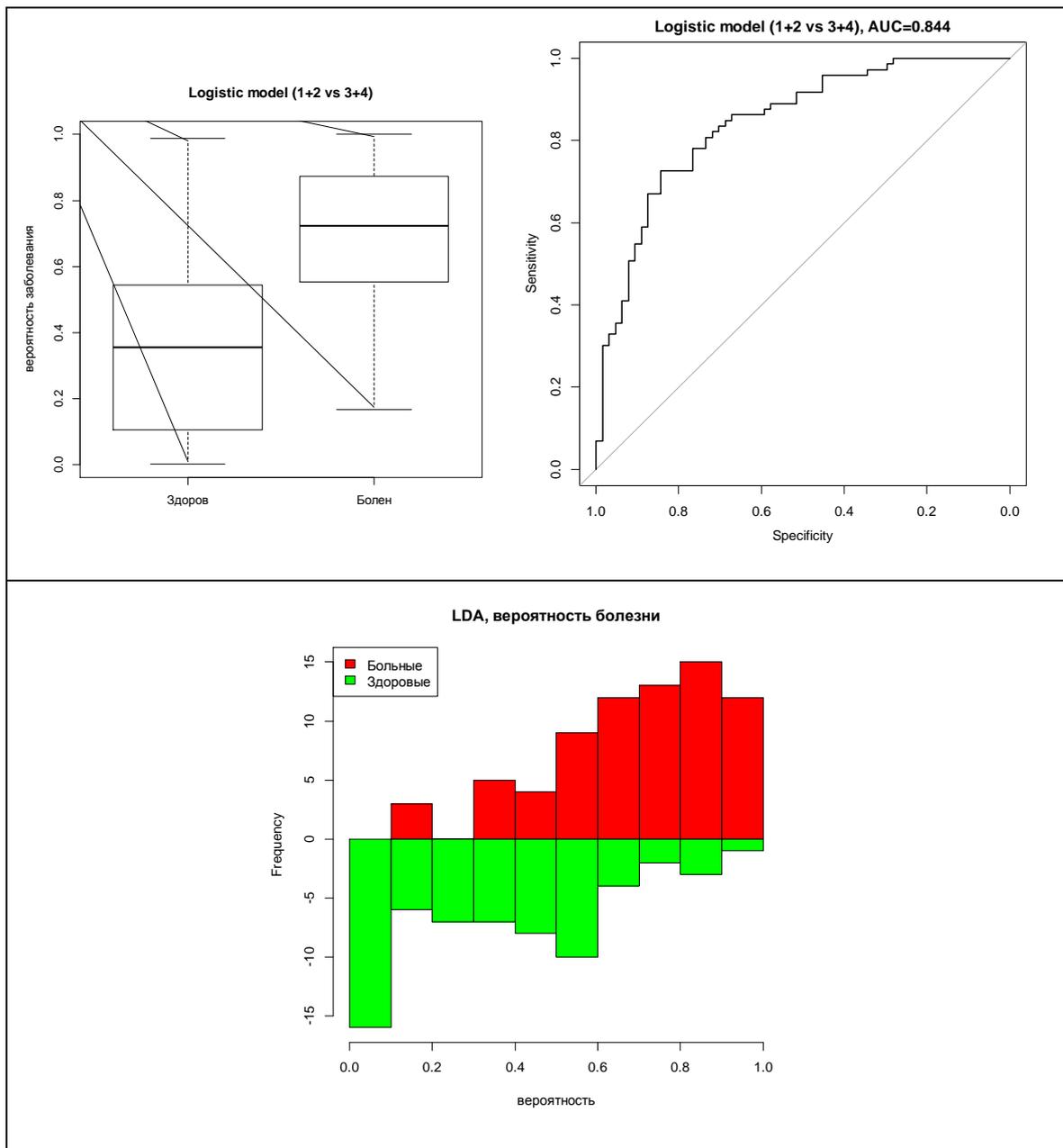


Рис.1 Распределение модельных вероятностей и ROC –анализ для группы здоровых и больных

Представленная модель с использованием набора переменных - S100B (S100), норадреналин – адреналинового (NAd-A) и норадреналин – дофаминового (NAd-Dad) коэффициентов, пола и возраста (Age) помогает в диагностике наличия заболевания (первичной меланомы или её рецидива) или его отсутствия.

Также по полученным данным мы построили математические модели прогностической выживаемости. Выполнили автоматический набор оптимальной модели пропорционального ущерба Кокса на все переменные. Были выделены значимые переменные среди маркеров на основе модели Кокса. Переменные перечислены в порядке снижения значимости: S100B (S100), хромогранин (Xp), адреналин (Ad), норадреналин-адреналиновый коэффициент (NAd-A), норадреналин-дофаминовый коэффициент (NAd-Dad). С учетом выделенных набором факторов построили различные математические модели, которые более сложные, и потенциально лучше отражают действительность в отличие от модели Кокса:

"gengamma"	Generalized gamma (stable)	mu	AFT
"genf"	Generalized F (stable)	mu	AFT
"weibull"	Weibull	scale	AFT
"gamma"	Gamma	rate	AFT
"exp"	Exponential	rate	PH
"llogis"	Log-logistic	scale	AFT
"lnorm"	Log-normal	meanlog	AFT
"gompertz"	Gompertz	rate	PH

PH – модель пропорционального ущерба Кокса (с модификацией), AFT – модель «ускорения времени», когда ущерб меняется со временем по различным законам (что моделируется «ускорением/замедлением» времени).

Проанализировав данные математические модели, нами была выбрана модель «ускорения времени» (accelerated failure time (AFT) model) - распределения gengamma и модель пропорционального ущерба Кокса (PH) – распределение gompertz, так как прогностическая выживаемость по средним значениям переменных совпадает с реальной выживаемостью по Каплан-Майеру.

Приводим модель прогностической выживаемости gengamma с учетом средних значений S100, хромогранина, адреналина, норадреналин-адреналинового и норадреналин-дофаминового коэффициентов, которая представлена на рисунке 2:

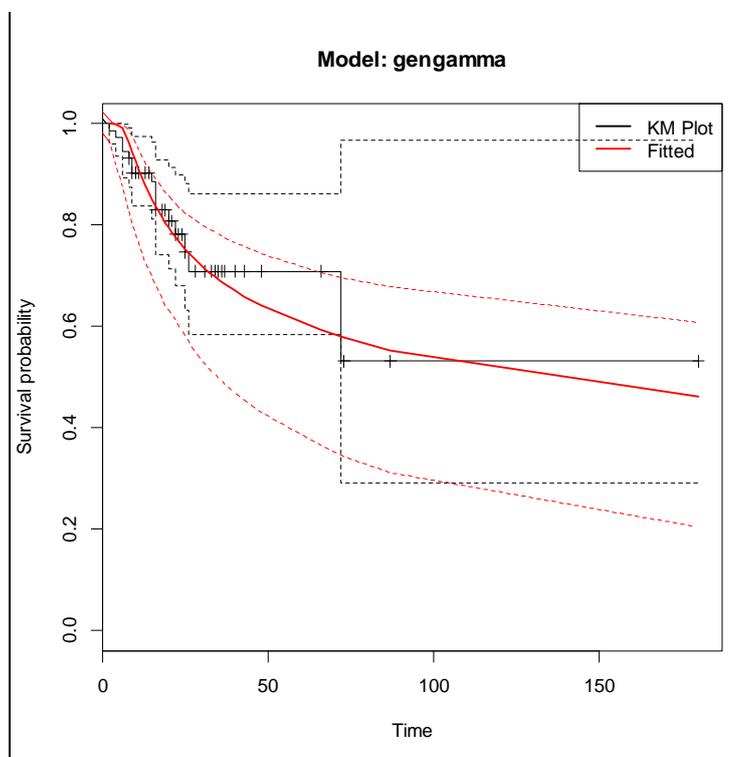


Рис.2 Модель прогностической выживаемости gengamma с учетом средних значений S100, хромогранина, адреналина, норадреналин-адреналинового и норадреналин-дофаминового коэффициентов.

Параметры модели gengamma

	mu	sigma	Q	S100	Xp	Ad	NAd_A	Nad_Dad
Coef	4.2257	1.1362	-3.5444	-0.0014	0.0020	-0.0245	-0.0545	0.0611
se	0.8739	0.3622	1.4376	0.0000	0.0032	0.0113	0.0320	0.0432
p-value	0.0000	0.0010	0.0070	0.0000	0.2590	0.0150	0.0440	0.0790

Все переменные очень значимы, $p\text{-value} < 0.01\%$. Первые три коэффициента – это параметры распределения, остальные – множители для переменных. Если коэффициент отрицательный (например, для S100, Ad и

Nad-A), то с увеличением S100, Ad и Nad-A выживаемость падает. На картинке красной линией показана выживаемость при средних значениях параметров: возраст (Age) -56,63768,

хромогранин (Xp) -43,22725,

адреналин (Ad)-47,71014,

норадреналин-адреналиновый коэффициент (Nad-A) – 8,70522,

норадреналин-дофаминовый коэффициент (Nad-Dad) – 7, 04580.

На рисунке 3 представлен пример прогнозируемой выживаемости при изменении одного из параметров – адреналина (Ad- 112).

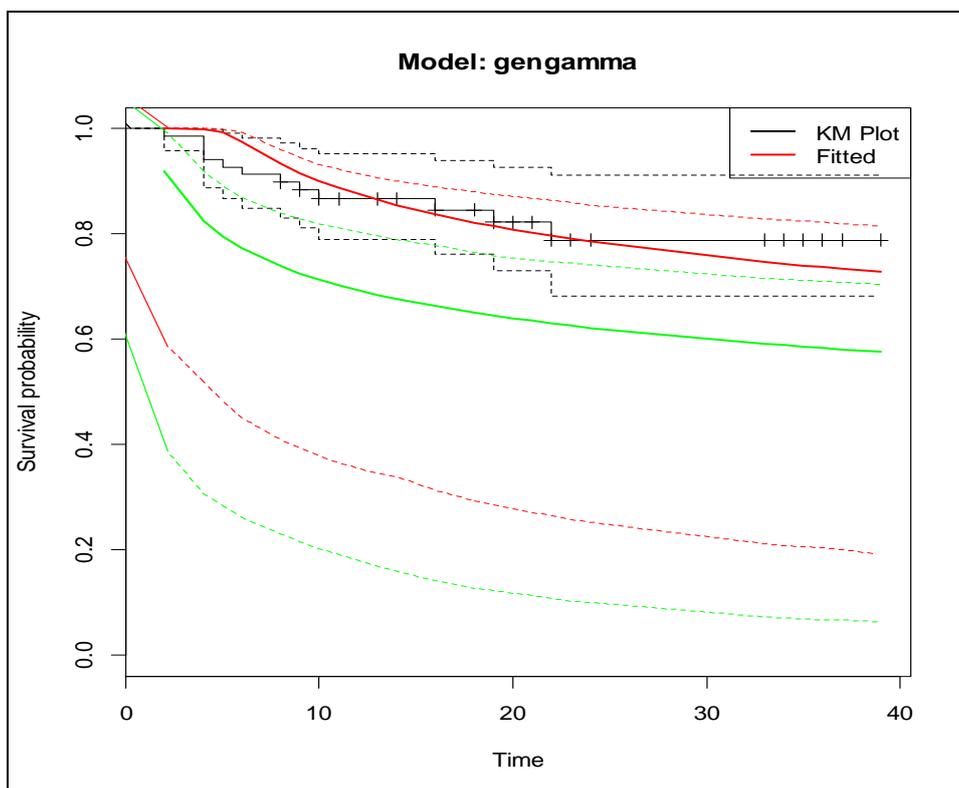


Рис. 3 Модель прогнозируемой выживаемости gengamma с учетом средних значений возраста, адреналина, норадреналин-адреналинового и норадреналин-дофаминового коэффициентов и с учетом изменения уровня адреналина.

Параметры модели gengamma

	mu	sigma	Q	Age	Xp	Ad	NAd_A	NAd_Dad
Coef	4.3864	0.8480	-7.5053	-0.0468	0.0121	-0.0236	-0.0831	0.2303
se	0.6678	0.5727	4.4500	0.0137	0.0033	0.0061	0.0194	0.0361
p-value	0.0000	0.0690	0.0460	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

На представленном рисунке 3 красная линия – это прогнозируемая выживаемость, рассчитанная по средним значениям параметров (Ad=47), зеленой линией показана кривая прогнозируемой выживаемости при тех же средних значениях параметров, но при изменении уровня адреналина (Ad=112). Таким образом, подставляя данные изучаемых параметров, мы получаем различные кривые прогнозируемой выживаемости.

При добавлении дополнительных переменных модель gengamma становится неустойчивой, поэтому использовали модель пропорционального ущерба Кокса с модификацией распределение gompertz.

Модель прогнозируемой выживаемости gompertz с использованием средних значений параметров возраста, S100B, норадреналин-адреналинового и дофаминового коэффициентов и серотонина, которая представлена на рисунке 4:

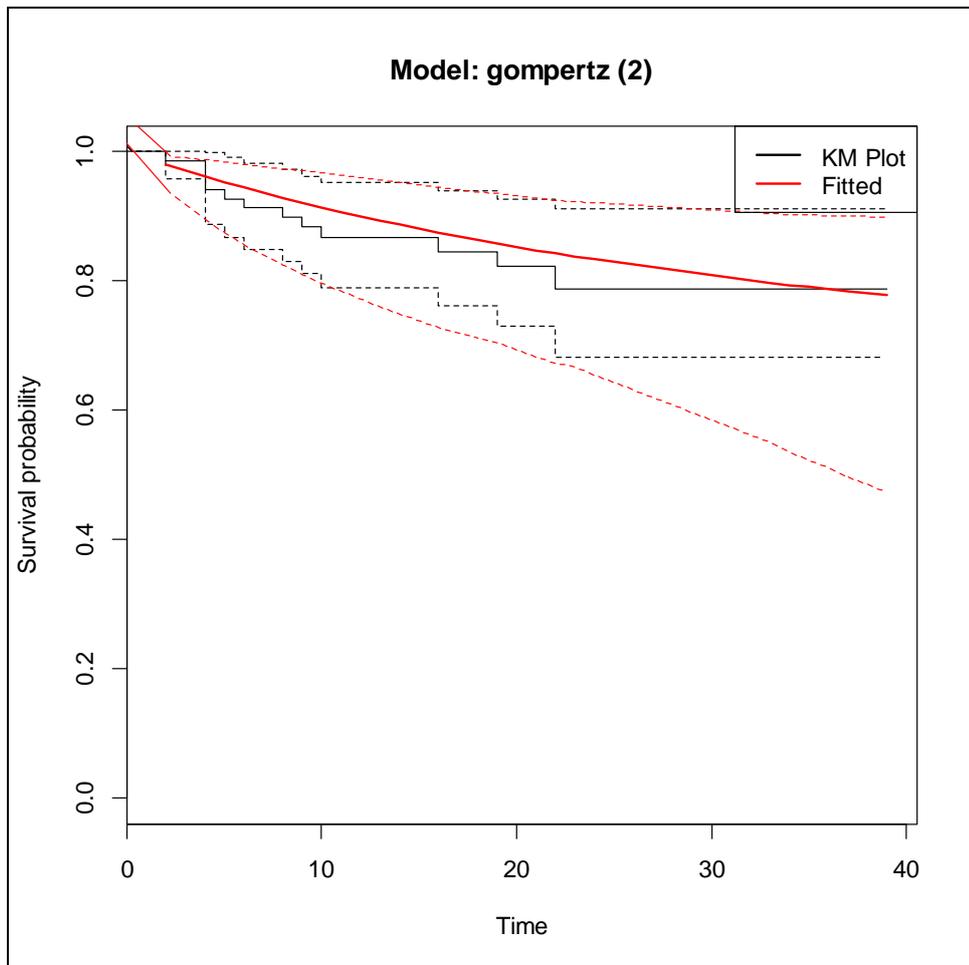


Рис. 4 Модель прогнозируемой выживаемости gompertz с учетом средних значений возраста, S100B, норадреналин-адреналинового и дофаминового коэффициентов и серотонина.

Параметры модели gompertz:

	shape	rate	Age	S100	NAd_A	NAd_Ad_DAd	C
Coef	-0.0260	0.0975	-0.0319	0.0015	0.0300	-0.0318	-0.0086
se	0.0405	0.1558	0.0239	0.0003	0.0426	0.0812	0.0070
p-value	0.2610	0.2660	0.0910	0.0000	0.2400	0.3480	0.1110

На рисунке видно, что красная линия, построенная по средним значениям возраста, S100B, норадреналин-адреналинового коэффициента, дофаминового коэффициента и серотонина проходит по линии выживаемости Каплан-Майера, что позволяет предположить о влиянии выбранных параметров на прогноз выживаемости больных меланомой кожи.

Подставляя данные изучаемых параметров конкретного больного меланомой кожи, получаем модель прогнозируемой выживаемости у данного пациента.

Таким образом, разработанные математические модели: диагностическая и прогностическая, - с учетом молекулярных факторов помогают в проведении дифференциальной диагностики между рецидивом заболевания и его отсутствием, а также помогают моделировать прогноз течения меланомы.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальной медико-социальной и экономической проблемой общественного здравоохранения многих стран, в т.ч. и России, остаются вопросы ранней диагностики и лечения меланомы кожи, поскольку особенности её клинического течения отличаются непредсказуемостью, высоким потенциалом местного роста, ранним регионарным и отдаленным метастазированием [Фрадкин С.З. и соавт., 2000; Демидов Л.В. и соавт., 2012; Tsao H. et al., 2004; Rigel D.S. et al., 2010; Leclerc E., 2011; Varughese B.E. et al., 2013]. По данным Национального Института Рака (США), ежегодный прирост заболеваемости составляет 3-5% в год, т.е. больше, чем при других злокачественных опухолях [Белякова Н.И. и соавт., 2008; Armstrong B.K. et al., 1994; Jemal A. et al., 2004]. В Австралии и Новой Зеландии прирост заболеваемости составляет 7% в год [Little J.W., 2006]. В США заболеваемость меланомой ежегодно увеличивается на 4-6% [Rigel D.S. et al., 2010; Leclerc E., 2011; Rodriguez-Cerdeira C. et al., 2011; Bennassar A. et al., 2012]. В Российской Федерации также отмечается стойкая тенденция к увеличению заболеваемости меланомой кожи. Так за десятилетие с 2005 по 2014 год заболеваемость в расчете на 100 тыс. населения выросла в Российской Федерации с 3,54 до 4,13, и прирост составил 29,96% [Чиссов В.И. и соавт; 2007; Каприн А.Д. и соавт., 2015; Каприн А.Д. и соавт., 2016]. Среди других злокачественных новообразований кожи меланома встречается относительно редко (менее 5%), но на её долю приходится около 80% летальных исходов, связанных с опухолями кожи [Демидов Л.В. и соавт., 2001; Демидов Л.В. и соавт., 2007; Miller A.J. et al., 2006; Liu S. et al., 2008; Sladden M.J. et al., 2010; Rodriguez-Cerdeira C. et al., 2011; Varughese B.E. et al., 2013].

В последнее десятилетие повышенное внимание к меланоме привело к увеличению частоты постановки диагноза на ранних стадиях заболевания. По

данным А.Д. Каприна и соавт. (2015г), за период с 2005 по 2014 г. доля больных I и II стадией заболевания выросла с 63,7% до 74,3%, а доля больных с III и IV стадией уменьшился - с 32,5% до 22,1% [Каприн А.Д. и соавт., 2015]. Но, к сожалению, диагностика меланомы кожи врачами первичного звена и онкологами неудовлетворительна, хотя, по данным В.В. Анисимова, чувствительность клинической диагностики первичной меланомы кожи на основании только анамнестических, визуальных и физикальных данных составляет 90,2% [Анисимов В.В., 2001]. Диагностика меланомы кожи в III-IV стадии в настоящее время остается высокой (22,1%), что резко ухудшает прогноз заболевания и не позволяет надеяться на успешное излечение.

Таким образом, рост заболеваемости, поздняя диагностика, неудовлетворительные результаты лечения меланомы кожи диктуют необходимость раннего выявления заболевания, определения прогноза течения его с помощью молекулярных маркеров, характеризующих опухоль и состояние макроорганизма для определения стратегии лечения.

В качестве маркеров, характеризующих макроорганизм, были выбраны нейротрансмиттеры (адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин), определяющие состояние нейрогуморальной системы организма, с одной стороны, с другой – принимающие участие в этиопатогенезе опухоли. Известно, что развитие и прогрессирование злокачественного процесса зависят не только от биологических свойств опухоли, но и от функционального состояния нейроэндокринной и иммунной систем организма [Кавецкий Р.Е., 1977; Балицкий К.П., 1985; Лабунец И.Ф. и соавт., 1989; Балицкий К.П., 1991; Elenkov I.J. et al., 2000]. По данным отечественных и зарубежных авторов, для неопластического процесса характерен дисбаланс в системе возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров [Меньшиков В.В., 1963; Матлина Э.Ш. и соавт., 1967; Ойфе Г.Р., 1971; Lechin F. et al., 2002; Schuller H.M., 2008; Fitzgerald P.J., 2012; Li S. et al., 2013].

Нейротрансмиттеры вегетативной нервной системы действуют как мощные регуляторы многочисленных функций клеток по выработке факторов роста, факторов ангиогенеза, факторов, способствующих метастазированию, а также провоспалительных цитокинов, нейротрансмиттеров опухолевыми клетками и окружающей опухоль средой. Они модулируют также пролиферацию, миграцию, апоптоз трансформированных клеток, неоангиогенез в опухоли, и тем самым вносят вклад в формирование и прогрессию злокачественных новообразований [Абрамов В.В. и соавт., 1998; Берштейн Л.М., 2000; Франциянц Е.М. и соавт., 2013; Schuller H.M., 2008; Guo K. et al., 2009; Moreno-Smith M. et al., 2010; Tilan J. et al., 2010]. Работ по исследованию нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи мы не встретили. Зарубежные исследователи изучали нейротрансмиттеры (норадреналин и адреналин) *in vitro*, на моделях клеточной линии человеческой меланомы и животных моделях [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Yang E.V. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2009; Yang E.V., 2010; Moretti S. et al., 2013]. Единственную работу по определению нейротрансмиттеров в моче больных меланомой кожи встретили в отечественной литературе [Тригулова О.К., 2009].

В качестве маркеров заболевания определялись белок S100B и хромогранин А. В настоящее время перспективным прогностически значимым маркером меланомы кожи рассматривается опухолеассоциированный сывороточный маркер S100B [Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Guo H.B. et al., 1995; von Schoutz E. et al., 1996; Gogas H. et al., 2009]. Хромогранин А в качестве опухолевого маркера взят исходя из мнений исследователей, что меланома кожи – нейроэндокринная опухоль [Горбунова В.А. и соавт., 2007; Lum S.S. et al., 2001; Eyden B. et al., 2005; Slominski A. et al., 2010].

Молекулярные маркеры исследованы у 126 больных, поступивших в хирургическое отделение №3 ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» МЗ Республики Марий Эл и онкологическое отделение №3 ГАУЗ

«Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ Республики Татарстан, до начала специализированного противоопухолевого лечения.

Больные были разделены на три группы (табл. 1): I группа – первичные больные - 53 пациента (42,1%), II группа - пациенты с рецидивом заболевания – 30 (23,8%) и III группа – это пациенты без рецидива заболевания - 43 (34,1%). Женщины составили 65,1%, что объясняется более высокой частотой встречаемости меланомы кожи среди женщин, соотношение - 1,9:1 (табл. 2). Наибольшее число заболевших приходилось на пятую и шестую декаду жизни (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными литературы [Кудрявцев Д.В. и соавт., 2008; Гырылова С.Н. и соавт., 2009; Markovic S.N. et al., 2007; Psaty E.L. et al., 2010; Whiteman D.C. et al., 2011].

Наиболее распространенными гистологическими формами по клинико-биологическим особенностям были поверхностно-распространяющаяся и узловатая форма пигментной меланомы (табл. 10), с преимущественным расположением первичного очага на коже туловища, а именно на коже спины (табл. 6, 12 и 16), что соответствует данным литературы [Bulliard J.-L., 2000; Markovic S.N. et al., 2007; Whiteman D.C., 2011]. В первой группе преобладали пациенты с IA, IB, IIA стадиями заболевания, при этом у женщин преобладали IA и IIA стадии, у мужчин – IB стадия заболевания (табл. 11). В группе с рецидивом меланомы преобладали пациенты с IB стадией – 30% (табл. 13), т.е. при III уровне инвазии по Кларку (толщина опухоли по Бреслоу более 0,75 мм), повышается риск рецидива заболевания, о чем пишут и другие исследователи [Ilmonen S. et al., 2002; Luke C.G. et al., 2003; Becker D. et al., 2006; Medic S. et al., 2007].

Группа без рецидива заболевания представлена пациентами, состоящими на диспансерном учете от 2 и более 10 лет с IA и IB стадиями заболевания (табл. 19).

По результатам наших исследований у 53,3% больных рецидивы меланомы кожи возникли в период до года после радикальной операции,

причем наибольшая частота отмечена в виде регионарных и отдаленных метастазов (табл. 15), что согласуется и с данными литературы [Демидов Л.В. и соавт., 2001; Анисимов В.В., 2000; Семилетова Ю.А. и соавт., 2010; Семилетова Ю.А. и соавт., 2012]. До 3 лет рецидивы возникли у 83,3% больных (табл. 15). Значительно чаще прогрессирование процесса диагностировалось при локализации меланомы на коже туловища и нижних конечностей при толщине опухоли по Бреслоу более 0,75мм.

Высокая частота регионарного метастазирования и диссеминации процесса, диагностируемых до года, может свидетельствовать не только о высокой агрессивности опухоли, но и о неадекватности первичной диагностики регионарных и отдаленных метастазов, а это в свою очередь невыполненная лимфаденэктомия, непроведенные в адьювантном режиме химио- и иммунотерапия. Таким образом, необходимо внедрять молекулярные маркеры для диагностики пациентов высокого риска раннего прогрессирования заболевания, диагностики микрометастазов в лимфатических узлах и отдаленных органах, а также маркеров диагностики дисбаланса нейроэндокринной системы организма, которая отвечает за функционирование иммунной системы и психо-эмоциональный статус пациента.

По результатам нашего исследования впервые выявлено достоверно значимое снижение по сравнению с группой контроля уровня адреналина во всех трех исследуемых группах больных меланомой кожи (табл. 20). В отличие от результатов Д.М.Фатеева (2013), который наблюдал повышение уровня адреналина у больных раком почки [Фатеев Д.М., 2013], у больных меланомой кожи идет снижение данного нейротрансмиттера. Наши данные согласуются с результатами Д.А. Харагезова (2006), по данным которого при раке толстого кишечника также наблюдалось снижение уровня адреналина в плазме крови [Харагезова Д.А., 2006]. В отличие от нас, О.К. Тригулова (2009), определявшая норадреналин и адреналин в суточной моче у 28 больных меланомой кожи, констатирует, что у 85% больных отмечен

дефицит норадреналина [Тригулова О.К, 2009]. Уровень норадреналина (табл. 20) достоверно был снижен только в группе первичных больных меланомой кожи, а в других группах наблюдалась тенденция к его снижению, в отличие от Д.М.Фатеева (2013), который при раке почки наблюдал практически неизменный уровень последнего в крови [Фатеев Д.М., 2013]. Мы наблюдали повышение уровня дофамина в плазме крови в группе первичных больных, больных с рецидивом и нормальный его уровень в группе больных без рецидива заболевания. По данным О.К. Тригуловой (2009), среднее количество дофамина в моче у больных меланомой кожи вдвое ниже, чем у здоровых. Данные по содержанию дофамина у первичных больных и больных с рецидивом заболевания согласуются с данными Д.М. Фатеева (2013) при раке почки [Фатеев Д.М., 2013]. При раке толстого кишечника уровень дофамина в крови снижен [Харагезова Д.А., 2006]. В группе первичных больных с учетом стадии заболевания выявлено достоверно значимое снижение уровня адреналина и норадреналина при I и II стадиях заболевания, по уровню дофамина достоверно значимых различий с группой контроля не получено (табл. 22).

Данные литературы по содержанию дофамина в тканях опухоли противоречивы. Отечественные авторы отмечают некоторое повышение содержания дофамина в опухолевой ткани желудка и уменьшение его в опухолевой ткани кишечника [Клименко Е.М. и соавт., 1983]. Напротив, по данным зарубежных авторов, при раке желудка уровень эндогенного дофамина в опухоли ниже, чем в окружающих здоровых тканях, что дало им основание предположить, что медиатор выступает в качестве фактора эндогенного подавления роста опухоли [Chakroborty D. et al., 2004; Tilan J. et al., 2010].

Таким образом, данные по содержанию нейротрансмиттеров у онкологических больных остаются противоречивыми, что требует дальнейшего их изучения при злокачественных новообразованиях различных

локализаций, что привнесет новые данные в этиопатогенез опухолей, а значит, изменит и подходы к их лечению.

Впервые нами была изучена концентрация нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи с учетом локализации рецидива заболевания. По нашим результатам в группе больных с рецидивом заболевания в плазме крови наблюдается достоверно значимое снижение уровня адреналина не зависимо от характера рецидива. Уровень норадреналина оставался в пределах нормы в группе больных с рецидивом в регионарные лимфатические узлы и достоверно был снижен в группе с диссеминированным процессом, уровень дофамина оставался в пределах нормы (табл. 23).

Впервые нами проанализированы соотношения нейротрансмиттеров в плазме крови больных меланомой кожи: норадреналин к адреналину (НА/А) – норадреналин-адреналиновый коэффициент, норадреналин к дофамину (НА/ДА) - норадреналин-дофаминовый коэффициент и соотношение суммы концентрации норадреналина и адреналина к концентрации дофамина (НА+А)/ДА – дофаминовый коэффициент (табл. 21). Эти показатели характеризуют автономную нервную систему и отражают соотношение медиаторного и гормонального звеньев симпатико-адреналовой системы. В исследуемых группах больных мы отметили достоверную однонаправленность изменений в виде усиления норадренергического и ослабления адренергического звена симпатико-адреналовой системы, т.е. у больных меланомой кожи имеет место преобладание медиаторного звена над гормональным. При оценке норадреналин-дофаминового и дофаминного коэффициентов выявлено снижение их во всех исследуемых группах по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). По результатам Д.М. Фатеева (2013), норадреналин-адреналиновый и дофаминовый коэффициенты у больных раком почки достоверно не отличались от таковых у здоровых людей, что свидетельствовало о достаточной сбалансированности гормонального и медиаторного компонента симпатико-адреналовой системы [Фатеев Д.М.,

2013] у данной категории больных. Таким образом, при нормальном или даже повышенном уровне дофамина (субстрат для синтеза норадреналина и адреналина), уровень адреналина и норадреналина в плазме крови больных меланомой кожи был снижен, что может свидетельствовать о дисфункции ферментных систем, задействованных в обмене нейротрансмиттеров.

Впервые проанализированы норадреналин-адреналиновый, норадреналин-дофаминовый и дофаминовый коэффициенты в зависимости от стадии заболевания в группе первичных больных (табл. 22). Наблюдали повышение норадреналин-адреналинового коэффициента при всех стадиях заболевания, но достоверно значимое отличие было получено при I и III стадии заболевания. При оценке норадреналин-дофаминового и дофаминового коэффициентов выявлено их снижение при всех стадиях заболевания, но достоверность результатов получена при I и II стадиях. Таким образом, имеет место некая фазность в обмене катехоламинов в зависимости от стадии заболевания, что требует дальнейших исследований.

При изучении коэффициентов с учетом характера рецидива меланомы кожи получено достоверное повышение норадреналин-адреналинового коэффициента не зависимо от характера рецидива: регионарное метастазирование или диссеминированный процесс (табл. 23). При диссеминированном процессе наблюдали еще и снижение норадреналин-дофаминового и дофаминового коэффициентов, что свидетельствовало о более глубоких нарушениях в обмене нейротрансмиттеров. Таким образом, максимальные нарушения нейротрансмиттерного обмена наблюдаются в группе больных с рецидивом меланомы кожи в виде диссеминации процесса, что возможно обусловлено проявлением декомпенсации симпатико-адреналовой системы, что в свою очередь способствует процессу диссеминации. Следовательно, вспомогательная нейрофармакологическая терапия может служить в качестве важного дополнительного инструмента в лечении, прежде всего, этой группы больных. Поскольку изменения в

нейротрансмиттерном обмене найдены уже при I стадии заболевания, считаем рационально её применение уже с I стадии заболевания.

Впервые нами исследован уровень серотонина в плазме крови больных меланомой кожи. По результатам исследования наблюдали снижение уровня серотонина во всех трех группах, но достоверно значимое отличие по сравнению с группой контроля получено в первой и в третьей группе (табл. 24). При оценке уровня серотонина с учетом стадии заболевания наблюдается снижение концентрации медиатора при всех стадиях заболевания, достоверно значимое отличие имеет место при II стадии (табл. 25).

Данные литературы по содержанию серотонина у больных с другими злокачественными новообразованиями также противоречивы. Так, при раке легких отмечается как увеличение серотонина в крови [Дубилей П.В. и соавт. 1971, цит. по Филатовой Н.А., 1986], так и отсутствие достоверных различий по сравнению со здоровыми донорами [Crowford N. 1965, цит. по Филатовой Н.А., 1986]. При раке желудка наблюдали как увеличение [Подильчак М.Д. и соавт. 1970, цит. по Филатовой Н.А. 1986], так и уменьшение содержания серотонина в крови [Агаев Б.А. и соавт., 1977]. Б.А. Агаев (1977) не нашел четкой зависимости уровня серотонина в крови со стадией заболевания, а также структурой опухоли [Агаев Б.А. и соавт., 1977]. Содержание серотонина в периферической крови больных раком легкого повышено по сравнению со здоровыми лицами в 2,5 раза, после радикальной операции на легком уровень серотонина в крови снизился в 2 раза, приближаясь к норме [Булыгина А.В. 1973]. По-видимому, автор изучал данный медиатор у больных с карциноидом легкого. Кроме того, известно, что серотонин может вырабатываться и в самой меланоме. Так, Horai T. с соавторами (1979) опубликовал данные о высокой концентрации серотонина в опухолевой ткани метастаза меланомы в легком. Единичные исследования зарубежных авторов свидетельствуют о том, что клетки меланомы человека синтезируют и метаболизируют широкий спектр биогенных аминов, в том числе и

серотонин [Mc Ewan M. et al., 1987; Slominski A., 2002]. Снижение уровня гуморального серотонина объясняется на наш взгляд истощением его запасов ввиду участия в различных патологических реакциях, уменьшением синтеза при нарушении метаболических процессов, а также с накоплением в опухолевой ткани. Таким образом, противоречивые данные литературы требуют дальнейшего изучения данного медиатора у онкологических больных, поскольку, согласно экспериментальным данным, серотонин обладает выраженным противоопухолевым действием, изменяя кислородный режим нормальных и опухолевых тканей, т.е. создает условия аноксии в ткани опухоли в течение длительного времени [Пухальская Е.Ч., 1960г; Винницкий В.Б., 1970], а также влияет на функции некоторых эндокринных желез не только прямым действием, но и через центральные механизмы [Иззати - Заде К.Ф. и соавт., 2004].

В 70-80-х годах прошлого столетия отечественные исследователи изучали нейротрансмиттерный обмен по содержанию катехоламинов в крови, в моче, в тканях опухоли и непораженных частях органов, а также определяли состояние симпатико-адреналовой системы с использованием функциональных проб. Они отметили, что в процессе развития и распространения злокачественной опухоли происходит изменение в соотношении медиаторного и гормонального звеньев симпатико-адреналовой системы, нарушается внутриклеточный обмен. Это создает условия для развития функциональной десимпатизации ткани опухоли и организма в целом, что находит отражение в изменении тонуса симпатико-адреналовой системы у онкологических больных [Ойфе Г.Р., 1971; Шевелева В.С. и соавт., 1980; Шульга Н.И., 1980; Мельников Р.А. и соавт., 1981; Филатова Н.А. и соавт., 1982; Клименко Е.В. и соавт., 1983; Тарутинов В.И. и соавт., 1984; Сафина М.Р., 1986]. По результатам исследований Г.Р. Ойфе (1971), при прогрессировании ракового процесса происходят не только количественные изменения в содержании адренолиноподобных веществ в периферической крови, но и в большей степени нарушается их соотношение [Ойфе Г.Р.,

1971]. Впервые нами показано, что при меланоме кожи также наблюдаются изменения в содержании нейротрансмиттеров в периферической крови, и нарушается их соотношение, идет дисфункция симпатико-адреналовой системы с преобладанием медиаторного звена над гормональным.

Исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo* на клеточных моделях коллективами ученых [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Sood A.K. et al., 2006; Thaker P.H. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2006] показали на примере рака яичников и рака носоглотки, что катехоламины (норадреналин и адреналин) могут влиять на прогрессирование опухоли путем модуляции экспрессии матриксных металлопротеиназ, ангиогенных цитокинов, фактора роста эндотелия сосудов в опухолевых клетках, тем самым стимулируя инвазивность. В исследованиях на моделях рака молочной железы и рака легких у животных было показано увеличение метастазов при активации β -адренорецепторов, что приводило к усилению васкуляризации опухоли, то есть повышался уровень фактора роста эндотелия сосудов и других ангиогенных факторов [Ben-Eliyahu S. et al., 1991; Melamed R. et al., 2005; Armaiz-Pena G.N. et al., 2009; Guo K. et al., 2009]. Исследования на моделях клеточной линии человеческой меланомы влияния норадреналина показали, что последний через β_1 - и β_2 – адренорецепторы влияет на экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкина-8 и интерлейкина-6, т.е. факторов, которые способствуют ангиогенезу и метастазированию. В результате модуляции фактора роста эндотелия сосудов, матриксных металлопротеиназ (ММР-2 и ММР-9) и циклооксигеназы происходит инвазия опухолевых клеток и диссеминация процесса [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Yang E.V. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2009; Yang E.V., 2010].

S. Moretti с соавторами (2013), изучавший экспрессию β - адренорецепторов в кожной меланоме на человеческой A375 первичной и Hs29-4T клеточных линиях метастатической меланомы и влияние на них эндогенных агонистов норадреналина и адреналина, показал, что в тканях злокачественной меланомы в отличие от доброкачественных невусов оба β_1 -

и β_2 - адренорецепторы значительно выражены. Авторы доказали, что адреналин и норадреналин увеличивают выброс факторов ангиогенеза, и этот эффект был заторможен введением неселективного антагониста β -адренорецепторов - пропранололом. Их результаты показали, что норадреналин и адреналин модулируют в пробирке через активацию β -адренорецепторов ряд биологических реакций, которые могут оказать проонкогенный эффект в клеточных линиях меланомы. Эти наблюдения подтверждают гипотезу, что катехоламины норадреналин и адреналин путем активации ими рецепторов, способствуют прогрессии меланомы в естественных условиях [Moretti S. et al., 2013]. Ранее по данным морфологических исследований было установлено, что нервные волокна и их окончания при злокачественных опухолях претерпевают дистрофические изменения не только в области разрастания опухолевой ткани, но и вдали от нее. Это приводит к нарушению высвобождения нейротрансмиттеров. Денервированная ткань поглощает катехоламины менее интенсивно, чем нормальная [Меньшиков В.В., 1963; Клименко Е.М. и соавт., 1983]. Таким образом, норадреналин и адреналин играют немаловажную роль в канцерогенезе опухолей, в том числе и меланомы. Наибольшие нарушения обмена норадреналин и адреналина мы наблюдаем у больных с рецидивом меланомы кожи в виде диссеминации процесса.

В отличие от норадреналина и адреналина дофамин имеет противоположное воздействие на рост опухоли. Рядом авторов было показано, что введение дофамина тормозит рост различных опухолей, например: рака желудка, толстой кишки, рака молочной железы, нейробластомы, в том числе и меланомы [Wick M.M., 1980; Kubota R. et al., 1992; Chakroborty D. et al., 2004; Sarkar C. et al., 2008; Thaker P.H. et al., 2008; Armaiz-Pena G.N. et al., 2009; Tilan J. et al., 2010]. Ингибирующее влияние на опухоль дофамин реализует через прямое антиангиогенное действие на эндотелиальные клетки. И во всех моделях рака на животных применение дофамина показало значительное снижение васкуляризации опухоли

[Chakroborty D. et al., 2004; Asada M. et al., 2008; Sarkar C. et al., 2008; Armaiz-Pena G.N. et al., 2013]. Дофамин блокирует фактор роста эндотелия сосудов - индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников, миграцию и проницаемость сосудов, т.е. можно говорить об участии дофамина в процессах неоваскуляризации опухоли [Tilan J. et al., 2010; Armaiz-Pena G.N. et al., 2013]. Некоторое повышение уровня дофамина, которое мы наблюдали у больных меланомой кожи, на наш взгляд можно объяснить, как проявление адаптационных механизмов противоопухолевой защиты макроорганизма.

Найденные нами нарушения в обмене нейротрансмиттеров при меланоме кожи связаны, с одной стороны, с нарушением их обмена в макроорганизме и с участием в их обмене самой опухоли, с другой стороны. Нам представляется, что снижение уровня в плазме крови адреналина и норадреналина, при нормальном и даже повышенном уровне дофамина, исходного субстрата для синтеза последних, можно объяснить дисфункцией ферментных систем, участвующих в синтезе и ферментных систем, участвующих в распаде (катехол-о-метилтрансфераза, моноаминооксидаза), а также, возможно, избыточным захватом нейротрансмиттеров самой опухолью («опухоль-ловушка»). Возможно, снижение уровня адреналина и норадреналина у больных меланомой кожи связано также с пониженным уровнем серотонина, который, как известно, стимулирует секрецию адреналина и норадреналина в мозговой части надпочечника, а также через гипоталамо-гипофизарную систему [Иззати-заде К.Ф. и соавт., 2004].

При дисфункции нейроэндокринной системы подавляется цитотоксическая активность Т-клеток, NK – клеток, и нарушается презентация антигена [Меерсон Ф.З. и соавт., 1985; Ben-Elliyahu S. et al., 2000; Moreno-Smith M. et al., 2010; Li S. et al., 2013]. По данным I.J. Elenkov (2000), медиаторы влияют на функционирование иммунной системы в регулировании миграции лейкоцитов и опухолевых клеток. А миграция лейкоцитов имеет первостепенное значение для противоопухолевого

иммунного ответа, в то время как миграция опухолевых клеток является необходимым условием для распространения и развития метастазов [Entschladen F. et al., 2004; Yang E.V. et al., 2009; Moreno-Smith M. et al., 2010]. В качестве ко-фактора, по данным L. Temoshok с соавт. (1985), способствующим опухолевой прогрессии, в частности меланомы, выступает и стресс - через активацию симпатико-адреналовой системы, путем модуляции экспрессии проангиогенных и прометастатических факторов [Lutgendorf S.K. et al., 2003; Sood A.K. et al., 2006; Thaker P.H. et al., 2006; Yang E.V. et al., 2008]. Учитывая найденные изменения в обмене нейротрансмиттеров при меланоме кожи, мы согласны с мнением F. Lechin с соавт. (2002), что необходимо дополнять при диагностике злокачественных новообразований знания по нейроэндокринному профилю, т.е необходимо проводить дифференциальный диагноз состояния симпатико-адреналовой системы для того, чтобы индивидуализировать терапевтический подход к каждому пациенту путем назначения соответствующих нейрофармакологических лекарственных препаратов для нормализации нейротрансмиттеров («физиологический тип терапии» – небольшими дозами препаратов) [Lechin F. et al., 2002]. Так, F. Lechin и соавт. (2002), предлагают в качестве нейрофармакологических препаратов использовать предшественники норадреналина, агенты, способствующие высвобождению норадреналина, небольшие дозы β -блокирующих агентов, ингибиторы поглощения норадреналина, небольшие дозы предшественника серотонина и другие. По литературным данным, при хроническом использовании бета-блокаторов наблюдается снижение числа рецидивов, частоты прогрессирования и смертности от злокачественных новообразований на примере рака молочной железы, предстательной железы и злокачественной меланомы [Fitzgerald P.J. et al., 2012; Schuller H.M. et al., 2012]. Тем самым, β -блокаторы могут считаться новым адъювантом в существующей терапевтической стратегии опухолей [Li S. et al., 2013], т.е. это позволяет

подумать о репозиционировании бета - блокаторов в онкологическую практику.

Таким образом, изучение нейротрансмиттерного обмена при меланоме кожи позволяет оценить состояние симпатико-адреналовой системы у больного и выработать стратегию по лечению, направленную не только на санацию опухолевого очага, но и на нормализацию уровня нейротрансмиттеров больного, т.к. они принимают участие в большинстве физиологических и патофизиологических функций, в адаптационных реакциях, в формировании иммунной, антиоксидантной, антиметастатической и противоопухолевой резистентности организма [Балицкий К.П., 1983; Терещенко И.П., 1987; Уманский В.Ю. и соавт., 1990; Корнева Е.А., 1993; Fitzgerald P.J., 2012].

Применение эффективных молекулярных маркеров, характеризующих состояние опухоли, в частности меланомы кожи, позволит осуществлять раннюю диагностику заболевания и его рецидивов. По данным отечественных и зарубежных авторов, пациенты с начальной стадией меланомы кожи без клинически значимых метастазов уже имеют микрометастазы и риск раннего рецидива [Леончук А.Д., 1990; Вагнер Р.И. и соавт., 1996; Курдина М.И. и соавт., 1996; Анищенко И.С. и соавт., 2003; Кукушкина М.Н. и соавт., 2012; Ranieri J.M. et al., 2006; Ellis M.S. et al., 2010], поэтому важно выделить этих пациентов для адъювантной терапии. Таким образом, существует потребность в серологических маркерах, которые могли бы указать, имеются ли у первичной меланомы метастазы в регионарных лимфатических узлах или отдаленных органах, и принять правильное решение о тактике проводимой терапии [Liu S. et al., 2008; Haass N.K. et al., 2009]. В литературе нет единого мнения об эффективности того или иного серологического маркера при злокачественных новообразованиях, все они являются взаимодополняющими, и их клиническое значение остается предметом дискуссий [Сергеева Н.С. и соавт., 2011; Снеговой А.В. и соавт., 2011; Faries M.B. et al., 2007].

Как показало исследование, содержание белка S100B в группе больных с рецидивом заболевания выше такового в группе больных с первичной меланомой и группе диспансерных больных. При анализе уровня S100B в исследуемых группах видно, что маркер проявил себя лучше в качестве маркера диагностики рецидива заболевания (табл. 26). По нашим данным, в группе с рецидивом заболевания маркер был повышен у 73,1%, в группе первичных – у 46% больных.

При анализе уровня S100B в зависимости от стадии заболевания в группе первичных больных мы наблюдаем тенденцию повышения маркера по средней концентрации S100B в сыворотке с ростом стадии заболевания, но с учетом небольшой выборки говорить о стадиоспецифичности не представляется возможным (табл. 27). По данным литературы, у больных с меланомой кожи наблюдается стадиоспецифичность: равномерное повышение уровня S100B в сыворотке крови с максимальным показателем при III и IV стадиях заболевания [Guo H.V. et al., 1995; Сергеева Н.С. и соавт., 2008].

Изучая концентрацию S100B в сыворотке крови в группе первичных больных в зависимости от глубины инвазии по Кларку (табл. 28), т.к. данные о толщине опухоли по Бреслоу отсутствовали у большинства больных, были получены данные, что даже при небольшой выборке первичных больных имеется тенденция к повышению уровня маркера S100B с увеличением глубины инвазии по Кларку, по средним концентрациям. По данным литературы, уровень белка S100B в сыворотке крови коррелирует с такими прогностическими факторами течения меланомы кожи, как: толщина опухоли по Бреслоу и уровень инвазии по Кларку, тем самым увеличивается чувствительность и специфичность маркера [Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Abraha H.D., et al., 1999; Bolandera A. et al., 2008].

При рецидиве заболевания с нарастанием диссеминации процесса наблюдается тенденция к росту уровня маркера (табл. 29). Оценка информативности маркера S100B при меланоме кожи показала, что во второй

группе больных (с рецидивом заболевания) чувствительность, специфичность и точность составили соответственно 73,1%, 84,2% и 79,7%, поэтому его применение целесообразно для диагностики рецидивы меланомы (табл. 30). Кроме того, нами было отмечено, что у ряда пациентов в группе первичных больных с изначально высоким уровнем S100B рецидив и летальный исход наступал в течение 2-15 месяцев, т.е. у этих больных он выступал в качестве прогностического маркера. Полученные нами данные согласуются с данными литературы о потенциальной роли сывороточного белка S100B как перспективного прогностического маркера для ранней диагностики рецидива и метастатического процесса [Сергеева Н.С. и соавт., 2008; Martenson E.D. et al., 2001; Banfalvi T. et al., 2002; Bottoni U. et al., 2003; Andres R. et al., 2004; Domingo-Domenech J. et al., 2005; Mocellin S. et al., 2008; Tarhini A.A. et al., 2008; Wevers K.P. et al., 2013]. Рост уровня белка S100B при рецидиве заболевания, а также при диссеминированном процессе меланомы связан с тем, что он принимает активное участие в регуляции всех основных метаболических процессов, в регуляции пролиферации, контроле клеточного цикла, энергетическом обмене, активности ферментов, клеточном росте, апоптозе [Maelandsmo G.M., 1997; Donato R., 2003; Santamaria-Kisiel L. et al., 2006; Miwa N., 2008; Donato R. et al., 2013; Halawi A., 2014].

Наши данные совпадают с данными литературы о том, что высокие цифры сывороточного белка S100B ассоциированы с плохим прогнозом в отношении рецидива и выживаемости [Tarhini A.A. 2009]. Согласно с мнением некоторых исследователей [Domingo-Domenech J., 2007; Peric B., 2011], что уровень белка S100B может играть большую роль при диспансеризации пациентов с меланомой кожи, поскольку в нашем исследовании он был повышен в группе с рецидивом у 73,1%, в группе без рецидива только у 32,2% больных. При регулярном его определении в сыворотке крови у больных меланомой он может быть полезным диагностическим инструментом для обнаружения на ранних этапах больных с бессимптомным течением метастатического процесса, а также позволяет,

как можно раньше провести инструментальную диагностику метастатического очага. Повышение концентрации в сыворотке S100B предшествует обнаружению метастазов меланомы на несколько недель [Jury C.S., 2000].

Учитывая, что у половины первичных больных он также был выше дискриминационного уровня, считаем также, что возможно его применение и для первичной диагностики меланомы кожи. Для окончательного решения вопроса о целесообразности его применения для первичной диагностики необходимо большее количество клинических наблюдений.

Исследуя уровень хромогранина А у больных меланомой кожи, мы не получили достоверных различий в его содержании у больных и здоровых, поэтому данный маркер не может рассматриваться в качестве диагностического и прогностического. Учитывая, что у части больных (14%) хромогранин А был выше дискриминационного уровня, можно предположить, что у них меланома носила нейроэндокринный характер. Для точного ответа на данный вопрос необходимо иммуногистохимическое исследование экспрессии хромогранина в опухолевых клетках, что не было задачей нашего исследования.

Впервые с учетом молекулярных факторов выбран ряд математических моделей для диагностики и прогноза меланомы кожи. Из многочисленных математических моделей были отобраны информативные: для дифференциальной диагностики - логистическая модель с использованием параметров (пол, возраст (Age), S100B (S100), норадреналин-адреналиновый (Nad-Ad) и норадреналин-дофаминовый (Nad-Dad) коэффициенты), для прогноза течения заболевания – модель «ускорения времени», распределения gengamma и модель пропорционального ущерба Кокса, распределение gompertz, так как прогностическая выживаемость по средним значениям переменных совпадает с реальной выживаемостью по Каплан-Майеру. Логистическая модель позволяет проводить дифференциальную диагностику между наличием заболевания и его отсутствием. Используя данные

контрентного больного с применением модели gengamma и gompertz можно построить прогностическое течение заболевания у этого пациента.

Таким образом, для оценки течения меланомы помимо известных клинико-морфологических факторов прогноз выживаемости необходимо оценивать уровень белка S100B (отражающий процесс активности опухоли) и уровень нейротрансмиттеров и их соотношение (отражающий состояние макроорганизма в процессе активности опухоли) у каждого пациента. Использование данных факторов в математических моделях позволяет в клинике прогнозировать течение меланомы кожи.

ВЫВОДЫ

1. В плазме крови больных первичной меланомой кожи, больных рецидивной меланомой и больных без рецидива заболевания снижен уровень адреналина. Уровень норадреналина снижен в группе больных с первичной меланомой и при диссеминированном процессе в группе больных с рецидивом заболевания. Уровень дофамина повышен в группе первичных больных и больных с рецидивом заболевания. Уровень серотонина снижен во всех группах больных, достоверно значимое снижение – в группе больных первичной меланомой и в группе больных без рецидива заболевания.
2. В группе первичных больных меланомой кожи уровень адреналина снижен при I и II стадиях, уровень норадреналина снижен при всех стадиях, уровень серотонина снижен при II стадии заболевания, по уровню дофамина достоверно значимых различий не получено.
3. Во всех исследуемых группах больных меланомой кожи наблюдается повышение норадреналин-адреналинового коэффициента и снижение норадреналин-дофамина и дофамина коэффициентов, что свидетельствует о достоверной однонаправленности изменений в соотношениях катехоламинов в виде усиления норадренергического и ослабления адренергического звена симпатико-адреналовой системы и нарушении метаболизма катехоламинов.
4. В группе первичных больных и больных с рецидивом заболевания повышен уровень S100B. В группе первичных больных с ростом стадии заболевания и с увеличением глубины инвазии по Кларку наблюдается тенденция к повышению уровня маркера. В группе больных с рецидивом заболевания выявлена тенденция роста уровня маркера с нарастанием диссеминации процесса. Наибольшую информативность: чувствительность 73,1%, специфичность 84,2% и точность 79,7% - показал маркер S100B при рецидиве заболевания, что делает его целесообразным использовать при диспансерном наблюдении больных меланомой кожи.

5. По уровню хромогранина А достоверно значимых различий у больных меланомой кожи и здоровых не получено, и данный маркер не может рассматриваться в качестве диагностического и прогностического маркера.

6. Разработанные математические модели с учетом молекулярных факторов позволяют проводить дифференциальную диагностику между рецидивом заболевания и его отсутствием, а также моделировать прогноз течения меланомы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения состояния нейромедиаторной системы у больных меланомой кожи необходимо определять уровень адреналина, норадреналина, дофамина, серотонина и их соотношения в плазме крови.
2. Для раннего выявления рецидива меланомы целесообразно применять исследование белка S100B в сыворотке крови.
3. Возможно применение серологического белка S100B в комплексной диагностике первичной меланомы кожи.
4. Целесообразно применение нейрофармакологических препаратов для нормализации симпатико-адреналовой системы при всех стадиях заболевания, и особенно при диссеминации процесса с учетом концентрации нейротрансмиттеров и их соотношений в плазме крови.
5. В реабилитации больных меланомой кожи для нормализации симпатико-адреналовой системы необходимо участие онкопсихологов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, В.В. Асимметрия нервной, эндокринной и иммунной систем / Абрамов В.В., Абрамова Т.Я. – Новосибирск: Наука – 1996. – 97 с.
2. Агаев, Б.А. Серотонин в крови у больных раком желудка / Б.А. Агаев, Б.Г. Гулиев // Вопрос онкологии. – 1977. – Т.23, №5. – С. 50–54.
3. Акмаев, И.Г. Нейроиммуноэндокринология: факты и гипотезы / И.Г. Акмаев // Проблема эндокринологии. – 1997. – Т.43, №1. – С.3–9.
4. Аксель, Е.М. Состояние онкологической помощи населению в России и странах СНГ в 2007 г. / Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина. – 2009. – Т.20, №3(прил.1). – С. 8–155.
5. Анисимов, В.В. Стандартное обследование пациентов с подозрением на меланому. Современная клиническая классификация / В.В. Анисимов // Практическая онкология. – 2001. –Т. 4, №8. – С. 12–22.
6. Анищенко, И.С. Проблемы диагностики меланомы кожи на догоспитальном этапе // Материалы Российской конференции «Достижения и современные возможности лучевой терапии в плане комбинированного и комплексного лечения больных со злокачественными новообразованиями», 13–14 мая. Екатеринбург / И.С. Анищенко, А.В. Важенин, И.Р. Ахметов– 2003. – С. 13–14.
7. Балицкий, К.П. Метастазирование опухолей. Патогенетические аспекты / К.П. Балицкий. – Киев, 1991. – 200 с.
8. Балицкий, К.П. Нервная система и противоопухолевая защита / К.П. Балицкий. – Киев, 1983.
9. Балицкий, К.П. Патогенетические аспекты метастазирования / К.П. Балицкий // Экспериментальная онкология. – 1985. – №6. – С. 16–20.
10. Балицкий, К.П. Стресс и метастазирование злокачественных опухолей / К.П. Балицкий, Ю.П. Шмалько. – Киев, 1987. – 174с.
11. Барчук, А.С. Хирургическое лечение меланомы / Барчук А.С. // Практическая онкология. – 2001. – №4. – С.30–36.

12. Берштейн, Л.М. Гормональный канцерогенез / Л.М. Берштейн. – СПб.: Наука, 2000. – 199 с.
13. Биопсия «сторожевых» лимфатических узлов при меланоме кожи / М.Н. Кукушкина, С.И.Коровин, О.И. Солодянникова, Г.Г. Сукач [и др.] // Сакромы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2012. – №3. – С. 39–47
14. Биохимия человека: в 2-х т. : пер. с англ. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М: Мир, 1993. – 384с.
15. Борщевская, М.И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов / М.И. Борщевская, С.М. Васильева // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т45, №1. – С.13–24.
16. Булыгина, А.В. Содержание серотонина в крови у больных раком легкого / А.В. Булыгина // Вопрос онкологии. – 1973. – Т.19, №8. – С. 42–44.
17. Вагнер, Р. И. Меланома кожи / Вагнер Р. И., Анисимов В.В., Барчук А.С. – СПб.: Наука, 1996. –Ч. 2. – 350 с.
18. Влияние вегетативной регуляции на отдаленные результаты радикального хирургического лечения рака желудка / Д.Н. Егоров, И.Г. Соловьева, М.М. Черенкова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 4 (20). – С. 20–26.
19. Высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли (карциноиды) и нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы. Современный взгляд на проблему / В.А. Горбунова, Н.Ф. Орел, Г.Н. Егорова, А.Е. Кузьминов / М.: Литтерра, 2007. – 104 с. – (Серия «Практ. руководства»)
20. Гриневич, Ю.А. Взаимосвязи нарушений в эндокринной и иммунной системах больных злокачественной меланомой // Экспериментальная онкология. – 1988. – Т.10, №3. – С. 51–54.
21. Демидов, Л. В. Меланома кожи. Микростадирование и клинико-гистологическая классификация / Л.В. Демидов // Российский журнал кожных и венерических болезней. –1998. –№ 4. –С. 12–17.

22. Демидов, Л.В. Адъювантное лечение больных меланомой кожи / Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич // Практическая онкология. – 2001. – №4. – С. 42–46.
23. Демидов, Л.В. Хирургическое лечение меланомы кожи / Л.В. Демидов, И.А. Утяшев // Практическая онкология. – 2012. – Т.13, №2. – С. 125–134.
24. Дильман, В.М. Эндокринологическая онкология / В.М. Дильман. – 2е изд.– Л: Медицина, 1983. – 480 с.
25. Значение уровня сывороточного белка S-100 при меланоме / Н.С. Сергеева, М.П. Мишунина, И.А. Силина [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2007. – №4. – с. 13–16.
26. Изаате-Заде, К.Ф. Нарушения обмена серотонина в патогенезе заболеваний нервной системы / К.Ф. Изаате-Заде, А.В. Баша, Н.Д. Демчук // Журнал неврологии и психиатрии. – 2004. – №9. – С. 62–70.
27. Использование серологического опухолеассоциированного маркера S100 для мониторинга больных с меланомой (пособие для врачей) / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина, Т.И. Лазутина [и др.] – М.: ФГУ «МНИОИ им.П.А. Герцена Росмедтехнологий». – 2008. – 18 с.
28. Кавецкий, Р.Е. Взаимодействие организма и опухоли / Р.Е. Кавецкий. –Киев: Наука Думка. – 1977. – 236с.
29. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, – 2016. – ил. – 250с.
30. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А.Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. – 236 с.: ил.

31. Клименко, Е. М. Содержание катехоламинов в опухолях желудочно–кишечного тракта / Е.М. Клименко, В.С. Шевелева, Р.А. Мельников // Вопрос онкологии. – 1983. – Т. 29, №2. – С. 19–25.
32. Корнева, Е.А. Нейроэндокринные механизмы регуляции функции иммунной системы. Иммунофизиология / Е.А. Корнева, Э.К. Шхинек, Б.А. Флова; под ред. Е.А. Корневой. – СПб., 1993.
33. Косицкий Г.И. Физиология человека / Г.И. Косицкий. – М: Медицина. – 1985. – 3 – е изд., перераб и доп. – 544 с.
34. Курдина, М.И. Выявление злокачественных опухолей кожи при диспансеризации / М.И. Курдина, М.В. Тымчишина // I съезд онкологов стран СНГ: Ч.2.: сб. науч. трудов. – М.; 1996. – ч.2. – С.407.
35. Лабунец, И.Ф. Нарушение функций иммунной системы и их коррекция при меланоммах с регионарными метастазами / И.Ф. Лабунец, Ю.А. Гриневич, Б.А. Толстопятова // Вопрос онкологии. – 1989. – Т.35, №4. – С. 416–423.
36. Лабунец, И.Ф. Функциональная активность вилочковой железы и гипофизарно–надпочечниковой системы у больных злокачественной меланомой кожи / И.Ф. Лабунец, А.Н. Василюк // Экспериментальная онкология. – 1984. – Т.6, №1. – С.63–65.
37. Лемехов В. Г. Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи / В. Г. Лемехов // Практическая онкология. –2001. –№ 4. –С. 3–6.
38. Леончук, А.Д. Организационные и клинические вопросы диагностики меланомы кожи на амбулаторном этапе обследования / А.Д. Леончук: автореф. дисс. канд. мед. наук. – Л. НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. 1990, 32 с.
39. Липатникова, А.К. Гранины в качестве биохимических, иммуногистохимических и метаболических маркеров гормонально–неактивных аденом гипофиза / А.К. Липатникова, Л.К. Дзеранова, Е.А. Пигарова // Ожирение и метаболизм. – 2013. – №2. – С. 42–44.

40. Матлина, Э.Ш. Клиническая биохимия катехоламинов / Э.Ш. Матлина, В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1967. – 304 с.
41. Меерсон, Ф.З. Стрессорные нарушения в системе противоопухолевого иммунитета и их ограничение стресс–лимитирующими факторами / Ф.З. Меерсон, Г.Г. Сухих // Вестник АМН СССР. – 1985. – №8. – С.23–29.
42. Мельников, Р. А. Состояние симпатико–адреналовой системы у больных раком молочной железы / Р.А. Мельников, Р.Т. Попова, В.С. Шевелева // Вопрос онкологии. – 1981. –Т. 27, №12. – С. 9–14.
43. Меньшиков, В.В. О некоторых вопросах обмена катехоламинов / В.В. Меньшиков // Проблемы эндокринологии и гормонотерапии. – 1963. – №6. – С.102–109.
44. Методы неинвазивной диагностики меланомы / Д.В. Соколов, Л.В. Демидов, Н.Н. Потекаев [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2008. – №4. – С. 6–9.
45. Морфологические критерии прогноза у больных меланомой кожи / И.И. Яковцова, В.Д. Садчиков, М.В. Садчикова, О.В. Долгая [и др.] // Патология. – 2012. – Т.24, №1. – С. 34–37.
46. Нервная и иммунная система в канцерогенезе / В.В. Абрамов, Д.Н. Егоров, В.К. Вардосанидзе, В.В. Козлов – Новосибирск: СО РАМН, 1998. –102 с.
47. Ойфе, Г.Р. О соотношении содержания катехоламинов в крови и в моче у больных злокачественными новообразованиями пищеварительного тракта в условиях физиологической нагрузки / Г.Р. Ойфе // Клиническая хирургия. –1971. –№5 – С. 69 – 72.
48. Определение белка S–100 как серологического опухолеассоциированного маркера при меланоме / Н.С. Сергеева, Т.Н. Лазутина, М.П. Мишунина, Н.В. Маршутина [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2008. – №2. – с. 19–22.

49. Особенности клинического течения и прогнозирование исхода лечения у больных локализованной меланомой кожи в условиях экологического дискомфорта / Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, Ю.С. Мардынский [и др.] // Экология человека. – 2008. – №12. – С. 29–34.
50. Островский, М.А. Физиология человека / Островский М.А., Донцов А.Е. – 1985. – 670с.
51. Остроумова, М.Н. Нарушения в нейроэндокринном звене адаптационного гомеостаза при раке / М.Н. Остроумова : автореф. дис. док. мед. наук. – Л. – 1989. – 32 с.
52. Повышение функциональной активности естественных киллеков под влиянием фармакологической коррекции состояния симпатико–адреналовой системы у больных раком легкого / В.Ю. Уманский, Е.К. Балицкая, Ю.П. Шмалько, И.В. Касьяненко // Вопрос онкологии. – Т.36. – 1990. – №1. – С.13–16.
53. Подильчак, М.Д. / М.Д. Подильчак, Е.С. Абрагамович, Р.В. Рудный // Вопрос онкологии. – 1970. – №1. – С.42–46.
54. Полиморфизм гена дофамин– β –гидроксилазы, параметры вегетативной регуляции и клинико–патологические характеристики злокачественного процесса у больных раком желудка / И.Г. Соловьева, М.А. Губина, А.Г. Ромашенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – №5(47). – С. 46–51.
55. Пухальская, Е.Ч. Проблема серотонина и рак / Е.Ч. Пухальская // Вестник академии медицинских наук СССР. – 1960. – №12. – С.61–72.
56. Репина, В.П. Влияние различных концентраций катехоламинов на функционирование иммунокомпетентных клеток / В.П. Репина // Экология человек. – 2008. – №2. – С.30–33.
57. Роль хромогранина А в диагностике рака предстательной железы / А.В. Сивков, Н.Г. Кешишев, Г.Д. Ефремов [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2012. – №3. – С. 68–70.

58. Сайнога, Т.В. В диагностике нейроэндокринных опухолей легких / Т.В. Сайнога, А.А. Славинский А. Хромогранин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2011. – №10. – С. 48–49.
59. Самунджан, Е.М. Кора надпочечников и опухолевый процесс: монография / Е.М. Самунджан. – Киев: Наукова думка, 1973. – 202 с.
60. Сафина, М.Р. Значение биогенных аминов в патогенезе и формировании группы риска по предраку и раку тела матки / М.Р. Сафина: автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. мед. наук – 1986. – Казань. – 17 с.
61. Селье, Г. (Selye H.) На уровне целого организма / Г. Селье (H. Selye). – М: Наука, 1972 – 123 с.
62. Селье, Г. (Selye H.) Стресс без дистресса / Г. Селье (H. Selye). – М: Прогресс, 1979 – 124 с.
63. Семенова, А.И. Адьювантное лечение меланомы кожи / А.И. Семенова // Практическая онкология. – 2012. – Т.13, №2. – С. 135–142.
64. Сергеева, Н.С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутин // Практическая онкология. – 2011. – Т.12, №4. – С. 147–154.
65. Сергеева, Н.С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутин // Практическая онкология. – 2011. – Т.12, №4. – С. 147–154.
66. Система факторов неоангиогенеза и пролиферации в ткани меланомы кожи, её перифокальной зоны и по линии резекции / Е.М. Франциянц, Е.Ф. Комарова, В.В. Позднякова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – №7. – С. 423–427.
67. Смирнов И.О. Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры её старения / И.О. Смирнов, И.М. Кветной, И.В. Князькин, С.И. Данилов. – СПб.: изд. ДЕАИ. – 2005. – 288 с.
68. Смирнов, В.М. Физиология человека: учебник / под ред. В.М. Смирнова. – М: Медицина. – 2001.– 608 с.

69. Совершенствование методов диагностики меланомы кожи / Л.В. Демидов, Д.В. Соколов, И.В. Булычева [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т.18, №1. – С. 36–41.
70. Современная морфологическая, иммуногистохимическая и молекулярно–гшенетическая диагностика меланомы кожи / Я.В. Вишневская, Я.А. Машенкина, А.И. Сендерович [и др.] // Вестник московского онкологического общества. – 2011. – №9. – С.2–4.
71. Тарутинов, В.И. Нарушение функции симпатoadренальной системы у больных раком пищевода и желудка / В.И. Тарутинов, А.Р. Палюх В.Б. Винницкий [и др.] // Вопросы онкологии. – 1984. – Т.30, №8. – С. 60–67.
72. Терещенко, И.П. Патофизиологические основы злокачественного роста / И.П. Терещенко, А.П. Кашулина. – М., 1987. – 256 с.
73. Тригулова, О.К. Состояние некоторых показателей гормонального гомеостаза у больных меланомой кожи / О.К. Тригулова: автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. мед. наук. – Ростов–на–Дону. – 2009. – 26 с.
74. Факторы риска и диагностика метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных меланомой кожи туловища и конечностей / Н.И. Белякова, Э.А. Жаврид, М.С. Абрамович, А.Ю. Харин // Онкологический журнал. – 2008. – Т.2, №3. – С. 31–37.
75. Факторы риска рецидивов после радикального лечения меланомы кожи / Ю.В. Семилетова, В.В. Анисимов, В.Г. Лемехов, Д.Е. Мацко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – №2(50). – с. 22–24.
76. Фатеев, Д.М. Влияние нефрэктомии и резекции почки на адаптивные возможности системы кровообращения (клинико–экспериментальное исследование) / Д.М. Фатеев: автореф. на соиск. учен. степени канд. мед. наук. – СПб., 2013. – 22с.
77. Филатова, Н.А. Активность аминоксидазы и содержание серотонина в крови при раке желудочно–кишечного тракта и легких / Н.А. Филатова // Вопросы медицинской химии. – 1986. – Т.32, №2. – С.36–39.

78. Фрадкин, С.З. Меланома кожи: практическое пособие для врачей / С.З. Фрадкин, И.В. Залуцкий // Минск. – 2000. – 221с.
79. Харагезов, Д.А. Показатели гормонального и медиаторного гомеостаза при комплексном лечении больных раком желудочно–кишечного тракта / Д.А. Харагезов: автореферат на соискание ученой степени канд. мед. наук. – Ростов – на –Дону. – 2006.
80. Харкевич, Д.Д. Чувствительность лимфоцитов крови больных раком желудка к мет–энкефалину, дофамину и серотонину / Д.Д. Харкевич, Г.И. Губина, З.Г. Кадагидзе // Экспериментальная онкология. – 1990. – Т.12, №2. – С. 66–68.
81. Цитоплазматические рецепторы стероидных гормонов и клиничко–морфологические особенности меланомы кожи / Е.С. Герштейн, Б.Б. Тайлаков, К.Д. Смирнова и [др.] // Вопросы онкологии. – 1991. – Т.37, №4. – С.441–446.
82. Чиссов, В.В. Злокачественные новообразования в России в 2005 году (заболеваемость и смертность) / В.В. Чиссов, Г.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Роздрава, 2007. – 252с.: ил.
83. Шанин, А.П. Роль нейроэндокринных факторов в возникновении и развитии меланом / А.П. Шанин // Вопросы онкологии. – 1957. – №8. – С.319–323.
84. Шапот, В.С. О взаимосвязях и пусковых механизмах расстройств гомеостаза в опухолевом организме / В.С. Шапот, В.П. Шелепов // Архив патологии. – 1983. – Т45, №8. – С. 3–12.
85. Шевелева, В.С. Состояние симпатoadреналовой системы у больных злокачественными опухолями желудочно–кишечного тракта / В.С. Шевелева, Р.А. Мельников, Н.Н. Симонов // Вопрос онкологии. –1980. –Т. 26, №8 – С. 35–41.
86. Шульга, Н.И. Функциональное состояние надпочечников у больных раком легкого / Н.И. Шульга // Вопросы онкологии. – 1980. – Т.26, №8. – С. 32–34.

87. A comparison of 3 tumor markers (MIA, TA90IC, S-100B) in stag III melanoma patients / M.B. Faries, R.K. YeY. Gupta [et al.] // *Cancer Invest.* – 2007. – Vol. 25, № 5. – P. 285–293.
88. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients / P. Vereecken, F. Cornelis, Van Baren N., V. Vandersleyen, J-F. Baurain // *Hindawi Publishing Corporation Dermatology Research and Practice.* – 2012. – Vol.7. – P. 1–7
89. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival / A. Jemal, L.X. Clegg, E. Ward [et al.] // *Cancer.* – 2004. – Vol.101. – P.3–27.
90. Are cutaneous melanomas of specified thickness showing deeper levels of invasion at diagnosis? / C.G. Luke, B.J. Coventry, E.J. Foster-Smith, D.M. Roder // *Asian Pacific J. Cancer Prev.* – 2003. – Vol.4. – P. 307–311.
91. Armstrong, B.K. Cutaneous melanoma / B.K. Armstrong, A. Kricger // *Cancer Surv.* – 1994. – Vol.19–20. – P. 219–240.
92. Banerjee S.S. Divergent differentiation in malignant melanomas: a review / S.S. Banerjee, B. Eyden // *Histopathology.* – 2008. – Vol.52, №2. – P. 119–129.
93. Banerjee S.S. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma / S.S. Banerjee, M. Harris // *Histopathology.* – 2000. – Vol. 36, №5. – P. 387 – 402.
94. Banerjee, S.S. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma / S.S. Banerjee, M. Harris // *Histopathology.* – 2000. – Vol.36, №5. – P. 387–402.
95. Baseline staging of melanoma with unknown primary site: the value of serum s100 protein and positron emission tomography / P.A. Oberholzer, M. Urosevic, H.C. Steinert, R. Dummer // *Dermatology.* – 2008. – Vol. 217(4). – P. 351–355.

96. Barrassar, A. Surgical treatment of primary melanoma / A. Barrassar, P. Ishioka, Vilalta A. // *Surgical Dermatologic Therapy*. – 2012. – Vol.25. – P. 432–442.
97. Biomarkers in melanoma / H. Gogas, A.M. Eggermont, A. Hauschild [et al] // *Annals of Oncology*. – 2009. – Vol.20. – P. 8–13.
98. Brochez, L. Serological markers for melanoma / L. Brochez, J. Naeyaert // *British Journal of Dermatology*. –2000. – Vol.143. – № 2. – P. 256–268.
99. Chromogranin / G.N. Hendy, S. Bevan, M–G .Mattei, A.J. Mouland // *Clin. Invest. Med*– 1995. – Vol.18. – P. 47–65.
100. Chromogranin A and its fragments as regulators of small intestinal neuroendocrine neoplasm proliferation / F. Giovinazzo, S. Schimmack, B. Svejda, D. Alaimo, R. Pfraqner, I. Modlin, M. Kidd // *PLoS One*. –2013. – Vol.8, №11. – e81111.
101. Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules / Elias, S., Delestre C., Courel M., Anouar Y., Montero–Hadjadje M. // *Cell Mol. Neurobiol*. – 2010. – Vol.30, №8. – P. 1189–1195.
102. Chromogranin A expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models / B. Colombo, F. Curnis, C. Foglieni [et al] // *Cancer Res*. – 2002. – Vol.62, №3. – P. 941–946.
103. Chromogranin A in human disease / D.T .O' Connor, S.K. Mahata, L. Taupenot, M. Mahata [et al] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2002. – Vol.482. – P. 377–388.
104. Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha–induced vascular leakage / E. Ferrero, S. Scabini, E. Magni [et al.] // *FASEB J*. – 2004. – Vol.18. – P. 554–556.
105. Chromogranin A regulates tumor self–seeding and dissemination / E. Dondossola, L. Crippa, B. Colombo, E. Ferrero, A. Corti // *Cancer Res*. – 2012. – Vol.72, №2. – P. 449–459.

106. Chromogranins as regulators of exocytosis / R. Borges, J. Diaz–Vera, N. Dominguez [et al] // *Journal of Neurochemistry*. – 2010. – Vol.114, №2. – P. 335–343.
107. Chronic stress and susceptibility to skin cancer / A.N. Saul, T.M. Oberyszyn, C. Daugherty [et al] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol.97, № 23. – P. 1760–1767.
108. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma / S.R. Palmer, L.A. Erickson [et al] // *Mayo Clin. Proc.* – 2011. – Vol.86, №10. – P. 981–990.
109. Clinical significance of serum s100 in metastatic malignant melanoma / H.B. Guo, B. Stoffel-Wangner, T. Bierwirth [et al] // *Eur. J. Cancer*. – 1996. – Vol.31. – P. 1898-1902.
110. Cohen, S. Psychologic stress, Immunity and Cancer / S. Cohen, B.S. Rabin // *J. of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol.90, №1. – P. 3–4.
111. Colon, J.M. Granin–derived peptides as diagnostic and prognostic markers for endocrine tumors / J.M. Colon // *Regul. Pept.* – 2010. – Vol.165, №1. – P. 5–11.
112. Comen, E. Self-seeding in cancer / E. Comen, L. Norton // *Resent Results Cancer Res.* – 2012. – Vol.195. – P. 13-23.
113. Comparison of prognostic significance of serum 5–S–Cysteinydopa, LDH and S–100B protein in stage III–IV malignant melanoma / T. Banfalvi, M. Boldizsar, M. Gergye [et al.] // *Pathology Oncology Research*. – 2002. – Vol.8, №3. – P. 183–187.
114. Conversion of L–tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells / A. Slominski, I. Semak, A. Pisarchik, T. Sweatman, A. Szczesniewski, Wortsman J. // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol.30, № 511(1–3). – P.102–106.
115. Corti, A. Chromogranin A and the endothelial barrier function / Corti A., Ferrero E. // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol.19, №24. – P. 4051–4058.

116. Corti, A. Chromogranin A and the tumor microenvironment / A. Corti // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2010. – Vol.30. – P. 1163–1170.
117. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress / A. Slominski, J. Wortsman, T. Luger, R. Paus, S. Solomon // *Physiol Rev.* – 2000. – Vol.80. – P. 979–1020.
118. Cutaneous melanoma: a model to study cancer metastasis / S.P.L. Leong, J.E. Gershenwald, S. Soong [et al] // *J. Surg. Oncol.* – 2011. – Vol. 103. – P. 538–549.
119. Cutaneous melanoma: prognostic factors / J. Hoimsi, M. Kashani-Sabet, J.L. Messina, A. Daud // *Cancer control.* – 2005. – Vol. 12, №4. – P. 223–229.
120. De Wit, N.J. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions / N.J. De Wit, van G.N. Muijen, D.J. Ruiter // *Histopathology.* – 2004. – Vol.44, №6. – P. 517–541.
121. Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis / D. Chakroborty, C. Sarkar, R.B. Mitra [et al] // *Clinical Cancer Research.* – 2004. – Vol.10, №13. – P. 4349–4356.
122. Depression, natural killer cell activity, and cortisol secretion / A.H. Miller, G.M. Asnis, C. Lackner [et al] // *Biol. Psychiatry.* – 1991. – Vol.29, №9. – P. 878–886.
123. Dhabhar F.S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology / Dhabhar F.S. // *NeuroImmunoModulation.* – 2009. – Vol.16, №5. – P.300–317.
124. Dickson, P.V. Staging and prognosis of cutaneous melanoma / P.V. Dickson, J.E. Gershenwald // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* – 2011. Vol.20, №1. – P. 1 – 17.
125. Differential expression of HPA axis homolog in the skin / A. Slominski, J. Wortsman, R.C. Tuckey, R. Paus // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2007. – Vol.266. – P.143–149.

126. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma / G.M. Maeldansmo, V.A. Florenes, T. Mellingsaete [et al] // *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*. – 1997. – Vol.74. – P. 464–469.
127. Distribution and functional significance of somatostatin receptors in malignant melanoma / S.S. Lum, W.S. Fletcher, M.S. O' Dorisio [et al] // *World J Surg*. – 2001. – Vol.25, №4. – P. 407–412.
128. Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins / R. Donato // *Microsc. Res.Tech*. – 2003. – Vol.60. – № 6. – P.540–551.
129. Donato, R. S100: a multigenic family of calcium–modulated proteins of the EF–hand type with intracellular and extracellular functional roles / R. Donato // *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. – 2001. – Vol. 33(7). – P. 637–668.
130. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models / C. Sarkar, D. Chakroborty, U.R. Chowdhury, P.S. Dasgupta, S. Basu // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol.14, №8. – P. 2502–2510.
131. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA–MB–468 human breast carcinoma cells / T.L. Drell, J. Joseph, K. Lang [et al] // *Breast Cancer Res Treat*. – 2003. – Vol.80. – P. 63–70.
132. Elevated serum levels of S100 and survival in metastatic malignant melanoma / J. Buer, M. Probst., A. Franzke [et al.] // *Br.J.Cancer*. – 1997. – Vol. 75(9). – P. 1373–1376.
133. EORTC Melanoma Group: On the release and half–life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients / G. Ghanem, B. Loir, R. Morandini, F. Sales, D. [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2001. – Vol.94. – P.586–590.
134. Epidemiology of melanoma: is it still epidemic? What is the role of sun, sunbeds, Vit D, betablocks, and other? / De V. Giorgi, A. Gori, M. Grazzini, S. Rossari [et al] // *Dermatol Ther*. – 2012. – Vol.25. – №5. – P.392–396.
135. Epinephrine protect cancer cells from apoptosis via activation of cAMP–dependent protein kinase and BAD phosphorylation / K.S. Sastry, Y.

Karpova, S. Prokopovich [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, №19. – P. 14094–14100.

136. Evelyn, C.I. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors / C.I. Evelyn, B.W. Schaefer, C.W. Heizmann // Int. J. Cancer. – 1996. – Vol.68. – P. 325–332.

137. Evidence and interdisciplinary consense – based German guidedines: diagnosis and surveillance of melanoma / C. Garde, A. Hauschild, M. Volkenandt [et al] // Melanoma Res. – 2007. – Vol.17. – P. 393-399.

138. Expression of calcyclin in human melanocytic lesions / M.A. Weterman, van Muijen G.N., H.P. Bloemers, D.J. Ruiter // Cancer Res. – 1993. – Vol. 53(24). – P.6061–6066.

139. Eyden, B. Malignant melanoma with neuroendocrine differentiation: clinical, histological, immunohistochemical and ultrastructural features of three cases / B. Eyden , D. Pandit, S.S. Banerjee // Histopathology. – 2005. – Vol.47, №4. – P. 402–409.

140. Fawzy, F.I. Malignant Melanoma: effects of a brief, structured psychiatric intervention on survival and recurrence at 10-year follow-up / F.I. Fawzy, A.L. Canada, N.W. Fawzy // Archives of General Psychiatry. – 2003. – Vol.60. – P.100–103.

141. Fernandez-Flores, A. Prognostic factors for melanoma progression and metastasis: from Hematoxylin-Eosin to genetics / A. Fernandez-Flores // Rom. J. Morphol. Embryol. –2012. – Vol.53. – №3. – P.449–459.

142. Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited / I.J. Fidler // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – Vol.3, №6. – P. 453–458.

143. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification / C.M. Balch, J.E. Gershenwald, S.–J. Soong, J.F. Thompson, M.B. Atkins [et al.] // J. of Clin.Oncol. – 2009. – Vol.27, №36. – P. 6199–6206.

144. Fitzgerald, P.J. Beta blockers, norepinephrine, and cancer: an epidemiological viewpoint / P.J. Fitzgerald // *Clin. Epidemiol.* – 2012. – Vol.4. – P.151–156.
145. Functions of S100 proteins / R. Donato, B.R. Cannon, G. Sorci [и др.] // *Curr.Mol.Med.* – 2013. – Vol.13. – № 1. – P.24–57.
146. Glantz, S.A. Медико–биологическая статистика: пер. с англ. / S.A. Glantz. – М.: Практика, 1999. – 459с.
147. Glinicki, P. Chromogranin A (CgA) – the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on it's concentration in blood / P. Glinicki, W. Jeske // *Endokrynol. Pol.* – 2010. – Vol.61, №4. – P. 384–387.
148. Godbout, J.P. Stress–induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer / J.P. Godbout, R.laser // *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* – 2006. – Vol.1. – P.421–427.
149. Goldstein, D.S. Catecholamines 101 / D.S. Goldstein // *Ciin. Auton. Res.* – 2010. – Vol.20. – №6. – P.331–352.
150. Granins and catecholamines: functional interaction in chromaffin cells and adipose tissue / R. Borges, N. Dominquez, C.B. Smith [et al.] // *Adv. Pharmacol.* – 2013. – Vol.68. – P. 93–113.
151. Haass, N.K. Melanoma biomarkers: current status and utility in diagnosis, prognosis, and response to therapy / N.K. Haass, K.S. Smalley // *Mol. Diagn. Ther.* – 2009. – Vol.13, №5. – P. 283–296.
152. Halawi, A. S100 proteins and the skin: a review / A. Halawi, O. Abbas, M. Mahalingam // *J. Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* – 2014. – Vol. 28(4). – P. 405–414.
153. Harpio, R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma / R. Harpio, R. Einarsson // *Clin. Biochem.* – 2004. – Vol.37. – P.512–518.
154. High incidence and characterization of glucocorticoid receptor in human malignant melanoma / H. Bhakoo, R. Milholland, R. Lopez, C. Karakosis // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1981. – Vol.66, № 1. – P. 21-25.

155. High accumulation of 2(F-18)F DOPA in the non-S phase melanocytes in B16 melanoma in vivo assessed by micro radiography / R. Kubota, S. Yamada, K. Ishimata [et al.] // J. Nucl. Med. – 1992. – Vol.33, №5. – P.984–987.
156. Horai T. Malignant melanoma producing serotonin / T. Horai // Cancer. – 1979. – Vol.43. – P.294–298.
157. Iig, E.C. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors / E.C. Iig, B.W. Schefer, C.W. Heizmann // Int. J. Cancer. – 1996. – Vol.68. – P. 325–332.
158. Immunohistochemical characteristics of melanoma / S.J. Ohsie, G.P. Sarantopoulos, A.J. Cochran, Binder // Journal of Cutaneous Pathology. – 2008. – Vol.35, №5. – P. 433–444.
159. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas / A. Spatz, M.G. Cook, D.E. Elder [et al] // Eur. J. Cancer. – 2003. – Vol.39, №13. – P. 1861–1865.
160. Is 0.75 mm Breslow thickness the correct cut-off point for performing sentinel node biopsy in patients with melanoma? / A. Doumas, A. Dionyssopoulos, T. Christoforidis, A. Papaconstantinou [et al.] // Hell J. Nucl. Med. – 2010. – Vol.13, №3. – P.253–256.
161. Jury, C.S. Rising levels of serum S100 protein precede other evidence of disease progression in patients with malignant melanoma / C.S. Jury, E.J. McAllister, R.M. Mackie // Br.Dermatol. – 2000. – Vol. 143(2). – P. 269–274.
162. Lack of elevation of serum S100B in patients with metastatic melanoma as a predictor of outcome after induction with an autologous vaccine of proliferating tumor cells and dendritic cells / P.M. Schiltz, R.O. Dillman, C.M. Korse [et al.] // Cancer Biother Radiopharm. – 2008. – Vol.23(2). – P. 244–212.
163. Lechin, F. Neurocircuitry and neuroautonomic disorders (Reviews and therapeutic strategies) / F. Lechin, van der B. Dijs, M.E. Lechin, 2002.
164. Leclerc, E. The roles of S100 proteins and RAGE in melanoma / E. Leclerc // Breakthroughs in Melanoma Research, 2011. – P. 331–356.

165. Levodopa and dopamine analogs as DNA polymerase inhibitors and antitumor's agents in human melanoma / M.M. Wick // *Cancer Res.* – 1980. – Vol.40, №5. – P. 1414–1417.
166. Li, N. New prognostic factors of cutaneous melanoma: a review of the literature / N. Li, J. Mangini, J. Bhawan // *Department of J. Cutan. Pathol.* – 2002. – Vol.29. – P.324–340.
167. Li, S. Role of the nervous system in cancer metastasis (Review) / S. Li, Y. Sun, D. Gao // *Oncology Letters.* – 2013. – Vol. 5. – P. 1101–1111.
168. Little, J.W. Melanoma: etiology, treatment and dental implications / J.W. Little // *Gen. Dent.* – 2006. – Vol.54, №1. – P.61–66.
169. Louthan, O. Chromogranin A in physiology and oncology / O. Louthan // *Folia Biol. (Praha).* – 2011. – Vol.57, №5. – P. 173–81.
170. Mahabeleshwar, G.H. Angiogenesis in melanoma / G.H. Mahabeleshwar, T.V. Byzova // *Semin. Oncol.* – 2007. – Vol.34, № 6. – P. 555–565.
171. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis / S.N. Markovic, L.A. Erickson, R.D. Rao [et al] // *Mayo Clin. Proc.* – 2007. – Vol. 82, №3. – P. 364–380.
172. Malignant Melanoma: Effects of an early structured psychiatric intervention, coping and affective state on recurrence and survival 6 years later / F.I. Fawzy, N.W. Fawzy, C.S. Hyun [et.al.] // *Archives of General Psychiatry.* – 1993. – Vol.50. – P.681–689.
173. Malignant melanomas simulating various types of soft tissue tumors / B.G. Zelger, H. Steiner, B. Wambacher, B. Zelger // *Dermatol. Surg.* – 1997. – Vol.23, №11. – P.1047–54.
174. Marginal and joint distributions of S100, HMB-45, and Melan-A across a large series of cutaneous melanomas / H. Viray, W.R. Bradley, K.A. Schalper, D.L. Rimm, B.E. Rothberg // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2013. – Vol.137, №8. – P. 1063–1073.

175. Marginating pulmonary–NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a β -adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor / R. Melamed, E. Rosenne, K. Shakhari [et al] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2005. – Vol.19, №2. – P.114–126.
176. Markers and tissue resources for melanoma: meeting report / D. Becker, M.C. Mihm, S.M. Hewitt [et al] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol.66, № 22. – P. 10652–10657.
177. Markers of melanogenesis in malignant melanoma / B. Matous, E. Bubnova, A. Budesinska, M. Kostirova // *Sb. Lek.* – 1994. – Vol.95, №4. – P. 333–338.
178. Maternal serum S100 protein in normal and Down Syndrome pregnancies / H.D. Abraha, P.L. Nobel, K.H. Nicolaides, R.A. Sherwood // *Prenatal Diagnosis*. – 1999. – Vol.19. – P. 334–336.
179. McEwan, M. Inhibition of melanization in human melanoma cells by a serotonin uptake inhibitor / M. McEwan, P.G. Parsons // *J. Invest. Dermatol.* – 1987. – Vol.89, №1. – P. 82–86.
180. Miller, A.J. Melanoma / A.J. Miller, M.C. Mihm // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol.355. – P. 51–65.
181. Miller, D.R. Psychogenesis, stress, immunity and cancer etiology and prognosis: discussion of Dr. Fox's paper / D.R. Miller // *Childn. Cancer Proc. Symp. Family and Pediat. Cancer*. – 1982. – P. 31–34.
182. Miwa, N. S100–annexin complexes – biology of conditional association / N. Miwa, T. Uebi, S. Kawamura // *FEBS Journal*. – 2008. – Vol. 275. – P. 4945 – 4955.
183. Molecular markers of circulating melanoma cells / S. Medic, R.L. Pearce, P.J. Heenan, M. Ziman // *Pigment Cell Res.* – 2007. – Vol.20, № 2. – P. 80–91.

184. Moreno–Smith, M. Impact of stress on cancer metastasis / M. Moreno–Smith, S.K. Lutgendorf, A.K. Sood // *Future Oncol.* – 2010. – Vol.6, №12. – P.1863–1881.
185. Natural and amyloid self–assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity / G. Fritz, H.M. Botelho, L.A. Morozova–Roche, C.M. Gomes // *FEBS Journal.* – 2010. – Vol.227, №22. – P. 4578–4590.
186. Nemeroff, C. The role of serotonin in the pathophysiology of depression: an important as ever / C. Nemeroff, M. Owens // *Clinical Chemistry.* – 2009. – Vol.55, №8. – P. 1578–1579.
187. Neuroendocrine modulation of cancer progression / G.N. Armaiz–Pena, S.K. Lutgendorf, S.W. Cole, A.K. Sood // *Brain Behav Immun.* – 2009. – Vol.23, №1. – P. 10–15.
188. Neurotransmitters are regulators for the migration of tumor cells and leukocytes / F. Entschladen, K. Lang, T.L. Drell, J. Joseph, K.S. Zaenker // *Cancer Immunol Immunother.* – 2002. – Vol.51, №9. – P.467–482.
189. Nodels, F.R. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours / F.R. Nodels, D.J. Kwekkeboom, R. Bouillon, S.W. Lamberts // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol.28, №6. – P. 431–440.
190. Nonaka, D. Differential expression of S100 protein subtypes in malignant melanoma and benign and malignant peripheral nerve sheath tumors / D. Nonaka, L. Chiriboga, B.P. Rubin // *Journal of Cutaneous Pathology.* – 2008. – Vol.35, №11. – P. 1014–1019.
191. Norepinephrine upregulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)–2, and MMP–9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells / E.V. Yang, A.K. Sood, M. Chen [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol.66. – P.10357–10364.
192. Norepinephrine up–regulates VEGF, IL–8, and IL–6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress–related enhancement of tumor progression / E.V. Yang, S.J. Kim, E.L. Donovan [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2009. – Vol.23, №2. – P.267–275.

193. Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol / K. Guo, Q. Ma, L. Wang [et al.] // *Oncol. Reports.* – 2009. – Vol. 22, №4. – P. 825–830.
194. Ohsie S.J. Immunohistochemical characteristics of melanoma / S.J. Ohsie, G.P. Sarantopoulos, A.J. Cochran, S.W. Binder // *Journal of Cutaneous Pathology.* – 2008. – Vol.35, №5. – P. 433–444.
195. Ohsie, S.J. Immunohistochemical characteristics of melanoma / S.J. Ohsie, G.P. Sarantopoulos, A.J. Cochran, S.W. Binder // *J. of Cutan. Pathol.* – 2008. – Vol.35, №3. – P. 433–444.
196. On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients / G. Ghanem, B. Loir, R. Morandini [et al] // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol.94. – P. 586–590.
197. Palm, D. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers / D. Palm, K. Lang, B. Niggemann [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol.118. – P. 2744–2749.
198. Pennix, B.W. Chronically depressed mood cancer risk in older persons / B.W. Pennix, J.M. Guralnic [et al.] // *J. Nat. Cancer Int.* – 1990. – Vol.90, №24. – P.1888–1893.
199. Petersson, S. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions / S. Petersson., E. Shubbar, C. Enerbäck // *Melanoma Research.* – 2009. – Vol.19. – P.215–225.
200. Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma / H.M. Kluger, K. Hoyt, A. Bacchiocchi [et al] // *Clin.Cancer. Res.* – 2011. – Vol.17. – №8. – P.2417–2425.
201. Pons, M. Molecular biology of malignant melanoma / M. Pons, P. Mancheno-Corvo, P. Martin-Duque, M. Quintanilla // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2008. – Vol.624. – P. 252–264.

202. Prognosis of primary melanoma / S. Ilmonen, S. Asko–Seljavaara, A.–L. Kariniemi [et al.] // *Scandinavian Journal of Surgery*. – 2002. – Vol. 91. – P. 166–171.
203. Prognostic and predictive molecular markers in cutaneous malignant melanoma: the first step toward personalized medicine / S. Liu, P. Kirschmeier, J. Simon, C. Seidel–Dugan, M. Puhlmann // *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. – 2008. – Vol.6. – P. 272–294.
204. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis / E. Nagore, V. Oliver, R. Bottella–Estrada [et al.] // *Melanoma Res*. – 2005. – Vol. 15. – P. 169–177.
205. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma / L. Mervic // *Acta. Dermatovenerologica*. – 2012. – Vol.21. – P. 27–31.
206. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi–institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database / J.F. Thompson, S.J. Soong, C.M. Balch [et al.] // *J. Clin. Oncol*. – 2011. – Vol.29, № 16. – P. 2199–2205.
207. Prognostic value of serum analysis of S–100B protein in malignant melanoma / von E. Schoultz, L.O. Hansson, E. Djureen, J. Hansson, R. Karnell, B.Nilsson [et al] // *Melanoma Res*. – 1996. – Vol.6. – P. 133–137.
208. Prognostic value of serum S–100B in malignant melanoma / R. Andres, J.I. Mayordomo, P. Zaballos, J. Rodino [et al.] // *Tumori*. – 2004. – Vol.90. – P.607–610.
209. p38 MAP kinase is necessary for melanoma – mediated regulation of VE-cadherin disassembly / P. Khanna, T. Yunkunis, H.S. Muddana [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. – 2010. – Vol.298(5). – C1140-50.
210. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter / M. Asada, S. Ebihara, Y. Numachi [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2008. – Vol.123, №3. – P.511–518.

211. Rigel, D.S. The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs / D.S. Rigel, J. Russak, R. Friedman // *CA: A Cancer Journal Clin.* – 2010. – Vol.60. – P.301–316.
212. Role of serum S100B and PET–CT in follow–up of patients with cutaneous melanoma / B. Peric, I. Zagar, S. Novarovic[et al] // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol.11. – P. 328
213. Roodriguez–Cerdeira, C. New perspective of «omics» applications in melanoma research / C. Roodriguez–Cerdeira, A. Molaes–Vila // *The Open Biochemistry Journal.* – 2011. – Vol.5 – P.60–66.
214. S–100 beta protein in serum, a tumor marker in malignant melanoma–current state of knowledge and clinical experience / A. Jackel, M. Deichmann, V. Waldmann, M. Bock, H. Naher // *Hautarzt.* – 1999. – Vol. 50(4). – P. 250–256.
215. S–100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastasis: a prospective 2–center study of 570 patients with melanoma / P. Kaskel, C. Berking, S. Sander [et al] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1999. – Vol. 41. – P. 962–969.
216. S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma / U. Bottoni, P. Izzo, A. Richetta [et al.] // *Melanoma Research.* – 2003. – Vol.13. – P. 427–427.
217. S–100B: a stronger prognostic biomarker then LDH in stage IIIB–C melanoma / K.P. Wevers, S. Kruijff, M.J. Speijers [et al] // *Ann. Surg. Oncol.* – 2013. – Vol.20, №8. – P. 2772–2779.
218. Santamaria–Kisial, L. Calcium–dependent and independent interactions of the S100 protein family / L. Santamaria–Kisial, A.C. Rintala–Dempsey, G.S. Shaw // *Biochem J.* – 2006. – Vol.396. – P. 201–214.
219. Schuller, H.M. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy / H.M. Schuller // *Anticancer Drugs.* – 2008. – Vol.19, № 7. – P 655–671.
220. Schwartz, M.K. Biochemistry of malignant melanoma / M.K. Schwartz // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 1976. – Vol.6, №1. – P. 56–64.

221. Scott, R.E. Role of the clinical laboratory in the diagnosis and management of malignant melanoma / R.E. Scott, D.M. Wilson // Mayo Clin. Proc. – 1989. – Vol.64, №7. – P. 837–845.
222. Sentinel lymph node staging of cutaneous melanoma: predictor and outcomes / M.S. Ellis, R.Weerasinghe, C. Corless, J.T. Vetto // Am. J. Surg. – 2010.– Vol.199, №5. – P. 663–668.
223. Serological and immunohistochemical analysis of S100 and new derivatives as markers for prognosis in patients with malignant melanoma / A. Bolandera, M. Agnarsdottir, G. Wageniusa, S. Strömberg // Melanoma Research. – 2008. – Vol.18. – P. 412–419.
224. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis / B. Weide, M. Elsasser, P. Buttner [et al.] // British Journal of Cancer. – 2012. – Vol.107. – P. 422–428.
225. Serum protein s-100 predicts clinical outcome in patients with melanoma treated with adjuvant interferon–comparison with tyrosinase rt-PCR / J. Domingo–Domenech, R. Molina Vera [et al.] // Oncology. – 2005. – Vol. 68(4–6). – P. 341–349.
226. Serum S-100 has prognostic significance in malignant melanoma / J.M. Bonfrer, C.M. Korse, S.P. Israels // Anticancer Res. – 1997. – Vol17. P. 2975 – 2977.
227. Serum S100—a marker for disease monitoring in metastatic melanoma / G. Henze, R. Dummer, H.J. Joller–Jemelka, R.. Boni, G. Burg // Dermatology. – 1997. – Vol. 194(3). – P. 208–212.
228. Serum S100B is suitable for prediction and monitoring of response to chemoimmunotherapy in metastatic malignant melanoma / A.P. Hamberg, C.M. Korse, J.M. Bonfrer, de Gast G.C. // Melanoma Res. – 2003. – Vol.13. – P. 45 – 49.

229. Serum S-100B protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma / E.D. Martenson, L.O. Hansson, B. Nilsson [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol.19. – P. 824–831.
230. Sheskin, D.J. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures / D.J. Sheskin. – Chapman & Hall/CRC, 2004. – 1193 p.
231. Shinihara, M.M. S100, HMB-45, and Melan-A negative primary melanoma / M.M. Shinihara, H. Deubner, Z.B. Argenyi // *Dermatol. Online J.* – 2009. – Vol.15, № 9. – P. 7.
232. Short German German guidelines: malignant melanoma / C. Garbe, D. Schadendorf, W. Stolz // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2008. – Vol. 6. – P. 9-14.
233. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma / F.S. Dhabhar, A.N. Saul, C. Daugherty [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2010. – Vol.24, №1. – P.127–137.
234. Slominski, A. Cutaneous expression of corticotropin releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors / A. Slominski, J. Wortsman, A. Pisarchik [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – Vol.15. – P. 1678–1693.
235. Slominski, A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin / A. Slominski, J. Wortsman // *Endocrine Rev.* – 2000. – Vol.21. – P. 457–487.
236. Slominski, A. Melanocytes as sensory and regulatory cells in the epidermis / A. Slominski, R. Paus, D. Schanderdorf // *J. Theor. Biol.* – 1993. – Vol.164. – P. 103–120.
237. Slominski, A. Neuroendocrine activity of the melanocyte / A. Slominski // *Exp. Dermatol.* – 2009. – Vol.18, №9. – P. 760–763.
238. Slominski, A., Paus R. Are L-tyrosine and L-dopa hormone-like bioregulators? / A. Slominski, R. Paus // *J. Theor. Biol.* – 1990. – Vol.143. – P. 123–138.
239. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells / A.K. Sood, R. Bhatti, A.A. Kamat [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol.12. – P. 369–375.

240. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system / S. Ben-Eliyahu, R. Yirmiya, J.C. Liebeskind [et al] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 1991. – Vol.5, №2. – P. 193–205.
241. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines / S.K. Lutgendorf, S. Cole, E. Costanzo [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol.9. – P.4514–4521.
242. Structure–activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle / S. Ratti, F. Curnis, R. Longhi [et al] // *J Biol. Chem.* – 2000. –Vol.275, № 38. – P. 29257–19263.
243. Sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer / E.K. Sloan, S.J. Priceman, B.F. Cox, S. [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol.70 (18). – P. 7042–7052.
244. Tandler, N. Protein and non–protein biomarkers in melanoma: a critical update / N. Tandler, B. Mosch, J. Pietzsch // *Amino Acids*. – 2012. – Vol.43, №6. – P. 2203–2230.
245. Taupenot, L. The chromogranin – Secretogranin family / L. Taupenot, K.L. Harper, O' Connor D.T // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol.348. – P.1134–1149.
246. Thaker P.H. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer / P.H. Thaker, A.K. Sood // *Semin. Cancer Biol.* – 2008. – Vol.18, №3. – P. 164–170.
247. Thaker, P.H., Han L.Y., Kamat A.A. et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma / Thaker P.H., Han L.Y., Kamat A.A. [et al] // *Nature Medicine*. – 2006. – Vol.12. – P. 939–981.
248. The chromogranin A peptide vasostatin–I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells / A. Blois, B. Srebro, M. Mandala [et al] // *Reg. Pept.* – 2006. – Vol.135. – P. 78–84.

249. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties / K.B. Helle, A. Corti, M.H. Metz–Boutigue, B. Tota // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. – Vol.64, №22. – P. 2863–2886.
250. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma / R.L. Barnhill, J. Katzen, A. Spatz, Fine J. Berwick M. // *J. Cutan. Pathol.* – 2005. – Vol.32, №4. – P. 268–273.
251. The prognostic importance of sentinel lymph node biopsy in thin melanoma / J.M. Ranieri, J.D. Wagner, S. Wenck [et al.] // *Ann. Surg Oncol.* – 2006. – Vol.13, №7. – P. 927–932.
252. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta–analysis / S. Mocellin, D. Hoon, A. Ambrosi, D. Nitti, C.R. Rossi // *Clin. Cancer.Res.* – 2006. – Vol.12, №15. – P.4605–4613.
253. The relationship of psychosocial factors to prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma / B.W. Heller, R.W. Sagebiel [et al.] // *J. of Psychosomatic Research.* – 1985. – Vol.29. – P.139–153.
254. Therapeutic groin dissection for melanoma; Risk factors for short term morbidity / HPAM Poos, S. Kruijff, E. Bastiaannet, R.J. van Ginkel, H.J. Hoekstra // *Eur. J. Surg Oncol.* – 2009. – Vol.35. – P.877–883.
255. The role microsatellites as a prognostic factor in primary malignant melanoma / L. Shaikh, R.W. Sagebiel, C.M.M. Ferreira [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2005. – Vol. 141. – P. 739–742.
256. The role of sentinel lymph node biopsy in the diagnosis and prognosis of malignant melanoma / C. Mangas, C. Paradelo, J. Rex, C. Ferrandiz // *Actas Dermosifiliogr.* – 2008. – Vol.99. – P.331–348.
257. The sympathetic nerve an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system / I.J. Elenkov, R.L. Wilder, G.P. Chrousos, E.S. Vizi // *Pharmacological Reviews.* – 2000. – Vol.52. – P.595–638.

258. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer / E.K. Sloan, S.J. Priceman, B.F. Cox [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70(18). – P.7042–7052.
259. Tilan, J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis—Link between Stress and Cancer Progression / J. Tilan, J. Kitlinska // *J. Oncol.* – 2010.
260. Tsao, H. Management of cutaneous melanoma / H. Tsao, M.B. Atkins, A.J. Sober // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol.351. – P. 998–1012.
261. Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: multimarker RT–PCR versus a luminoimmunometric assay for S–100 / C. Berking, E.M. Schlupen, A. Schrader [et al] // *Arch.Dermatol.Res.* – 1999. – Vol. 291(9). – P.479–484.
262. Tumor self–seeding by circulating cancer cell / M.Y. Kim, T. Oskarsson, S. Acharyya [et al.] // *Cell.* – 2009. – Vol.139. –P. 1315–1326.
263. Tumor–infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patient with cutaneous melanoma / R.C. Taylor, A. Patel, K.S. Panageas [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 869–875.
264. Tumour–cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters / F. Entschladen, T.L. Drell, K. Lang, J. Joseph, K.S. Zaenker // *Lancet Oncol.* – 2004. – Vol. 5, №4. – P. 254–258.
265. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow–up of cutaneous melanoma / R. Dummer, R.Panizzon, P.H. Bloch, G. Burg // *Dermatology* . – 2005. – Vol. 210(1). – P. 39–44.
266. Value of serum S–100B for prediction of distant relapse and survival in stage III B/C melanoma / L.H.M. Smit, O.E. Nieweg, W.J. Mooi [et al] // *Anticancer Research.* – 2008. – Vol.28. – P. 2297–2302.
267. Varughese, B.E. Genes and signaling pathways affecting the pathogenesis of melanoma / B.E. Varughese, R.S. Tarapore // *Journal of Postdoctoral Research.* – 2013. – Vol. 1. – P.51–67.

268. Varughese, B.E. Genes and signaling pathways the pathogenesis of melanoma / B.E. Varughese, R.S. Tarapore // Journal of Postdoctoral Research. – 2013. – Vol.1, №2. – P. 51–67.

269. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine / E.V. Yang, E.L. Donovan, D.M. Benson, R. Glaser // Brain Behav. Immun. – 2008. – Vol.22. – P.318–323.

270. Whiteman, D.C. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cell of origin / D.C. Whiteman, W.J. Pavan, B.C. Bastian // Pigment Cell & Melanoma Research. 2011. – Vol.24. – №.5. – P. 879–897.

271. Yang, E.V. Role for catecholamines in tumor progression. Possible use for β -blockers in the treatment of cancer / E.V. Yang // Cancer Biol. Ther. – 2010. – Vol.10, №1. – P.30–32.

272. β -adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines / S. Moretti, D. Massi, V. Farini [et al] // Lab Invest. – 2013. – Vol.93, №3. – P.279–290.