

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШКУРУПІЙ БОГДАНА МИКОЛАЇВНА

УДК: 616.345-006.6-094-076-08-036.8

ДИСЕРТАЦІЯ
МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ В ЯКОСТІ
ПРОГНОСТИЧНИХ ФАКТОРІВ

14.03.02 – патологічна анатомія

22 «Охорона здоров'я»

222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

———— Шкурупій Б.М.

Науковий керівник:

д.м.н., професор
Захарцева Любов Михайлівна

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Шкуруній Б.М. Морфологічні особливості раку товстої кишки в якості прогностичних факторів. Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». — Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, МОЗ України, Київ, 2025.

Карциноми товстої кишки є однією з лідируючих причин захворюваності та смертності від онкологічних захворювань для обох статей. Хоч захворюваність на рак товстої кишки варіює залежно від країни, проте в середньому складає від 20 до 50 випадків на 100 тисяч населення, відповідно це близько 10% від загальної структури онкологічної захворюваності [21, 25]. В середньому загальна 5-річна виживаність становить близько $\approx 63\%$, та залежно від стадії захворювання різко знижується від 91% – при локалізованих формах карцином до 13% – у карцином з віддаленими метастазами на момент встановлення діагнозу. На жаль, значна частка пацієнтів на момент встановлення діагнозу вже мають метастази в лімфатичні вузли чи віддалені метастази, що значно знижує показники загальної виживаності та є несприятливим фактором в плані прогнозу [22]. Доволі бентежною є тенденція збільшення кількості випадків колоректальних карцином діагностованих в молодому віці до 50 років. За останнє десятиліття цей показник зріс майже в 2 рази [27]. Окрім того перебіг захворювання у молодших пацієнтів є більш агресивним, та часто діагностовані на більш прогресивних стадіях [28].

Дотепер стадіювання згідно TNM є ключем до обрання стратегії лікування [144, 148]. Однак, стадія в повній мірі не розкриває всього потенціалу агресивності клінічного перебігу карцином товстої кишки. Адже пухлини однакової стадії та гістологічних характеристик можуть мати доволі відмінний клінічний прогноз, що частково можна пояснити гетерогенністю [171].

Ад'ювантна хіміотерапія є важливим етапом лікування для локально розповсюджених форм захворювання з метою попередження розвитку віддалених метастазів [144, 149, 169]. Надзвичайно важливим є вибір правильного режиму та тривалості хіміотерапії, особливо з точки зору порівняння реальної користі, що пацієнт отримає від даного методу лікування та інсуючих рівнів ризику розвитку токсичності [155]. Тому питання пошуку додаткових прогностичних ознак, що допоможуть визначити категорію пацієнтів з більш агресивним перебігом захворювання та які потребують більш інтенсивного подальшого лікування залишається відкритим.

Тому метою цього дослідження є визначити додаткові прогностичні ознаки для карцином товстої кишки.

Вирішення цієї проблеми та обґрунтування результатів дослідження було досягнуте завдяки комплексному застосуванню сучасних методів вивчення аденокарцином товстої кишки: гістологічних, імуногістохімічних та статистичних методів.

Для досягнення мети дослідження було проведено комплексний ретроспективно-проспективний аналіз історій хвороб та гістологічних препаратів 236 пухлин хворих на рак товстої кишки, лівобічної локалізації, що проходили лікування на базі КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр» протягом 10 років (з 2009-2019 роки). За даними аналізу визначено структуру вікового розподілу, та оцінено загальну виживаність. Проведено морфологічну оцінку особливостей зразків пухлин та проведено імуногістохімічне дослідження.

Задачами дослідження було:

1. Дослідити статистичні дані (статеву-вікову структуру захворюваності та загальну виживаність) хворих, що лікувалися в КНП «КМКОЦ» з 2009 по 2019 роки, визначити патоморфологічні особливості пухлин цих пацієнтів.

2. Оцінити стромальний компонент у вигляді пухлино-стромального співвідношення та визначити його роль для прогнозування аденокарцином товстої кишки.

3. Оцінити щільність імунного інфільтрату в товстокишкових аденокарциномах та з'ясувати його вплив на прогноз.

4. Визначити статус мікросателітної нестабільності (MSS/MSI) в аденокарциномах товстої кишки та його зв'язок з прогностичними ознаками.

5. Дослідити експресію білку PD-L1 в зразках аденокарцином товстої кишки та його прогностичне значення.

6. Визначити субпопуляційний склад імунного інфільтрату аденокарцином товстої кишки (CD4+ та CD20+ лімфоцитів).

7. Оцінити прогностичне значення та взаємозв'язки перерахованих вище морфологічних та імуногістохімічних параметрів для прогнозування перебігу лівобічних аденокарцином товстої кишки.

Основна частина досліджених пухлин це аденокарцинома NOS (неспецифічного типу) – 222 (94,1 %), кількість інших підтипів була менш значною, муциозна аденокарцинома – 11 (4,6 %), та перстнеподібноклітинна аденокарцинома – 3 (1,3%). Структура статеві-вікового розподілу виглядала наступним чином: 132 пацієнти (55,9 %) жіночої статі, та 104 пацієнти (44,1 %) чоловічої статі; кількість пацієнтів до 45 років – 7 (2,9 %), у віці від 46 до 75 років – 184 (78 %), та тих хто старше 75 років – 45 (19,1 %).

Кількість хворих з I стадією склала 11 хворих (4,7%), з II стадією – 107 (45,3%), з III стадією – 65 (27,5%), та з IV стадією – 53 (22,5%).

Середній період спостереження за пацієнтами склав 2,9 років (діапазон 0,08 – 7,3 роки). З 236 пацієнтів, що були долучені в дослідження, 73 хворих померли (30,9 %). Серед померлих 41,1% (30 пацієнтів) померли протягом першого року після встановлення діагнозу, 46,7% (34 хворих) померли в період від 1 до 3х років після встановлення діагнозу, 9,6% (7 хворих) померли в період

від 3 до 5ти років після встановлення діагнозу, 2,7% (2 хворих) померли після відмітки 5 років після встановлення діагнозу.

5-річна виживаність пацієнтів з аденокарциномами товстої кишки з I стадією склала $90,1\% \pm 8,6\%$; з II стадією – $86,0\% \pm 4,3\%$; з III стадією – $57,1\% \pm 9,2\%$; з IV стадією $13,4\% \pm 7,1\%$.

В 180 пухлинах було визначено співвідношення строми та пухлини, з умовним розподілом на пухлини з високим пухлино-стромальним співвідношенням (ПСС) ($\geq 50\%$ строми) та низьким ПСС ($< 50\%$ строми). Грунтуючись на отриманих результатах аналізу було встановлено, що пухлино-стромальне співвідношення (ПСС) є незалежною прогностичною ознакою для аденокарцином товстої кишки. Пухлини, що мають високий показник ПСС ($\geq 50\%$ строми) мають гірший прогноз для загальної виживаності в порівнянні з пухлинами з малою кількістю стромального компоненту. При побудові кривих виживаності Каплана-Меєра встановлено, що показники загальної виживаності пухлин з високим ПСС ($\geq 50\%$ строми) в порівнянні з пухлинами з низьким ПСС наступні: 1-річна загальна виживаність $89,5 \pm 3,5\%$ проти $96,9 \pm 1,8\%$; 3-річна загальна виживаність $65,8\% \pm 5,8\%$ проти $91,6\% \pm 3,0\%$; 5-річна загальна виживаність $38,4 \pm 7,9\%$ проти $74,2 \pm 6,6\%$, відповідно. Зв'язок між пухлино-стромальним співвідношенням та загальною виживаністю пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки є статистично достовірним ($p < 0,001$). Аналіз однофакторної та багатфакторної моделей регресії Кокса показав, що пухлини з низьким ПСС (строма $< 50\%$) статистично достовірно мають кращі показники загальної виживаності (КР 0.39, 95% ДІ 0.21-0.70, $p = 0,001$) в порівнянні з пухлинами з високим ПСС (строма $\geq 50\%$). Коефіцієнт Каппа-Коена склав 0,81, що засвідчує високий рівень погодженості між патологами, які оцінюють пухлино-стромальне співвідношення.

В пухлинах 236 хворих досліджено наявність внутрішньопухлинної лімфоцитарної інфільтрації. При побудові кривих виживаності Каплана-Меєра було встановлено, що кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛІ) має

статистично значущий зв'язок з загальною виживаністю ($p < 0,001$). Загальна однорічна виживаність для групи А (мала кількість ПЛІ 0-9%) склала $79,3 \pm 4,3\%$, для групи В (помірна кількість ПЛІ 10-39%) становила $91,5 \pm 2,7\%$, для групи С (висока кількість ПЛІ $> 40\%$) – $90,5 \pm 4,5\%$. Загальна трирічна виживаність для групи А (ПЛІ 0-9%) склала $58,0 \pm 5,3\%$, для групи В (ПЛІ 10-39%) становила $78,5 \pm 4,0\%$. Аналіз однофакторної та багатофакторної моделей Кокса показав що помірна та висока інфільтрація ПЛІ має статистично значущий вплив на загальну виживаність: група В (ПЛІ 10-39%) (КР 0.57, 95% ДІ 0.34-0.96, $p = 0.039$), група С (ПЛІ $> 40\%$) (КР 0.41, 95% ДІ 0.17-1.01, $p = 0.054$). Таким чином, помірна кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛІ 10-39%) є незалежною прогностичною ознакою для загальної виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки. Коефіцієнт Каппа-Коена склав 0,75, що підтверджує високий рівень погодженості між патологами, що оцінювали ПЛІ. Додатково було визначено статус MSI/MSS для 73 зразків. При побудові кривої виживаності Каплана-Меєра було встановлено, що для вибірки меншого розміру зберігається статистично значущий вплив ПЛІ на загальну виживаність пацієнтів ($p = 0,042$). Також, було виявлено статистично значущий обернений кореляційний зв'язок кількості ПЛІ зі статусом MSI/MSS ($p = 0,026$).

Для оцінки індивідуального ризику несприятливого прогнозу пацієнтів була побудована інтегрована шкала, що враховує три незалежних прогностичних фактори, які асоційовані з виживаністю: кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, статус метастазів в лімфатичних вузлах pN, а також пухлино-стромальне співвідношення. Кожній з ознак, що категоризована відповідним кількісним значенням, було присвоєно умовну кількість балів відповідно до ступеня її асоціації з ризиком смерті за результатами log-rank тестів та медіан виживаності за Kaplan-Meier. Сума балів формує загальний ризиковий бал, який дозволяє класифікувати пацієнтів на групи низького, помірного та високого ризику.

Для 32 зразків резекції аденокарциноми проведено імуногістохімічне дослідження експресії білку PD-L1. Під час дослідження асоціативних зв'язків за допомогою методу Фішера було встановлено статистично значущу асоціацію експресії білка PD-L1 зі ступенем диференціювання пухлини ($p=0,03$), глибиною пухлинної інвазії pT ($p=0,05$) та інфільтрацією CD4+ пухлино-інфільтруючими лімфоцитами (що вказує на можливість використання в якості додаткового маркера оцінки агресивності пухлини). Існує статистично значуща відмінність між групами з різним рівнем експресії PD-L1 ($p=0,028$), потенційно це може свідчити про його вплив на тривалість виживаності та відповідно прогностичне значення даного маркера. Тож його визначення може бути доцільним як при плануванні використання імунотерапії як третьої лінії лікування аденокарцином товстої кишки, так і з метою прогнозування агресивності клінічного перебігу.

Для 16 випадків було проведено визначення субпопуляцій CD20+ та CD4+ лімфоцитів. Статистично значущого зв'язку субпопуляцій CD20+ та CD4+ лімфоцитів з загальною виживаністю не було виявлено ($p=0,31$ та $p=0,11$, відповідно). Проте при застосуванні логранк-тренд тесту було встановлено статистично значущий вплив інфільтрації субпопуляції CD4+ лімфоцитів на градієнт виживаності ($p=0,03$) (що вказує на потенційний вплив CD4+ лімфоцитів на загальну виживаність). Проаналізувавши зв'язки CD20+ лімфоцитів з клініко-гістологічними параметрами було встановлено статистично значущу асоціацію зі стадією ($p=0,05$), глибиною інвазії пухлини pT ($p=0,02$), ступенем диференціювання пухлини G ($p=0,05$) та CD4+ лімфоцитами (що вказує на можливість застосування визначення кількості субпопуляції CD20+ лімфоцитів для оцінки агресивності аденокарциноми товстої кишки).

Під час комплексного оцінювання всіх прогностичних ознак аденокарцином товстої кишки, було статистично достовірно встановлено, що наявність метастазів в лімфатичних вузлах (pN), наявність віддалених метастазів (M), кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ), та пухлино-стромальне співвідношення є найбільш значущими ознаками. Визначення

субпопуляцій CD4⁺ та CD20⁺ лімфоцитів можна проводити додатково для визначення агресивності аденокарцином товстої кишки. Проведення імуногістохімічного дослідження експресії білку PD-L1 є доцільним в випадку планування третьої лінії лікування відповідними таргетними препаратами та оцінки агресивності поведінки пухлини.

Наукова новизна. Вперше проведено комплексне дослідження особливостей мікрооточення аденокарцином товстої кишки. Встановлено, що карциноми товстої кишки з однаковими стадіями, гістологічною структурою, ступенем диференціювання мають значні відмінності в характеристиках пухлинної стромы та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Грунтуючись на результатах проведеного дослідження виявлено відмінності прогнозу залежно від кількості пухлинної стромы та пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Вперше створено інтегровану шкалу оцінки ризиків клінічного перебігу аденокарцином товстої кишки, що одночасно включає три незалежні прогностичні ознаки, а саме статус лімфатичних вузлів, пухлино-інфільтруючі лімфоцити та пухлино-стромальне співвідношення. Встановлено, що частота відсутності чи наявності імунного інфільтрату корелює зі статусом MSH-H.

Встановлено що експресія білку PD-L1 в аденокарциномах товстої кишки пов'язана з тривалістю виживаності та асоціюється зі ступенем диференціювання пухлини (G), глибиною пухлинної інвазії (pT) та інфільтрацією CD4⁺ пухлино-інфільтруючими лімфоцитами. Присутність субпопуляцій CD20⁺ лімфоцитів статистично значуще асоційована зі стадією, глибиною інвазії пухлини (pT), ступенем диференціювання пухлини (G) та CD4⁺ лімфоцитами. На основі даних отриманих під час цих досліджень можна зробити припущення, що визначення цих маркерів є відображенням біологічної поведінки пухлини та надають додаткову інформацію про агресивність перебігу аденокарцином товстої кишки.

Такий чином, детальне комплексне вивчення перерахованих вище характеристик мікрооточення пухлини дає розширене розуміння особливостей

прогресування аденокарцином товстої кишки. Продemonстровано, що взаємодія пухлинних клітин з мікрооточенням має вагомий вплив на виживання. Реакція стромы та імунного інфільтрату допомагають оцінити біологічну агресивність клітин раку, що можливо використовувати в прогнозуванні клінічного перебігу захворювання.

Практичне значення. Результати виконаного дослідження допоможуть покращити прогнозування перебігу аденокарцином товстої кишки. Отримані результати підтверджують можливість впровадження визначення кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та пухлино-стромальне співвідношення в рутинну практику патолога з метою прогнозування перебігу аденокарцином товстої кишки. Методики визначення цих параметрів не передбачає додаткових часових та економічних затрат, що спрощує їх застосування. Відсутність чи мінімальна кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів є додатковим маркером доцільності визначення статусу MSI/MSS. Запропонована шкала дозволяє стратифікувати пацієнтів на основі трьох ключових ознак, що мають прогностичну значущість. Такий підхід є простим у застосуванні, не вимагає складних математичних моделей та може бути інтегрований у клінічну практику для попереднього прогнозування перебігу захворювання та прийняття рішень щодо інтенсивності лікування. Визначення експресії білка PD-L1 може бути доцільним при розгляді додаткових опцій лікування чи визначення агресивності клінічного перебігу. Деталізація прогнозу надає додаткові можливості стратифікації пацієнтів на відповідні групи ризику. Це надає можливість більш ефективно використовувати протоколи лікування, і відповідно позитивно вплине на показники виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки.

Ключові слова: рак товстої кишки, колоректальний рак, прогноз, аденокарцинома товстої кишки, рак ободової кишки, рак прямої кишки, пухлинне мікрооточення, прогностичне значення, пухлино-інфільтруючі лімфоцити, строма пухлини, загальна виживаність, імунотерапія.

ABSTRACT

Shkurupii B.M. **Morphological features of colon cancer as prognostic factors.** Qualification work in the form of a manuscript.

The thesis for the degree of Philosophy Doctor (PhD) of Medical Sciences, field of knowledge 22 “Health care”, specialty 222 “Medicine”. — National Medical Bogomolts University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2025.

Colon cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality from cancer for both sexes. Although the incidence of colon cancer varies depending on the country, it averages 20 to 50 cases per 100,000 population, corresponding to about 10% of the total cancer incidence [21, 25]. On average, the overall 5-year survival rate is about $\approx 63\%$, and depending on the stage of the disease, it sharply decreases from 91% - in localized forms of carcinomas to 13% - in carcinomas with distant metastases at the time of diagnosis. Unfortunately, a significant proportion of patients at the time of diagnosis already have metastases in the lymph nodes or distant metastases, which significantly reduces overall survival rates and is an unfavorable factor in terms of prognosis [22]. The trend of increasing cases of colorectal carcinomas diagnosed at a young age, up to 50 years, is quite disturbing. This rate has almost doubled in the last decade [27]. In addition, the course of the disease in younger patients is more aggressive, and they are often diagnosed at more advanced stages [28].

TNM staging is still the key to choosing a treatment strategy [144, 148]. However, the stage does not fully reveal the full potential of the aggressiveness of the clinical course of colon carcinomas. After all, tumors of the same stage and histological characteristics can have quite different clinical prognosis, which can be partly explained by heterogeneity [171]. Adjuvant chemotherapy is an important stage of treatment for locally advanced forms of the disease in order to prevent the development of distant metastases [144, 149, 169]. Choosing the right regimen and duration of chemotherapy is extremely important, especially in terms of comparing the real benefit that the patient will receive from this treatment method and the inherent levels of risk of toxicity [155]. Therefore, the question of finding additional prognostic signs that

would help identify the category of patients with a more aggressive course of the disease and who require more intensive further treatment remains open.

Therefore, the purpose of this study is to identify additional prognostic features for colon carcinomas.

The solution to this problem and the substantiation of the study results were achieved through the comprehensive application of modern methods for studying colon adenocarcinomas: histological, immunohistochemical and statistical methods.

To achieve the goal of the study, a comprehensive retrospective-prospective analysis of disease histories and histological preparations of 236 tumors of patients with colon cancer, left-sided localization, who underwent treatment at the Kyiv City Clinical Oncology Center for 10 years (from 2009-2019). According to the analysis, the age distribution structure was determined, and overall survival was estimated. A morphological assessment of the features of tumor samples was performed and an immunohistochemical study was performed.

The objectives of the study were:

1. To investigate the statistical data (sex-age structure of morbidity and overall survival) of patients treated at the KNP "KMKOTS" from 2009 to 2019, to determine the pathomorphological features of the tumors of these patients.
2. To assess the stromal component in the form of a tumor-stromal ratio and determine its role in the prognosis of colon adenocarcinoma.
3. To assess the density of the immune infiltrate in colon adenocarcinomas and to determine its impact on the prognosis.
4. To determine the status of microsatellite instability (MSS/MSI) in colon adenocarcinomas and its relationship with prognostic features.
5. To investigate the expression of the PD-L1 protein in colon adenocarcinoma samples and its prognostic value.
6. To determine the subpopulation composition of the immune infiltrate of colon adenocarcinoma (CD4+ and CD20+ lymphocytes).

7. To assess the prognostic value and relationships of the above morphological and immunohistochemical parameters for predicting the course of left-sided colon adenocarcinoma.

The main part of the studied tumors was adenocarcinoma NOS (nonspecific type) – 222 (94.1%), the number of other subtypes was less significant, mucinous adenocarcinoma – 11 (4.6%), and signet ring cell adenocarcinoma – 3 (1.3%). The structure of the sex and age distribution was as follows: 132 patients (55.9%) were female, and 104 patients (44.1%) were male; the number of patients under 45 years of age was 7 (2.9%), between 46 and 75 years of age – 184 (78%), and those over 75 years of age – 45 (19.1%).

The number of patients with stage I was 11 patients (4.7%), with stage II – 107 (45.3%), with stage III – 65 (27.5%), and with stage IV – 53 (22.5%).

The average follow-up period for patients was 2.9 years (range 0.08–7.3 years). Of the 236 patients included in the study, 73 patients died (30.9%). Among the deceased, 41.1% (30 patients) died within the first year after diagnosis, 46.7% (34 patients) died within 1 to 3 years after diagnosis, 9.6% (7 patients) died within 3 to 5 years after diagnosis, and 2.7% (2 patients) died after the 5-year mark after diagnosis.

The 5-year survival rate of patients with stage I colon adenocarcinomas was 90.1% $\pm$ 8.6%; stage II – 86.0% $\pm$ 4.3%; stage III – 57.1% $\pm$ 9.2%; stage IV 13.4% $\pm$ 7.1%.

In 180 tumors, the ratio of the stroma to the tumor was determined, with a conditional division into tumors with a high tumor-stromal ratio (TSR) ($\geq$ 50% stroma) and low TSR (<50% stroma). Based on the results of the analysis, it was found that the tumor-stromal ratio (TSR) is an independent prognostic sign for colon adenocarcinoma. Tumors with a high TSR ($\geq$ 50% stroma) have a worse prognosis for overall survival compared to tumors with a small amount of stromal component. When constructing Kaplan-Meier survival curves, it was found that the overall survival rates of tumors with a high TSR ($\geq$ 50% stroma) compared to tumors with a low TSR are as follows: 1-year overall survival 89.5 $\pm$ 3.5% vs. 96.9 $\pm$ 1.8%; 3-year overall survival 65.8 $\pm$ 5.8% vs. 91.6 $\pm$ 3.0%; 5-year overall survival 38.4 $\pm$ 7.9% vs. 74.2 $\pm$ 6.6%,

respectively. The association between tumor-stromal ratio and overall survival of patients with colon adenocarcinoma is statistically significant ($p < 0.001$). Univariate and multivariate Cox regression analysis showed that tumors with low PSS (stroma $< 50\%$) statistically significantly have better overall survival (HR 0.39, 95% CI 0.21-0.70, $p = 0.001$) compared with tumors with high PSS (stroma $\geq 50\%$). The Kappa-Cohen coefficient was 0.81, indicating a high level of agreement between pathologists assessing the tumor-stromal ratio.

The presence of intratumoral lymphocytic infiltration was investigated in the tumors of 236 patients. When constructing Kaplan-Meier survival curves, it was found that the number of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) has a statistically significant relationship with overall survival ($p < 0.001$). The overall one-year survival for group A (low TIL 0-9%) was $79.3 \pm 4.3\%$, for group B (moderate TIL 10-39%) was $91.5 \pm 2.7\%$, for group C (high TIL $> 40\%$) – $90.5 \pm 4.5\%$. The overall three-year survival for group A (TIL 0-9%) was $58.0 \pm 5.3\%$, for group B (TIL 10-39%) was $78.5 \pm 4.0\%$. Univariate and multivariate Cox regression analysis showed that moderate and high PIL infiltration had a statistically significant effect on overall survival: group B (PIL 10-39%) (HR 0.57, 95% CI 0.34-0.96, $p = 0.039$), group C (PIL $> 40\%$) (HR 0.41, 95% CI 0.17-1.01, $p = 0.054$). Thus, a moderate number of tumor-infiltrating lymphocytes (PIL 10-39%) is an independent prognostic sign for overall survival of patients with colon adenocarcinoma. The Kappa-Cohen coefficient was 0.75, confirming a high level of agreement between pathologists who assessed PIL. Additionally, MSI/MSS status was determined for 73 samples. When constructing the Kaplan-Meier survival curve, it was found that for a smaller sample size, a statistically significant effect of PIL on overall survival of patients was maintained ($p = 0.042$). Also, a statistically significant inverse correlation between the number of PIL and MSI/MSS status was found ($p = 0.026$). To assess the individual risk of adverse prognosis of patients, an integrated scale was constructed that takes into account three independent prognostic factors associated with survival: the number of tumor-infiltrating lymphocytes, the status of lymph node metastases pN, and the tumor-stromal ratio. Each of the features, categorized by the corresponding quantitative value, was assigned

a conditional number of points according to the degree of its association with the risk of death according to the results of log-rank tests and median survival according to Kaplan-Meier. The sum of the scores forms a total risk score, which allows classifying patients into low, moderate and high risk groups.

Immunohistochemical study of PD-L1 protein expression was performed on 32 adenocarcinoma resection specimens. When studying associative relationships using the Fisher method, a statistically significant association of PD-L1 protein expression with the degree of tumor differentiation ($p=0.03$), depth of tumor invasion pT ($p=0.05$) and infiltration by CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes was established (which indicates the possibility of using it as an additional marker for assessing tumor aggressiveness). There is a statistically significant difference between groups with different levels of PD-L1 expression ($p=0.028$), which may potentially indicate its impact on survival duration and, accordingly, the prognostic value of this marker. Therefore, its determination may be appropriate both when planning the use of immunotherapy as a third-line treatment for colon adenocarcinoma and for the purpose of predicting the aggressiveness of the clinical course.

For 16 cases, the determination of CD20⁺ and CD4⁺ lymphocyte subpopulations was performed. A statistically significant relationship between the CD20⁺ and CD4⁺ lymphocyte subpopulations and overall survival was not found ($p=0.31$ and $p=0.11$, respectively). However, when using the logrank trend test, a statistically significant effect of the infiltration of the CD4⁺ lymphocyte subpopulation on the survival gradient was established ($p=0.03$) (which indicates the potential impact of CD4⁺ lymphocytes on overall survival). Having analyzed the relationship between CD20⁺ lymphocytes and clinical and histological parameters, a statistically significant association was established with the stage ($p=0.05$), the depth of tumor invasion pT ($p=0.02$), the degree of tumor differentiation G ($p=0.05$) and CD4⁺ lymphocytes (which indicates the possibility of using the determination of the number of CD20⁺ lymphocyte subpopulations to assess the aggressiveness of colon adenocarcinoma).

During the comprehensive evaluation of all prognostic signs of colon adenocarcinoma, it was statistically reliably established that the presence of metastases

in the lymph nodes (pN), the presence of distant metastases (M), the number of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), and the tumor-stromal ratio are the most significant signs. Determination of CD4+ and CD20+ lymphocyte subpopulations can be performed additionally to determine the aggressiveness of colon adenocarcinoma. Conducting an immunohistochemical study of PD-L1 protein expression is appropriate in the case of planning third-line treatment with appropriate targeted drugs and assessing the aggressiveness of tumor behavior.

Scientific novelty. For the first time, a comprehensive study of the microenvironment of colon adenocarcinoma has been conducted. It has been established that colon carcinomas with the same stages, histological structure, and degree of differentiation have significant differences in the characteristics of the tumor stroma and the number of tumor-infiltrating lymphocytes. Based on the results of the study, differences in prognosis were identified depending on the number of tumor stroma and tumor-infiltrating lymphocytes. For the first time, an integrated scale for assessing the risks of the clinical course of colon adenocarcinoma has been created, which simultaneously includes three independent prognostic signs, namely, lymph node status, tumor-infiltrating lymphocytes, and tumor-stromal ratio. It has been established that the frequency of absence or presence of immune infiltrate correlates with MSH-H status.

It has been established that the expression of the PD-L1 protein in colon adenocarcinomas is associated with the duration of survival and is associated with the degree of tumor differentiation (G), the depth of tumor invasion (pT) and infiltration by CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes. The presence of CD20+ lymphocyte subpopulations is statistically significantly associated with the stage, the depth of tumor invasion (pT), the degree of tumor differentiation (G) and CD4+ lymphocytes. Based on the data obtained during these studies, it can be assumed that the determination of these markers is a reflection of the biological behavior of the tumor and provides additional information about the aggressiveness of the course of colon adenocarcinomas.

Thus, a detailed comprehensive study of the above characteristics of the tumor microenvironment provides an expanded understanding of the features of the progression of colon adenocarcinomas. It has been demonstrated that the interaction of tumor cells with the microenvironment has a significant impact on survival. The reaction of the stromal and immune infiltrates helps to assess the biological aggressiveness of cancer cells, which can be used to predict the clinical course of the disease.

Practical significance. The results of the study will help to improve the prediction of the course of colon adenocarcinoma. The results obtained confirm the possibility of introducing the determination of the number of tumor-infiltrating lymphocytes and the tumor-stromal ratio into the routine practice of the pathologist in order to predict the course of colon adenocarcinoma. The methods for determining these parameters do not require additional time and economic costs, which simplifies their application. The absence or minimal number of tumor-infiltrating lymphocytes is an additional marker of the feasibility of determining MSI/MSS status. The proposed scale allows stratifying patients based on three key signs that have prognostic significance. This approach is simple to use, does not require complex mathematical models and can be integrated into clinical practice for preliminary prediction of the course of the disease and decision-making regarding the intensity of treatment. Determination of PD-L1 protein expression may be appropriate when considering additional treatment options or determining the aggressiveness of the clinical course. The detailed prediction provides additional opportunities for stratifying patients into appropriate risk groups. This allows for more effective use of treatment protocols, and accordingly will positively affect the survival rates of patients with colon adenocarcinoma.

Keywords: colon cancer, colorectal cancer, prognosis, colon adenocarcinoma, colon cancer, rectal cancer, tumor microenvironment, prognostic value, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor stroma, overall survival, immunotherapy

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті, опубліковані у наукових фахових виданнях України:

1. Zakhartseva, L., & Shkurupii, B. (2021). Tumor-infiltrating lymphocytes as easily accessible prognostic tool in adenocarcinoma of the colon. *Experimental oncology*, 43(4), 331–335. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.16991> (Scopus). (Автор здійснила збір матеріалу, підготувала огляд літератури, разом зі співавторами провела гістологічне дослідження, інтерпретацію даних клінічних досліджень, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).
2. Shkurupii, B., & Zakhartseva, L. (2024). Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes and its association with clinical-morphological features of colon adenocarcinomas. *Experimental oncology*, 46(1), 45–52. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.01.045> (Scopus). (Автор здійснила збір матеріалу, підготувала огляд літератури, разом зі співавторами провела гістологічне дослідження, інтерпретацію даних клінічних досліджень, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).
3. Роль пухлинного мікрооточення в прогнозуванні виживаності пацієнтів з аденокарциномною товстої кишки I–III стадій. (2024). *Clinical Oncology*, 54(2). <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466x.54-2.32616> (Автор провела аналіз літератури, збір матеріалу, провела гістологічне дослідження, узагальнила та проаналізувала отримані дані дослідження, підготувала ілюстративний матеріал, оформила статтю до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези виступів на конференціях:

4. B.M. Shkurupii, S.V. Klymenko, L.M. Zakhartseva, B.T. Klimuk, L.A. Rybchenko, L.O. Poluben Frequency of KRAS mutation in patients with colorectal cancer in Ukraine. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкология. 2019, T21, №1:74.
5. Shkurupii B., Zakhartseva L., Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma as an additional prognostic tool for patient outcome assessment. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):45–46.
6. Shkurupii B., Role of Tumor-infiltrating lymphocytes and tumor strome in colorectal carcinoma for prognosis of patients outcome. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):8–9.
7. Zakhartseva L.M., Shkurupii B.M., The prognostic value of tumour – infiltrating lymphocytes in MSS/MSI adenocarcinomas of colon, stage II-IV. (36th European Congress of Pathology in Florence). Florence, Italy 7–11 September, 2024 (poster). 36th European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.207.

Зміст

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1: СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА АДЕНОКАРЦИНОМИ ТОВСТОЇ КИШКИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПРОГНОЗ. (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	28
1.1 ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО РАК ТОВСТОЇ КИШКИ	28
1.2 ЗАХВОРЮВАНІСТЬ НА РАК ТОВСТОЇ КИШКИ, ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ФАКТОРИ РИЗИКУ	33
1.3 МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РІЗНИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПІДТИПІВ АДЕНОКАРЦИНОМ ТОВСТОЇ КИШКИ.....	41
1.4 ГІСТОЛОГІЧНІ ПРОГНОСТИЧНІ ФАКТОРИ, РОЛЬ ПУХЛИННОГО МІКРООТОЧЕННЯ.....	47
1.5 ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ ДЛЯ РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ	52
1.6 КОРОТКА ХАРАКТЕРИСТИКА СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ	56
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ	60
РОЗДІЛ 2: МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	61
2.1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРІАЛІВ	61
2.2 МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	63
2.3 СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ	66
РОЗДІЛ 3: РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	67
3.1 СТРУКТУРА ТА ВІКОВИЙ РОЗПОДІЛ АДЕНОКАРЦИНОМ ТОВСТОЇ КИШКИ (РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ АРХІВНОГО МАТЕРІАЛУ ЗА 2009-2019РР.)	67

3.2 АНАЛІЗ ДИНАМІКИ ЗАХВОРЮВАНOSTІ НА АДЕНОКАРЦИНОМУ ТОВСТОЇ КИШКИ З 2009-2019 РР. (ЗА ДАНИМИ КИЇВСЬКОГО МІСЬКОГО КЛІНІЧНОГО ОНКОЛОГІЧНОГО ЦЕНТРУ)	70
3.3 ГІСТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АДЕНОКАРЦИНОМУ ТОВСТОЇ КИШКИ (ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ДОСЛІДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ).....	73
3.4 АНАЛІЗ ГІСТОЛОГІЧНИХ ТА ПРОГНОСТИЧНИХ ФАКТОРІВ ДЛЯ АДЕНОКАРЦИНОМУ ТОВСТОЇ КИШКИ.....	78
3.4.1 Пухлино-стромальне співвідношення в якості прогностичного фактора для аденокарцином товстої кишки	78
3.4.2 Пухлино-інфільтруючі лімфоцити в якості прогностичного фактора для аденокарцином товстої кишки.....	85
3.5 АНАЛІЗ ЕСПРЕСІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ В ЯКОСТІ ПРОГНОСТИЧНИХ ФАКТОРІВ ДЛЯ АДЕНОКАРЦИНОМУ ТОВСТОЇ КИШКИ	97
3.5.1 Аналіз значимості субпопуляцій CD4+ та CD20+ пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для аденокарцином товстої кишки.....	97
3.5.2 Експресія PD-L-1 в аденокарциномах товстої кишки, його прогностичне значення	105
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	111
ВИСНОВКИ	117
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	120
ДОДАТОК А.....	149
ДОДАТОК Б.....	150
НАУКОВІ ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	150
ДОДАТОК В.....	151
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ	151

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

KPP – колоректальний рак

АКТ – адаптивна клітинна терапія

АКТК – аденокарцинома

АХ – ад’ювантна хіміотерапія

KPP – колоректальний рак

ПАФ – пухлино-асоційовані фібробласти

ПЛ – пухлино-інфільтруючі лімфоцити

ПКМ – позаклітинний матрикс

ПСС – пухлино-стромальне співвідношення

САП – сімейний аденоматозний поліпоз

MSI – мікросателітна нестабільність

MSS – мікросателітна стабільність

MRR – система репарації невідповідності ДНК

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Захворюваність на рак товстої невинно зростає. За даними оприлюдненими Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я рак товстої кишки посідає третє місце в структурі онкологічної захворюваності. Близько 10% випадків виявлених злоякісних новоутворень це карциноми товстої кишки. В усьому світі смертність від даної нозології також є досить високою, адже цей вид раку посідає друге місце в структурі смертності від онкологічних захворювань [21, 143]. Згідно даних Національного канцер-реєстру №23 в 2020 році в рак товстої кишки посів четверте місце в структурі онкологічної морбідності обох статей, та друге місце в структурі смертності від онкологічних захворювань серед жінок, і четверте місце у чоловіків відповідно [25]. Окрім того, захворюваність є значним економічним тягарем для суспільства адже включає в себе як прямі економічні витрати пов'язані з витратами на медичне обслуговування пацієнтів, так і не прямі – пов'язані з втратою працездатності та смертю [168].

Вибір стратегії лікування залежить від оцінки ризику прогресування та рецидиву раку товстої кишки. Незважаючи на сучасні діагностичні можливості стратифікація ризику рецидиву після резекції раку товстої кишки в основному базується на інтегративній оцінці клініко-патологічних та молекулярних особливостей пухлини, зокрема патологічної стадія TNM та статусу молекулярного маркера MMR/MSI. Допоміжними прогностичними критеріями є наявність судинної, лімфатичної та периневральної інвазії [144, 148, 169].

Згідно рекомендацій Європейського товариства медичної онкології (ESMO) ад'ювантна хіміотерапія не призначається пацієнтам з II стадією раку товстої кишки у випадку, якщо вони відносяться до групи низького ризику. Якщо ж пацієнти відносяться до групи з середнім рівнем ризику, подальше призначення ад'ювантної хіміотерапії залежить від статусу молекулярного маркера MMR/MSI. Та беззаперечно, хіміотерапія призначається пацієнтам з II

стадією групи високого ризику та пацієнтам, що мають III стадію захворювання [148]. Одним з важливих факторів який потрібно приймати до уваги при призначенні ад'ювантної хіміотерапії, це перевага користі від даного виду терапії над побічними ефектами лікування. До сьогодні рівні розвитку токсичності хіміотерапії лишаються високими та можуть викликати такі ускладнення як лейкопенія, діарея, нудота, тромбоцитопенія та інші, це в свою чергу може призводити не тільки до погіршення якості життя пацієнтів, а й до припинення хіміотерапії [33, 155]. Окрім того, Auclin E. та автори [155] в своєму дослідженні зазначають, що лише близько 20 % пацієнтів отримують реальну користь від ад'ювантної хіміотерапії на противагу решті, хто ризикує зазнати впливу токсичності лікування. Дані отримані в дослідженні TOSCA [170] показали, що тривалість ад'ювантної хіміотерапії є важливим фактором, який необхідно враховувати задля забезпечення балансу максимальної ефективності та безпечності лікування.

З огляду на всі переваги та ризики ад'ювантної хіміотерапії та вузький спектр параметрів для стратифікації пацієнтів, виникає потреба в пошуку додаткових прогностичних характеристик.

Мета дослідження: визначити комплекс прогностичних гістологічних, та імуногістохімічних факторів для аденокарцином товстої кишки.

Завдання дослідження:

1. Дослідити статистичні показники (вік, стать, виживаність) хворих, що проходили лікування в КНП «КМКОЦ» за останні 10 років, визначити патгістологічні особливості аденокарцином товстої кишки цих пацієнтів.
2. Оцінити пухлино-стромальне співвідношення в аденокарциномах товстої кишки.
3. Оцінити щільність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в аденокарциномах товстої кишки.

4. Провести імуногістохімічне дослідження MSS/MSI статусу в аденокарциномах товстої кишки.

5. Провести імуногістохімічне дослідження експресії білку PD-L1 в аденокарциномах товстої кишки.

6. Провести імуногістохімічне дослідження субпопуляцій CD4+ та CD20+ лімфоцитів в складі імунного інфільтрату пухлини.

7. Оцінити прогностичне значення перелічених вище гістологічних та імуногістохімічних параметрів для прогнозування перебігу та вибору подальших стратегій лікування.

Об'єкт дослідження – аденокарциноми товстої кишки.

Предмет дослідження – патогістологічні та імуногістохімічні характеристики аденокарцином товстої кишки та прогнозування їх перебігу.

Методи дослідження: проспективно-ретроспективний аналіз даних медичної історії пацієнта (встановлення стадії, особливостей лікування та даних виживаності), визначення гістологічних особливостей (підрахунок відсотка стромального компоненту в пухлині, визначення кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, гістологічного типу пухлини, ступеню диференціювання), статусу мікросателітної нестабільності (MSI/MSS), імуногістохімічних параметрів (оцінювання інтенсивності експресії білків PD-L1, визначення субпопуляцій CD4+ та CD20+ лімфоцитів в складі імунного інфільтрату пухлини), статистичний аналіз отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше виконано комплексне дослідження мікрооточення аденокарцином товстої кишки. Було описано відмінності щільності пухлинної строми та різноманіття патернів інтенсивності імунного інфільтрату в аденокарциномах товстої кишки. Ґрунтуючись на проведених дослідженнях, було виявлено відмінності прогнозу для пухлин з різним відсотком пухлинної строми та різним

числом пухлино-інфільтруючих лімфоцитів незалежно від гістологічного типу та ступеню диференціювання пухлини. Розроблено інтегративну шкалу оцінки індивідуального ризику клінічного перебігу аденокарцином товстої кишки. З'ясовано, що кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів має обернену кореляцію зі статусом MSH-H.

Виявлено, що інфільтрація CD 20+ лімфоцитами асоційована зі ступенем диференціювання пухлини, глибиною її інвазії, стадією, тому можна припустити що В-клітинна імунна відповідь виконує важливу роль у прогресуванні пухлини та може слугувати як індикатор агресивності пухлинного росту. Статистично достовірно виявлено тренд впливу CD4+ лімфоцитів на виживаність пацієнтів. А також виявлено асоціацію з CD20 + лімфоцитами. Грунтуючись на основі отриманих результатів можна припустити, що взаємозв'язок між цими субпопуляціями лімфоцитів є відображенням координації між гуморальною та клітинною відповіддю.

З'ясовано, що експресія PD-L1 пов'язана з тривалістю виживаності.

Отримані дані підкреслюють важливість визначення наведених вище характеристик мікрооточення пухлини для розширеного розуміння регуляції росту та прогресії пухлини, та прогнозування перебігу аденокарцином товстої кишки.

Практичне значення

Грунтуючись на результатах отриманих в дисертаційній роботі створено рекомендації, що дозволять більш точно прогнозувати перебіг захворювання. Стратифікація пацієнтів відповідно до груп ризику може бути покращена завдяки інтегрованому оцінюванню таких морфологічних характеристик як пухлино-стромальне співвідношення, кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та наявність метастазів в лімфатичних вузлах. Комплекс цих характеристик, допоможе покращити прогнозування клінічного перебігу аденокарциноми

товстої кишки, удосконалити стратифікацію подальшого лікування пацієнтів – та покращити показники загальної виживаності.

Особистий внесок здобувача

Автор самостійно виконав дисертаційну роботу. Разом з керівником обрана тема дослідження, сформульована мета та завдання дослідження а також обрано групу для досліджень. Дисертант самостійно провів інформаційний пошук, зібрав та обробив матеріали дослідження, провів гістологічні дослідження та статистичну обробку отриманих даних, на основі яких сформульовано висновки про потенціал використання додаткових прогностичних маркерів. Всі розділи дисертації були написані автором самостійно. У наукових роботах, оприлюднених дисертантом у співавторстві, йому належить фактичний матеріал, його внесок є визначальним. Права співавторів публікацій порушені не були, конфлікти інтересів відсутні. Матеріали даної роботи не були використані в інших дисертаціях.

Апробація результатів дослідження

Основні положення та отримані результати даної дисертаційної оприлюднені на науково-практичній конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ 4-5 лютого 2019р.), всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих вчених «Патологічна анатомія – основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення» (18-19 листопада 2021 р.), міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку» (22-23 квітня 2021 р.), XXXVI Конгресі Європейської асоціації патологів (Флоренція, Італія, 7-11 вересня 2024р.)

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії №1 Національного університету ім. О.О.Богомольця

«Розробка гістологічних і молекулярно-біологічних критеріїв диференційної діагностики пухлин та передпухлинних змін в органах і їх прогностичне значення», № державної реєстрації 0119U101131; термін виконання 2019-2021 роки. Дисертант є співвиконавцем зазначеної науково-дослідної роботи. Тема дисертації затверджена вченою радою медичного факультету №2 НМУ ім. О.О.Богомольця (протокол № 5 від 11 січня 2018 року).

Публікації

Результати дисертації опубліковані у 7 наукових працях, з них 3 – наукові статті (в тому числі 2 у періодичному науковому виданні України, що індексується Scopus, 1 - у фаховому виданні України категорії Б).

Структура і обсяг дисертації

Загальний обсяг дисертації складає 151 сторінка машинописного тексту. Дисертація викладена українською мовою та складається з анотацій українською та англійською мовами, переліку публікацій здобувача, вступу, огляду літератури (1 розділ), матеріалів та методів дослідження (2 розділ), власного дослідження (3 розділ), аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список джерел включає 176 праць. Робота ілюстрована 31 малюнком та 20 таблицями.

РОЗДІЛ 1: СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА АДЕНОКАРЦИНОМИ ТОВСТОЇ КИШКИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПРОГНОЗ. (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальні відомості про рак товстої кишки

Колоректальний рак (КРР) – поняття що включає в себе різноманітні гістологічні підтипи злоякісних новоутворень всіх відділів товстої та прямої кишки. Найбільш розповсюдженим типом є аденокарцинома товстої кишки (АКТК) – злоякісна пухлина, що походить з епітелію слизової оболонки кишки [1]. Анатомічно всі колоректальні пухлини за локалізацією можна умовно поділити на три групи: правосторонні пухлини – до яких належать злоякісні новоутворення сліпої кишки, висхідної кишки, печінкового згину та поперечної кишки; лівосторонні пухлини – всі злоякісні новоутворення селезінкового згину, низхідної кишки та сигми; окремо – група пухлин прямої кишки [2].

Такий поділ обумовлений тим, що численними дослідженнями виявлено значну різницю в морфологічних та гістологічних особливостях пухлин різних анатомічних груп, прогнозі перебігу, загальної виживаності та молекулярних шляхах розвитку [2, 3, 4, 5]. Морфологічно переважна більшість правосторонніх пухлин представлена поліпоїдними утвореннями, що виступають в просвіт кишки та можуть викликати виражену анемію у пацієнтів. В той час як лівосторонні пухлини в основному більш плоскі, характеризуються інфільтративним ростом та призводять до звуження та обструкції просвіту кишки [2]. Частота лівосторонніх пухлин переважає над правосторонніми. Більшість лівосторонніх пухлин мають високий чи помірний ступінь диференціації, в той час як відсоток пухлин з нижчою диференціацією зазвичай вищий серед правосторонніх. Крім того менш прогностично сприятливі гістологічні підтипи аденокарцином, такі як муциозна чи перстнеподібноклітинна аденокарцинома значно частіше діагностуються серед пухлин правих відділів кишки [3, 4, 5]. Ці відмінності між правосторонніми та лівосторонніми пухлинами можна пояснити з точки зору ембріогенезу товстої кишки: сліпа кишка, висхідна кишка та дві

третини ободової кишки розвиваються з середньої кишки, а дистальна третина ободової кишки, низхідна кишка та сигма формуються з задньої кишки [6]. Основні відмінності правосторонніх та лівосторонніх пухлин узагальнені в таблиці 1.1.1.

Таблиця 1.1.1 Узагальнення основних клініко-морфологічних відмінностей право- та лівосторонніх пухлин товстої кишки

	Правосторонні пухлини товстої кишки	Лівосторонні пухлини товстої кишки
Демографічні відмінності	Частіше розвиваються у пацієнтів жіночої статі	Частіше розвиваються у пацієнтів чоловічої статі
Клінічна симптоматика	Частіше астенічний синдром, анемія, діарейний синдром	Закрепи, обструктивний синдром, кровотечі
Макроскопічно	Пухлини поліпоїдної форми, що ростуть у просвіт кишки. Часто на момент діагностики досягають великого розміру	Пухлини більш пласкої форми зі схильністю до обструкції просвіту кишки
Гістологічний тип	- Муцинозна аденокарцинома - Перстнеподібноклітинна аденокарцинома	Аденокарцинома, NOS
Мікросателітна нестабільність	Часто мікросателітно нестабільні (MSI-high)	Частіше не проявляють мікросателітної нестабільності (MSS)
Часто мутовані гени	- KRAS - BRAF - GFbR2 - PI3KA	- TP53 - APC - KRAS
Вживаність	- Гірший прогноз безрецидивної виживаності - Гірший прогноз загальної виживаності	- Кращий прогноз безрецидивної виживаності - Кращий прогноз загальної виживаності

Етіологічно раки товстої кишки поділяються на: спадкові форми пов'язані з певними генетичними синдромами, такими як сімейний аденоматозний поліпоз (САП) чи синдром Лінча, та спорадичні форми раку [7]. За даними літератури на

долю спадкових форм припадає всього лише близько 3-6%, решта спорадичні форми серед яких до 20% випадків пацієнти мають сімейну історію раку товстої кишки [7, 8, 9].

Сімейний аденоматозний поліпоз (САП) аутосомно-домінантне захворювання, що спричинене мутацією зародкової лінії в гені APC. У пацієнтів з САП виявляють множинні аденоми товстої кишки та прямої кишки (>100 аденом) з ризиком розвитку раку товстої кишки до 100% протягом життя. В середньому пухлини у пацієнтів з САП розвиваються в середньому до 40 років. Поліпи та аденоми також розвиваються і в верхніх відділах травного тракту – шлунку та дванадцятипалій кишці [10].

Синдром Лінча – аутосомно-домінантне захворювання, що розвивається через порушення функціонування системи репарації ДНК (MMR). Ризик розвитку пухлин товстої кишки у пацієнтів з синдромом Лінча коливається в межах 50-80%, що вимагає застосування окремої стратегії скринінгу з початком регулярних скринінгів з віку 20-25 років [9].

На сьогодні можна виділити три основні типи генетичної нестабільності викликані молекулярними порушеннями, які є ключовими в різноманітних шляхах канцерогенезу колоректальних карцином. Це: 1) хромосомна нестабільність (CIN-шлях); 2) гіпермутантна мікросателітна нестабільність (MSI) внаслідок порушення системи репарації ДНК (MMR); 3) ультрамутантний тип, що викликаний помилками зчитування полімерази [11, 12].

Однією з послідовностей по якій розвиваються злоякісні пухлини товстої кишки є послідовність «аденома-карцинома». Основне припущення, що аденоми поступово набувають гіперпластичних змін внаслідок послідовних альтерацій, які призводять до порушення регуляції генів відповідальних за ріст. Подальші мутації призводять до злоякісного переродження аденом [13]. Окрім того дослідження Winawer, S. J. та ін. [14] показало, що превентивне видалення поліпів та аденом значно знижує ризики розвитку раку товстої кишки. Однією з

ключових подій в злоякісному переродженні аденом є мутація в гені-супресорі пухлинного росту APC, яка виявляється більш ніж в 90% випадків САП та більшості спорадичних випадків раку товстої кишки [8, 13]. Важливо відзначити, що далеко не всі аденоми прогресують до карцином, адже ключову роль в цьому процесі відіграє критичне накопичення мутацій для подальшого розвитку тим чи іншим шляхом онкогенезу. Одним з яких є вищезгаданий CIN-шлях для якого притаманні аномалії каріотипу, порушення плоїдності чи втрата гетерозиготності. Зазвичай пухлини, які розвиваються даним шляхом демонструють мутації в генах APC, KRAS, BRAF, PI3KA та TP53, які відповідальні за коректну підтримку клітинних функцій шляхом балансування активності онкогенів та пухлинних-супресорів. Мутація гену APC, яка зазвичай є ініціальною, веде до посилення транскрипції генів, які відповідальні за пухлиноутворення та інвазію. Посилення проліферативної активності пов'язане з посиленою активністю MAP-кінази, що спричинена мутаціями KRAS та PI3KA. Завершальною є мутація TP53, що веде до неконтрольованого клітинного поділу [13, 15, 16].

Іншим класичним шляхом є шлях мікросателітної нестабільності MSI, який є гіпермутабельним та призводить до накопичення великої реплікативних помилок. За нормальних умов система репарації невідповідностей ДНК (MMR) здатна розпізнавати та відновлювати неспівпадіння, а також делеції і інсерції в повторюваних послідовностях ланцюгів ДНК. Проте цього не відбувається в наслідок мутацій в ключових білках цієї системи MLH1, MSH2, MSH6 та PSM2. Тож нові ланцюжки ДНК синтезуються вже накопиченими новими мутаціями. Найчастіше спорадичні пухлини з MSI мають мутації в гені BRAF, а от мутації в гені APC значно рідше в порівнянні пухлинами, що розвинулись CIN-шляхом [11, 12, 13, 16]. Наразі визначення статусу MSI є важливим для прогнозу та предикції відповіді на лікування, тож є одним з ключових елементів стратифікації пацієнтів для подальшої терапії [17].

Ключовим для розвитку зубчастих новоутворень є CIMP-шлях. В його основі лежить гіперметилування неметильованих ділянок CpG-острівців геному, що приймають участь у регуляції відновлення ДНК, клітинного циклу, ангіогенезу та міжклітинних взаємодій. Порушення цих процесів призводить до злоякісного переродження клітин та подальшого пухлинного прогресування [18, 19]. Визначення статусу CIMP-статусу набуло нового діагностичного значення завдяки затвердженню FDA рідинного тесту на основі аналізу метилування циркулюючої позаклітинної ДНК. Він є ефективним для скринінгу прогресивного колоректального раку, а от для ранніх стадій нажаль виявився малочутливим [20].

Таким чином, карциноми товстої кишки є досить гетерогенними з розмаїттям шляхів карциногенезу. Молекулярний профіль та шляхи онкогенезу, що задіяні в процесі розвитку пухлини залежать від анатомічної локалізації. Ці особливості є визначальними для клінічного перебігу, прогнозу та ефективності лікування даного захворювання.

1.2 Захворюваність на рак товстої кишки, епідеміологія та фактори ризику

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, захворюваність та смертність від раку товстої кишки невідмінно зростає. На разі рак ободової кишки посідає третє місце в структурі онкологічної захворюваності серед обох статей, та друге місце в структурі смертності від онкологічних захворювань, поступаючись в лідерстві раку легень [21].

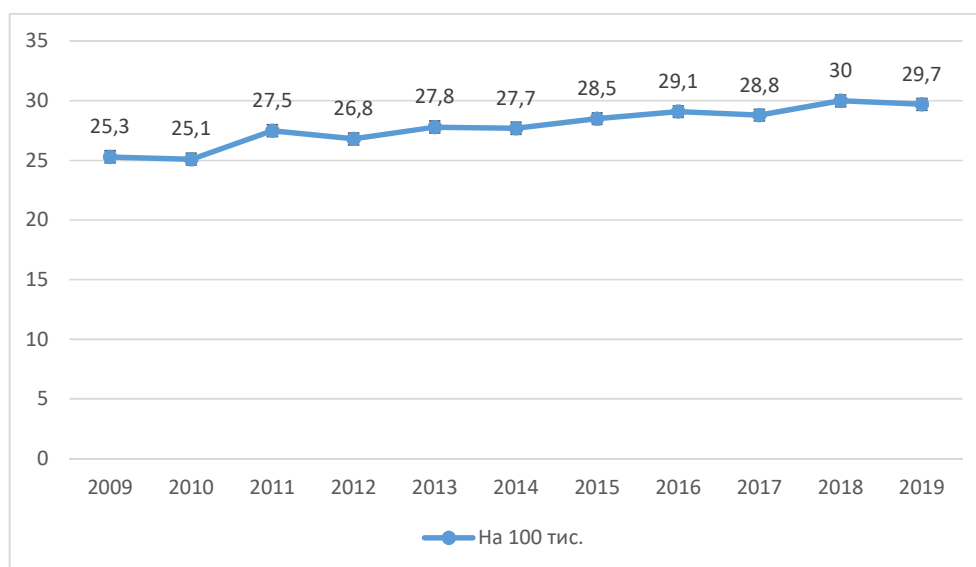
Проте більш втішачими є дані щодо 5-річної загальної виживаності (ЗВ), яка за даними Американської асоціації раку в середньому складає 63%. Залежно від стадії на якій було діагностовано захворювання значення 5-річної виживаності різко падає: при локалізованій стадії раку товстої кишки 5-річна ЗВ складає 91%; за наявності метастазів в регіонарні лімфатичні вузли – 72%; за наявності віддалених метастазів – 13% [22].

За останніми даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я за 2018 число нових випадків захворювання на рак для обох статей склало 18 078 957. Серед них 1 800 977 – це колоректальний рак (КРР). КРР став причиною 861 663 смертей лише за минулий 2018 рік, та посів друге місце в структурі смертності населення від онкологічних захворювань [21]. Таку відмінність захворюваності та смертності між статями численні автори пояснюють вищим рівнем шкідливих звичок, таких як паління та зловживання алкоголем, та менш різноманітним харчуванням у чоловіків в порівнянні з жінками. А також не менш важливу роль в такій статистичній розбіжності відіграє більша обізнаність в питаннях здорового способу життя, увага до тривожних симптомів та більш частий контакт з системою охорони здоров'я – частіше звернення задля скринінгових процедур серед жінок, ніж серед чоловіків [23, 24, 25].

В Україні за кількістю виявлених нових випадків онкологічних захворювань для обох статей колоректальний рак посідає одне з перших місць (22 283 нових випадки (13,1%)); окремо для жінок цей показник складає (11 098 (12,7%)) і є другим в структурі онкозахворюваності після раку молочної залози;

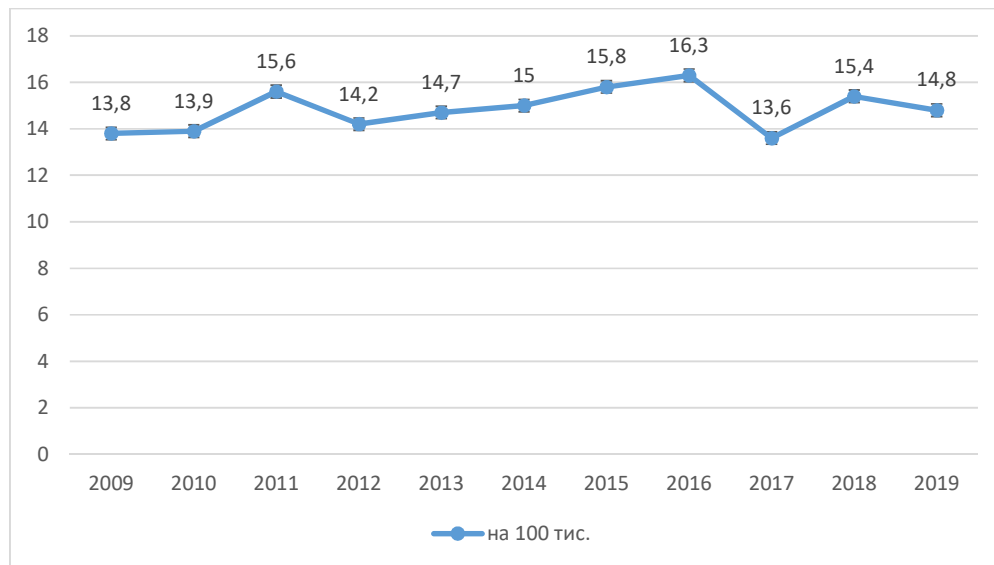
для чоловіків – (11 185 (13,6%)), цей вид раку займає друге місце серед смертності від онкозахворювань після раку легень. Згідно даних опублікованих Національним канцер-реєстром України показники захворюваності на рак ободової кишки в Україні та смертності від нього майже вдвічі перевищують світові показники. Лідером захворюваності серед українських регіонів є місто Київ, де цей показник станом на 2019 рік склав 34,3 на 100 тисяч населення. Проте за показниками смертності Київ посідає 5 місце, а лідерами є Дніпропетровська, Запорізька, Харківська та Черкаська області [25].

З 2009 по 2019 роки захворюваність на рак ободової кишки у місті Київ має стабільний тренд до зростання (мал.1.2.1).



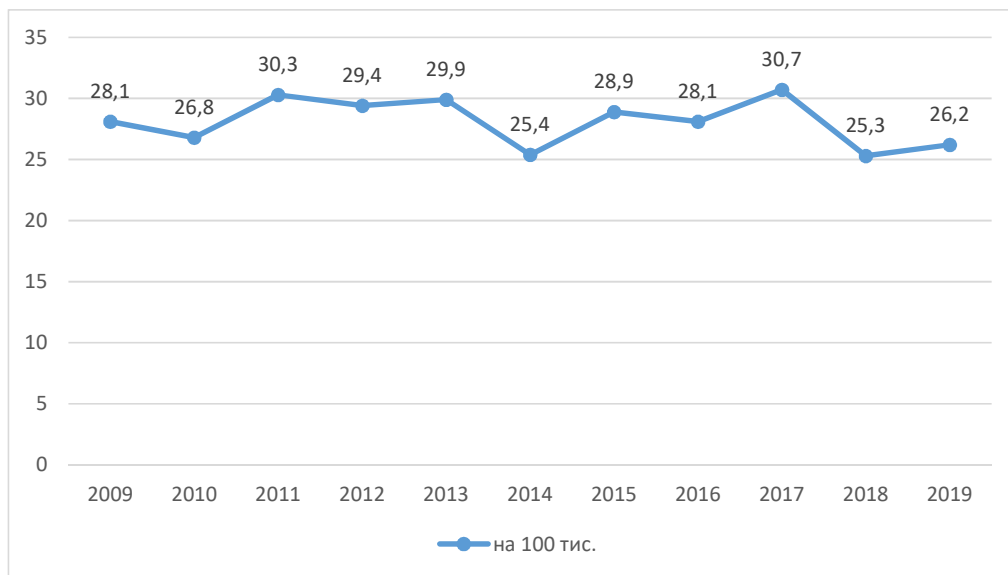
Мал.1.2.1 Захворюваність на рак ободової кишки у місті Києві на 100 тис. населення протягом 2009-2019 рр.

Рівні смертності в той же самий період залишались на приблизно однаковому рівні з незначними коливаннями (мал. 1.2.2).



Мал. 1.2.2. Смертність хворих на рак ободової кишки у місті Києві на 100 тис. населення протягом 2009-2019 рр.

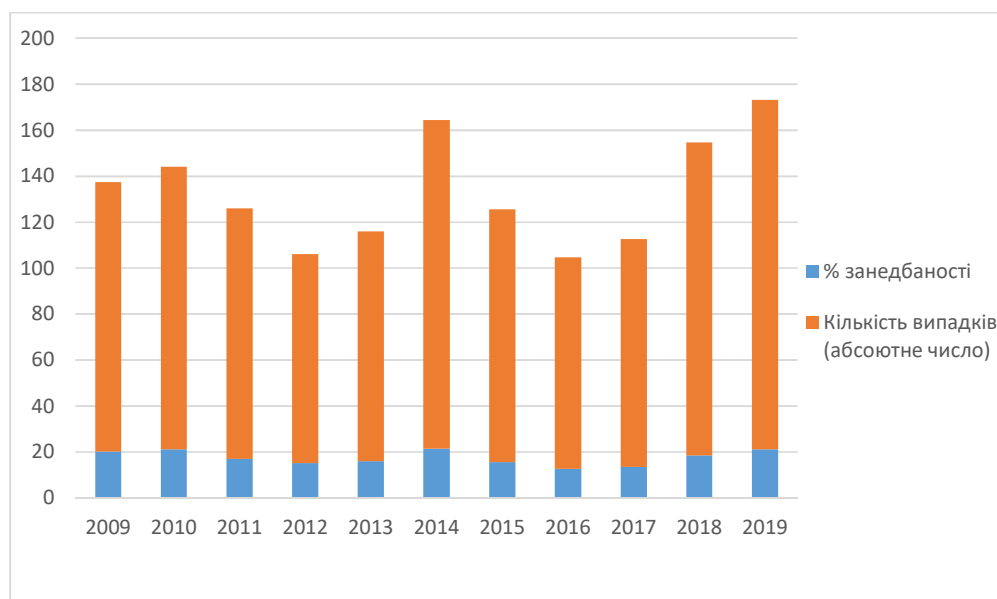
Чіткого тренду до зростання чи зниження дорокової летальності хворих не спостерігається, адже коливання в період з 2009 по 2019 роки є нестабільними (мал 1.2.3).



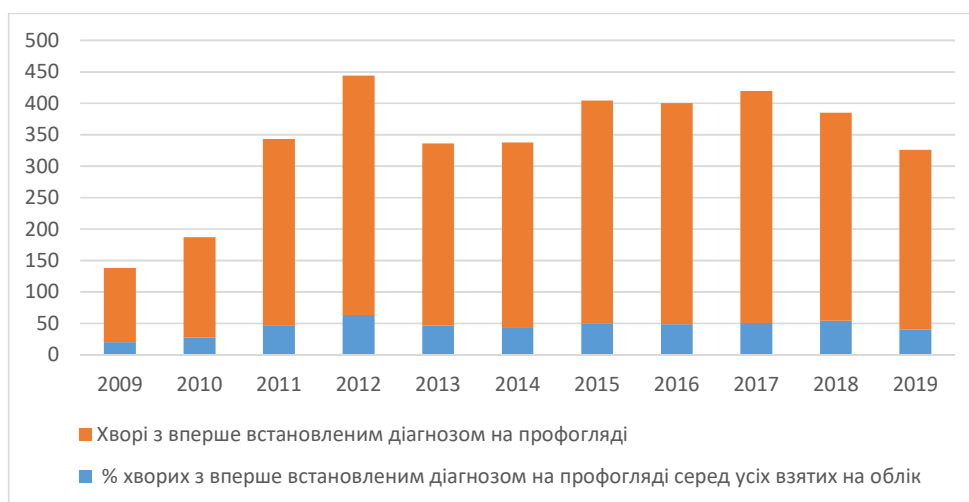
Мал. 1.2.3. Дорокова летальність хворих на рак ободової кишки у місті Києві на 100 тис. населення протягом 2009-2019 рр.

Згідно даних представлених на (мал. 4), відсоток занедбаних випадків, тобто з наявністю віддалених метастазів на момент становлення діагнозу

залишається стабільно однаковим. Як і відсоток первинної діагностики раку ободової кишки на профілактичних оглядах (мал. 1.2.4-1.2.5).



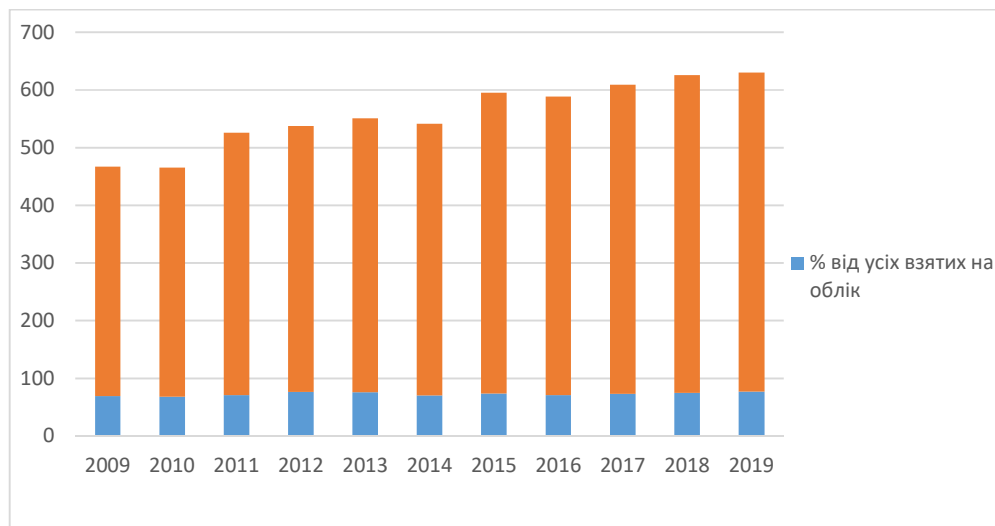
Мал. 1.2.4. Показник занедбаності для раку ободової кишки у місті Києві протягом 2009-2019 рр.



Мал. 1.2.5. Кількість та відсоток хворих, яким вперше було встановлено діагноз раку товстої кишки на профогляді протягом 2009-2019 у місті Києві.

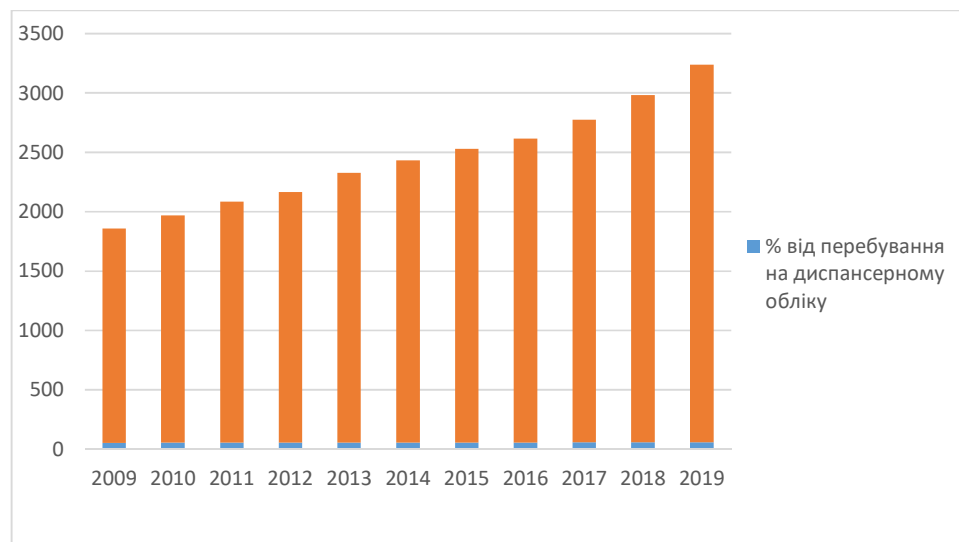
Хоча в абсолютній кількості показник охоплення хворих на рак ободової кишки має чіткий тренд до зростання, проте у відсотковому співвідношенні

залишається на однаковому рівні протягом усього періоду спостереження (2009-2019рр.) (мал. 1.2.6).



Мал. 1.2.6. Кількість та відсоток хворих на рак ободової кишки, яких охоплено спеціальним лікуванням протягом 2009-2019 рр. у місті Києві.

Показник кількості хворих, що перебувають на обліку від 5 років постійно зростає (від 1807 у 2009 році до 3183 у 2019 році). Відсотковий показник теж зростає, хоч і більш плавно (від 51,9% у 2009 році до 57,2% у 2019 році) (мал.1.2.7).



Мал. 1.2.7. Перебування хворих на рак ободової кишки на обліку протягом 5 і більше років у місті Києві протягом 2009-2019 рр.

Хоча показники захворюваності стабільно зростають, відмічається стабілізація рівнів смертності. Ця тенденція до стабілізації рівнів смертності частково може бути пояснена покращенням діагностичних опцій. Наразі наявні діагностичні методи та тести з високими рівнями діагностичної чутливості та специфічності дозволяють виявляти рак товстої кишки на більш ранніх стадіях, що розширює спектр доступних лікувальних опцій. До прикладу чутливість колоноскопії для раку товстої кишки складає 95%, а специфічність до 89%, що за даними спостережних досліджень дозволяє знизити відносний ризик смертності на 68%; тест на приховану кров в калі (FOBT тест) має діагностичну чутливість від 50% до 75% зі специфічністю до 99%, що за даними рандомізованих контрольованих досліджень дозволяє знизити відносний ризик смертності на 18% [26].

Тривожним трендом є зростання випадків раннього раку товстої кишки. Раннім раком товстої кишки вважаються випадки захворювання, що діагностовані пацієнтам до 50 років. Yeو H. та ін. [27] виявили тренд щорічного зростання кількості випадків раку товстої кишки серед пацієнтів молодших 50 років майже на 1,4% і це на фоні плавного зниження кількості випадків в когорті пацієнтів сарше 50 років. Окрім того варто відзначити, що у випадках раннього раку товстої кишки пухлини часто представлені більш розповсюдженими формами з нижчим рівнем диференціації пухлин [28]. До 27% пацієнтів віком до 50 років на момент встановлення діагнозу мають віддалені метастази, а серед пацієнтів віком сарше 50 років таких близько 20%. Частково цей феномен можна пояснити стандартами скринінгу, адже рекомендований вік початку скринінгу для популяції зі звичайним рівнем ризику є 50 років. Chen F.W. та автори [29] зазначають, що навіть в симптоматичних пацієнтів віком до 50 років часові затрати на встановлення первинного діагнозу на 40% більші в порівнянні з пацієнтами старшого віку. Частково це спричинено помилково встановленими діагнозами на початкових етапах діагностики.

Найвищі рівні захворюваності зазвичай прослідковувались в країнах з високим рівнем доходів, таких як США, Австралія, країни західної та північної Європи. Це можна пояснити особливостями дієти та меншою фізичною активністю, що призводять до ожиріння. Проте зараз в таких країнах відмічається стабілізація смертності за рахунок покращення діагностичних стратегій [21]. Напротивагу, в країнах з середнім рівнем доходів прослідковується тренд зростання захворюваності на рак товстої кишки, що пов'язують як зі зміною дієтичних звичок так і старінням населення в таких країнах [30]. Прослідковується чіткий лінійний зв'язок між зростанням індексу маси тіла та захворюваністю на рак товстої кишки. Примітним є що особливо вираженим цей зв'язок є у осіб, що страждають на абдомінальний тип ожиріння, з вираженим накопиченням вісцерального жиру. Цей взаємозв'язок пояснюється такими метаболічними порушеннями, як інсулінорезистентність та наявністю системного запалення, що є кофакторами в процесі канцерогенезу [31, 32, 33].

Іншим вагомим провокуючим фактором є вживання алкоголю. Численні дослідження підтверджують підвищення ризику розвитку колоректального раку на 20% при помірному вживанні алкоголю (від 12,6 – 49,9 г/день етанолу), та понад 50% при регулярному надмірному вживанні (≥ 50 г/день етанолу). Метаболіти алкоголю впливають на порушення процесу метилювання ДНК, відповідно блокуючи процес його синтезу та відновлення. Цікавим є факт, що цей ризик є значно вищим для осіб, що походять з азійського регіону в порівнянні з вихідцями з європейського регіону [34, 35, 36]. Одним з припущень, що можуть пояснити таку особливість є генетина відмінність в метаболізмі алкоголю. В азійській популяції значно частіше зустрічаються особи з відсутністю чи зниженою активністю алкоголь-дегідрогенази [35]. Окрім прямого негативного впливу, надмірне вживання алкоголю призводить до дефіциту фолатів. Дефіцит фолатів підвищує частоту виникнення аденом товстої кишки, які є прекурсорами раку даної локалізації [37]. Gibson T.M. та автори [38] в своєму дослідженні порівнюючи когорти пацієнтів, що отримали додаткову саплементачію

препаратами фолієвої кислоти і фолатів та тих хто мав дефіцит, встановили наявність зв'язку між дефіцитом даного мікронутрієнта та раком товстої кишки. Хоча визнали, що враховуючи тривалість шляху карциногенезу «аденома-карцинома», потрібні значно триваліші дослідження щоб ґрунтовно оцінити цей взаємозв'язок [38].

За останні роки значно ширше розкрита роль вітаміну Д в організмі людини. Ма У. Та ін. [39] в епідеміологічному дослідженні виявили обернений зв'язок з ризиком розвитку пухлин товстої кишки. В дослідженні McCullough M.L. та авторів виявлено статистично достовірний зв'язок між рівнями вітаміну Д в крові та ризиком розвитку злоякісних новоутворень товстокишкової локалізації. Вони припускають, що концентрація вітаміну Д на рівні 75-100 нмоль/л має протективний вплив [40].

Прослідковується взаємозв'язок між запальними захворюваннями товстого кишечника, такими як виразковий коліт та хвороба Крона. Незначно підвищений ризик розвитку колоректальних неоплазій у пацієнтів з хворобою Крона. Хворі з виразковим колітом також мають слабку силу зв'язку їх основного захворювання та онкологічних захворювань товстої кишки, який в основному прослідковується в випадках довготривалого та поширеного коліту [41, 42].

Підсумовуючи, варто зазначити що контроль над різноманіттям численних факторів ризику для колоректального раку є доволі непростою задачею. Тому для розкриття вагомості всіх потенційних детермінант в процесі канцерогенезу необхідні довготривалі дослідження.

1.3 Морфологічна характеристика різних гістологічних підтипів аденокарцином товстої кишки

Аденокарцинома – найчастіший тип злоякісних новоутворень товстої кишки, її частка складає до 90% усіх пухлин цієї локалізації. Встановлення діагнозу аденокарциноми товстої кишки зазвичай не представляє значної складності завдяки впізнаваному патерну. В класичному варіанті він представлений залозистими структурами, що місцями набувають крібриформної гістоархітекτονіки та в просвіті містять скупчення некротичного детриту – так звані «брудні» некрози. Ці залозисті структури хаотично розсіяні в десмопластичній стромі [1, 43]. В переважній більшості пухлини мають помірний рівень диференціації. Проте рівень узгодженості між патологами щодо розрізнення високодиференційованих та помірnodиференційованих пухлин низький. Частіше конвенційно патологи схилиються до класифікування значної кількості високодиференційованих аденокарцином як помірnodиференційованих, що створило активні дискусії навколо переходу до спрощеного поділу всіх пухлин на high-grade та low-grade. Варто зазначити, що класична система грейдингу застосовується лише до аденокарциноми неспецифічного типу, решта гістологічних підтипів аденокарцином мають інші прогностичні ознаки [44].

Наступний за популярністю гістологічний підтип це муциозна аденокарцинома, для нього характерні роширені просвіти залоз переповнені позаклітинними конгломератами слизу, обривками епітелію та поодинокими клітинами. У відсотковому співвідношенні муцинозний компонент має складати понад 50% від усієї площі пухлини, пухлини що містять менше муцинозного патерну рекомендовано категоризувати, як аденокарциноми з муцинозним компонентом [1, 44]. В 4му перегляді «Класифікації пухлин травної системи» Всесвітньої організації охорони здоров'я для грейдингу рекомендовано використовувати наявність та тип мікросателітної нестабільності: вважалося, що пухлини з високим рівнем мікросателітної нестабільності (MSI-H) переважно

поводяться як low-grade, а пухлини з низьким рівнем мікросателітної нестабільності та мікросателітно стабільні пухлини – high grade відповідно [44]. Проте в 5му перегляді «Класифікації пухлин травної системи» Всесвітньої організації охорони здоров'я знову повернулися до ідеї визначення рівня диференціації за переважаючим патерном збережених гландулярних структур [1]. Hosseini, S. [45] та автори в своєму дослідженні не виявили впливу муцинозного підтипу на загальну виживаність пацієнтів та заперечили припущення що він має гірші показники в порівнянні з неспецифічною аденокарциномою без урахування інших гістопатологічних ознак. Проте Park, J. S. та ін. [46] показали, що муцинозний патерн часто присутній в пухлинах з іншими неблагоприємними ознаками, такими як правостороння локалізація, молодий вік, та більш прогресивна стадія на момент діагностики. Муцинозні аденокарциноми значно частіше пов'язані з наявністю мікросателітної нестабільності та гіпермутабельного фенотипу, що робить внесок в загальну клінічну неблагоприємність [47, 48, 49]. На сьогоднішній день лікувальна стратегія не залежить від гістологічного типу пухлини [50]. Проте Glasgow, S. C. та автори у своєму дослідженні виявили, що муцинозні аденокарциноми демонструють надмірну експерію маркерів резистентності до оксиплатину та 5-фторурацилу, що може частково пояснити гіршу відповідь на лікування [51]. А Mekenkamp, L. J. та інші [52] висловили припущення, що муцин сам по собі може як фізичний фактор може сприяти хіміотерапевтичній резистентності. Проте питання щодо прогностичної цінності самого по собі муцинозного фенотипу пухлин товстої кишки та його впливу на лікування і надалі залишається дискусійним.

Перснеподібно-клітинна аденокарцинома товстої кишки належить до доволі рідкісних підтипів, її частота не перевищує 1% всіх аденокарцином [53]. Перснеподібно-клітинною аденокарциномою можна вважати у випадку якщо більш ніж >50% пухлини складається зі специфічного вигляду пухлинних клітин – ядро клітини різко зміщене на периферію за рахунок тиску надмірної кількості

накопиченого інтрацитоплазматичного муцину. В разі якщо кількість таких клітин не перевищує 50%, тоді варто розцінювати такі пухлини як пухлини з перстнеподібно-клітинною диференціацією [1, 44]. Також можна виокремити два гістологічних варіанти перстнеподібноклітинних аденокарцином: багаті муцином – перстнеподібні клітини ніби «плавають» у великій кількості позаклітинного муцину; та інфільтративні – з малою кількістю, або відсутнім позаклітинним муцином. Проте цей поділ залишається доволі умовним, так як не існує запроваджених рекомендацій щодо поділу на форми багаті та бідні муцином. Форми з малою кількістю муцину доволі часто характеризуються наявністю інших прогностично несприятливих ознак – периневральною, лімфатичною та венозною інвазією та мають більш агресивний клінічний перебіг [54]. Класичними та найбільш типовими для аденокарцином товстої кишки вважаються метастази в легені, печінку та очеревину [55]. Але для перстнеподібно-клітинних аденокарцином незвичайні локалізації далеко не рідкість – такі як молочна залоза, орбіта, стравохід та гортань [1, 56, 57, 58, 59]. З точки зору клініко-патологічних характеристик перстнеподібно-клітинні карциноми проявляють прогностично малосприятливі ознаки: частіше розвиваються у молодих пацієнтів, локалізуються в правих відділах кишківника та діагностуються на більш пізніх стадіях. Окрім того, значення показників загальної виживаності значно гірші в порівнянні з муцинозними та типовими не муцинозними аденокарциномами [60, 53]. На відміну від муцинозних аденокарцином, гістологічний патерн перстнеподібноклітинних карцином сам по собі розглядається як критерій неблагоприємного прогнозу та внесений до 7го перегляду Керівництва AJCC щодо визначення стадії раку, як незалежний прогностичний фактор [61]. Дуже часто перстнеподібноклітинні аденокарциноми є так званими «linitis plastica» (дифузними раками), тобто ростуть інфільтративно. Це значно ускладнює діагностику через відсутність достатньої кількості візуальних даних при ендоскопічних діагностичних процедурах і потребу проведення повторних та більш глибоких біопсій, через значну кількість хибно-негативних результатів [54].

Медулярна карцинома рідкісний гістологічний підтип аденокарциноми. Солідні пласти клітин з великими везикулярними ядрами, яскравими ядерцями, та значною кількістю еозинофільної цитоплазми характерні для даного підтипу пухлин. Характерною також є інтенсивна внутрішньоепітеальна лімфоцитарна інфільтрація [1, 44]. Багато досліджень публікували дані про те, що медулярний патерн мають є позитивною прогностичною ознакою [62, 63, 64, 65]. Можна припустити, що не було враховано багатьох факторів які ведуть до похибки (bias). Ці дослідження в основному описували невеликі когорти, що включали досить неоднорідні популяції [63, 64]. Проте Gómez-Álvarez, M. A. та автори [66] виявили, що показники загальної виживаності для медулярних аденокарцином нижчі в порівнянні з конвенційними аденокарциномами [66]. Інші ж автори припускають, що значна кількість медулярних аденокарцином помилково діагностується як звичайна недиференційована аденокарцинома, що може призводити до вибору неправильної лікувальної стратегії таких пацієнтів [67, 68].

Цікавим гістологічним підтипом є зубчаста аденокарцинома, яка мікроскопічно схожа з зубчастими поліпами. Мікроскопічно гландулярний епітелій набуває «зубчастої» гістоархітекτονіки – з «мереживними», муцинозними, крибриформними та трабекулярними ділянками. Іншою відмінною ознакою зубчастих аденокарцином є низьке ядерно-цитоплазматичне співвідношення [1, 44]. За даними літератури цей підтип зустрічається близько 9% випадків аденокарцином товстої кишки. Клінічно зубчасті аденоми частіше локалізуються в дистальних відділах та на момент діагностики мають метастази в лімфатичні вузли. Примітно, що синхронні пухлини зустрічаються частіше з зубчастими карциномами ніж з класичними аденокарциномами (NOS) [69].

Важливо приділити увагу темі прекурсорів раку товстої кишки. Ще 15 років тому «зубчасті» ураження не отримували достатньої уваги в плані діагностики та не виділялись як окрема класифікаційна одиниця, патологи та клініцисти трактували їх як гіперпластичні поліпи [44, 70]. Проте в 5му перегляді

«Класифікації пухлин травної системи» Всесвітньої організації охорони здоров'я класифікація доброякісних утворень товстої кишки зазнала суттєвих змін і «зубчасті» утворення почали розглядати, як окрему незалежну категорію [1]. Ключові зміни в класифікації зубчастих новоутворень згруповані в (таблиці 1.3.1)

Таблиця 1.3.1. Відмінності класифікації зубчастих новоутворень ВООЗ 4го та 5го перегляду.

Класифікація зубчастих утворень згідно класифікації ВООЗ 4й перегляд (2010 р.)	Класифікація зубчастих утворень згідно класифікації ВООЗ 5й перегляд (2019 р.)
• Гіперпластичний поліп	• Гіперпластичний поліп
• Сидяча зубчаста аденома/поліп ○ з дисплазією ○ без дисплазії	• Сидяче зубчасте ураження ○ з дисплазією ○ без дисплазії
• Традиційна зубчаста аденома	• Традиційна зубчаста аденома
	• Зубчаста аденома, некласифікована

В основі логіки відокремлення «зубчастого» утворення як окремої класифікаційної одиниці є факт, що далеко не всі зубчасті аденоми мають диспластичні зміни, а численні зубчасті новоутворення не поліповидної форми. Тому введення терміну «зубчастого» утворення надає більшої чіткості в структуризації цього складного утворення. Для встановлення діагнозу «зубчастого» утворення необхідно встановити наявність мінімум одного з даних гістологічних ознак, які дозволяють чітко відрізнити їх від гіперпластичних поліпів: а) L-подібний чи T-подібний вигляд крипти; б) розширення основи крипти; в) поширення «зубчастості» в основу крипти; г) асиметрія проліферації [71].

Варто зазначити, що гіперпластичні поліпи найрозповсюдженіший тип зубчастих утворень. Найчастіше вони зустрічаються у лівих відділах товстої кишки. Гістологічно його структура представлена рівномірно видовженими криптами, з наявністю зубчастої будови лише в верхніх відділах крипти. В

основному виділяють два гістологічних варіанти поліпів: гіперпластичні поліпи багаті бокаловидними клітинами та мікроевезикулярні поліпи. Мікроевезикулярні поліпи зокрема вважаються прекурсорами сидячих зубчастих утворень. А сидячі зубчасті утворення, на рівні з традиційними зубчастими аденомами, в свою чергу є основними прекурсорами колоректальних карцином [72, 73, 74].

Характерними макроскопічними відмінностями традиційних зубчастих аденом є більший розмір та вигляд поліпа на ніжці. Епітелій, що вкриває крипти цих аденом доволі подібний до нормального тонкокишкового епітелію. Яскраво еозинофільна цитоплазма в якій центрально розміщене видовжене ядро. Одними з ключових ознак вважаються щілиноподібна форма зубчастих крипт та наявність вогнищ ектопічних крипт [75, 76]. Основні клініко-морфологічні відмінності різних зубчастих новоутворень згруповані в (таблиці 1.3.2).

Таблиця 1.3.2. Клініко-морфологічні особливості зубчастих новоутворень

	Частота	Локалізація	Морфологія	Гістологія
Гіперпластичний Поліп	>75% всіх зубчастих новоутворень	Частіше ліві відділи, іноді правосторонні	Пласкі чи об'ємні поліповидні	Рівномірно видовжені крипти, зубчасті елементи розміщені в верхніх відділах крипт
Зубчасте ураження	<10% всіх зубчастих новоутворень	Частіше ліві відділи, іноді правосторонні	Плаский чи «сидячий» вигляд, проте значно більші за поліпи за площею	Розширення основи крипт та базальна локалізація зубчастих елементів
Традиційна зубчаста аденома	1-7% всіх зубчастих новоутворень	В основному праві відділи	Значного розміру поліповидне утворення на ніжці	Гіпереозинофілія, видовжені вузькі ядра, наявність ектопічних крипт, зубчасті щілини

1.4 Гістологічні прогностичні фактори, роль пухлинного мікрооточення

В основі визначення лікувальної стратегії та стратегії подальшого спостереження пацієнтів з колоректальним раком на сьогодні ключовою залишається система стадіювання TNM (з визначенням глибини інвазії пухлини (T), розповсюдження пухлини в лімфатичні вузли (N), та наявністю віддалених метастазів (M)) [17, 77]. Було відмічено цікавий парадокс виживаності, пацієнти зі стадією ПА/ІІВ раку товстої кишки, мали гірші показники загальної виживаності в порівнянні з пацієнтами зі стадією ІІА. Причому визначити ключові фактори, що впливали на виживаність не вдалося [78]. Для прийняття рішень щодо подальшого лікування пропонуються враховувати різноманітні додаткові фактори: такі як рівні сироваткового раково-ембріонального антигену (РЕА), лімфоваскулярна інвазія, периневральна інвазія, статус мікросателітної нестабільності (MSI) та мутаційний статус (зокрема KRAS, NRAS та BRAF). Проте їх вагомість може значно варіювати залежно від стадії захворювання [77]. Тому пошук додаткових прогностичних ознак і факторів залишається актуальним та постійно триває.

Більшість досліджень зосередженні на детальному вивченні пухлинних клітин, їх молекулярних профілів та механізмів взаємодій та впливів з організмом «хазяїна», проте не меншої уваги та детального вивчення заслуговує пухлинне мікрооточення, адже воно може бути яскравим відображенням біологічної поведінки пухлини – розуміння його ролі в пухлинній прогресії та резистентності до лікування [79]. Одним з найбільших «гравців» у пухлинному мікрооточенні є строма пухлини та запальний інфільтрат в складі якого є пухлино-інфільтруючі лімфоцити (ПЛ), макрофаги, нейтрофіли та інші імунні клітини [80, 81].

Беззаперечною є участь пухлинної строми в процесі розвитку та прогресування злоякісних новоутворень. Взаємодія між пухлинними клітинами та стромою в певному розумінні є двосторонньою: злоякісно трансформовані пухлинні клітини ініціюють ремоделювання пухлинної строми, а трансформована строма здатна посилювати злоякісну трансформацію та

диференціацію клітин епітелію [82]. Кількість та склад пухлинної стромы значно відрізняється для різних нозологій. Ба більше, навіть може сильно варіювати в пухлинах різних пацієнтів, що мають пухлини однакового гістологічно типу та локалізації. Взаємозв'язку між ступенем диференціації пухлини та складом пухлинної стромы не встановлено [83]. Якщо прицільно звертатися до компонентів стромы, то одним з найвагоміших учасників є пухлино-асоційовані фібробласти (ПАФ). Фенотипово ПАФ відрізняються від фібробластів в нормальній не змінній тканині [84]. ПАФ здатні виділяти різноманітні фактори росту, що впливають на перебудову внутрішньопухлинної стромы: фактор росту судин (ФРС), фактор росту нервів (ФРН), фактор росту сполучної тканини (ФРСТ), інсуліноподібний фактор росту (ІФР), та інші [85]. Ще одним важливим компонентом стромы є позаклітинний матрикс (ПКМ). Пухлинні клітини викликають порушення локального гомеостазу в ПКМ. Внаслідок хронічного запалення, як реакції на присутність пухлини, наростає гіпоксія яка веде до активації фібробластів. Ті в свою чергу продукують більше колагену, що призводить до ущільнення оточуючої стромы – десмоплазії [82]. Десмоплазія виступає одним із факторів резистентності пухлини до лікування, тому для покращення ефекту лікування пропонується застосовувати препарати, що впливають на рівень вираженості десмоплазії в пухлині [86, 87]. Але з іншого боку така терапія одночасно несе ризик метастазування через можливу індукцію металопротеїназ (ММП) [88]. Взаємодія між ПАФ та ПКМ є частиною процесу запуску міграції неопластичних клітин, та по суті забезпечує можливість процесу розповсюдження пухлини. ПАФ здатні експресувати матриксні металопротеїнази, які відповідальні за процес деградації ПКМ. Вивільнений ФРС в рихлому ПКМ посилює ангиогенез, що ще більше сприяє процесам інвазії та розповсюдження ракових клітин [89].

Прогностичне значення пухлино-стромального співвідношення (ПСС) в якості вимірюваного фактора було продемонстроване численними дослідженнями для найрізноманітніших нозологій [90, 91, 92, 93]. Високе ПСС в

тричі-негативних карциномах молочної залози було незалежним маркером гіршої безрецидивної та загальної виживаності [90]. Аналогічно, Smit, M. A. та автори [91] з'ясували, що у пацієнтів з плоскоклітинним раком легень II стадії та низьким ПСС загальна виживаність була кращою в порівнянні з когортою пацієнтів з високим ПСС (загальна 5-річна виживаність 84% проти 60%, відповідно). В цьому дослідженні ПСС також був незалежним прогностичним фактором [91]. Хоча у пацієнтів з аденокарциномою жовчного міхура ПСС було асоційоване з загальною виживаністю, проте Li H. та інші [92] не змогли показати незалежність ПСС в якості прогностичного фактора.

Методологія оцінки ПСС доволі проста і не вимагає специфічних додаткових технік, тому може бути проведена одночасно зі стандартним процесом діагностики. Методологія дещо варіює у різних дослідників, але найчастіше 50% строми використовується як граничне значення для поділу на когорти та дозволяє отримати високі рівні погодженості між спостерігачами [90, 91, 92].

ПІЛ показав себе як незалежний прогностичний фактор для багатьох солідних пухлин. Wakeham, K. та ін. [94] з'ясували, що інфільтрація ПІЛ є незалежним прогностичним фактором. Виживаність пацієнтів з інтенсивною та помірною інфільтрацією ПІЛ була значно вищою в порівнянні з когортою пацієнтів з низьким ПІЛ [94]. В своєму дослідженні Heikkinen, I. та автори [95] також продемонстрували, що високий стромальний ПІЛ та ПІЛ по інвазивному краю є вагомими прогностичними факторами. Натомість внутрішньопухлинний ПІЛ не показав статистично значимої прогностичної ваги [95]. ПІЛ також продемонстрував прогностичну значимість в дослідженні для ранніх стадій (стадія ІА-ІВ) недрібноклітинного раку легень. Автори виявили, що інтенсивна інфільтрація ПІЛ в пухлинах більшого розміру (>5 см) була пов'язана з нижчими показниками рецидивів захворювання та кращими показниками 5-річної безрецидивної виживаності. Проте в менших пухлинах цієї кореляції не було виявлено [96]. Доволі добре вивчена прогностична значимість ПІЛ для молочної

залози, включаючи різні гістологічні підтипи [97, 98, 99]. Окрім того ПІЛ в молочній залозі є важливим предиктивним маркером відповіді на терапію, що привертає все більше уваги до цього напрямку [98, 100]. В 2014 році «Міжнародна робоча група з ПІЛ в молочній залозі» опублікувала рекомендації щодо оцінки ПІЛ в пухлинах молочної залози. Ключові моменти методології описано в (таблиці 1.4.1) [102].

Таблиця 1.4.1. Рекомендації оцінки «Міжнародної робочої групи з ПІЛ в молочній залозі»

1. Оцінка ПІЛ має виразитись як співвідношення площі яку займають мононуклеарні запальні клітини до загальної площі стромы пухлини.
2. Оцінку ПІЛ необхідно проводити в межах пухлини, скупчення ПІЛ поза пухлиною виключаються.
3. ПІЛ в ділянках некрозів чи артефактів не враховуються.
4. Рахувати слід лише мононуклеарні клітини з чітко округлим ядром (лімфоцити та плазматичні клітини. Лейкоцити виключають з підрахунку (поліморфоядерні клітини).
5. Оцінювати ПІЛ варто як середнє значення на всій площі пухлини, не варто концентруватися на «гарячих» точках.

Наразі, методології оцінки ПІЛ варіюють та потребують більш детального вивчення. Визначення граничних значень для поділу на прогностичні групи та в яких ділянках пухлини необхідно проводити оцінку інфільтрату різняться у різних авторів [94, 95, 96, 100, 101, 103]. За локалізацією ПІЛ можна умовно розділити на три основні категорії: внутрішньопухлинний – знаходиться безпосередньо в пухлинній масі в прямому контакті з пухлинними клітинами; стромальний ПІЛ – роззосереджений в оточуючій пухлинній стромі; та перитуморальний – розміщений по периферії в інвазивних краях пухлини [104].

В дослідженні ПІЛ для раку товстої кишки Klintrup, K. та автори [105] виявили, що висока інтенсивність імунного інфільтрату є позитивним прогностичним маркером. Вони розділили ПІЛ за інтенсивністю на 4 групи (від 0 до 3), проте зосередилися на оцінці ПІЛ в інвазивному краї та всередині пухлинних комплексів [105]. Wang, Q. та інші [106] оцінювали перитуморальний

лімфоцитарний інфільтрат у вигляді третинних лімфоїдних структур та з'ясували, що їх велика кількість є сприятливим фактором для прогнозу загальної виживаності пацієнтів з раком кишки. Окрім того висока концентрація третинних лімфоїдних структур була пов'язана з низьким відсотком пухлинної стромы, який також зарекомендував себе в якості позитивного прогностичного фактора [106]. Переважна більшість досліджень пухлинного імунного інфільтрату зосередженна на аналізі його складу та впливу активності окремих підтипів лімфоцитів та інших імунних клітин на прогноз [107]. Naito Y. та автори [108] вивчали вплив інтенсивності CD8⁺ Т-лімфоцитів (клітин кіллерів) на прогноз хворих з раком товстої кишки та з'ясували, що висока інфільтрація CD8⁺ Т-лімфоцитами, зокрема в «гніздах» пухлини, має значиму кореляцію з прогнозом. Page D. B. та автори [109] запропонували використання в якості легковідтворюваного та стандартизованого інструменту шкалу Immunoscore. Суть Immunoscore полягає в визначенні інтенсивності інфільтрації пухлини та інвазивного краю CD3⁺ та CD8⁺ лімфоцитами. Окрім того вони використовували спеціальне програмне забезпечення для автоматизації підрахунку лімфоцитів та виключення варіабельності та суб'єктивності оцінки патологами. Проте вони все одно зіткнулися з певними обмеженнями цього методу: адже цілком виключити варіабельність результатів можна лише в межах однієї лабораторії (з технічних причин методології імуногістохімічного фарбування) [109]. Комп'ютерні технології та штучний інтелект все ширше застосовуються в цій галузі [110]. Для рутинного використання подібних технологій необхідно більше ґрунтовних досліджень, валідації методологій і програмного забезпечення. Перелічені вище методики з визначення складу імунного інфільтрату потребують застосування імуногістохімічних досліджень [107]. Це тягне за собою додаткові часові та фінансові витрати, навідміну від оцінки загального пулу ПЛЛ на звичайних гістологічних скельцях забарвлених гематоксилі-еозином, яка може бути проведена під час рутинного гістологічного дослідження для встановлення діагнозу.

1.5 Імуногістохімічні прогностичні маркери для раку товстої кишки

Програмований білок клітинної смерті 1 (PD-1) є трансмембранний білком – чекпоінт інгібітором, що експресується на поверхні багатьох активованих імунних клітин, зокрема CD4⁺ і CD8⁺ Т-лімфоцитів, В-клітин та моноцитів [111]. Через взаємодії PD-1 з лігандами, PD-L1 та PD-L2, відбувається пригнічення функціонування Т-хелперів та Т-кіллерів, а також інших пухлиноінфільтруючих лімфоцитів (ПІЛ). В той же самий час відбувається посилення активності імуносупресивних регуляторних Т-клітин (Treg). Окрім того лігація PD-1 призводить до зупинки клітинного циклу та активації апоптозу. Разом ці події є одними з ключових механізмів в уникненні пухлиною імунної відповіді [112, 113, 114, 115].

В розрізі імунних реакцій на пухлину цікавою є група CD4⁺ лімфоцитів, основну масу яких складають Т-хелпери, та певну частину –Т-регуляторні клітини. Окрім гуморальних реакції виділення лімфокінів, що пригнічують реактивність інших лімфоцитів, CD4⁺ клітини здатні прямо сприяти стимуляції, чи інгібуванню клітинної активності [6]. Для пухлин простати інтенсивна інфільтрація CD4⁺ лімфоцитами мала негативне прогностичне значення, та була незалежною від інших клінічних факторів, таких як стадія. В пухлинах легень пацієнти що до лікування мали високу інфільтрацію CD4⁺ лімфоцитами мали гіршу загальну виживаність. Для тих хто отримав лікування до резекції пухлини, навпаки, масивна інфільтрація CD4⁺ лімфоцитами свідчила про позитивний прогноз в розрізі загальної виживаності [117]. McArdle, P. A. та автори встановили, що інфільтрація CD4⁺ лімфоцитів в пухлинах простати була незалежним прогностичним маркером, загальна виживаність пацієнтів з інтенсивним CD4⁺ інфільтратом була нижчою як для місцево-поширених так і метастатичних форм захворювання [118].

Роль В-клітин в пухлинному інфільтраті мало з'ясована на сьогодні, данні про прогностичну цінність доволі контроверсійні. Ключовою фізіологічною функцією В-лімфоцитів є розпізнавання та презентація антигенів Т-клітинам

(CD4+) [119]. Cabrita, R. Та інші. [120] встановили, що в основному антигенпрезентацію виконують В-клітини, що зосередженні в так званих третинних лімфоїдних структурах (ТЛС). Окрім антигенпрезентації, деякі В-клітини здатні взаємодіяти з імуносупресивними популяціями клітин (Т-регулятори та імуносупресивні клітини мієлоїдного походження), та сприяти імуносупресивній активності пухлинного мікрооточення [121]. В дослідженні Griss, J. Та співавторів [122] в пухлинах меланоми висока інфільтрація CD20+ лімфоцитами асоціювалась з тривалішим періодом виживаності та кращою відповіддю на терапію чекпойнт інгібіторами. В пухлинах молочної залози стромальна інфільтрація CD20+ лімфоцитами асоціювалась з кращим прогнозом, зокрема була маркером повної патологічної відповіді на неоад'ювантну хіміотерапію [123]. Mahmoud S. M. та інші [124] вважають, що CD20+ лімфоцити є незалежним прогностичним фактором для раку молочної залози. Напротивагу, в дослідженні Thompson, E. та авторів [125] зазначається присутність інтенсивної В-клітинної інфільтрації в неінвазивній карциномі молочної залози (DCIS) була асоційована з мікроінвазивністю та та випадками рецидиву [125]. Meshcheryakova A. та співавтори [126] припускають, що наявність великої кількості як внутрішньопухлинних CD20+ лімфоцитів в пухлинах товстої кишки, так і в ектопічних фолікулах, є ознаками значно нижчого ризику рецидиву збільшення тривалості загальної виживаності. Проте, це одне з небагатьох досліджень для раку товстої кишки, тож це питання потребує однозначно глибшого вивчення.

Пембролізумаб та ніволумаб – анти-PD-1 антитіла, широко застосовуються в імунотерапії раку. Вони впливають на клітинну ланку імунітету активізуючи субпопуляцію цитотоксичних Т-лімфоцитів та ребалансування імунного інфільтрату в пухлинному мікрооточенні завдяки зменшенню кількості імуносупресивних клітин, зокрема регуляторних Т-клітини (Treg). Завдяки блокаді лігування PD-L1 і PD-1 на поверхні ракових клітин, пухлина знову стає

«видимою» для імунних клітин, які можуть ефективніше атакувати та елімінувати її [127, 128].

Більшість триваючих клінічних досліджень ефективності анти-PD-1 імунотерапії для раку товстої кишки досліджують ізольовану чи в поєднанні з іншими агентами дію таких препаратів як пембролізумаб, дурвалумаб, ніволумаб та ін. Наразі опція призначення імунотерапії обмежена когортою пацієнтів з метастатичним раком товстої кишки [129, 130, 131]. Окрім того зрозумілою з точки зору переваг є стратегія призначення імунотерапії для пухлин з MSI. Такі пухлини мають вище мутаційне навантаження та інтенсивнішу інфільтрацію пухлини імунними клітинами. В дослідженні 2020 року André, T. та ін. [129] порівнювали ефективність пембролізумабу в порівнянні з хіміотерапією для з MSI-H аденокарциномою товстої кишки IV стадії. Тривалість життя без прогресії була достовірно вищою у пацієнтів, що отримували пембролізумаб, а частота виникнення побічних ефектів в 3 рази нижчою в порівнянні з тими хто отримував хіміотерапію [129]. Johnson B. та автори [132] в своєму дослідженні дійшли висновку, що висока щільність CD8⁺ пухлино-інфільтруючих лімфоцитів до початку терапії може слугувати індикатором вірогідно більш успішної відповіді на лікування.

MSS пухлини потребують пошуку альтернативних підходів, зокрема пошуку предиктивних маркерів чи комбінування чекпоінт інгібіторів з іншими препаратами [133]. Зокрема однією з таких комбінацій препаратів в є поєднання анти-PD-1/PD-L1 моноклональних антитіл з антитілами до цитотоксичного асоційованого антигену Т-лімфоцитів 4 (CTLA4), який експресується виключно на Т-лімфоцитах та відповідає за початок їх активації [133]. Ефективність даної комбінації вивчали в рандомізованому клінічному дослідженні, яке показало що одночасне застосування анти-PD-1 та анти-CTLA-4 у пацієнтів з MSS пухлинами товстої кишки покращує показники середньої загальної виживаності, проте без істотного впливу на середню тривалість життя без прогресії [134]. Досить цікавим є дослідженням ефективності комбінації ніволумабу в поєднанні з іпілілумабом

для аденокарцином I-III стадії в якості неоад'ювантної терапії. Таке лікування показало високу ефективність як для MMR-профіцитних (pMMR), так і для MMR-дефіцитних (dMMR) пухлин. Окрім того інтенсивна інфільтрація CD8⁺ PD-1⁺ лімфоцитами виявилась предиктивним маркером позитивної відповіді на терапію в когорті пацієнтів з pMMR пухлинами. [135]. Отримані дані потребують більш глибокого дослідження на ширшому колі пацієнтів, проте дане дослідження показало потенціал як можливої стандартизації неоад'ювантного лікування анти-PD-1 антитілами, так і напрямок пошуку предиктивних маркерів.

Експресія PD-L1 є вагомим маркером для характеристики пухлинного мікрооточення. Теоретично інтенсивна експресія PD-L1 пухлинними клітинами може розглядатись як предиктор відповіді на імунотерапію. Подібна предиктивна цінність вже була показана в численних дослідженнях для інших солідних пухлин [136, 137, 138, 139, 140]. Му С.У. та автори в своєму дослідженні виявили, що мембранна та цитоплазматична експресія PD-L1 в клітинах пухлини є маркером поганого прогнозу у пацієнтів з аденокарциномою легень, адже асоціювалась з коротшим періодом загальної виживаності [136]. Напротивагу Velcheti, V. та інші [141] навпаки стверджують, що пацієнти з недрібноклітинним раком легень та позитивною експресією PD-L1 клітинами пухлини мають значно кращі показники загальної виживаності. Надмірна експресія PD-L1 в аденокарциномах підшлункової залози може розцінюватись як індикатор поганого прогнозу, адже корелює з гіршими показниками загальної виживаності [138]. В дослідженні асоціації експресії PD-L1 з виживаністю для раку нирки, було виявлено, що 5-річна загальна виживаність пацієнтів з позитивною експресією PD-L1 в 2 рази нижча порівняно з пацієнтами чий пухлини не експресували PD-L1 [139]. Дані, щодо впливу експресії PD-L1 на прогноз для раку товстї кишки залишаються контрверсійними та потребують подільших досліджень [139, 142].

1.6 Коротка характеристика сучасних методів лікування раку товстої кишки

Зважаючи на те, що рак товстої кишки на сьогодні є однією з лідируючих онкологічних нозологій за рівнями захворюваності та смертності, тема покращення діагностики та покращення стратегій лікування є надзвичайно важливою [143]. Сучасні підходи лікування включають широкий спектр методологій: хірургічне лікування, хіміотерапія, променева терапія, таргетна терапія та імунотерапія. Проте до цього часу визначення груп ризику для пацієнтів та розробка стратегії з застосуванням конкретних видів лікування в основному базується на стадії захворювання TNM [144]. Звісно, допоміжними орієнтирами для розуміння перебігу захворювання локалізація пухлини та гістологічний тип [145, 146]. На сьогодні серед предиктивних факторів виділяють мутаційний статус генів KRAS, NRAS, BRAF, який визначає ефективність таргетної терапії, а також статус мікросателітної нестабільності (MSI-H/dMMR), що свідчить про потенційну чутливість пухлини до імунотерапії [147].

Хірургічне втручання є основним радикальним методом лікування аденокарциноми товстої кишки. Вибір конкретної методики хірургічного втручання базується на численних факторах, основними з яких є: стадія захворювання (відповідно TNM), конкретна локалізація пухлини, наявність чи відсутність перфорації кишки, загальний стан пацієнта – включаючи супутню патологію [144, 148, 149]. Quintana, J. M. та автори [150] у своєму дослідженні оцінювали вплив обраної хірургічної методики на результати лікування, порівнюючи відкрите хірургічне втручання з лапароскопічним. Не дивлячись на те, що переважно результати лікування були схожими для обох методик, все ж таки частота ускладнень пов'язаних з операцією та кількість повторних госпіталізацій була вищою в групі відкритих операцій порівняно з лапароскопічними. Дослідники це пов'язують з частішими випадками супутньої патології та тяжкістю основного захворювання на момент проведення операції в когорті тих для кого було обрано відкрите хірургічне втручання, тому наголошують, що більш неупереджені результати можуть бути отримані в дослідженнях де лапароскопічна

техніка застосовується у пацієнтів з тяжчим перебігом захворювання [150]. Deijen, C. L. та ін. [151] в 10-річному дослідженні теж не виявили значної різниці між безрецидивною та загальною виживаністю пацієнтів яким було проведено відкрите хірургічне втручання та пацієнтами кому було проведено лапароскопічне видалення пухлини. А ось дослідження робот-асистованих хірургічних втручань в порівнянні з лапароскопічними показали покращені інтра- та післяопераційні результати для робот-асистованих операцій. Нажаль ці дослідження є короткотривалими, тому потребують більш глибокого вивчення [152, 153, 154].

Враховуючи все вище зазначене, післяопераційна стратегія подальшого лікування, зокрема хіміотерапії, вимагає значної уваги та індивідуалізації задля отримання максимальної користі та уникнення негативного впливу. Окрім відсутності терапевтичного ефекту, виникнення серйозних побічних реакцій можуть бути причиною припинення ад'ювантної хіміотерапії. Auslin, E. та автори [155] зазначають, що лише 20% пацієнтів з III стадією отримують реальну користь від ад'ювантної хіміотерапії, решта піддаються непотрібному впливу токсичності. В дослідженні IDEA було проведено порівняння 3х та 6ти місячних CAPOX та FOLFOX режимів, різниці 3х річної безрецидивної виживаності склала всього лише 0,9%. Зокрема пацієнти з групи низького ризику мали практично однакові показники безрецидивної виживаності протягом 3х років. Але в групі високого ризику перевага 6-місячного режиму над 3-місячним була відчутною. А от рівні токсичності та серйозних побічних реакцій таких як діарея, нейтропенія, тромбоцитопенія, нудота і інші, була майже в 2 рази вищою при застосуванні 6 місячного режиму, в порівнянні з місячним [156].

Бевацізумаб – моноклональне тіло до фактора росту ендотелію VEGF, на даний момент показав свою ефективність в поєднанні з ад'ювантною хіміотерапією (АХ) та затверджений до застосування як опція лікування лише для метастатичного раку товстої кишки [144]. Окрім того клінічне дослідження AtezoTRIBE показало ефективність та безпечність комбінації бевацізумабу та атезолізумабу – анти-PD-L1 агента, в якості додатку до першої лінії терапії

FOLFOXIRI. У пацієнтів з нелікованим MSS раком товстої кишки, хто отримував дану комбінацію препаратів, спостерігалось покращення виживаності без прогресії пацієнтів [157]. Хоча клінічне дослідження S-AVANT не виявило значимої ефективности застосування бевацізумабу для пацієнтів з III стадією раку товстої кишки [158]. Проте цікавими є результати дослідження Zunder, S. M. та авторів [159], в якому досліджувався прогностичний та предиктивний потенціал ПСС для когорт пацієнтів з раком товстої кишки II/III стадії хто отримував бевацізумаб. Досить очевидною була неефективність бевацізумабу для пухлин з низьким ПСС, напротивагу серед пухлин з високим ПСС відмічалась сприятлива тенденція до покращення виживаності. Вони наголошують, що їх дослідження мали певні обмеження, які не дозволили їм цілком підтвердити чи відкинути гіпотетичну ефективність цього препарату для стадії II/III. Тому варто більш детально зануритись у вивчення ПСС як інструменту для таргетування пацієнтів, що потенційно могли б отримати переваги від подібного лікування [159].

Нещодавно було опубліковано результати 2ї фази клінічних досліджень ніволумабу (інгібітора чекпойнту PD-1) в поєднанні з іпілімумабом (моноклональне антитіло блокатор CTLA-4), як неоадьювантної опції для лікування dMMR неметастатичного локально-поширеного раку товстої кишки. У 98% пацієнтів була відповідь на лікування, з них повна відповідь у 68% учасників дослідження. Середній період спостереження склав 2 роки та 2 місяці і за цей час у жодного з пацієнтів не було рецидиву захворювання. Дані результати є багатообіцяючими [160]. Враховуючи, що ефективність імунотерапії для MSS пухлин залишається низькою, постійно тривають пошуки комбінацій препаратів які б дозволили активувати чутливість пухлини до чекпойнт інгібіторів. Одним з таких досліджень є I фаза клінічного дослідження комбінації пембролізумабу з трібенанібом (який є інгібітором ангіопоетину $\frac{1}{2}$) для лікування локально-поширеного MSS раку товстої кишки. Відповідь на лікування цими препаратами була отримана в 7,3% пацієнтів на протязі 3х років. Проте автори дослідження

наголошують, що пошук додаткових предиктивних ознак чутливості до PD-1 імунотерапевтичних комбінацій є необхідним [161].

Враховуючи, проблеми обмеженої ефективності імунотерапії в останні роки стає більш актуальною адаптивна клітинна терапія (АКТ), яка може допомогти заповнити цю прогалину [162]. АКТ це специфічний метод терапії в основі якого лежить вилучення, модифікація та припноження *in vitro* імунних клітин пацієнта, які потім знову вводяться пацієнту та здатні розпізнавати та знищувати саме пухлинні клітини [163]. Звісно, поки що широке використання АКТ не можливе через високу вартість та технічну складність цього виду лікування, який потребує наявності вузькоспеціалізованих лабораторій та спеціалістів. Окрім того поки що не вдалося впоратися з досягненням недостатньої ефективності та високими рівнями токсичності АКТ [164]. Все ж таки перспектива розвитку цього напрямку лікування є багатообіцяючою. Tran, E. Та автори [165] опис клінічного випадку, який був частиною клінічного дослідження АКТ. Пацієнка з метастатичним раком товстої кишки загалом мала 7 вогнищ уражень в легенях та пройшла курс лікування клітинною терапією. Ефективність лікування була більш ніж задовільною, через 9 місяців після завершення курсу 6 метастатичних вогнищ регресували цілком чи мали ознаки прогресуючого регресу. Ураження, що не продемонстувало активного регресу пізніше було хірургічно видалено, разом ще з одним КТ негативним ураженням і патогістологічне дослідження даних утворень продемонструвало масивний некроз та цілковиту відсутність живих пухлинних клітин [165]. Однозначно, необхідно більше досліджень даного напрямку, тож ґрунтовні клінічні дослідження тривають [166, 167].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

Беручи до уваги викладене в розділі вище, можна сформулювати наступні висновки:

1. Рак товстої кишки – гетерогенна група пухлин з численними шляхами розвитку, найпоширенішим гістологічним типом є аденокарцинома. Враховуючи більшу розповсюдженість та неоднозначність прогнозу клінічного перебігу – лівосторонні пухлини заслуговують більшої уваги.
2. Рак товстої кишки є однією з найпоширеніших нозологій в структурі онкологічних захворювань та є провідною причиною смертності. Не дивлячись на вдосконалення діагностичних опцій тренди захворюваності та смертності залишаються зростаючими. Зростає частота випадків захворювання в ранньому віці.
3. Конвенційна аденокарцинома є домінуючим гістологічним підтипом. Ступінь диференціювання пухлини не відображає її потенціалу до агресії та не є вагомим для прогнозу клінічного перебігу.
4. Оцінка таких деяких гістологічних параметрів можуть бути допоміжними в оцінці прогнозу клінічного перебігу. Строма пухлини має дуальне значення в онкогенезі: з одного боку реакція стромы може відображати агресивність впливу пухлинних клітин в процесі злоякісної трансформації; з іншого боку приймати участь в контролі пухлинної прогресії. Оцінка загального пулу пухлино-інфільтруючих лімфоцитів має значний прогностичний потенціал.
5. Дослідження експресії PD-L1 може нести значну прогностичну/предиктивну цінність, та бути допоміжним в персоналізації стратегій лікування. Визначення конкретних субпопуляцій пухлино-інфільтруючих лімфоцитів може мати прогностичний потенціал та потребує подальших досліджень.
6. Наявні прогностичні критерії не дають чіткого розуміння хто з пацієнтів отримає найбільшу перевагу від лікування.

Тож дослідження в цій області є актуальними.

РОЗДІЛ 2: МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Загальна характеристика матеріалів

Виконано ретроспективно-простакувнє дослідження гістологічних препаратів операційного матеріалу та клінічних даних з медичних записів пацієнтів (n=236), яким було встановлено діагноз аденокарцинома сигмоподібної кишки, та які лікувалися з приводу даного діагнозу на базі Київського міського клінічного центру протягом з 2009 по 2019 рік. Проаналізовано частоту та структуру вікового розподілу захворюваності, оцінено загальну виживаність пацієнтів, та описано морфологічні особливості пухлинного матеріалу.

Загалом з 236 пацієнтів, що були залучені до дослідження 73 хворих (30,9 %) померли. Розподіл за стадією виглядає наступним чином: I стадія – 11 хворих (4,7%); II стадія – 107 хворих (45,3%); III стадія – 65 (27,5%); IV стадія – 53 (22,5%).

Оцінку пухлино-стромального співвідношення та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в якості прогностичних параметрів було проведено для всіх 236 випадків. Окремо проведено 64 імуногістохімічні реакції. Зокрема, 32 імуногістохімічних досліджень експресії PD-L1 на зразках резекції аденокарцином; 16 імуногістохімічних досліджень експресії CD4+ та 20 імуногістохімічних досліджень експресії CD20+, для визначення окремих субпопуляцій лімфоцитів в пухлиному імунному інфільтраті.

Схематичне зображення алгоритму досліджень наведено на схемі. 2.1.1

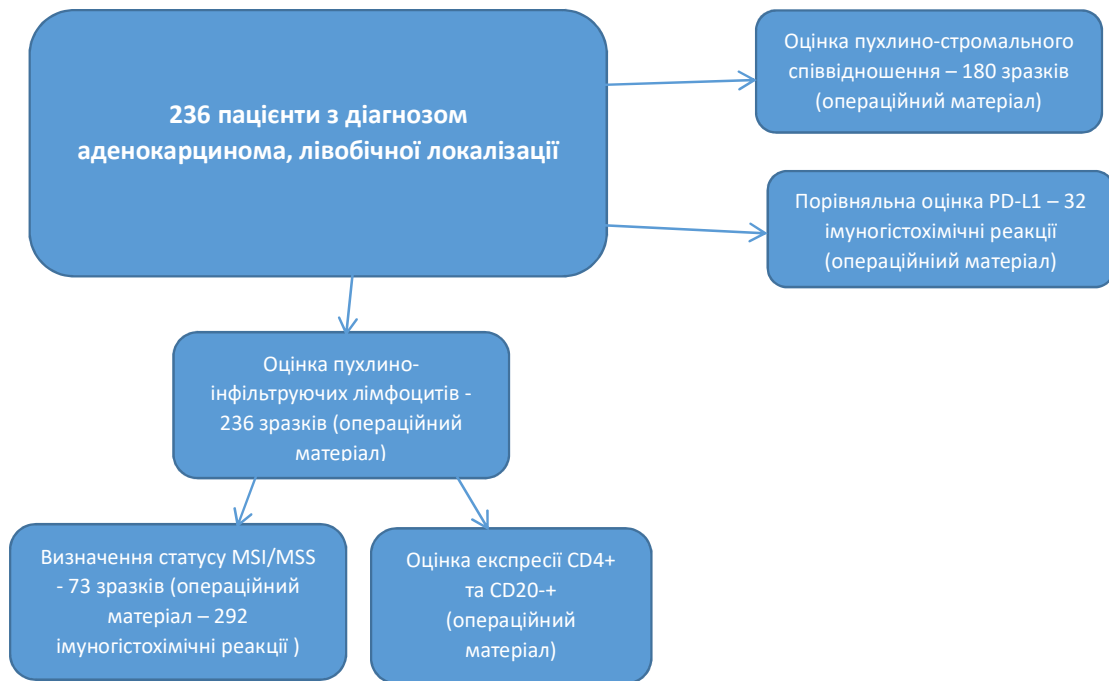


Схема 2.1.1. Алгоритм виконаних досліджень.

Тож загалом досліджено 236 зразків та виконано 356 імуногістохімічні дослідження.

Виконане дослідження було схвалено комісією з питань біоетичної експертизи при НМУ імені О.О. Богомольця (протокол №118 від 18 січня 2019 р.).

2.2 Методи та методики дослідження

Для вирішення завдань дослідження та досягнення поставленої мети використано загальноклінічні, гістологічні, імуногістохімічні методи дослідження та статистичний аналіз даних.

Процесування тканини пухлини було виконано за допомогою фіксації тканини пухлини в нейтральному 10% розчині формаліну та подальшого заключення в парафін за допомогою стандартної гістологічної техніки. Гістологічні зразки товщиною зрізу 4 мкм було депарафінізовано та пофарбовано гематоксиліном та еозином.

Гістологічне дослідження проведено методом стандартної світлової мікроскопії на мікроскопі Carl Zeiss® Primo Star. За допомогою цього ж мікроскопа виконано фотодокументування зразків.

Всі зразки оцінювались двома патологами без розкриття супроводжуючої клінічної інформації для уникнення упередженості.

Визначення гістологічного питу пухлин здійснювалось на основі 5-го перегляду класифікації пухлин травного тракту BOOЗ [1]. Стадіювання виконано згідно 8-го перегляду TNM класифікації злоякісних пухлин (AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition) [77].

При оцінюванні пухлино-стромального співвідношення (ПСС) було використано рекомендації van Pelt G.W. та співавторів [172]. Оцінку проводили в зоні найбільшої інвазії, там де встановлювали глибину інвазії пухлини (pT статус). Оптимальну ділянку для визначення строми (з найбільшим вмістом строми та вільну від некрозів чи крововиливів) визначали на x40 збільшенні. Після цього на x100 збільшенні прицільно оцінювали придатність цієї ділянки для кінцевої оцінки: для адекватності оцінки пухлинні клітини мають бути присутні в усіх краях обраної ділянки. Вміст строми було оцінено у як відсоткове співвідношення об'єму строми до об'єму пухлинних клітин з послідовним кратним зростанням показника на 10% (наприклад 10%, 20%, 30%, і т.д.).

Граничне значення для ПСС 50%. Відповідно, всі зразки було розділено на дві категорії з низьким ПСС (<50%) та високим ПСС ($\geq 50\%$).

Визначення кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) було проведено згідно методології рекомендованої Міжнародною робочою групою з оцінки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при раку молочної залози [101]. Оцінка ПЛ проводилась в межах інвазивної пухлини, з виключенням некротичних зон та ділянок крововиливів. Оцінювалися лише лімфоцити, що розміщені в стромі та лише мононуклеарні клітини (лімфоцити та плазматичні клітини), а поліморфоядерні клітини (лейкоцити) були виключені з підрахунку. ПЛ оцінено як відсоток площі зайнятої лімфоцитами відносно площі стромы. Кінцеве значення % ПЛ є середнім значенням оцінки в кількох ділянках зрізу, проте без зосередження на «гарячих точках». Граничні значення для поділу на групи визначені наступним чином: група А (ПЛ 0-9%) – з низькою лімфоцитарною інфільтрацією; група В (ПЛ 10-39%) – з помірною лімфоцитарною інфільтрацією; група С (ПЛ $>40\%$) – з інтенсивною лімфоцитарною інфільтрацією.

Для визначення клінічних даних пацієнтів, загальної виживаності та особливостей лікування було проведено вивчення історій хвороб пацієнтів та даних статистичного відділу Київського міського клінічного онкологічного центру.

Загальна виживаність (ЗВ) визначали як проміжок часу від дати постановки діагнозу до дати смерті пацієнта чи дати останнього спостереження.

Всі імуногістохімічні реакції проведені з використанням Dako EnVision FLEX системи візуалізації.

Для визначення статусу мікросателітної нестабільності було виконано імуногістохімічне дослідження з наступними маркерами: MLH1 (DAKO, клон ES05), PMS2 (DAKO, клон EP51), MSH2 (DAKO, клон FE11), MSH6 (DAKO, клон EP49). Для позитивного та негативного контролю використано відповідні зразки ендометрію. Оцінювання експресії та результатів дослідження

проводилось відповідно до рекомендацій наданий Національним інститутом раку Америки (NCI) [176]. Пацієнти розподілені на наступні категорії: пацієнти з високим рівнем мікросателітної нестабільності (MSI-High) – втрата експресії 2х чи більше маркерів; з низькою мікросателітною нестабільністю (MSI-Low) – втрата експресії одного маркера; та мікросателітно стабільні (MSS) – всі маркери експресуються.

Визначення субпопуляцій CD4+ лімфоцитів було проведено за допомогою імуногістохімічної реакції з первинним антитілом CD4 ((Clone 4B12), PA0427, Leica Biosystems). Визначення субпопуляцій CD20+ лімфоцитів було виконано за допомогою імуногістохімічної реакції з первинним антитілом CD20 (Clone (L26), PA0200, Leica Biosystems). Позитивний контроль – тканина лімфатичного вузла; негативний контроль – нормальна тканина печінки. Підрахунок CD4+ та CD20+ лімфоцитів проводився, як середнє значення кількості позитивних клітин на 5 рандомно обраних ділянках високої потужності при x40 кратному збільшенні. Для оцінювання обиралися ділянки пухлини уникаючи інвазивного краю, зони крововиливів, некрозів, а також ділянки з великою кількістю судин. Оцінювали лише лімфоцити що знаходяться в стромі, внутрішньопухлинний інфільтрат чи клітини що розташовані в просвіті судин не враховувались. Кількість позитивних лімфоцитів була оцінена та поділена на наступні категорії: (-)=позитивні клітини відсутні, (+)=1–25 клітин зафарбовано, (++)=26–50 клітин зафарбовано , та (+++)=51–100 клітин зафарбовано. [101, 173].

Визначення експресії PD-L1 було проведено за допомогою імуногістохімічної реакції з моноклональним антитілом PD-L1 Clone (CAL10) (StatLab, USA). Позитивний контроль – тканина недрібноклітинного раку легень; негативний контроль – нормальна тканина печінки. Оцінювання проводилось як в пухлино-інфільтруючих лімфоцитах так і клітинах пухлини. Враховувались усі живі клітини, що продемонстрували наявність часткового чи повного мембранозного фарбування, а також ті що мали гранулярне чи спотове фарбування. Розрахунок проводився комбінованою шкалою позитивності (CPS):

$CPS = (\text{Кількість PD-L1 позитивних пухлинних клітин} + \text{кількість PD-L1 позитивних пухлино-інфільтруючих лімфоцитів} / \text{загальна кількість життєздатних клітин}) \times 100$. Відповідно до CPS всі зразки було розділено на наступні групи: Група А – ($CPS < 1$), Група В – ($CPS > 1$) [174].

Протокол дослідження відповідав Гельсенській декларації і був затверджений комісією з питань біоетичної експертизи при НМУ імені О.О. Богомольця (протокол №118 від 18 січня 2019 р.).

2.3 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз виконано за допомогою програмного пакету EZR 1,35 (R statistical software version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [175] та статистичного пакету Medstat.

Виживаність оцінювали після побудови кривих виживаності Каплана-Мейєра з логрангового критерію.

Для визначення прогностичної цінності гістологічних та імуногістохімічних факторів було виконано побудову моделі пропорційних ризиків Кокса, виконано прорахунок як одноваріантного та багатоваріантних коефіцієнтів ризику (HR) для параметрів з довірчим інтервалом 95%.

Для визначення рівня погодженості між патологоми було використано коефіцієнт Каппа-Коена.

Для визначення кореляційних зв'язків між параметрами було виконано ранговий кореляційний аналіз Спірмена. Оцінка розподілу на нормальність не проводилась, так як даний метод є непараметричним. Рівень статистичної достовірності було прийнято на рівні $p=0,05$.

Для встановлення асоціативних зв'язків між імуногістохімічними маркерами та клініко-морфологічними факторами було використано критерій Фішера.

РОЗДІЛ 3: РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

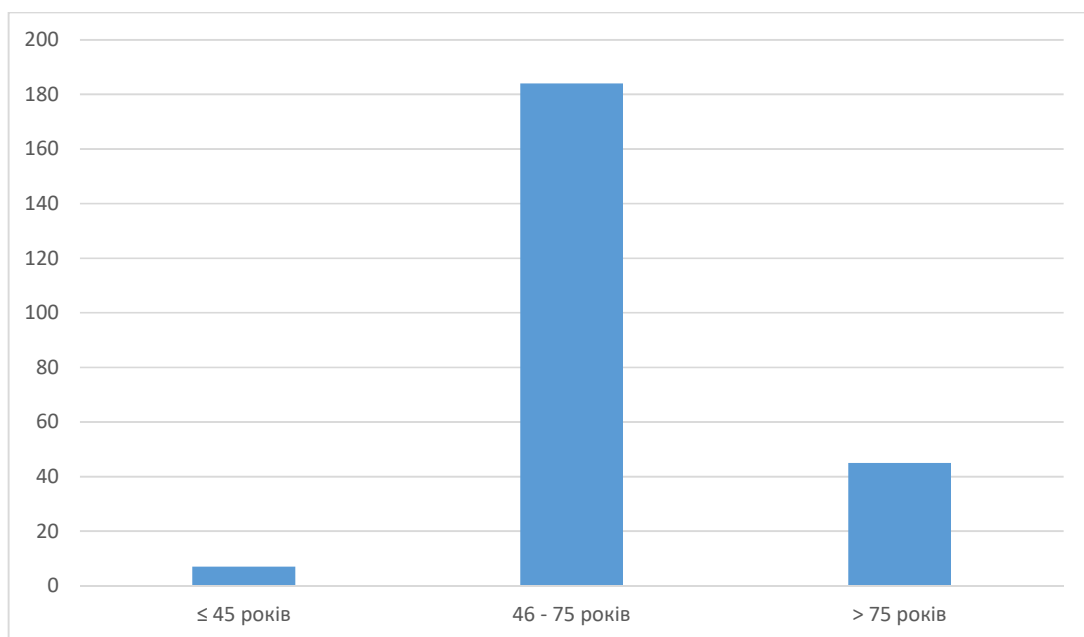
3.1 Структура та віковий розподіл аденокарцином товстої кишки (результати дослідження архівного матеріалу за 2009-2019рр.)

Дослідивши 236 зразків аденокарцином товстої кишки (ободова кишка, лівобічна локалізація) встановлено, що розподіл за гістологічним типом пухлини виглядає наступним чином: лівова частка пухлин це Аденокарцинома, NOS (неспецифічного типу) – 222 зразки (94,1 %), муциозна аденокарцинома – 11 зразків (4,6 %), та перстнеподібноклітинна карцинома – 3 зразки (1,3 %). Дані представлені у таблиці 3.1.1.

Табл. 3.1.1 Характеристика розподілу гістологічних варіантів аденокарцином товстої кишки

Гістологічний тип	Абс. дані	%
Аденокарцинома, NOS	222	94,1
Муциозна аденокарцинома	11	4,6
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	3	1,3

Згідно вікового розподілу частка пацієнтів молодше 45 років (включно) яким було встановлено діагноз аденокарцинома товстої кишки становить 2,9 % (7 випадків), пацієнтів у віці від 46 до 75 років – 78 % (184 випадків), та тих хто старше 75 років – 19,1 % (45 випадків) (Мал.3.1.1).



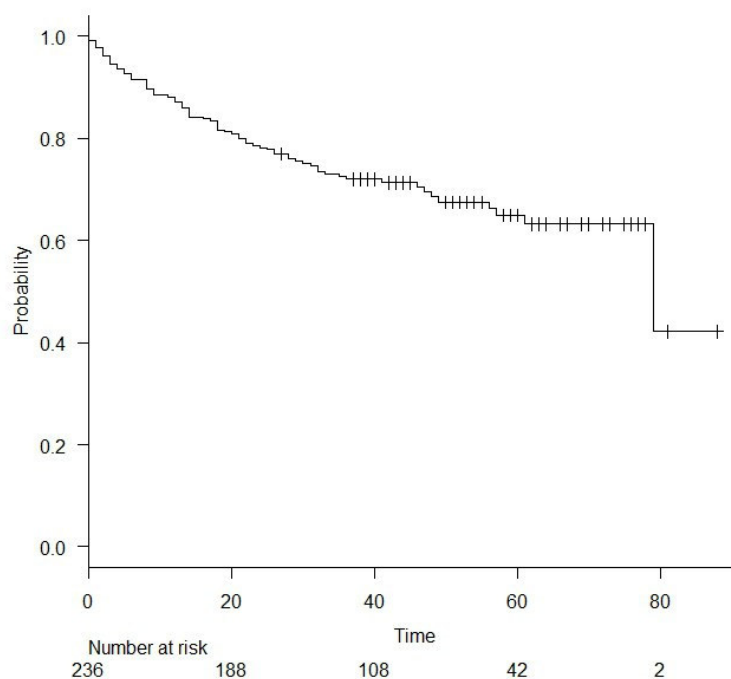
Мал. 3.1.1 Структура вікового розподілу пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки.

Розподіл за статтю представлений незначним переважанням пацієнтів жіночої статі 132 пацієнти (55,9%), чоловіків – 104 пацієнти (44,1%) відповідно.

Середній період спостереження за пацієнтами склав 2,9 років (діапазон 0,08 – 7,3 роки). З 236 пацієнтів, що були долучені в дослідження, 73 хворих померли (30,9 %).

Кількість хворих з I стадією склала 11 хворих (4,7%), з II стадією – 107 (45,3%), з III стадією – 65 (27,5%), та з IV стадією – 53 (22,5%).

Аналіз кривої виживаності Каплана-Мейєра (мал. 3.1.2) показав, що 1-річна виживаність хворих становила $87,2\% \pm 2,1\%$, 3-річна виживаність становила $72,0\% \pm 3,0\%$, та 5-річна виживаність становила $63,2\% \pm 4,0\%$.



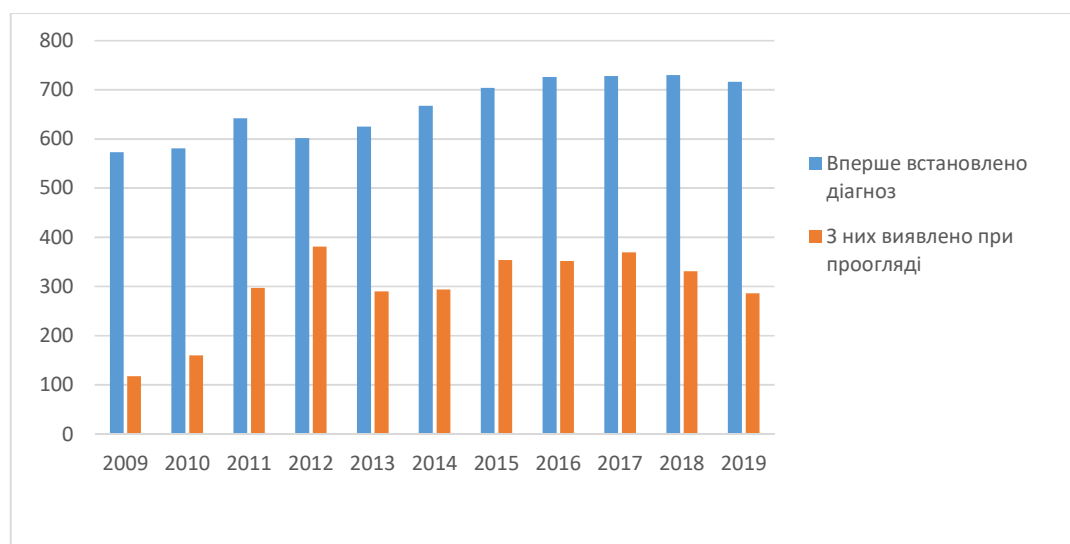
Мал. 3.1.2. Крива виживаності за Капланом-Меєром для пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки.

5-річна виживаність хворих включених в дослідження відповідно до стадії складала: з I стадією складала $90,1\% \pm 8,6\%$; з II стадією – $86,0\% \pm 4,3\%$; з III стадією – $57,1\% \pm 9,2\%$; з IV стадією $13,4\% \pm 7,1\%$.

Отримані дані, щодо структури та вікового розподілу для аденокарцином товстої кишки не відрізняється від літературних даних. Дані щодо перспектив загальної виживаності підтверджують необхідність детальних досліджень прогностичних факторів.

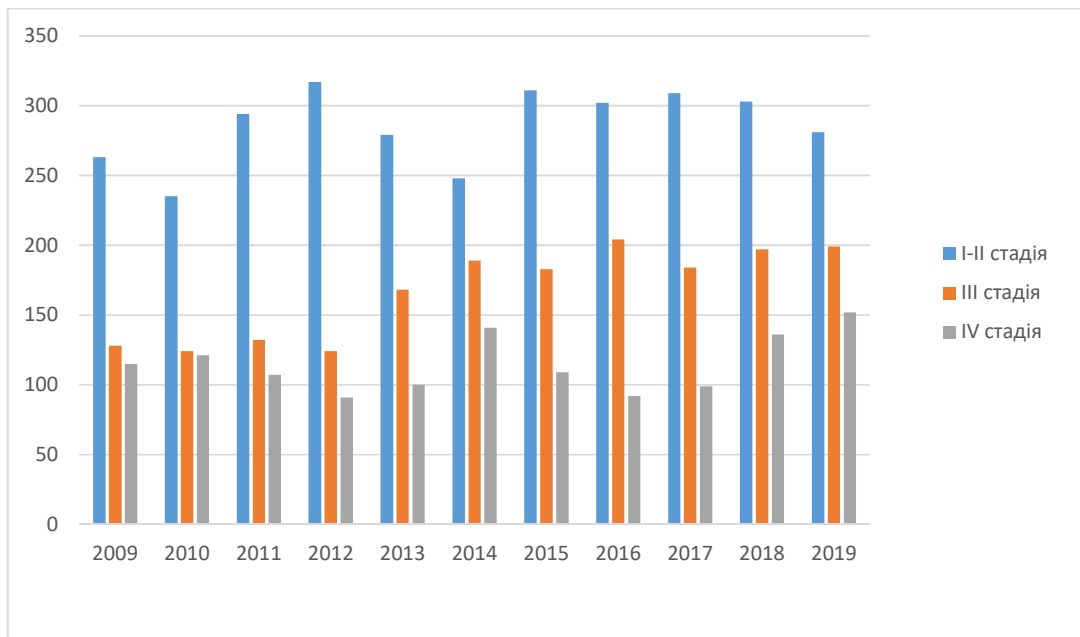
3.2 Аналіз динаміки захворюваності на аденокарциному товстої кишки з 2009-2019 рр. (за даними Київського міського клінічного онкологічного центру)

Аналіз кількості пацієнтів, яким вперше встановили діагноз рак ободової кишки на базі Київського міського клінічного онкологічного центру протягом 10ти років (2009-2019рр.) плавно зростала (від 573 випадків у 2009 році до 716 випадків в 2019 році) (мал.3.2.1).



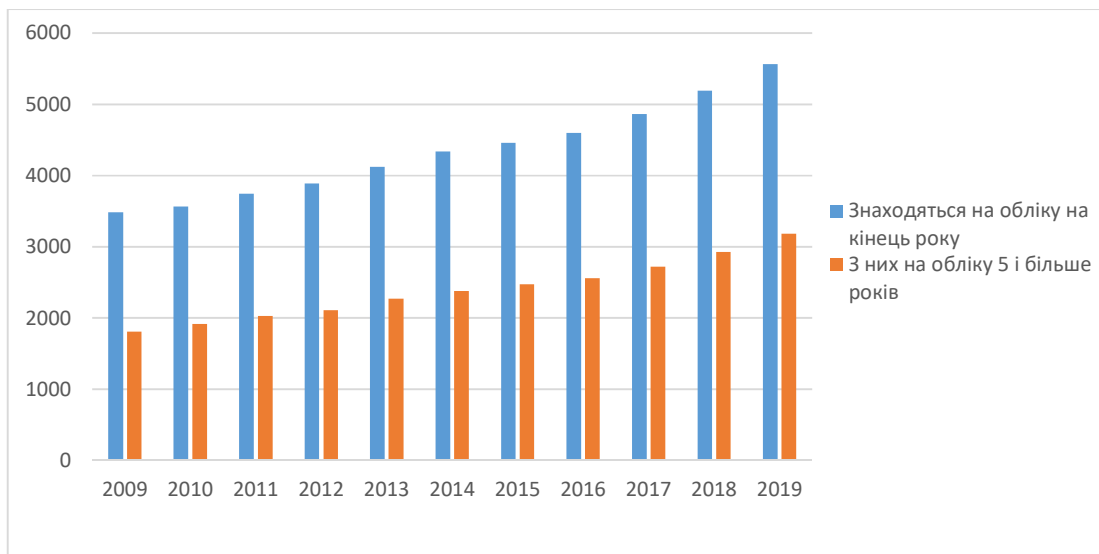
Мал. 3.2.1. Хворі яким вперше встановлено діагноз рак ободової кишки у Київському міському клінічному онкологічному центрф протягом 2009-2019 рр.

Більшість випадків були виявлені на ранніх стадіях (I-II стадія). На протязі 10 років кількість хворих яким встановлено діагноз на I-II стадії залишалась відносно сталою (близько 300 випадків щороку), проте відмічалась тенденція до зростання випадків встановлення діагнозу на більш пізніх стадіях, зокрема на III стадії (з 128 випадків в 2009 році до 199 випадків в 2019 році) (мал.3.2.2)



Мал. 3.2.2. Статифікація хворих кому вперше встановлено діагноз рак ободової кишки за стадією (за TNM класифікацією).

В період з 2009 по 2019 роки кількість хворих, що знаходяться на обліку у Київському міському клінічному онкологічному центрі на кінець року постійно зростала (з 3483 осіб у 2009 році до 5566 осіб у 2019 році). Окрім того кількість хворих, що перебувають на обліку 5 років і більше аналогічно зростала (з 1807 осіб у 2009 році до 3183 осіб у 2019 році) (мал.3.2.3).



Мал. 3.2.3. Кількість хворих з раком ободової кишки, що перебувають на обліку у Київському міському клінічному онкологічному центрі станом на кінець року

Отже, тенденція до зростання кількості вперше діагностованих випадків раку ободової кишки залишається сталою (ця тенденція відповідає тренду зростання захворюваності на рак ободової кишки загалом у місті Києві, результати аналізу представлені в розділі 1). Недивлячись на те, що більшість випадків раку ободової кишки діагностовані на ранніх стадіях (I-II стадія), існує тренд до зростання вперше встановленого діагнозу на більш прогресивних стадіях (зокрема III стадія).

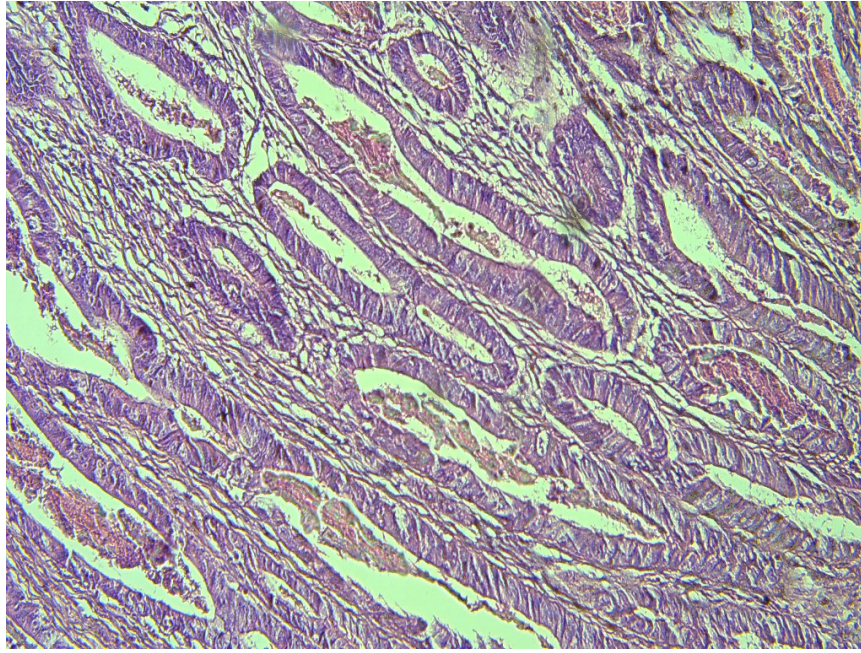
3.3 Гістологічна характеристика аденокарцином товстої кишки (за результатами дослідження матеріалу)

Цей підрозділ містить дані щодо гістологічних характеристик досліджених зразків аденокарцином товстої кишки.

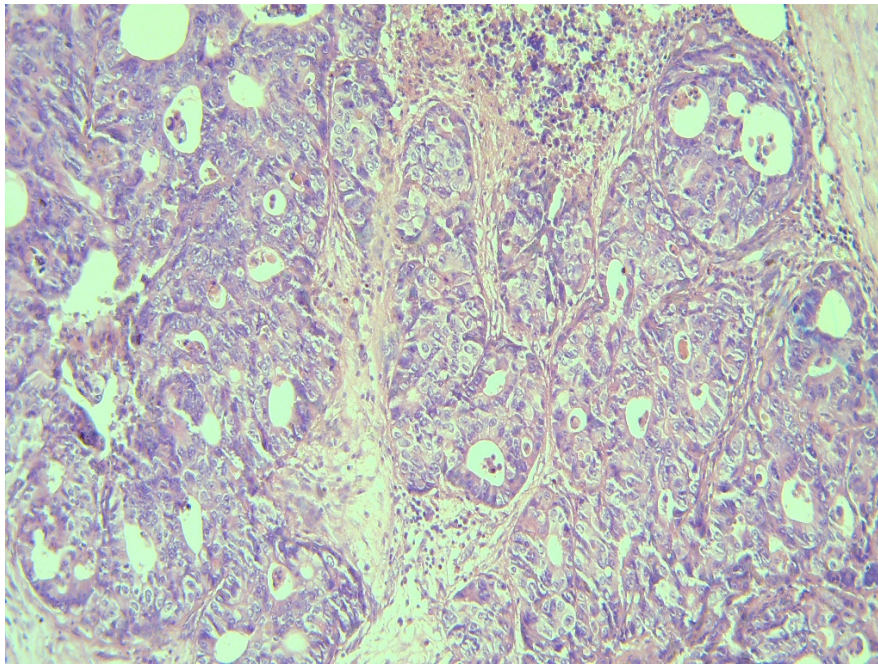
Дослідження проводилось на аденокарциномах товстої кишки лівобічної локалізації, які за даним літератури є найбільш чисельним гістологічним типом пухлин товстої кишки (близько 90%), зокрема аденокарциноми неспецифічного типу (NOS). В класичному вигляді аденокарцинома представлена нерівномірно розміщеними в десмопластичній стромі glandулярних структур, які є основою для визначення ступеню диференціювання (мал.3.3.1-3.3.2 – малюнки що відображають різні ступені диференціювання аденокарцином). Окрім того для інвазивних аденокарцином товстої кишки частою типовою характеристикою є десмопластична реакція стромального компоненту пухлини та присутність так званих «брудних некрозів». В нашому дослідженні 222 аденокарциноми були типовими аденокарциномами NOS (неспецифікованого типу), що становило 94,1% зразків включених в дослідження.

Визначення ступеню диференціювання проводилось відповідно до прийнятої Класифікації пухлини травного тракту ВООЗ [1]. 13 (5,5%) зразків були визначені як високодиференційовані (G1) – пухлинні клітини формують чіткі, подібні за виглядом до нормальних, залозисті структури. Мало виражена атипія, ядра в переважній більшості однорідні та базально орієнтовані. Переважаюча кількість досліджених зразків були помірnodиференційованими (G2) – 206 (87,3%), характерним є те, що наявність залозистих структур все ще спостерігається, проте типова гістоархітектоніка значно порушена. Окрім того втрачається ядерна полярність та спостерігається помірно виражений ядерний поліморфізм. Всього лише 14 (5,9%) досліджених зразків були низкодиференційованими (G3) – для цих пухлин характерним є відсутність формування залозистих структур в більш ніж >50% площі пухлини. Структура солідна, або дрібноацинарна, яскраво виражена ядерна поліморфність та

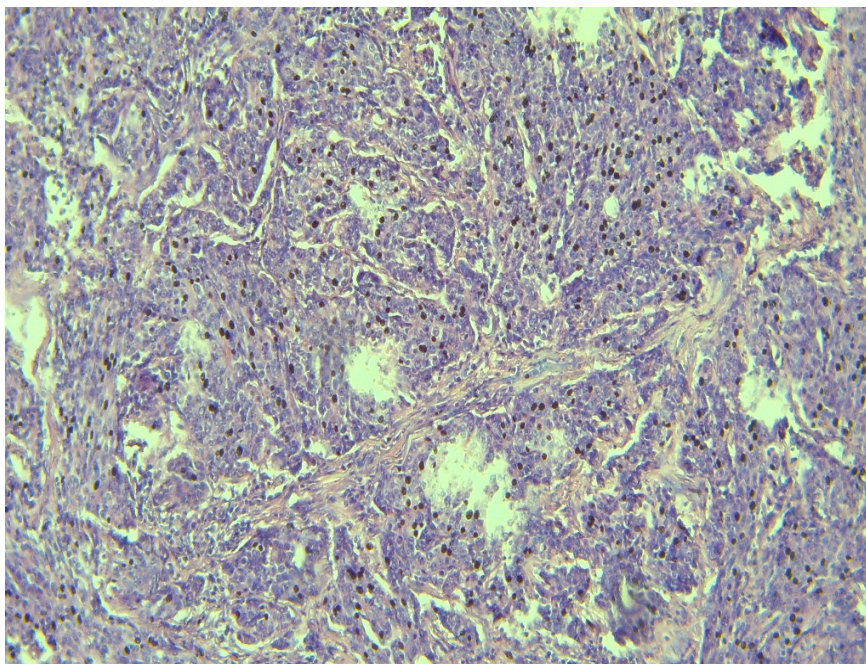
присутня велика кількість мітотичних фігур. Мала кількість випадків низькодиференційованої аденокарциноми в даному дослідженні пояснюється локалізацією обраної когорти, адже схильність низької диференціації більш притаманна правобічним карциномам товстої кишки.



Мал. 3.3.1. Високодиференційованна аденокарцинома товстої кишки G1, кількість сформованих залозистих структур становить >95% пухлини, гематоксилін-еозин, x100.

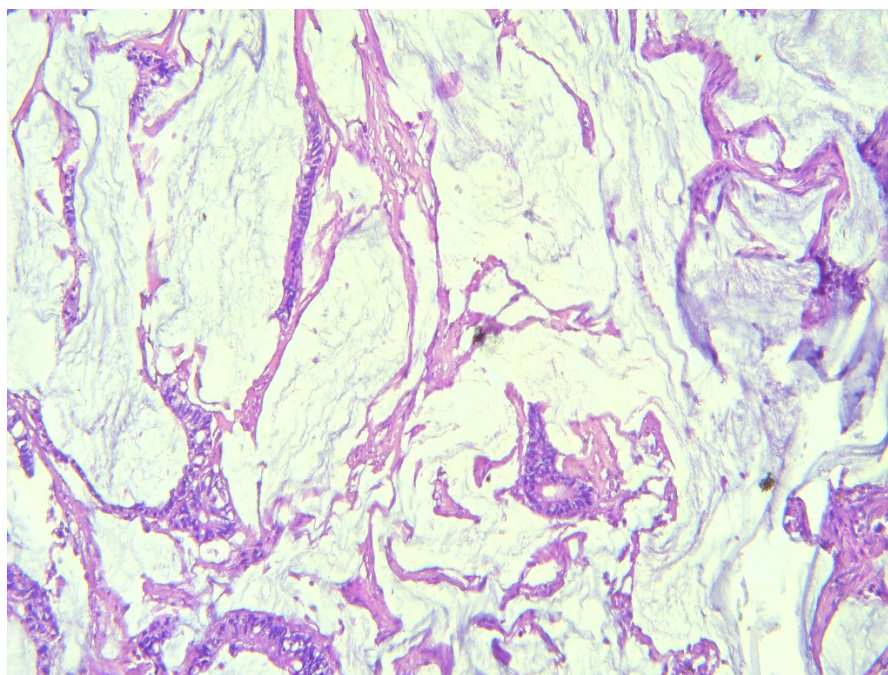


Мал. 3.3.2. Помірнодиференційованна аденокарцинома товстої кишки G2, кількість сформованих залозистих структур становить 50-95% пухлини, гематоксилін-еозин, x100.



Мал. 3.3.3 Низькодиференційованна аденокарцинома товстої кишки G3, кількість сформованих залозистих структур становить <50% пухлини, гематоксилін-еозин, x100.

Іншим специфічним підтипом аденокарцином, що були залучені в дослідження є муцинозні аденокарциноми. Характерною ознакою є переважання муцинозного компоненту понад половину від загальної пухлинної маси. Основною відмінною ознакою є наявність великої кількості позаклітинного муцину, який накопичується в простівіті залозистих структур. В даному дослідженні були наявні 11 (4,6%) муцинозних аденокарцином.



Мал. 3.3.4. Муцинозна аденокарцинома товстої кишки, озера муцину що заповнюють >50% залозистих структур у пухлині, гематоксилін-еозин, x100.

Перстнеподібноклітинна аденокарцинома товстої кишки доволі рідкісна. Її вигляд характеризується наявністю так званих перстнеподібних клітин, ядра яких зміщені на периферію за рахунок внутрішньоклітинного переповненн муцином. Часто ці клітини можуть зустрічатися розміщуватися у вигляді дифузних тяжів, гнізд чи пластів. Ця картина має складати близько >50 % пухлини. В дослідженні було залучено 3 (1,3%) зразків даного підтипу.

Таким чином в дослідженні переважаючим гістологічним підтипом була помірнодиференційована (G2) аденокарцинома NOS (неспецифічного типу), що відповідає літературним даним. Цей гістологічний підтип та ступінь

диференціювання мало інформативні в плані прогнозу захворювання, тому дослідження інших гістологічних характеристик надасть більш глибоке розуміння даної проблеми. Детально описано в наступному розділі.

3.4 Аналіз гістологічних та прогностичних факторів для аденокарцином товстої кишки

3.4.1 Пухлино-стромальне співвідношення в якості прогностичного фактора для аденокарцином товстої кишки

Дане дослідження проводилося на 180 зразках від пацієнтів з діагнозом аденокарцинома товстої кишки. Середній період спостереження становив 3,1 років (діапазон 0,08 – 7,3 роки). 55 хворих включених в дослідження померли.

Всі досліджені зразки були виключно операційним матеріалом, стандартно забарвлені гематоксилін-еозином. Отримані дані щодо морфологічних характеристик та супроводжуючої клінічної інформації досліджених зразків наведені в таблиці 3.4.1.1

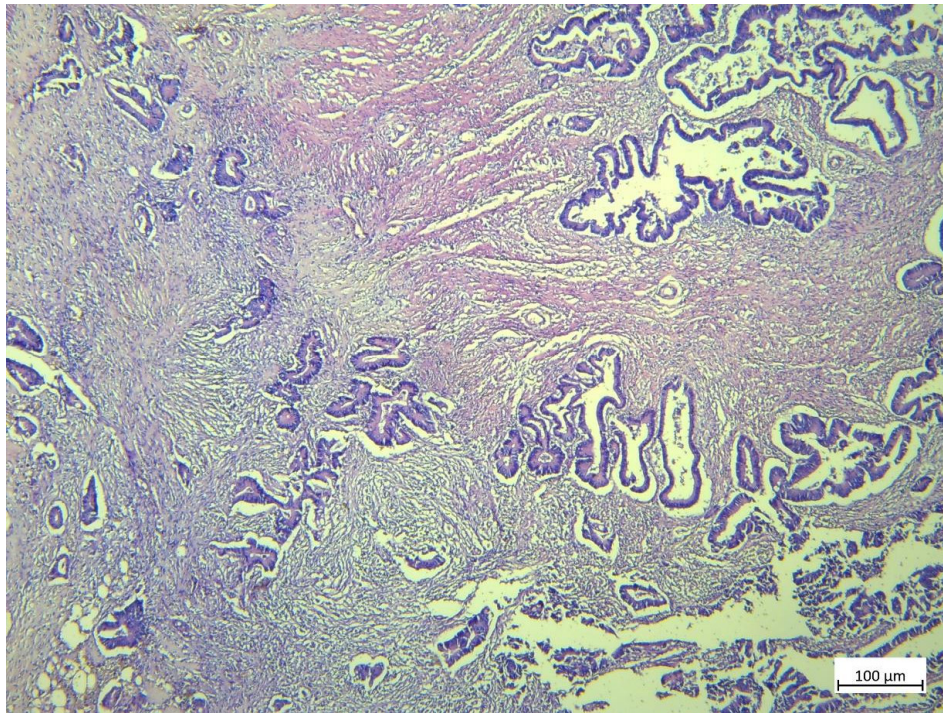
Таблиця 3.4.1.1.

Клініко-морфологічна характеристика зразків аденокарцином товстої кишки.

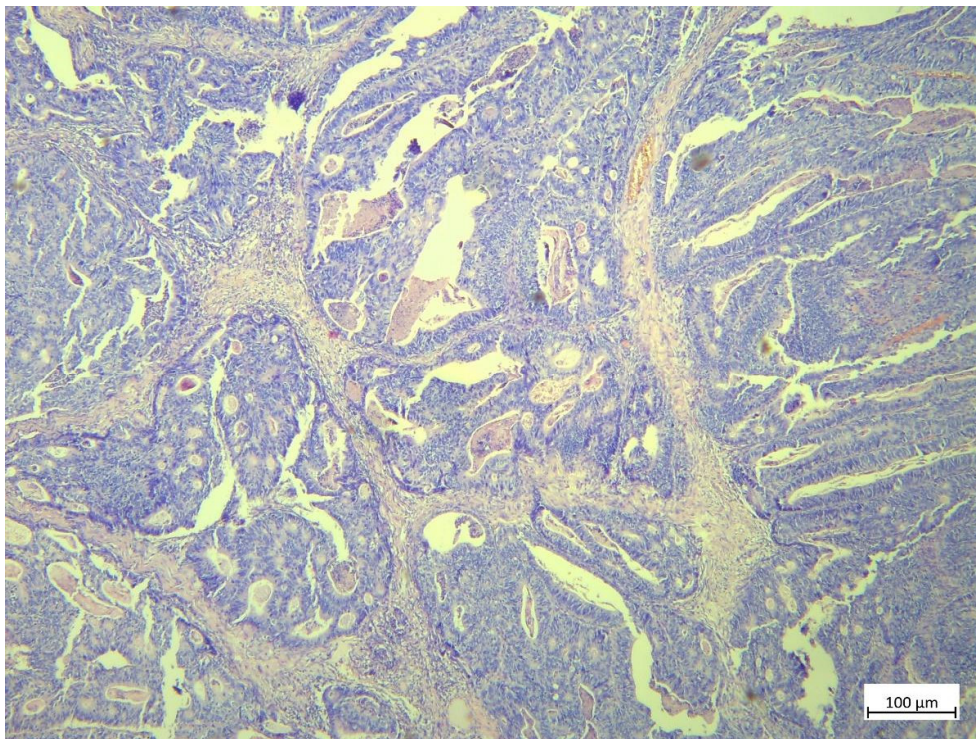
Параметр	Кількість	
	N (180)	%
Вік		
≤45	5	2,8%
46-75	146	81,1%
>75	29	16,1%
Стадія		
I	9	5,0
II	77	42,8
III	52	28,9
IV	42	23,3
pT (Пухлина)		
pT2	11	6,1
pT3	127	70,6
pT4	42	23,3
pN (Лімфатичні вузли)		
pN0	91	50,6
pN1	64	35,6
pN2	25	13,8
M (Віддалені метастази)		
M0	138	76,7

M1	42	23,3
Гістологічний тип		
Аденокарцинома, NOS	167	92,8
Муциозна аденокарцинома	10	5,5
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	3	1,7
Ступінь диференціювання		
G1	8	4,5
G2	159	88,3
G3	13	7,2
ПЛ (пухлино-інфільтруючі лімфоцити)		
Група А (0-9%)	65	36,1
Група В (10-39%)	79	43,9
Група С (>40%)	36	20,0
ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)		
Низький ПСС (<50%)	101	56,1
Високий ПСС ($\geq 50\%$)	79	43,9
Ад'ювантна хіміотерапія		
Так	175	74,1
Ні	61	25,9
Смерть		
Так	175	74,1
Ні	61	25,9

Пухлинно-стромальне співвідношення оцінювали в ділянках з найбільшою кількістю стромального компоненту та пухлинні клітини були присутні в усіх чотирьох частинах поля зору на 10ти кратному збільшенні. Поділ на групи виконано згідно наступного принципу: пухлини з кількістю строми $\geq 50\%$ відносно кількості пухлинних клітин (високий ПСС), в даному дослідженні 101 пацієнт (56,1%); кількість строми $< 50\%$ відносно пухлинних клітин (низький ПСС) – 79 пацієнтів (43,9%), відповідно (мал. 3.4.1.1, 3.4.1.2).



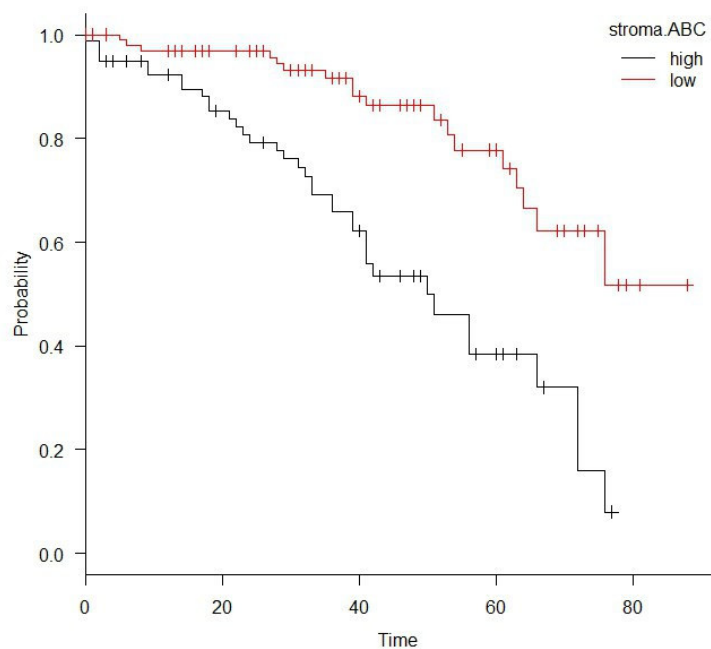
Мал. 3.4.1.1. Аденокарцинома товстої кишки з високим ПСС (кількість стромы $\geq 50\%$), гематоксилін-еозин, $\times 100$.



Мал. 3.4.1.2. Аденокарцинома товстої кишки з низьким ПСС (стромы $< 50\%$), гематоксилін-еозин, $\times 100$.

З метою визначення погодженості між патологами при оцінці пухлино-стромального співвідношення дослідження проводилось двома патологами незалежно один від одного та без розкриття супроводжуючих клінічних даних досліджуваних пацієнтів. Серед 180 зразків пухлин 165 зразків було оцінено обома патологами однаково, що становить 91% погодженості між ними. Передбачувана частота узгодженості, яку можна було очікувати випадково, визначалась за допомогою тесту Хі-квадрат Пірсона та складала: для групи з високим ПСС (строми $\geq 50\%$) – 33,51; для групи з низьким ПСС (строми $< 50\%$) – 67,33, відповідно. Коефіцієнт Каппа-Коена склав 0,81, що вказує на високий рівень погодженості між патологами, які оцінювали ПСС.

Показники загальної виживаності були наступними: у пацієнтів з низьким ПСС (строми $< 50\%$) загальна 1-річна виживаність становила – $96,9 \pm 1,8\%$, загальна 3-річна виживаність – $91,6\% \pm 3,0\%$, загальна 5-річна виживаність – $74,2 \pm 6,6\%$; у пацієнтів з високим ПСС (строми $\geq 50\%$) загальна 1-річна виживаність склала – $89,5 \pm 3,5\%$, загальна 3-річна виживаність – $65,8\% \pm 5,8\%$, загальна 5-річна виживаність – $38,4 \pm 7,9\%$, відповідно. Відповідно до кривої виживаності Каплана-Мейєра існує статистично достовірний взаємозв'язок між пухлино-стромальним співвідношенням та загальною виживаністю у пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки ($p < 0,001$) (мал.3.4.1.3.).



Мал. 3.4.1.3. Крива виживаності Каплана-Мейєра для пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки, стратифікована за ПСС, $p < 0,001$.

На основі аналізу однофакторної моделі регресії Кокса встановлено, показники загальної виживаності набагато вищі в групі пацієнтів з низьким ПСС (КР 0.28, 95% ДІ 0.16-0.49, $p < 0,001$) в порівнянні з групою з високим ПСС. (табл. 3.4.1.2.)

Таблиця 3.4.1.2.

Одноваріантний регресійний аналіз моделі Кокса впливу пухлино-стромального співвідношення на загальну виживаність пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P-значення
pT (Пухлина)			0,131
pT2	референтне		
pT3	3,17	0,43-23,20	0,254
pT4	4,96	0,66-37,21	0,119

pN (Лімфатичні вузли)			<0,001
pN0	Референтне		
pN1	3,20	1,65-6,20	<0,001
pN2	6,36	2,91-13,90	<0,001
M (Віддалені метастази)			
M0	Референтне		
M1	5,47	3,20-9,35	<0,001
Гістологічний тип			0,399
Аденокарцинома, NOS	Референтне		
Муциозна аденокарцинома	0,40	0,05-2,93	0,370
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	2,74	0,37-20,13	0,319
Ступінь диференціювання			0,546
G1	референтне		
G2	1,94	0,26-14,17	0,510
G3	2,90	0,33-24,95	0,330
ПЛ (пухлино-інфільтруючі лімфоцити)			0,003
Група А (0-9%)	референтне		
Група В (10-39%)	0,54	0,30-0,96	0,037
Група С (>40%)	0,21	0,08-0,56	0,001
ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)			
Низький ПСС (<50%)	референтне		<0,001
Високий ПСС (≥50%)	0,28	0,16-0,49	

Примітка: *р-значення <0,05

При проведенні мультиваріантного аналізу з використанням поетапного відбору найбільш значущих критеріїв за Акаїке виявлено, що пухлино-стромальне співвідношення ($p=0,001$), наявність метастазів в лімфатичних вузлах (pN) ($p=0,007$) та наявність віддалених метастазів статистично достовірно впливають на загальну виживаність пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки.

Пухлини з низьким ПСС (строма <50%) статистично достовірно мають кращі показники загальної виживаності (КР 0.39, 95% ДІ 0.21-0.70, $p=0,001$) в порівнянні з пухлинами з високим ПСС (строма $\geq 50\%$) (табл.3.4.1.3).

Таблиця 3.4.1.3.

Багатовагіантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичної цінності пухлино-стромального співвідношення для загальної виживаності для аденокарциноми товстої кишки з поетапним відбором параметрів за Акаїке

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	Р-значення
ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)			
Низький ПСС (<50%)	референтне		
Високий ПСС ($\geq 50\%$)	0,39	0,21-0,70	0,001
pN (Лімфатичні вузли)			0,007
pN0	Референтне		
pN1	1,73	0,84-3,54	0,130
pN2	3,59	1,59-8,10	0,002
M (Віддалені метастази)			
M0	Референтне		
M1	3,10	1,73-5,55	<0,001

Примітка: *р-значення <0,05

Отже, визначення пухлино-стромального співвідношення є доволі простим з технічної точки зору, а також показує високий рівень погодженості між патологами. Кількість строми в пухлині статистично достовірно впливає на загальну виживаність пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки та є незалежним прогностичним фактором для загальної виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки.

3.4.2 Пухлино-інфільтруючі лімфоцити в якості прогностичного фактора для аденокарцином товстої кишки

Дослідження було проведено на 236 зразках аденокарциноми товстої кишки. Для дослідження було використано тільки оперераційний матеріал. З 236 пацієнтів, що були включені в дослідження 73 хворих (30,1%) померли. Середній період спостереження склав 3,2 років (діапазон 0,08 – 7,3 роки).

Таблиця 3.4.2.1.

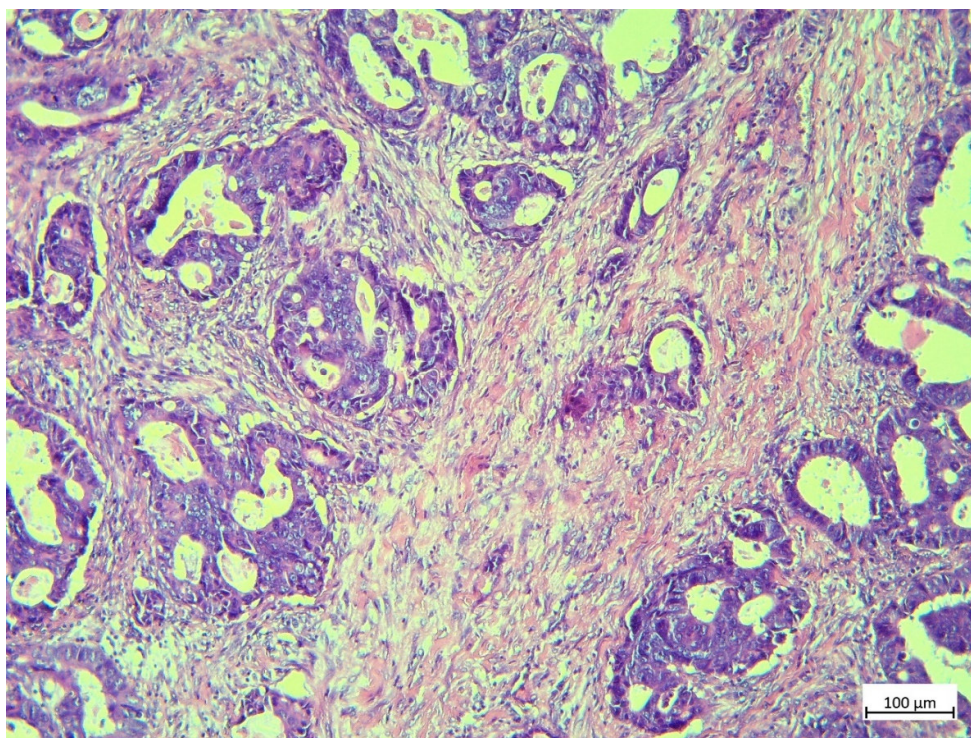
Загальна характеристика аденокарцином товстої кишки, що були включені в дослідження.

Параметр	Кількість	
	N (236)	%
Вік		
≤45	7	2,9%
46-75	184	78%
>75	45	19,1%
Стадія		
I	11	4,7
II	107	45,3
III	65	27,5
IV	53	22,5
pT (Пухлина)		
pT2	15	6,4
pT3	173	73,3
pT4	48	20,3
pN (Лімфатичні вузли)		
pN0	125	53
pN1	80	33,9
pN2	31	13,1

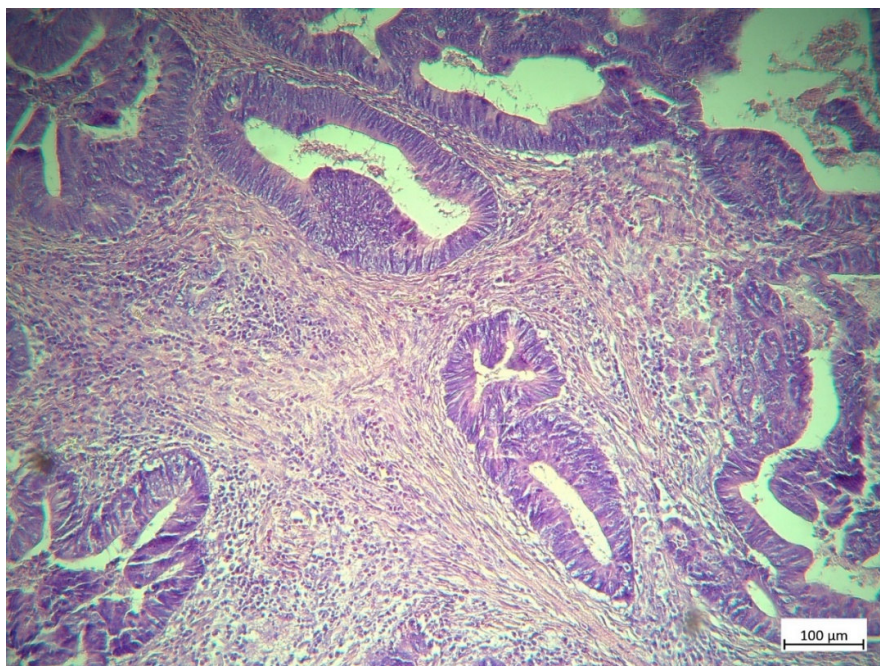
М (Віддалені метастази)		
М0	183	77,5
М1	53	22,5
Гістологічний тип		
Аденокарцинома, NOS	222	94,1
Муцинозна аденокарцинома	11	4,6
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	3	1,3
Ступінь диференціювання		
G1	13	5,5
G2	207	87,3
G3	13	5,9
ПЛ (пухлино-інфільтруючі лімфоцити)		
Група А (0-9%)	88	37,3
Група В (10-39%)	104	44,9
Група С (>40%)	42	17,8
ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)		
Низький ПСС (<50%)	142	60,2
Високий ПСС (≥50%)	94	39,8
Пухлинне брунькування		
Мала кількість брунькування “Low”	202	85,6
Помірне брунькування “Intermediate”	22	9,3
Значна кількість брунькування “High”	12	5,1

Ад'ювантна хіміотерапія		
Так	175	74,1
Ні	61	25,9
Смерть		
Так	73	30,9
Ні	163	69,1

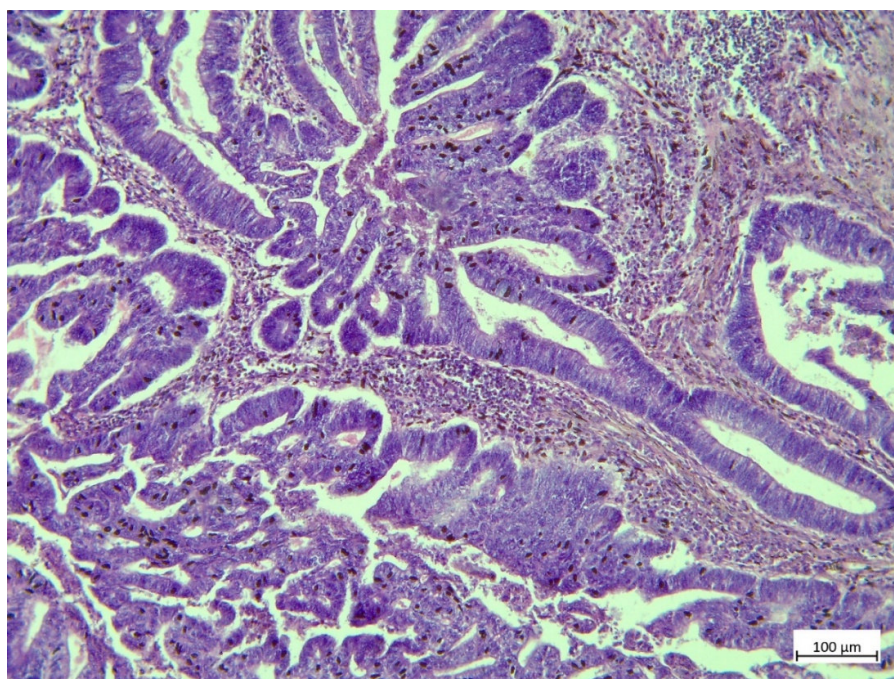
Оцінювання інтенсивності ПЛІ проводилось виключно в зоні внутрішньопухлинної стромы, уникаючи зон некрозів, крововиливів чи скупчення лімфоцитарного інфільтрату по інвазивному краю. За інтенсивністю лімфоцитарного інфільтрату у відсотковому співвідношенні пацієнтів було поділено на наступні групи: група А (з малою кількістю ПЛІ - 0-9%) – 88 хворих; група В (помірна кількість ПЛІ – 10-39%) – 106 хворий; та група С (велика кількість лімфоцитів >40%) – 42 хворих (мал. 3.4.2.1-3.4.2.3).



Мал. 3.4.2.1. Аденокарцинома товстої кишки з малою кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, група А (0-9%). Фарбування гематоксилін-еозином, x100.



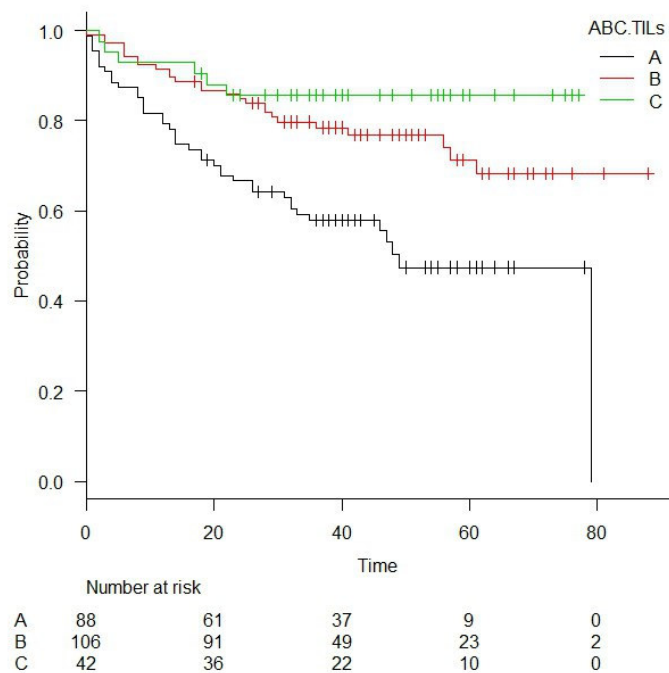
Мал. 3.4.2.2. Аденокарцинома товстої кишки з помірною кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, група В (10-39%). Фарбування гематоксилін-еозином, x100.



Мал. 3.4.2.3. Аденокарцинома товстої кишки з великою кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, група С (>40%). Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

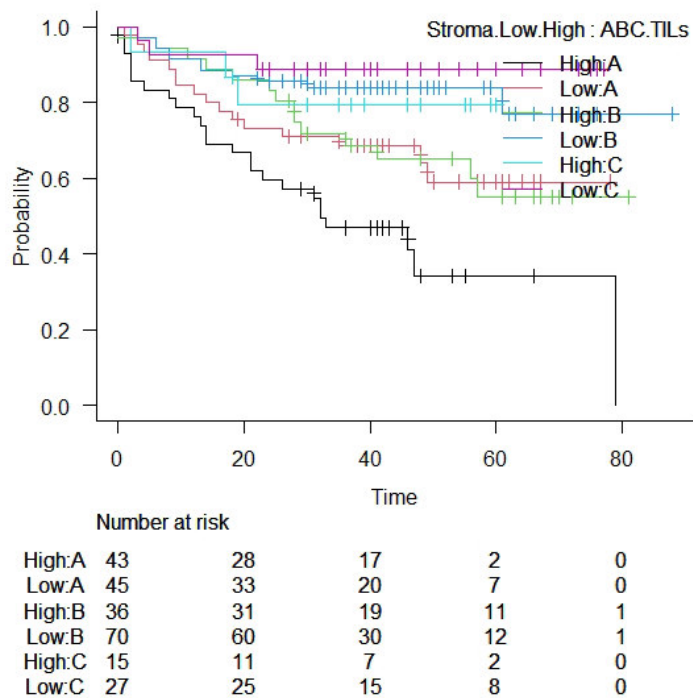
З метою визначення узгодженості між патологами, оцінювання кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів проводилось двома незалежними патологами без доступу до наявних клінічних даних. Щільність ПЛ була оцінена обома патологами однаково в 199 випадків з 236, тож загальна погодженість склала 86%. Передбачувана частота узгодженості, яку можна було очікувати випадково, була розрахована за допомогою тесту Хі-квадрат Пірсона та дорівнювала: для групи А (ПЛ 0-9%) – 31,32; групи В (ПЛ 10-39%) – 8,02; групи С (ПЛ 40%) – 8,02, відповідно. Коефіцієнт узгодженості Каппа-Коена склав 0,75, що демонструє високий рівень узгодженості між патологами, що проводили оцінку пухлино-інфільтруючих лімфоцитів.

Загальна однорічна виживаність для групи А (ПЛ 0-9%) склала $79,3 \pm 4,3\%$, для групи В (ПЛ 10-39%) становила $91,5\% \pm 2,7\%$, для групи С (ПЛ >40%) – $90,5 \pm 4,5\%$. Загальна трирічна виживаність для групи А (ПЛ 0-9%) склала $58,0 \pm 5,3\%$, для групи В (ПЛ 10-39%) становила $78,5\% \pm 4,0\%$, для групи С (ПЛ >40%) загальна трирічна виживаність була недоступною. П'ятирічна виживаність була доступною тільки для групи В (ПЛ 10-39%) та становила – $68,2 \pm 6,0\%$ (мал.3.4.2.4).



Мал. 3.4.2.4 Крива Каплана-Мейєра, стратифікована за групою пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, $p < 0,001$.

Аналіз кривої Каплана-Меєра показав, що кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в поєднанні з пухлино-стромальним співвідношенням статистично достовірно впливають на прогноз пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки ($p < 0,001$). Найгірша виживаність спостерягалась у групі А (ПІЛ 0-9%) та одночасно високим ПСС (строма $\geq 50\%$), де медіана виживаності становила всього 32 місяці. Це засвідчує доцільність застосування цих показників для стратифікації пацієнтів за ризиком для індивідуалізації протоколів лікування.



Мал. 3.4.2.6 Крива Каплана-Мейєра, одночасно стратифікована за групою пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та кількістю пухлино-стромального співвідношення.

Проведений одноваріантний регресійний аналіз моделі Кокса показав, що загальна виживаність в групі В (ВР 0.43, 95% ДІ 0.26-0.71, $p < 0.001$) та в групі С (ВР 0.25, 95% ДІ 0.11-0.59, $p < 0.001$) статистично достовірно вища в порівнянні з групою А (табл.3.4.2.2).

Таблиця 3.4.2.2.

Одноваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичної цінності пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для загальної виживаності для аденокарциноми товстої кишки

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	Р-значення

Вік			0,811
≤45	референтне		
46-75	1,02	0,25-4,19	0,973
>75	0,83	0,18-3,73	0,812
pT (Пухлина)			0,263
pT2	референтне		
pT3	3,20	1,82-5,61	0,251
pT4	5,84	3,07-13,91	0,136
pN (Лімфатичні вузли)			<0,001
pN0	Референтне		
pN1	3,20	1,82-5,61	<0,001
pN2	5,84	3,07-11,10	<0,001
M (Віддалені метастази)			
M0	Референтне		
M1	8,52	5,22-13,91	<0,001
Гістологічний тип			0,439
Аденокарцинома, NOS	Референтне		
Муциозна аденокарцинома	0,27	0,03-2,01	0,205
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	1,20	0,16-8,67	0,854
Ступінь диференціювання			0,282
G1	референтне		
G2	1,85	0,45-7,60	0,389
G3	3,22	0,65-16,03	0,152
ПЛ (пухлино-інфільтруючі лімфоцити)			<0,001
Група А (0-9%)	референтне		
Група В (10-39%)	0,43	0,26-0,71	<0,001
Група С (>40%)	0,25	0,11-0,59	<0,001

ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)			
Високий ПСС ($\geq 50\%$)	референтне		
Низький ПСС ($< 50\%$)	0,45	0,28-0,72	$< 0,001$
Пухлинне брунькування			0,156
Мала кількість брунькування	референтне		
Помірне брунькування	1,07	0,36-3,14	0,898
Значна кількість брунькування	0,59	0,23-1,50	0,271

Примітка: *p-значення $< 0,05$

Мульваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса з поетапним відбором параметрів за Акаїке показав, що пухлино-інфільтруючі лімфоцити ($p=0,039$), статус лімфатичних вузлів (pN) ($p<0,001$) та пухлино-стромальне співвідношення ($p=0,019$) мають статистично значущий вплив на загальну виживаність.

Статистично значущий вплив на загальну виживаність був виявлений в групах з помірним та високим ПЛ: група В (ПЛ 0-9%) (КР 0.57, 95% ДІ 0.34-0.96, $p=0.039$), група С (ПЛ 10-39%) (КР 0.41, 95% ДІ 0.17-1.01, $p=0.054$). Результати наведені в таблиці 3.4.2.3.

Таблиця 3.4.2.3.

Багатофакторний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичної цінності пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для загальної виживаності для аденокарциноми товстої кишки з поетапним відбором параметрів за Акаїке

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P-значення
ПЛ (пухлино-інфільтруючі лімфоцити)			0,039
Група А (0-9%)	референтне		

Група В (10-39%)	0,57	0,34-0,96	0,035
Група С (>40%)	0,41	0,17-1,01	0,054
pN (Лімфатичні вузли)			<0,001
pN0	Референтне		
pN1	2,65	1,48-4,71	<0,001
pN2	4,26	2,17-8,34	<0,001
ПСС (пухлино-стромальне співвідношення)			
Високий ПСС ($\geq 50\%$)	референтне		
Низький ПСС ($< 50\%$)	0,56	0,35-0,91	0,019

Примітка: *р-значення <0,05

При дослідженні асоціативних зв'язків клініко-морфологічних характеристик з пухлино-інфільтруючими лімфоцитами статистично достовірно було встановлено асоціацію з віком ($p=0,028$), глибиною інвазії пухлини (pT) ($p=0,015$), наявністю метастазів в лімфатичних вузлах (pN) ($p<0,001$) та наявністю віддалених метастазів ($p<0,001$). Дані результатів наведені в (табл.3.4.2.4).

Таблиця 3.4.2.4

Клініко-гістологічні характеристики аденокарцином та їх зв'язок з пухлино-інфільтруючими лімфоцитами

Параметр	Кількість						
	Група А (0-9%)	%	Група В (10-39%)	%	Група С (>40%)	%	p-value
Всього	88	37,3	106	44,9	42	17,8	
Вік							*0,028
=<45	3	3,4	1	0,9	0	0	
>46-75	29	33	25	23,6	5	11,9	
>75	56	0,6	80	75,5	37	88,1	
pT (Пухлина)							*0,015
pT2	3	3,4	4	3,8	8	19,1	

pT3	68	77,3	81	76,4	24	57,1	
pT4	17	19,3	21	19,8	10	23,8	
pN (Лімфатичні вузли)							*<0,001
pN0	35	39,8	56	52,8	34	81	
pN1	33	37,5	42	39,6	5	11,9	
pN2	20	22,7	8	7,6	3	7,1	
M (Метастази)							*<0,001
M0	56	63,6	90	84,9	37	88,1	
M1	32	36,4	16	15,1	5	11,9	
Ступінь диф-ня							0,83
G1	5	5,7	5	4,7	3	7,1	
G2	76	86,4	96	90,6	36	85,7	
G3	7	7,9	5	4,7	3	7,1	
ПСС							0,095
ПСС (≥50%)	43	48,9	36	34,0	15	35,7	
ПСС (<50%)	45	51,1	70	66,0	27	64,3	
Пухлинне брунькування							0,156
Low	72	81,8	92	86,8	38	90,5	
Intermediate	13	14,8	6	5,7	3	7,1	
High	3	3,4	8	7,5	1	2,4	
Гістологічний тип							0,439
Аденокарцинома, NOS	80	90,9	101	95,3	41	97,6	
Муциозна аденокарцинома	7	8,0	3	2,8	1	2,4	
Перстнеподібно-клітинна аденокарцинома	1	1,1	2	1,9	0		

Примітка: *p-значення <0,05

Додатково, для 73 зразків було визначено MSI/MSS статус. Дані щодо частоти MSI/MSS в кожній підгрупі ППЛ наведено в (табл. 3.4.2.4).

Таблиця 3.4.2.4

Частота мікросателітної нестабільності в різних групах ПІЛ

Параметр	Загальна Кількість		Кількість ПІЛ стратифікована за MSI/MSS					
	N	%	Група А (0-9%)	%	Група В (10-39%)	%	Група С (>40%)	%
Всього	73	100	23	31,5	28	38,4	22	30,1
MSI/MSS статус								
MSS	63	86,3	17	73,9	25	89,3	21	95,5
MSI-L	3	4,1	2	8,7	0	0	1	4,5
MSI-H	7	9,5	4	17,4	3	10,7	0	0

Навіть на вибірці меншого розміру при побудові кривої виживаності Каплана-Меєра зберігається статистично значущий вплив ПІЛ на загальну виживаність пацієнтів ($p=0,042$). При проведенні рангової кореляції Спірмена було виявлено статистично значущий обернений кореляційний зв'язок статусу MSI/MSS з кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p=0,022$).

Тож, помірну (ПІЛ 10-39%) та значну (ПІЛ >40%) кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів можна вважати незалежним прогностичним фактором для загальної виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки. Окрім того наявні асоціативні зв'язки пухлино-інфільтруючих лімфоцитів з глибиною інвазії, наявністю метастазів в лімфатичних вузлах та наявністю віддалених метастазів підтверджують прогностичне значення імунного інфільтрату пухлини та відображають біологічну поведінку пухлини. Отриманий нами обернений кореляційний зв'язок статусу MSI/MSS та ПІЛ може свідчити про потенційні механізми імуносупресії або про відмінності мікрооточення MSI-H аденокарцином товстої кишки на більш пізніх стадіях.

3.5 Аналіз еспресії імуногістохімічних маркерів в якості прогностичних факторів для аденокарцином товстої кишки

3.5.1 Аналіз значимості субпопуляцій CD4+ та CD20+ пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для аденокарцином товстої кишки

Визначення субпопуляцій CD4+ та CD20+ лімфоцитів було проведено на зразках резекції аденокарцином товстої кишки, загалом 16 зразків. З 16 пацієнтів померли 3 (18,75%). Середній період спостереження 2,9 років (діапазон від 1,5 до 5,3) для загальної виживаності. Детальний опис клініко-гістологічних характеристик та зв'язок з присутністю субпопуляції CD4+ лімфоцитів представлений в (табл. 3.5.1.1).

Таблиця 3.5.1.1.

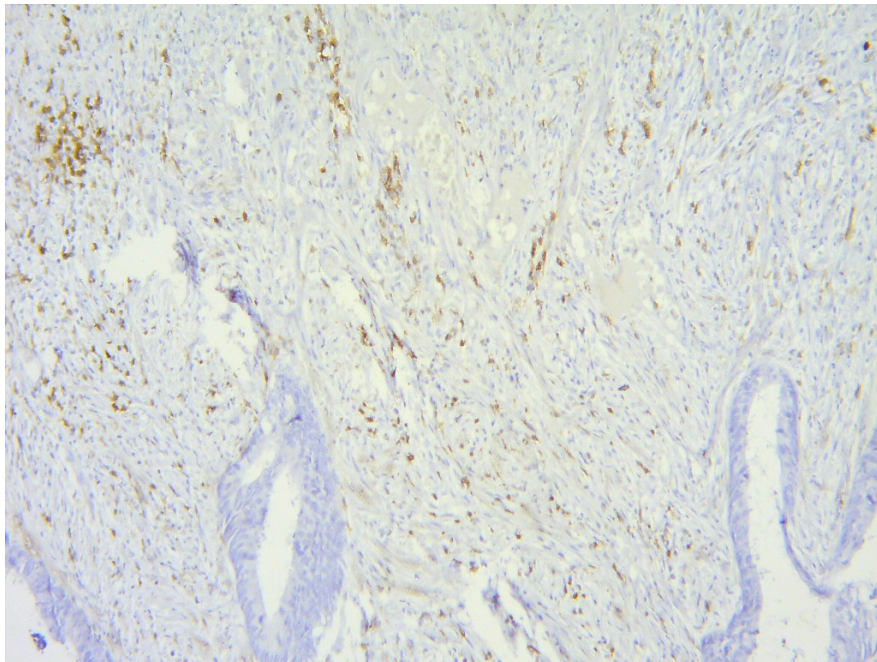
Клініко-гістологічні характеристики аденокарцином та їх зв'язок з присутністю CD4+ лімфоцитів

Параметр	Кількість								
	N	%	CD4+ + (1-25)	%	CD4+ ++ (26-50)	%	CD4+ +++ (>51)	%	p-value
Всього	16	100	3	18,75	6	37,5	7	43,75	
Вік									0,85
≤45	0	0	0	0	0	0	0	0	
>46-75	14	87,5	3	100	5	83,3	6	85,7	
>75	2	12,5	0	0	1	16,7	1	14,3	
Стадія									0,29
I	4	25	0	0	1	16,7	3	42,9	
II	6	37,5	2	66,7	3	49,9	1	14,2	
III	4	25	0	0	1	16,7	3	42,9	
IV	2	12,5	1	33,3	1	16,7	0	0	
pT (Пухлина)									0,31
pT2	4	25	0	0	1	16,7	3	42,9	
pT3	11	68,75	2	66,7	5	83,3	4	57,1	
pT4	1	6,25	1	33,3	0	0	0	0	

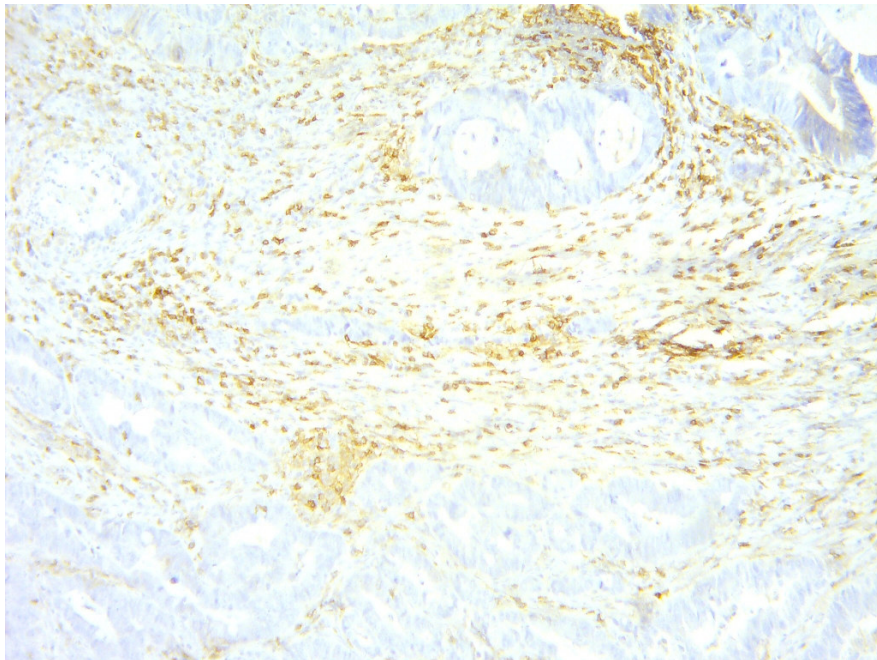
pN (Лімфатичні вузли)									0,31
pN0	11	68,75	2	66,7	5	83,3	4	57,1	
pN1	4	25	1	33,3	0	0	3	42,9	
pN2	1	6,25	0	0	1	16,7	0	0	
M (Метастази)									0,3
M0	14	87,5	2	66,7	5	83,3	7	100	
M1	2	12,5	1	33,3	1	16,7	0	0	
Ступінь диф-ня									0,65
G1	2	12,5	0	0	0	0	2	28,6	
G2	14	87,5	3	100	6	100	5	71,4	
ПСС									0,91
ПСС (≥50%)	4	25	1	33,3	1	16,7	2	28,6	
ПСС (<50%)	12	75	2	66,7	5	83,3	5	71,4	
ПЛ									0,50
Група А (0-9%)	1	6,25	1	33,3	0	0	0	0	
Група В (10-39%)	4	25	0	0	2	33,3	2	28,6	
Група С (>40%)	11	68,75	2	66,7	4	66,7	5	71,4	
CD20+									0,03
+(1-25)	12	75	3	100	6	100	3	42,9	
++(26-50)	4	25	0	0	0	0	0	0	
+++(>51)	0	0	0	0	0	0	4	57,1	

Примітка: *p-значення <0,05

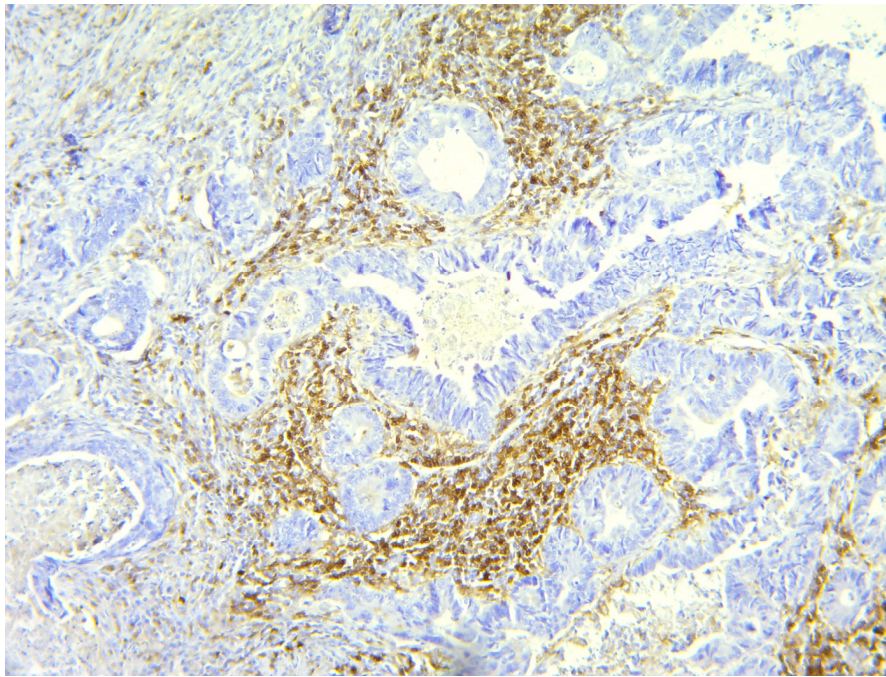
Розподіл груп виглядав наступним чином: 3 аденокарциноми (18,75%) було оцінено як ті де наявна мала кількість CD4+ лімфоцитів **група+** (1-25 клітин); 6 зразків з помірною кількістю CD4+ лімфоцитів **група++** (25-50 клітин); та 7 зразків з інтенсивною CD4+ лімфоцитарною інфільтрацією **група+++** (>51 клітин). Приклади зразків на мал. 3.5.1.1 – 3.5.1.3



Мал. 3.5.1.1 Експресія CD4+ лімфоцитів **група+** (1-25 клітин),
імуногістохімічне зафарбовування (Clone 4B12, Leica Biosystems), x100.



Мал. 3.5.1.2 Експресія CD4+ лімфоцитів **група++** (25-50 клітин),
імуногістохімічне зафарбовування (Clone 4B12, Leica Biosystems), x100.



Мал. 3.5.1.3 Експресія CD4+ лімфоцитів **група+++** (>51 клітин), імуногістохімічне зафарбовування (Clone 4B12, Leica Biosystems), x100.

Під час аналізу зв'язків з клініко-гістологічними параметрами асоціації з віком, типом пухлини, стадією, глибиною інвазії пухлини pT, метастазами в лімфатичні вузли pN, віддаленими метастазами, ступенем диференціювання, пухлино-стромальним співвідношенням, та загальною кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів не встановлено. CD4+ лімфоцити асоціювались з CD20+ лімфоцитами ($p=0,03$). При побудові кривих виживаності Каплана-Мейєра з застосуванням логранк-тесту статистично значущого впливу субпопуляції CD4+ лімфоцитів на загальну виживаність не було встановлено ($p=0,11$). Проте при застосуванні логранк-тренд тесту було виявлено статистично значущий вплив ($p=0,03$) кількості CD4+ лімфоцитів на градієнт виживаності. Це може вказувати на потенційний вплив CD4+ лімфоцитів на загальну виживаність, проте для підтвердження гіпотези необхідні подальші дослідження зі збільшеною вибіркою.

Детальний опис клініко-гістологічних характеристик та зв'язок з присутністю субпопуляції CD20+ лімфоцитів представлений в (табл. 3.5.1.2)

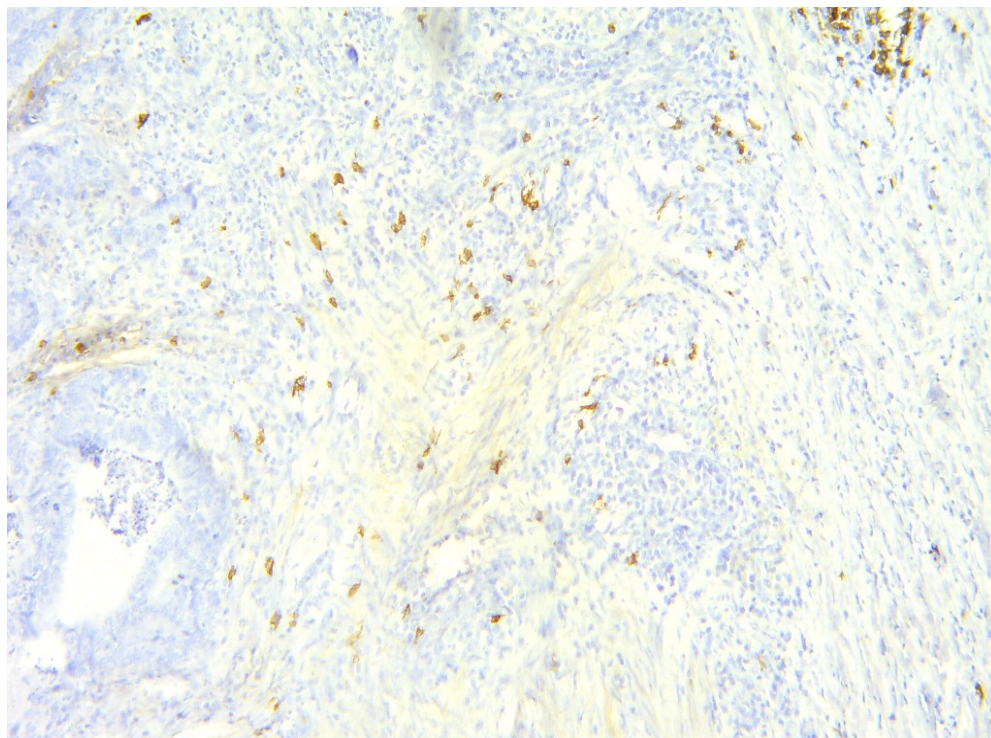
Таблиця 3.5.1.2

Клініко-гістологічні характеристики аденокарцином та їх зв'язок з присутністю CD20+ лімфоцитів

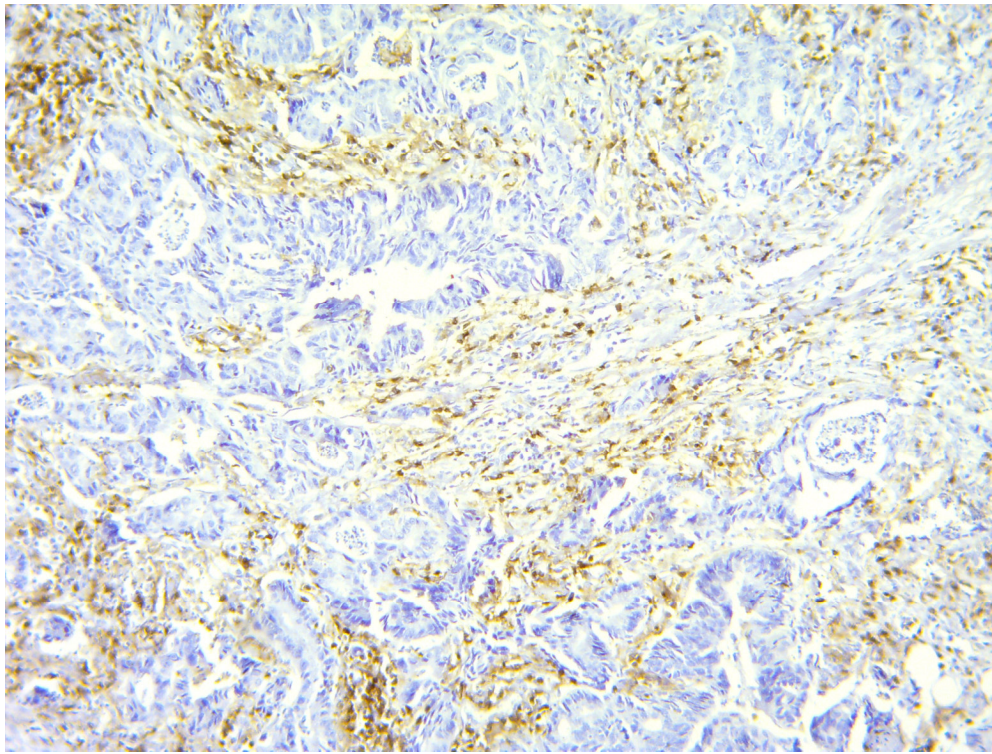
Параметр	Кількість						
	N	%	CD20+ (1-25)	%	CD20++ (26-50)	%	p-value
Всього	16	100	12	75	4	25	
Вік							0,78
=<45	0	0	0	0	0	0	
>46-75	10	62,5	10	83,3	4	100	
>75	6	37,5	2	16,7	0	0	
Стадія							*0,05
I	4	25	1	8,3	3	75	
II	6	37,5	6	50	0	0	
III	4	25	3	25	1	25	
IV	2	12,5	2	16,7	0	0	
pT (Пухлина)							*0,02
pT2	4	25	1	8,3	3	75	
pT3	11	68,75	10	83,4	1	25	
pT4	1	6,25	1	8,3	0	0	
pN (Лімфатичні вузли)							1
pN0	11	68,25	8	66,7	3	75	
pN1	4	25	3	25	1	25	
pN2	1	6,25	1	8,3	0	0	
M (Метастази)							1
M0	14	87,5	10	83,3	4	100	
M1	2	12,5	2	16,7	0	0	
Ступінь диф-ня							*0,05
G1	2	12,5	0	0	2	50	
G2	14	87,5	12	100	2	50	
ПСС							1
ПСС (≥50%)	4	25	3	25	1	25	
ПСС (<50%)	12	75	9	75	3	75	
ПЛ							0,64
Група А (0-9%)	1	6,25	1	8,3	0	0	
Група В (10-39%)	4	25	4	33,4	0	0	
Група С (>40%)	11	68,75	7	58,3	4	100	
CD4+							*0,03
+(1-25)	3	18,75	3	25	0	0	
++(26-50)	6	37,5	6	50	0	0	
+++(>51)	7	43,75	3	25	4	100	

Примітка: *р-значення <0,05

Відповідно до кількості CD20+ лімфоцитів зразки було поділено на групи: 12 зразків (75%) було оцінено як ті де наявна мала кількість CD20+ лімфоцитів **група+** (1-25 клітин); 4 зразки з помірною кількістю CD20+ лімфоцитів **група++** (25-50 клітин); та 0 зразків з високою інтенсивністю CD20+ лімфоцитарною інфільтрацією **група+++** (>51 клітин). Приклади зразків на мал. 3.5.1.4 – 3.5.1.5.



Мал. 3.5.1.4 Експресія CD20+ лімфоцитів **група+** (1-25 клітин), імуногістохімічне зафарбовування (Clone (L26), Leica Biosystems), x100.



Мал. 3.5.1.5 Експресія CD20+ лімфоцитів **група++** (25-50 клітин), імуногістохімічне зафарбовування (Clone (L26), Leica Biosystems), x100.

Під час аналізу зв'язків з клініко-гістологічними параметрами було виявлено статистично значущу асоціацію інфільтрації CD20+ лімфоцитів зі стадією ($p=0,05$), глибиною інвазії пухлини pT ($p=0,02$), ступенем диференціювання пухлини ($p=0,05$) та CD4+ лімфоцитами ($p=0,03$). Асоціації з віком, метастазами в лімфатичні вузли pN, віддаленими метастазами пухлино-стромальним співвідношенням, та загальною кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів не встановлено. При побудові кривих виживаності Каплана-Мейєра з застосуванням логранк-тесту статистично значущого впливу субпопуляції CD20+ лімфоцитів на загальну виживаність не було встановлено ($p=0,31$).

Таким чином, наявність статистично значущого тренду впливу інфільтрації субпопуляції CD4+ лімфоцитів на градієнт виживаності вказує на потенційний вплив CD4+ лімфоцитів на загальну виживаність, тож потребує подальшого більш детального вивчення. Асоціативні зв'язки CD20+ лімфоцитів зі стадією, глибиною інвазії пухлини pT, ступенем диференціювання пухлини G

та CD4⁺ лімфоцитами вказує на можливість застосування визначення кількості субпопуляції CD20⁺ лімфоцитів для оцінки агресивності поведінки карцином товстої кишки.

3.5.2 Експресія PD-L1 в аденокарциномах товстої кишки, його прогностичне значення

Визначення експресії PD-L1 в було проведено на 32 пострезекційних зразках аденокарцином товстої кишки, для 16 зразків були наявні дані про субпопуляції CD4+ та CD20+ лімфоцитів. З 32 пацієнтів померли 7 (21,9%). Середній період спостереження 3,02 років (діапазон від 1,2 до 6) для загальної виживаності. Детальний опис клініко-гістологічних характеристик та зв'язок з експресією PD-L1 представлений в табл. 3.5.2.1-3.5.2.2

Таблиця 3.5.2.1

Клініко-гістологічні характеристики аденокарцином та їх зв'язок з експресією PD-L1

Параметр	Кількість		PD-L1 (CPS<1)	%	PD-L1 (CPS≥1)	%	p-value
	N	%					
Всього	32	100	24	75	8	25	
Вік							0,46
≤45	1	3,1	1	4,2	0	0	
>46-75	26	81,3	18	75	8	100	
>75	5	15,6	5	20,8	0	0	
Стадія							0,77
I	2	6,3	2	8,3	0	0	
II	17	53,1	12	50	5	62,5	
III	9	28,1	6	26	3	37,5	
IV	4	12,5	4	16,7	0	0	
pT (Пухлина)							*0,05
pT2	4	12,5	1	4,1	3	37,5	
pT3	25	78,1	20	83,4	5	62,5	
pT4	3	9,4	3	12,5	0	0	
pN (Лімфатичні вузли)							0,69
pN0	21	65,6	15	62,5	6	75	
pN1	8	25	7	29,2	1	12,5	
pN2	3	9,4	2	8,3	1	12,5	
M (Метастази)							0,29
M0	27	84,4	19	79,2	8	100	
M1	5	15,6	5	20,8	0	0	

Ступінь диф-ня							*0,04
G1	4	12,5	1	4,1	3	37,5	
G2	28	87,5	23	95,9	5	62,5	
ПСС							0,65
ПСС (≥50%)	9	28,1	6	25	3	37,5	
ПСС (<50%)	23	71,9	18	75	5	62,5	
ПІЛ							1
Група А (0-9%)	1	3,1	1	4,1	0	0	
Група В (10-39%)	10	31,3	8	33,4	2	25	
Група С (>40%)	21	65,6	15	62,5	6	75	
Статус MSI/MSS							0,59
MSS	29	90,6	22	91,6	7	87,5	
MSI-L	1	3,1	1	4,2	0	0	
MSI-H	2	6,3	1	4,2	1	12,5	

Примітка: *р-значення <0,05

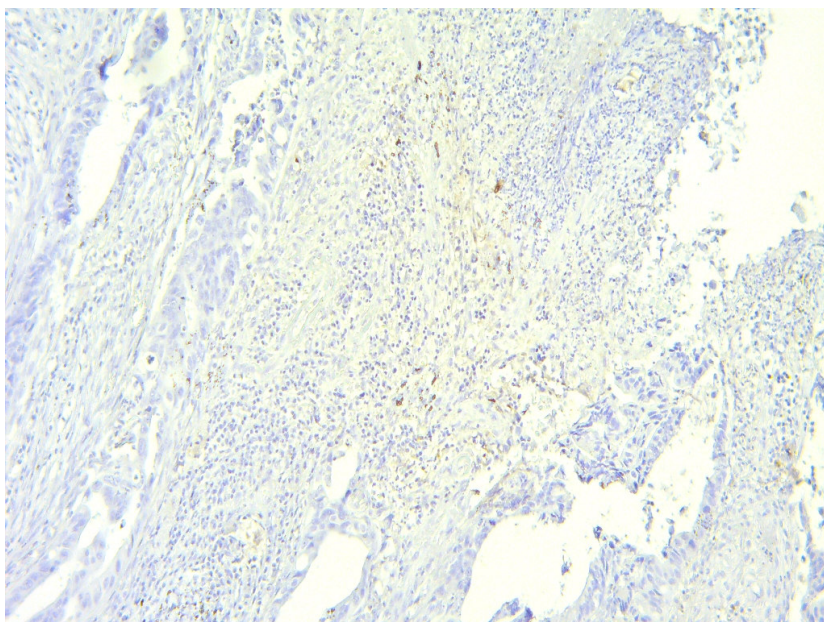
Таблиця 3.5.2.2

Асоціація експресії PD-L1 з інфільтрацією CD4+ та CD20+ лімфоцитами

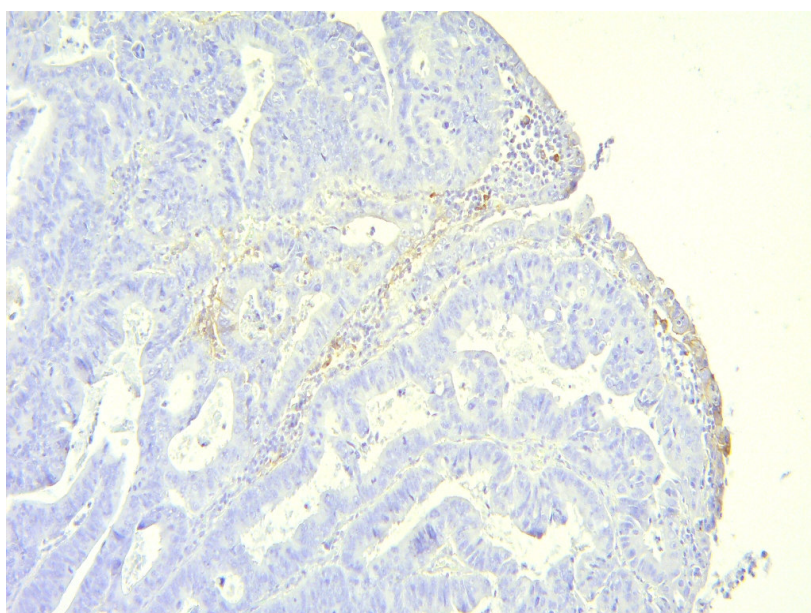
Параметр	Кількість						
	N	%	PD-L1 (CPS<1)	%	PD-L1 (CPS≥1)	%	p-value
Всього	16	100	11		5	25	
CD4+							*0,01
+(1-25)	3	18,75	3	27,3	0	0	
++(26-50)	6	37,5	6	54,5	0	0	
+++(>51)	7	43,75	2	18,2	5	100	
CD20+							0,06
+(1-25)	12	75	10	90,9	2	40	
++(26-50)	4	25	1	9,1	3	60	

Примітка: *р-значення <0,05

Відповідно до експресії PD-L1 пацієнтів було розділено на дві групи: група А – (CPS<1); група В – (CPS≥1), представлені на малюнках 3.5.2.1-3.5.2.2.



Мал. 3.5.2.1 Експресія PD-L1 група А – ($CPS < 1$), імуногістохімічне зафарбовування Clone (CAL10, StatLab, USA), $\times 100$.



Мал. 3.5.2.2 Експресія PD-L1 група В – ($CPS \geq 1$), імуногістохімічне зафарбовування Clone (CAL10, StatLab, USA), $\times 100$.

На основі отриманих даних було становлено статистично достовірну асоціацію експресії білка PD-L1 з наступними клініко-морфологічними ознаками: ступінь диференціювання пухлини ($p=0,03$), глибина пухлинної інвазії

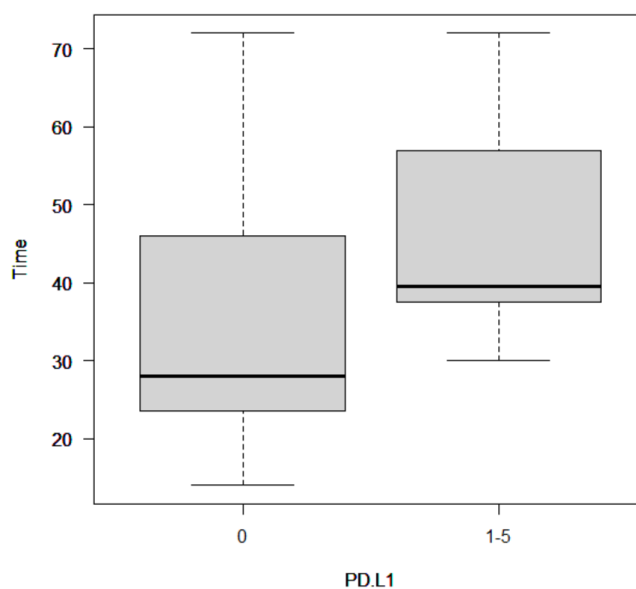
pT ($p=0,05$) та інфільтрація CD4⁺ пухлино-інфільтруючими лімфоцитами. Інші клініко-морфологічні ознаки не проявили статистично значущої асоціації з експресією PD-L1.

Було проведено односторонній дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) з метою оцінки впливу рівня експресії PD-L1 на тривалість виживаності пацієнтів. Виявлено статистично значущу різницю між групами ($F=5.29$; $p=0,028$), що вказує на вищий середній час виживаності у пацієнтів із підвищеною експресією PD-L1 ($CPS \geq 1$) порівняно з групою PD-L1 ($CPS < 1$) (табл. 3.5.2.3. та мал.3.5.2.1.).

Таблиця 3.5.2.3

Порівняння середнього часу виживаності залежно від рівня PD-L1 (ANOVA)

Група PD-L1	Середній час, дні	Стандартне відхилення	p-значення
PD-L1 ($CPS < 1$)	32.9	14.1	0.0286
PD-L1 ($CPS \geq 1$)	46.3	14.7	—



Малюнок 3.5.2.1 Коробковий (box-plot) графік залежності тривалості виживаності з рівнями експресії PD-L1

Тож, за результатами дисперсійного аналізу PD-L1 є потенційним прогностичним маркером, адже статистично значуща різниця між групами PD-L1(CPS<1) та PD-L1(CPS≥1) може вказувати на зв'язок між рівнем експресії PD-L1 та тривалістю життя. Асоціативні зв'язки експресії PD-L1 зі ступенем диференціювання пухлини та глибиною інвазії пухлини можуть відображати агресивність біологічної поведінки аденокарциноми товстої кишки. Визначення експресії даного маркера доцільно розглядати при плануванні таргетних опцій лікування пацієнтів з аденокарциномною товстої кишки.

Результати власних досліджень розділу 3 викладені в статтях [1, 2, 3] та апробовані на наукових форумах [4, 5, 6, 7]:

1. Zakhartseva, L., & Shkurupii, B. (2021). Tumor-infiltrating lymphocytes as easily accessible prognostic tool in adenocarcinoma of the colon. *Experimental oncology*, 43(4), 331–335. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.16991>
2. Shkurupii, B., & Zakhartseva, L. (2024). Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes and its association with clinical-morphological features of colon adenocarcinomas. *Experimental oncology*, 46(1), 45–52. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.01.045>
3. Роль пухлинного мікрооточення в прогнозуванні виживаності пацієнтів з аденокарциномною товстої кишки I–III стадій. Б.М. Шкурупій. 2024, Т. 14, № 2 (54): 1–6. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.54-2.32616
4. В.М. Shkurupii, S.V. Klymenko, L.M. Zakhartseva, B.T. Klimuk, L.A. Rybchenko, L.O. Poluben Frequency of KRAS mutation in patients with colorectal cancer in Ukraine. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкологія. 2019, Т21, №1:74.

5. Shkurupii B., Zakhartseva L., Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma as an additional prognostic tool for patient outcome assessment. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):45–46.
6. Shkurupii B., Role of Tumor-infiltrating lymphocytes and tumor strome in colorectal carcinoma for prognosis of patients outcome. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):8–9.
7. Zakhartseva L.M., Shkurupii B.M., The prognostic value of tumour – infiltrating lymphocytes in MSS/MSI adenocarcinomas of colon, stage II-IV. (36th European Congress of Pathology in Florence). Florence, Italy 7–11 September, 2024 (poster). 36th European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.207.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Захворюваність на карциноми товстої кишки є стабільно зростаючою для обох статей в усьому світі. Зараз КРР є третім за частотою діагнозом в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення, та другою причиною онкологічної смертності [21]. За даними статистики в Україні спостерігається аналогічна ситуація [25]. В Києві теж спостерігається тренд зростання захворюваності, який є лідером за темпами зростання – 34,3 на 100 000 населення. Негативною є тенденція діагностування КРР на більш пізніх стадіях (III-IV).

Аденокарцинома є найчастішим гістологічним підтипом товстокишкової локалізації [1]. Проте залежно від анатомічної локалізації, право- чи лівобічне розміщення, існують доволі помітні відмінності канцерогенетичних шляхів, прогнозу та загальної виживаності. Цей факт зумовлений особливостями розвитку товстої кишки в ембріогенезі [2, 3, 4, 5, 6]. Пухлини правобічної локалізації зазвичай мають більш прогностично несприятливий перебіг, частіше представлені більш агресивними гістологічними підтипами та нижчими рівнями диференціації пухлини [2, 3, 4]. Лівобічні пухлини вважаються більш прогностично сприятливими і в переважній більшості представлені аденокарциномами NOS (неспецифічного типу) з помірним ступенем диференціації пухлини [1]. Нажаль, гістологічний тип та ступінь диференціації, в тому числі стадія захворювання не завжди в повній мірі відображають увесь потенціал агресивності клінічного перебігу товстокишкових карцином лівобічної локалізації [171].

Підходи до лікування в основному ґрунтуються на стадії захворювання згідно класифікації TNM [144, 149]. Радикальним етапом лікування є хірургічне видалення пухлини, проте в подальшому постає питання про застосування ад'ювантної хіміотерапії [144, 149, 169]. Ключем до вибору режиму та тривалості застосування хіміотерапії є співставлення реальних переваг отриманих від застосування з ризиками розвитку побічних реакцій через значні рівні токсичності даного лікувального методу [155].

Тому метою нашого дослідження став пошук додаткових прогностичних факторів для аденокарцином товстої кишки лівобічної локалізації. Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання: дослідити клініко-морфологічні особливості аденокарциноми товстої кишки; визначити особливості пухлинного мікрооточення, а саме кількість пухлинної стромы та пухлино-інфільтруючих лімфоцитів; за допомогою імуногістохімічних досліджень визначити статус мікросателітної нестабільності (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), експресії білка PD-L1, та визначення субпопуляцій CD4⁺ та CD20⁺ лімфоцитів. Оцінити прогностичне значення визначених параметрів та їх взаємозв'язки. Задля виконання задач дослідження застосовано комплекс методів: гістологічний метод дослідження, імуногістохімічний метод та статистичний аналіз даних.

Ретроспективно-проспективне дослідження було виконано на резекційному матеріалі пацієнтів з діагнозом лівобічна аденокарцинома товстої кишки, які проходили лікування в КНП Київський міський онкологічний центр з 2009 по 2019 роки. Загальна кількість випадків склала n=236. Проведено вивчення гістологічних препаратів з визначенням їх морфологічних особливостей, а також вивчення історій захворювання даних пацієнтів з метою визначення структури та частоти захворюваності, вікового розподілу та визначення загальної виживаності.

З метою оцінки прогностичного значення особливостей пухлинного мікрооточення проведено визначення об'єму стромального компоненту (пухлино-стромальне співвідношення) і підрахунок інтенсивності імунного інфільтрату (кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів) для всіх зазначених випадків (n=236). Додатково проведено визначення статусу мікросателітної нестабільності для n=73 зразків (4 маркери – сумарно n=292 імуногістохімічні реакції).

Тож структурно віковий розподіл виглядає наступним чином: переважна більшість зразків аденокарцинома NOS – 222 випадки (94,1%); муциозна карцинома – 11 випадків (4,6%); і мерстнеподібно-клітинна карцинома – 3 випадки (1,3%). Розподіл за статтю майже рівномірний, з незначним

переваданню жіночої – жінок 132 (55,9%), а чоловіків 104 (44,1%) відповідно. Згідно структури вікового розподілу основна частка припадає на пацієнтів у віці 46-75% - 184 хворих (78%), старших 75 років було 45 випадків (19,1%), тих хто молодше 45 років всього лише 7 випадків (2,9%). Розподіл за стадією виглядав наступним чином: I стадія – 11 (4,7%); II стадія – 107 (27,5%); III стадія – 65 (27,5%); IV стадія – 53 (22,5%). Середня тривалість спостереження – 2,9 років (від 0,08 до 7,3 роки). З усіх 236 випадків померли 30,9% (73 пацієнти).

Загальна 5-річна виживаність залучених пацієнтів стратифікована відповідно до стадії: з I стадією склала $90,1\% \pm 8,6\%$; з II стадією – $86,0\% \pm 4,3\%$; з III стадією – $57,1\% \pm 9,2\%$; з IV стадією $13,4\% \pm 7,1\%$.

Визначення кількості пухлинної стромы (ПСС) було проведено з розподілом на 2 групи: група з великою часткою ПСС (стромальний компонент $\geq 50\%$), та група з низьким відсотком ПСС (строма $< 50\%$) [172]. Грунтуючись на отриманих результатах дослідження було визначено, щопухлино-стромальне співвідношення можна вважати незалежною прогностичною ознакою для карцином товстої кишки, зі статистично достовірно кращим прогнозом загальної виживаності для пухлин з малою кількістю стромы (низький ПСС $< 50\%$ стромы). При побудові кривих виживаності Каплана-Мейєра 1-річна загальна виживаність склала $89,5 \pm 3,5\%$ пухлин з високим ПСС (строма $\geq 50\%$) проти $96,9 \pm 1,8\%$ для пухлин з низьким ПСС ($< 50\%$); 3-річна загальна виживаність була $65,8\% \pm 5,8\%$ проти $91,6\% \pm 3,0\%$; 5-річна загальна виживаність становила $38,4 \pm 7,9\%$ проти $74,2 \pm 6,6\%$, відповідно. Статистично достовірно встановлено зв'язок загальної виживаності та відсотку стромы в пухлині ($p < 0,001$). На основі побудованих однофакторної та багатофакторних моделей Кокса встановлено статистично достовірно кращі показники загальної виживаності для пухлин з малим відсотком ПСС (стромальний компонент $< 50\%$) (КР 0.39, 95% ДІ 0.21-0.70, $p = 0,001$) відносно пухлин багатих стромою (високий ПСС – стромы $\geq 50\%$). Додатково становлена простота та відтворюваність методології оцінки пухлино-

стромального співвідношення – коефіцієнт Каппа-Коена становив 0,81, що свідчить про чудову узгодженість оцінок патологів.

Беззаперечно, в процесі канцерогенезу строма зазнає не менших трансформаційних змін, ніж епітеліальний компонент. Внаслідок цих змін строма здатна в подальшому впливати на посилення пухлинної прогресії [82]. Ключовими в цих процесах є пухлино-асоційовані фібробласти ПАФ. ПАФ здатні контролювати прогресію пухлинних клітин завдяки виділенню факторів росту, впливати на глибину та швидкість інвазії пухлини через ремоделювання позаклітинного матриксу (ПКМ) – або ущільнюючи строму, що оточує пухлину, чи навпаки «розрихлювати» за рахунок надмірної активації металопротеїназ [85, 88, 89]. Стан пухлинної стромы в значній мірі відповідальний за резистентність до хіміотерапії [86, 87]. Окрім того, активовані ПАФ можуть впливати на вивільнення IL-10, який пригнічує загальну популяцію Т-клітин, та проявляє імуносупресивну дію за рахунок активації клітин супресорів (Т-регуляторних клітин та клітин супресорів мієлоїдного походження (MDSC)) [88].

Кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) є іншим вагомим прогностичним фактором. Загальна виживаність для групи А (мала кількість ПЛ 0-9%): однорічна загальна виживаність – $79,3 \pm 4,3\%$, 3-річна виживаність склала $58,0 \pm 5,3\%$. Загальна виживаність для групи В (помірна кількість ПЛ 10-39%) становила: 1-річна – $91,5\% \pm 2,7\%$; 3-річна становила $78,5\% \pm 4,0\%$. Для групи С (висока кількість ПЛ >40%) загальна виживаність складала: 1-річна – $90,5 \pm 4,5\%$. Він статистично достовірно впливає на загальну виживаність пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки ($p < 0,001$). Згідно аналізу онофакторної та багатофакторної Коксівських моделей було встановлено наявність статистично значущого впливу пухлино-інфільтруючих лімфоцитів на загальну виживаність: зразки з помірним імунним інфільтратом, група В (ПЛ 10-39%) – (КР 0.57, 95% ДІ 0.34-0.96, $p=0.039$); зразки з масивною лімфоцитарною інфільтрацією – група С (ПЛ >40%) (КР 0.41, 95% ДІ 0.17-1.01, $p=0.054$). Додатково було проведено аналіз асоціативних зв'язків клініко-морфологічних

ознак з кількістю пухлиноінфільтруючих лімфоцитів та встановлено асоціативний зв'язок з віком ($p=0,028$), глибиною проростання пухлини ($p=0,015$), наявністю метастазів в лімфатичних вузлах ($p<0,001$) та наявністю віддалених метастазів ($p<0,001$). Простота застосування методу та хороша узгодженість між патологами статистично підтверджена за допомогою коефіцієнту Каппа-Коена.

Цілком логічним є вплив імунної реакції на поведінку пухлини. Тип цього впливу, промоторний чи супресивний, залежить від складу конкретних субпопуляцій лімфоцитів [107, 108]. Зокрема, CD8⁺ лімфоцити (цитотоксичні лімфоцити) є основою ефекторної ланки імунітету та напряду проявляють протипухлинну дію [108]. Проте, визначення субпопуляцій потребує як часових, так і фінансових затрат. На противагу, визначення загальної кількості пухлиноінфільтруючих лімфоцитів (у формі моноклеарного інфільтрату) може бути виконана під час рутинної діагностики, що зменшує навантаження на патолога та не впливає вартість діагностики. Виявлені асоціативні зв'язки допомагають глибше досягнути біологічну поведінку пухлини та більш детально прогнозувати перебіг.

У нашому дослідженні ми встановили обернений кореляційний зв'язок між статусом мікросателітної нестабільності та кількістю пухлиноінфільтруючих лімфоцитів. Це дещо відрізняється від літературних даних які свідчать про інтенсивну лімфоцитарну інфільтрацію в мікросателітно нестабільних пухлинах (MSI-High) [66, 129]. Проте, відмінність отриманих результатів можна пояснити наступним чином: переважна більшість мікросателітно нестабільних зразків в даному дослідженні була репрезентована на пізніх стадіях, а отже з високою вірогідністю зазнала імунного виснаження.

Для 16 зразків було проведено визначення CD4⁺ та CD20⁺ субпопуляцій лімфоцитів. Хоча побудувавши криві виживаності Каплана-Меєра не було виявлено статистично значущого впливу CD4⁺ лімфоцитів на загальну виживаність. Але при застосуванні логранкового-тренд тесту був встановлений

статистично значимий вплив даної субпопуляції лімфоцитів на градієнт виживаності, що свідчить про потенціал CD4⁺ лімфоцитів в якості прогностичного маркера. CD20⁺ лімфоцити також не проявили статистично значимого впливу на загальну виживаність ($p=0,31$). Проаналізувавши взаємозв'язки CD4⁺ та CD20⁺ субпопуляцій лімфоцитів з клініко-морфологічними характеристиками аденокарцином товстої кишки було виявлено статистично значиму асоціацію CD20⁺ лімфоцитів зі ступенем диференціювання ($p=0,05$), глибиною вrostання пухлини ($p=0,02$), стадією ($p=0,05$) та CD4⁺ лімфоцитами.

Експресія білка PD-L1 в зразках ($n=32$) аденокарцином товстої кишки була визначена за допомогою імуногістохімічного дослідження. Статистично значимим є вплив експресії PD-L1 на тривалість загальної виживаності ($p=0,028$). Методом Фішера встановлено асоціацію зі ступенем диференціювання пухлини ($p=0,03$), глибиною інвазії пухлини ($p=0,05$) та CD4⁺ лімфоцитами ($p=0,03$).

Лігування PD-L1 з PD-1 на поверхні лімфоцитів, зокрема Т-хелперів та Т-кілерів (CD4⁺ та CD20⁺) призводить інгібування активності даних клітин, в той же час відбувається активація Т-регуляторів та відповідно цей процес є базисом уникнення імунної відповіді пухлиною [112, 113, 114].

Згідно комплексної оцінки прогностичних маркерів для аденокарцином товстої кишки, було статистично достовірно підтверджено, що кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, пухлино-стромальне співвідношення, наявність метастазів в лімфатичних вузлах та віддалених метастазів є ключовими прогностичними ознаками. Визначення експресії PD-L1 має окремо розглядатись як додатковий прогностичний маркер у випадках коли планується специфічна таргетна терапія.

ВИСНОВКИ

1. Переважна більшість карцином товстої кишки лівобічної локалізації на момент встановлення діагнозу представлена пухлинами II-III стадії (72,8%), що зумовлює низькі показники загальної 5-річної виживаності пацієнтів з II стадією – $86,0\% \pm 4,3\%$ та III стадією – $57,1\% \pm 9,2\%$ та зумовлює необхідність розробки більш удосконалених підходів до діагностики й лікування.
2. Серед карцином товстої кишки переважають лівобічні карциноми ($>80\%$). У 94,1% це аденокарциноми NOS (неспецифічного типу) з помірним ступенем диференціювання.
3. Доведено, що пухлино-стромальне співвідношення є незалежним прогностичним фактором для аденокарцином товстої кишки з достовірно кращими показниками загальної виживаності пацієнтів з пухлинами, що мають менший відсоток строми ($<50\%$) (багатофакторний аналіз Сох-регресії з поетапним відбором найбільш значущих критеріїв за Акаїке $p=0,001$). Високий рівень узгодженості між патологами (коефіцієнт Каппа-Коена 0,81) вказує на простоту імплементації оцінювання даного показника в повсякденну практику патолога.
4. Встановлено, що кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в аденокарциномах товстої кишки є переконливим незалежним прогностичним фактором (багатофакторний аналіз Сох-регресії з поетапним відбором найбільш значущих критеріїв за Акаїке $p=0,039$). Відсутність або мала кількість (ПІЛ 0-9%) пухлино-інфільтруючих лімфоцитів є індикатором гіршого прогнозу в плані загальної виживаності пацієнтів.
5. Кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів асоційована зі статусом мікросателітної нестабільності MSI/MSS, а також глибиною інвазії

пухлини, наявністю метастазів в лімфатичних вузлах та віддаленими метастазами.

6. Встановлено, що визначення субпопуляцій CD4⁺ та CD20⁺ не має прямого прогностичного значення. Проте існує тренд до покращення загальної виживаності пацієнтів з більшою кількістю CD4⁺ лімфоцитарного інфільтрату в пухлині (Логранк тренд-тест $p=0,03$). Існує асоціація CD20⁺ лімфоцитів зі стадією, глибиною інвазії пухлини, ступенем диференціювання G та CD4⁺ лімфоцитами.
7. З'ясовано, що експресія білка PD-L1 корелює з тривалішим періодом загальної виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки (дисперсійний аналіз ANOVA $F=5.29$; $p=0,028$). Експресія білка PD-L1 асоційована зі ступенем диференціювання та глибиною інвазії пухлини, що може відображати біологічну агресивність пухлини.
8. Розроблено інтегровану шкалу оцінки індивідуального ризику пацієнтів, що ґрунтується на сукупності незалежних прогностичних факторів - статус лімфатичних вузлів pN, кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів та пухлино-стромального співвідношення. Кожній з ознак присвоєно визначену оціночну категорію з відповідною кількістю балів, пропорційною ступеню його асоціації з ризиком смерті. Загальна сума балів дає можливість стратифікувати пацієнтів за рівнем індивідуального ризику.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. В пухлинах аденокарцином товстої кишки під час рутинного діагностичного гістологічного дослідження є доцільним визначення таких додаткових морфологічних параметрів як пухлино-стромальне співвідношення та кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Методологія визначення є простою, легко відтворюваною, завдяки високому рівню погодженості між патологами під час оцінювання, та не вимагає додаткових економічних та часових затрат.
2. Інтегровану шкалу оцінки індивідуального ризику клінічного перебігу аденокарцином товстої кишки розроблену на основі трьох незалежних прогностичних ознак можливо застосовувати в клінічній практиці з метою покращення прогнозування клінічного перебігу захворювання та подальшого прийняття обґрунтованого рішення про призначення ад'ювантної хіміотерапії, що в свою чергу позитивно вплине на якість життя хворих та показники загальної виживаності.
3. Визначення експресії PD-L1 може бути доцільним не лише у випадках коли розглядається опція лікування таргетними препаратами, а й як додатковий маркер прогнозування агресивності перебігу аденокарцином товстої кишки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, & International Academy of Pathology. (2019). WHO classification of tumors. Digestive system tumors: WHO classification of tumors, volume 1 (D. E. Elder, Ed.; 1st ed.). IARC.
2. Jess, P., Hansen, I. O., Gammorg, M., Jess, T., & Danish Colorectal Cancer Group (2013). A nationwide Danish cohort study challenging the categorisation into right-sided and left-sided colon cancer. *BMJ open*, 3(5), e002608. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002608>
3. Benedix, F., Kube, R., Meyer, F., Schmidt, U., Gastinger, I., Lippert, H., & Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group (2010). Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Diseases of the colon and rectum*, 53(1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4>
4. Suttie, S. A., Shaikh, I., Mullen, R., Amin, A. I., Daniel, T., & Yalamarthi, S. (2011). Outcome of right- and left-sided colonic and rectal cancer following surgical resection. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 13(8), 884–889. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2010.02356.x>
5. Nawa, T., Kato, J., Kawamoto, H., Okada, H., Yamamoto, H., Kohno, H., Endo, H., & Shiratori, Y. (2008). Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(3), 418–423. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04923.x>
6. Kostouros, A., Koliarakis, I., Natsis, K., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A., & Tsiaoussis, J. (2020). Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review). *International journal of molecular medicine*, 46(1), 27–57. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4583>

7. Menon G, Cagir B. Colon Cancer. [Updated 2024 Dec 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
8. Garutti, M., Foffano, L., Mazzeo, R., Michelotti, A., Da Ros, L., Viel, A., Miolo, G., Zambelli, A., & Puglisi, F. (2023). Hereditary Cancer Syndromes: A Comprehensive Review with a Visual Tool. *Genes*, 14(5), 1025. <https://doi.org/10.3390/genes14051025>
9. Kanth, P., Grimmett, J., Champine, M., Burt, R., & Samadder, N. J. (2017). Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *The American journal of gastroenterology*, 112(10), 1509–1525. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.212>
10. Fearnhead, N. S., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. (2001). The ABC of APC. *Human molecular genetics*, 10(7), 721–733. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.721>
11. Arends M. J. (2013). Pathways of colorectal carcinogenesis. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 21(2), 97–102. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31827ea79e>
12. Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 469(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
13. Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>
14. Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., Waye, J. D., Schapiro, M., Bond, J. H., & Panish, J. F. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *The National Polyp*

Study Workgroup. The New England journal of medicine, 329(27), 1977–1981.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292701>

15. Fearon E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. Annual review of pathology, 6, 479–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>

16. Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology, 138(6), 2059–2072.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>

17. Benson, A. B., Venook, A. P., Al-Hawary, M. M., Arain, M. A., Chen, Y.-J., Ciombor, K. K., Cohen, S., Cooper, H. S., Deming, D., Farkas, L., Garrido-Laguna, I., Grem, J. L., Gunn, A., Hecht, J. R., Hoffe, S., Hubbard, J., Hunt, S., Johung, K. L., Kirilcuk, N., ... Gurski, L. A. (2021). Colon Cancer, version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 19(3), 329–359. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0012>

18. Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(15), 8681–8686.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8681>

19. Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G. J., Kraft, P., Loda, M., & Fuchs, C. S. (2007). Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 9(3), 305–314. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060170>

20. Nian, J., Sun, X., Ming, S., Yan, C., Ma, Y., Feng, Y., Yang, L., Yu, M., Zhang, G., & Wang, X. (2017). Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clinical and translational gastroenterology, 8(1), e216. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.66>

21. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
22. Robb, K., Stubbings, S., Ramirez, A., Macleod, U., Austoker, J., Waller, J., Hiom, S., & Wardle, J. (2009). Public awareness of cancer in Britain: a population-based survey of adults. *British journal of cancer*, 101 Suppl 2(Suppl 2), S18–S23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605386>
23. Quaife, S. L., Forbes, L. J., Ramirez, A. J., Brain, K. E., Donnelly, C., Simon, A. E., & Wardle, J. (2014). Recognition of cancer warning signs and anticipated delay in help-seeking in a population sample of adults in the UK. *British journal of cancer*, 110(1), 12–18. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.684>
24. Svensson, E., Grotmol, T., Hoff, G., Langmark, F., Norstein, J., & Tretli, S. (2002). Trends in colorectal cancer incidence in Norway by gender and anatomic site: an age-period-cohort analysis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11(5), 489–495. <https://doi.org/10.1097/00008469-200210000-00012>
25. Бюлетень Національного канцер-реєстру №23 – «Рак в Україні, 2018-2019».
26. Gupta S. (2022). Screening for Colorectal Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 36(3), 393–414. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.02.001>
27. Yeo, H., Betel, D., Abelson, J. S., Zheng, X. E., Yantiss, R., & Shah, M. A. (2017). Early-onset Colorectal Cancer is Distinct From Traditional Colorectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*, 16(4), 293–299.e6. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.06.002>

28. O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Liu, J. H., Etzioni, D. A., Livingston, E. H., & Ko, C. Y. (2003). Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *The American surgeon*, 69(10), 866–872.
29. Chen, F. W., Sundaram, V., Chew, T. A., & Ladabaum, U. (2017). Advanced-Stage Colorectal Cancer in Persons Younger Than 50 Years Not Associated With Longer Duration of Symptoms or Time to Diagnosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 15(5), 728–737.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.10.038>
30. Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. (2009). Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59(6), 366–378. <https://doi.org/10.3322/caac.20038>
31. Gonzalez-Gutierrez, L., Motiño, O., Barriuso, D., de la Puente-Aldea, J., Alvarez-Frutos, L., Kroemer, G., Palacios-Ramirez, R., & Senovilla, L. (2024). Obesity-Associated Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 25(16), 8836. <https://doi.org/10.3390/ijms25168836>
32. Aleksandrova, K., Nimptsch, K., & Pischon, T. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5(1), 61–77. <https://doi.org/10.2741/e596>
33. Kang, H. W., Kim, D., Kim, H. J., Kim, C. H., Kim, Y. S., Park, M. J., Kim, J. S., Cho, S. H., Sung, M. W., Jung, H. C., Lee, H. S., & Song, I. S. (2010). Visceral obesity and insulin resistance as risk factors for colorectal adenoma: a cross-sectional, case-control study. *The American journal of gastroenterology*, 105(1), 178–187. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.541>
34. Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., & Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of

published studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(9), 1958–1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>

35. Mizoue, T., Inoue, M., Wakai, K., Nagata, C., Shimazu, T., Tsuji, I., Otani, T., Tanaka, K., Matsuo, K., Tamakoshi, A., Sasazuki, S., Tsugane, S., & Research Group for Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan (2008). Alcohol drinking and colorectal cancer in Japanese: a pooled analysis of results from five cohort studies. *American journal of epidemiology*, 167(12), 1397–1406. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn073>

36. Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., & Soerjomataram, I. (2021). Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients*, 13(9), 3173. <https://doi.org/10.3390/nu13093173>

37. Wang, F., Wu, K., Li, Y., Song, R., Wu, Y., Zhang, X., Song, M., Liang, L., Smith-Warner, S. A., Giovannucci, E. L., & Willett, W. C. (2021). Association of folate intake and colorectal cancer risk in the postfortification era in US women. *The American journal of clinical nutrition*, 114(1), 49–58. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab035>

38. Gibson, T. M., Weinstein, S. J., Pfeiffer, R. M., Hollenbeck, A. R., Subar, A. F., Schatzkin, A., Mayne, S. T., & Stolzenberg-Solomon, R. (2011). Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *The American journal of clinical nutrition*, 94(4), 1053–1062. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.002659>

39. Ma, Y., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Liu, Z., & Qin, H. (2011). Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(28), 3775–3782. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.7566>

40. McCullough, M. L., Zoltick, E. S., Weinstein, S. J., Fedirko, V., Wang, M., Cook, N. R., Eliassen, A. H., Zeleniuch-Jacquotte, A., Agnoli, C., Albanes, D., Barnett, M. J.,

Buring, J. E., Campbell, P. T., Clendenen, T. V., Freedman, N. D., Gapstur, S. M., Giovannucci, E. L., Goodman, G. G., Haiman, C. A., Ho, G. Y. F., ... Smith-Warner, S. A. (2019). Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(2), 158–169. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy087>

41. Triantafillidis, J. K., Nasioulas, G., & Kosmidis, P. A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer research*, 29(7), 2727–2737.

42. Jess, T., Loftus, E. V., Jr, Velayos, F. S., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., Smyrk, T. C., Schleck, C. D., Tremaine, W. J., Melton, L. J., 3rd, Munkholm, P., & Sandborn, W. J. (2006). Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology*, 130(4), 1039–1046. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.037>

43. Christopher, D. M., Fletcher, M. D., & Frcpath, I. (n.d.). *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 2 Volume Set. FRCPath ISBN, 492–493.

44. Bosman, F. T., Carneiro, F., & Hruban, R. (2010). *WHO classification of tumours of the digestive system*. IARC Press.

45. Hosseini, S., Bananzadeh, A. M., Salek, R., Zare-Bandamiri, M., Kermani, A. T., & Mohammadianpanah, M. (2017). Prognostic Significance of Mucinous Histologic Subtype on Oncologic Outcomes in Patients With Colorectal Cancer. *Annals of coloproctology*, 33(2), 57–63. <https://doi.org/10.3393/ac.2017.33.2.57>

46. Park, J. S., Huh, J. W., Park, Y. A., Cho, Y. B., Yun, S. H., Kim, H. C., Lee, W. Y., & Chun, H. K. (2015). Prognostic comparison between mucinous and nonmucinous adenocarcinoma in colorectal cancer. *Medicine*, 94(15), e658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000658>

47. Reynolds, I. S., O'Connell, E., Fichtner, M., McNamara, D. A., Kay, E. W., Prehn, J. H. M., Furney, S. J., & Burke, J. P. (2019). Mucinous adenocarcinoma of the colon and rectum: A genomic analysis. *Journal of surgical oncology*, 120(8), 1427–1435. <https://doi.org/10.1002/jso.25764>
48. Luo, C., Cen, S., Ding, G., & Wu, W. (2019). Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. *Cancer communications (London, England)*, 39(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40880-019-0361-0>
49. Song, G.A., Deng, G., Bell, I., Kakar, S., Sleisenger, M.H., & Kim, Y.S. (2005). Mucinous carcinomas of the colorectum have distinct molecular genetic characteristics. *International Journal of Oncology*, 26, 745-750. <https://doi.org/10.3892/ijo.26.3.745>
50. Numata, M., Shiozawa, M., Watanabe, T., Tamagawa, H., Yamamoto, N., Morinaga, S., Watanabe, K., Godai, T., Oshima, T., Fujii, S., Kunisaki, C., Rino, Y., Masuda, M., & Akaike, M. (2012). The clinicopathological features of colorectal mucinous adenocarcinoma and a therapeutic strategy for the disease. *World journal of surgical oncology*, 10, 109. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-109>
51. Glasgow, S. C., Yu, J., Carvalho, L. P., Shannon, W. D., Fleshman, J. W., & McLeod, H. L. (2005). Unfavourable expression of pharmacologic markers in mucinous colorectal cancer. *British journal of cancer*, 92(2), 259–264. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602330>
52. Mekenkamp, L. J., Heesterbeek, K. J., Koopman, M., Tol, J., Teerenstra, S., Venderbosch, S., Punt, C. J., & Nagtegaal, I. D. (2012). Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(4), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.004>
53. Hyngstrom, J. R., Hu, C. Y., Xing, Y., You, Y. N., Feig, B. W., Skibber, J. M., Rodriguez-Bigas, M. A., Cormier, J. N., & Chang, G. J. (2012). Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the

National Cancer Data Base. *Annals of surgical oncology*, 19(9), 2814–2821.
<https://doi.org/10.1245/s10434-012-2321-7>

54. Hartman, D. J., Nikiforova, M. N., Chang, D. T., Chu, E., Bahary, N., Brand, R. E., Zureikat, A. H., Zeh, H. J., Choudry, H., & Pai, R. K. (2013). Signet ring cell colorectal carcinoma: a distinct subset of mucin-poor microsatellite-stable signet ring cell carcinoma associated with dismal prognosis. *The American journal of surgical pathology*, 37(7), 969–977. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182851e2b>

55. Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2016). Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific reports*, 6, 29765. <https://doi.org/10.1038/srep29765>

56. Wang, X., Zhang, H., & Lu, Y. (2022). Breast metastasis of signet ring cell carcinoma from the colon: a case report. *World journal of surgical oncology*, 20(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02840-7>

57. Tanaka, Y., Chino, O., Kajiwarra, H., Hanashi, T., Nakamura, T., & Makuuchi, H. (2023). A rare case of esophageal metastasis from signet-ring cell carcinoma of the cecum. *Surgical case reports*, 9(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s40792-023-01768-8>

58. Giacomini, P. G., Santeusano, G., Alessandrini, M., & Bruno, E. (1998). Laryngeal metastasis from a signet ring cell carcinoma of the colon. A case report and review of the literature. *Anales otorrinolaringologicos ibero-americanos*, 25(5), 463–470.

59. Bacorn, C., & Lin, L. K. (2020). Rare Signet Ring Cell Adenocarcinoma of the Colon Metastasis to the Orbit. *Case reports in ophthalmological medicine*, 2020, 2940579. <https://doi.org/10.1155/2020/2940579>

60. Thota, R., Fang, X., & Subbiah, S. (2014). Clinicopathological features and survival outcomes of primary signet ring cell and mucinous adenocarcinoma of colon:

retrospective analysis of VACCR database. *Journal of gastrointestinal oncology*, 5(1), 18–24. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2013.051>

61. Edge, S. B., Byrd, D. R., & Compton, C. C. (2010). *Compton CC, et al. AJCC Cancer Staging Manual*. Springer.

62. Jabbal, I. S., Nagarajan, A., Rivera, C., Yaghi, M., Liang, H., Nahleh, Z., Bejarano, P., Berho, M., & Wexner, S. (2022). Medullary carcinoma of the colon: A comprehensive analysis of the National Cancer Database. *Surgical oncology*, 45, 101856. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2022.101856>

63. Rüschoff, J., Dietmaier, W., Lüttges, J., Seitz, G., Bocker, T., Zirngibl, H., Schlegel, J., Schackert, H. K., Jauch, K. W., & Hofstaedter, F. (1997). Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *The American journal of pathology*, 150(5), 1815–1825.

64. Knox, R. D., Luey, N., Sioson, L., Kedziora, A., Clarkson, A., Watson, N., Toon, C. W., Cussigh, C., Pincott, S., Pillinger, S., Salama, Y., Evans, J., Percy, J., Schnitzler, M., Engel, A., & Gill, A. J. (2015). Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Annals of surgical oncology*, 22(9), 2988–2996. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4355-5>

65. Jessurun, J., Romero-Guadarrama, M., & Manivel, J. C. (1999). Medullary adenocarcinoma of the colon: clinicopathologic study of 11 cases. *Human pathology*, 30(7), 843–848. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90146-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90146-6)

66. Gómez-Álvarez, M. A., Lino-Silva, L. S., Salcedo-Hernández, R. A., Padilla-Rosciano, A., Ruiz-García, E. B., López-Basave, H. N., Calderillo-Ruiz, G., Aguilar-Romero, J. M., Domínguez-Rodríguez, J. A., Herrera-Gómez, Á., & Meneses-García, A. (2017). Medullary colonic carcinoma with microsatellite instability has lower survival compared with conventional colonic adenocarcinoma with microsatellite instability. *Przegląd gastroenterologiczny*, 12(3), 208–214. <https://doi.org/10.5114/pg.2016.64740>

67. Scott, N., West, N. P., Cairns, A., & Rotimi, O. (2021). Is medullary carcinoma of the colon underdiagnosed? An audit of poorly differentiated colorectal carcinomas in a large national health service teaching hospital. *Histopathology*, 78(7), 963–969. <https://doi.org/10.1111/his.14310>
68. Fatima, Z., Sharma, P., Youssef, B., & Krishnan, K. (2021). Medullary Carcinoma of the Colon: A Histopathologic Challenge. *Cureus*, 13(6), e15831. <https://doi.org/10.7759/cureus.15831>
69. García-Solano, J., Pérez-Guillermo, M., Conesa-Zamora, P., Acosta-Ortega, J., Trujillo-Santos, J., Cerezuela-Fuentes, P., & Mäkinen, M. J. (2010). Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Human pathology*, 41(10), 1359–1368. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.04.002>
70. Longacre, T. A., & Fenoglio-Preiser, C. M. (1990). Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *The American journal of surgical pathology*, 14(6), 524–537. <https://doi.org/10.1097/00000478-199006000-00003>
71. Odze R. D. (2021). "Sessile Serrated Lesion": The Art and Science of Naming a Disorder. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 145(10), 1190–1191. <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0134-LE>
72. Sano, W., Sano, Y., Iwatate, M., Hasuike, N., Hattori, S., Kosaka, H., Ikumoto, T., Kotaka, M., & Fujimori, T. (2015). Prospective evaluation of the proportion of sessile serrated adenoma/polyps in endoscopically diagnosed colorectal polyps with hyperplastic features. *Endoscopy international open*, 3(4), E354–E358. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1391948>
73. Sano, W., Hirata, D., Teramoto, A., Iwatate, M., Hattori, S., Fujita, M., & Sano, Y. (2020). Serrated polyps of the colon and rectum: Remove or not?. *World journal of gastroenterology*, 26(19), 2276–2285. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i19.2276>

74. Abdeljawad, K., Vemulapalli, K. C., Kahi, C. J., Cummings, O. W., Snover, D. C., & Rex, D. K. (2015). Sessile serrated polyp prevalence determined by a colonoscopist with a high lesion detection rate and an experienced pathologist. *Gastrointestinal endoscopy*, 81(3), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.04.064>
75. Crockett, S. D., & Nagtegaal, I. D. (2019). Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*, 157(4), 949–966.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.041>
76. McCarthy, A. J., Serra, S., & Chetty, R. (2019). Traditional serrated adenoma: an overview of pathology and emphasis on molecular pathogenesis. *BMJ open gastroenterology*, 6(1), e000317. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2019-000317>
77. Amin, M. B., Edge, S., Greene, F. L., Schilsky, R. L., Byrd, D. R., Gaspar, L. E., Washington, M. K., Gershenwald, J. E., Compton, C. C., & Hess, K. R. (Eds.). (2017). *AJCC Cancer Staging Manual* (8th ed.). Springer International Publishing.
78. Kim, H. S., Kim, K. M., Lee, S. B., Kim, G. R., Han, Y. D., Cho, M. S., Hur, H., Lee, K. Y., Kim, N. K., & Min, B. S. (2019). Clinicopathological and biomolecular characteristics of stage IIB/IIC and stage IIIA colon cancer: Insight into the survival paradox. *Journal of surgical oncology*, 120(3), 423–430. <https://doi.org/10.1002/jso.25515>
79. Bader, J. E., Voss, K., & Rathmell, J. C. (2020). Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Molecular cell*, 78(6), 1019–1033. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.034>
80. Valkenburg, K. C., de Groot, A. E., & Pienta, K. J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(6), 366–381. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0007-1>

81. Chen, Y., Zheng, X., & Wu, C. (2021). The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology*, 12, 792691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.792691>
82. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2019). Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 840. <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
83. Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(11), 839–849. <https://doi.org/10.1038/nrc1477>
84. Tripathi, M., Billet, S., & Bhowmick, N. A. (2012). Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell adhesion & migration*, 6(3), 231–235. <https://doi.org/10.4161/cam.20419>
85. Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American journal of cancer research*, 1(4), 482–497.
86. Coulson, R., Liew, S. H., Connelly, A. A., Yee, N. S., Deb, S., Kumar, B., Vargas, A. C., O'Toole, S. A., Parslow, A. C., Poh, A., Putoczki, T., Morrow, R. J., Alorro, M., Lazarus, K. A., Yeap, E. F. W., Walton, K. L., Harrison, C. A., Hannan, N. J., George, A. J., Clyne, C. D., ... Chand, A. L. (2017). The angiotensin receptor blocker, Losartan, inhibits mammary tumor development and progression to invasive carcinoma. *Oncotarget*, 8(12), 18640–18656. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15553>
87. Ritchie, J. P., Ramani, V. C., Ren, Y., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Penco, S., Pisano, C., Carminati, P., Tortoreto, M., Zunino, F., Vlodavsky, I., Sanderson, R. D., & Yang, Y. (2011). SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6), 1382–1393. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2476>

88. Feng, S., AgoulNIK, I. U., Bogatcheva, N. V., Kamat, A. A., Kwabi-Addo, B., Li, R., Ayala, G., Ittmann, M. M., & AgoulNIK, A. I. (2007). Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1695–1702. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2492>
89. Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *The Journal of experimental medicine*, 211(8), 1503–1523. <https://doi.org/10.1084/jem.20140692>
90. Zakhartseva, L. M., & Yanovytska, M. A. (2021). PROGNOSTIC VALUE OF TUMOR STROMA RATIO IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, 74(3 cz 2), 565–571.
91. Smit, M. A., Philipsen, M. W., Postmus, P. E., Putter, H., Tollenaar, R. A., Cohen, D., & Mesker, W. E. (2020). The prognostic value of the tumor-stroma ratio in squamous cell lung cancer, a cohort study. *Cancer treatment and research communications*, 25, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2020.100247>
92. Li, H., Yuan, S. L., Han, Z. Z., Huang, J., Cui, L., Jiang, C. Q., & Zhang, Y. (2017). Prognostic significance of the tumor-stroma ratio in gallbladder cancer. *Neoplasma*, 64(4), 588–593. https://doi.org/10.4149/neo_2017_413
93. Wang, K., Ma, W., Wang, J., Yu, L., Zhang, X., Wang, Z., Tan, B., Wang, N., Bai, B., Yang, S., Liu, H., Zhu, S., & Cheng, Y. (2012). Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(9), 1457–1461. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318260dfe8>
94. Wakeham, K., Murray, L., Muirhead, R., Hawkins, M. A., Sebag-Montefiore, D., Brown, S., Murphy, L., Thomas, G., Bell, S., Whibley, M., Morgan, C., Sleight, K., & Gilbert, D. C. (2021). Multicentre Investigation of Prognostic Factors Incorporating p16 and Tumour Infiltrating Lymphocytes for Anal Cancer After Chemoradiotherapy.

Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)), 33(10), 638–649.
<https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.04.015>

95. Heikkinen, I., Bello, I. O., Wahab, A., Hagström, J., Haglund, C., Coletta, R. D., Nieminen, P., Mäkitie, A. A., Salo, T., Leivo, I., & Almangush, A. (2019). Assessment of Tumor-infiltrating Lymphocytes Predicts the Behavior of Early-stage Oral Tongue Cancer. *The American journal of surgical pathology*, 43(10), 1392–1396.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001323>

96. Kilic, A., Landreneau, R. J., Luketich, J. D., Pennathur, A., & Schuchert, M. J. (2011). Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *The Journal of surgical research*, 167(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.08.029>

97. Moore, O. S., Jr, & Foote, F. W., Jr (1949). The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer*, 2(4), 635–642.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(194907\)2:4<635::aid-cnrcr2820020411>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(194907)2:4<635::aid-cnrcr2820020411>3.0.co;2-q)

98. Loi, S., Michiels, S., Adams, S., Loibl, S., Budczies, J., Denkert, C., & Salgado, R. (2021). The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(10), 1236–1244.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.07.007>

99. Criscitiello, C., Vingiani, A., Maisonneuve, P., Viale, G., Viale, G., & Curigliano, G. (2020). Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 183(2), 347–354. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05771-7>

100. Rizzo, A., & Ricci, A. D. (2022). Biomarkers for breast cancer immunotherapy: PD-L1, TILs, and beyond. *Expert opinion on investigational drugs*, 31(6), 549–555.
<https://doi.org/10.1080/13543784.2022.2008354>

101. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., Sparano, J., ... International TILs Working Group 2014 (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
102. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., Sparano, J., ... International TILs Working Group 2014 (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
103. Dülger, Ö., İlvan, Ş., & Turna, Z. H. (2020). Prognostic Factors and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer. *European journal of breast health*, 16(4), 276–281. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2020.5305>
104. Němejcová, K., Tichá, I., Bártů, M., Kodet, O., Důra, M., Jakša, R., Michálková, R., & Dundr, P. (2019). Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 32(3), 412–423. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12757>
105. Klintrup, K., Mäkinen, J. M., Kauppila, S., Väre, P. O., Melkko, J., Tuominen, H., Tuppurainen, K., Mäkelä, J., Karttunen, T. J., & Mäkinen, M. J. (2005). Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(17), 2645–2654. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.07.017>

106. Wang, Q., Shen, X., An, R., Bai, J., Dong, J., Cai, H., Zhu, H., Zhong, W., Chen, W., Liu, A., & Du, J. (2022). Peritumoral tertiary lymphoid structure and tumor stroma percentage predict the prognosis of patients with non-metastatic colorectal cancer. *Frontiers in immunology*, 13, 962056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962056>
107. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (New York, N.Y.), 313(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
108. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., & Ohtani, H. (1998). CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*, 58(16), 3491–3494.
109. Page, D. B., Broeckx, G., Jahangir, C. A., Verbandt, S., Gupta, R. R., Thagaard, J., Khiroya, R., Kos, Z., Abduljabbar, K., Acosta Haab, G., Acs, B., Akturk, G., Almeida, J. S., Alvarado-Cabrero, I., Azmoudeh-Ardalan, F., Badve, S., Baharun, N. B., Bellolio, E. R., Bheemaraju, V., Blenman, K. R., ... Specht Stovgaard, E. (2023). Spatial analyses of immune cell infiltration in cancer: current methods and future directions: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *The Journal of pathology*, 260(5), 514–532. <https://doi.org/10.1002/path.6165>
110. Makhoulouf, S., Wahab, N., Toss, M., Ibrahim, A., Lashen, A. G., Atallah, N. M., Ghannam, S., Jahanifar, M., Lu, W., Graham, S., Mongan, N. P., Bilal, M., Bhalerao, A., Snead, D., Minhas, F., Raza, S. E. A., Rajpoot, N., & Rakha, E. (2023). Evaluation of tumour infiltrating lymphocytes in luminal breast cancer using artificial intelligence. *British journal of cancer*, 129(11), 1747–1758. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02451-3>

111. Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D. M., Okumura, K., Azuma, M., & Yagita, H. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 169(10), 5538–5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>
112. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
113. Liang, S. C., Latchman, Y. E., Buhlmann, J. E., Tomczak, M. F., Horwitz, B. H., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2003). Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology*, 33(10), 2706–2716. <https://doi.org/10.1002/eji.200324228>
114. Yao, S., & Chen, L. (2014). PD-1 as an immune modulatory receptor. *Cancer journal* (Sudbury, Mass.), 20(4), 262–264. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000060>
115. Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L., & Boussiotis, V. A. (2012). Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Science signaling*, 5(230), ra46. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002796>
116. Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological reviews*, 222, 129–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>
117. Jia, W., Guo, H., Wang, M., Li, J., Yu, J., Zhu, H., & Wu, G. (2023). High post-chemotherapy TIL and increased CD4⁺TIL are independent prognostic factors of

surgically resected NSCLC following neoadjuvant chemotherapy. *MedComm*, 4(1), e213. <https://doi.org/10.1002/mco2.213>

118. McArdle, P. A., Canna, K., McMillan, D. C., McNicol, A. M., Campbell, R., & Underwood, M. A. (2004). The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer. *British journal of cancer*, 91(3), 541–543. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601943>

119. Hong, S., Zhang, Z., Liu, H., Tian, M., Zhu, X., Zhang, Z., Wang, W., Zhou, X., Zhang, F., Ge, Q., Zhu, B., Tang, H., Hua, Z., & Hou, B. (2018). B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4⁺ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity*, 49(4), 695–708.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.012>

120. Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., van Schoiack, A., Lövgren, K., Warren, S., Jirström, K., Olsson, H., Pietras, K., Ingvar, C., Isaksson, K., Schadendorf, D., Schmidt, H., ... Jönsson, G. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*, 577(7791), 561–565. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1914-8>

121. Michaud, D., Steward, C. R., Mirlekar, B., & Pylayeva-Gupta, Y. (2021). Regulatory B cells in cancer. *Immunological reviews*, 299(1), 74–92. <https://doi.org/10.1111/imr.12939>

122. Griss, J., Bauer, W., Wagner, C., Simon, M., Chen, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., Maurer-Granofszky, M., Roka, F., Penz, T., Bock, C., Zhang, G., Herlyn, M., Glatz, K., Läubli, H., Mertz, K. D., Petzelbauer, P., Wiesner, T., Hartl, M., Pickl, W. F., Somasundaram, R., ... Wagner, S. N. (2019). B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nature communications*, 10(1), 4186. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12160-2>

123. Brown, J. R., Wimberly, H., Lannin, D. R., Nixon, C., Rimm, D. L., & Bossuyt, V. (2014). Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(23), 5995–6005. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1622>
124. Mahmoud, S. M., Lee, A. H., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2012). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast cancer research and treatment*, 132(2), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1620-1>
125. Thompson, E., Taube, J. M., Elwood, H., Sharma, R., Meeker, A., Warzecha, H. N., Argani, P., Cimino-Mathews, A., & Emens, L. A. (2016). The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(3), 249–258. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.158>
126. Meshcheryakova, A., Tamandl, D., Bajna, E., Stift, J., Mittlboeck, M., Svoboda, M., Heiden, D., Stremitzer, S., Jensen-Jarolim, E., Grünberger, T., Bergmann, M., & Mechtcheriakova, D. (2014). B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PloS one*, 9(6), e99008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099008>
127. Hou, A., Hou, K., Huang, Q., Lei, Y., & Chen, W. (2020). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cell, a Promising Strategy to Overcome Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Frontiers in immunology*, 11, 783. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00783>
128. Dong, Y., Sun, Q., & Zhang, X. (2017). PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*, 8(2), 2171–2186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13895>

129. André, T., Shiu, K. K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J., Le, D. T., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M. Z. H., Marinello, P., ... KEYNOTE-177 Investigators (2020). Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine*, 383(23), 2207–2218. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699>
130. Cohen, R., Bennouna, J., Meurisse, A., Tournigand, C., De La Fouchardière, C., Tougeron, D., Borg, C., Mazard, T., Chibaudel, B., Garcia-Larnicol, M. L., Svrcek, M., Vernerey, D., Menu, Y., & André, T. (2020). RECIST and iRECIST criteria for the evaluation of nivolumab plus ipilimumab in patients with microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: the GERCOR NIPICOL phase II study. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(2), e001499. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001499>
131. Llosa, N. J., Lubber, B., Siegel, N., Awan, A. H., Oke, T., Zhu, Q., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Thompson, E. D., Jaffee, E. M., Durham, J. N., Sears, C. L., Le, D. T., Diaz, L. A., Jr, Pardoll, D. M., Wang, H., Housseau, F., & Anders, R. A. (2019). Immunopathologic Stratification of Colorectal Cancer for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Cancer immunology research*, 7(10), 1574–1579. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0927>
132. Ganesh, K., Stadler, Z. K., Cercek, A., Mendelsohn, R. B., Shia, J., Segal, N. H., & Diaz, L. A., Jr (2019). Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(6), 361–375. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0126-x>
133. Lin, K. X., Istl, A. C., Quan, D., Skaro, A., Tang, E., & Zheng, X. (2023). PD-1 and PD-L1 inhibitors in cold colorectal cancer: challenges and strategies. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, 72(12), 3875–3893. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03520-5>

134. Lote, H., Starling, N., Pihlak, R., & Gerlinger, M. (2022). Advances in immunotherapy for MMR proficient colorectal cancer. *Cancer treatment reviews*, 111, 102480. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102480>
135. Johnson, B., Haymaker, C. L., Parra, E. R., Soto, L. M. S., Wang, X., Thomas, J. V., Dasari, A., Morris, V. K., Raghav, K., Vilar, E., Kee, B. K., Eng, C., Parseghian, C. M., Wolff, R. A., Lee, Y., Lorenzini, D., Laberiano-Fernandez, C., Verma, A., Lang, W., Wistuba, I. I., ... Overman, M. J. (2022). Phase II study of durvalumab (anti-PD-L1) and trametinib (MEKi) in microsatellite stable (MSS) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal for immunotherapy of cancer*, 10(8), e005332. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005332>
136. Sharma, S., Singh, N., Turk, A. A., Wan, I., Guttikonda, A., Dong, J. L., Zhang, X., & Opyrchal, M. (2024). Molecular insights into clinical trials for immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: Unravelling challenges and future directions. *World journal of gastroenterology*, 30(13), 1815–1835. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i13.1815>
137. Kuang, C., Park, Y., Augustin, R. C., Lin, Y., Hartman, D. J., Seigh, L., Pai, R. K., Sun, W., Bahary, N., Ohr, J., Rhee, J. C., Marks, S. M., Beasley, H. S., Shuai, Y., Herman, J. G., Zarour, H. M., Chu, E., Lee, J. J., & Krishnamurthy, A. (2022). Pembrolizumab plus azacitidine in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer: a single-arm phase 2 trial and correlative biomarker analysis. *Clinical epigenetics*, 14(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01226-y>
138. Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., & Nakajima, Y. (2007). Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(7), 2151–2157. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2746>

139. Thompson, R. H., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Dong, H., Lohse, C. M., Webster, W. S., Sengupta, S., Frank, I., Parker, A. S., Zincke, H., Blute, M. L., Sebo, T. J., Cheville, J. C., & Kwon, E. D. (2006). Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer research*, 66(7), 3381–3385. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4303>
140. Droeser, R. A., Hirt, C., Viehl, C. T., Frey, D. M., Nebiker, C., Huber, X., Zlobec, I., Eppenberger-Castori, S., Tzankov, A., Rosso, R., Zuber, M., Muraro, M. G., Amicarella, F., Cremonesi, E., Heberer, M., Iezzi, G., Lugli, A., Terracciano, L., Sconocchia, G., Oertli, D., ... Tornillo, L. (2013). Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(9), 2233–2242. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.02.015>
141. Velcheti, V., Rai, P., Kao, Y. H., Chirovsky, D., Nunes, A. T., & Liu, S. V. (2024). 5-Year Real-World Outcomes With Frontline Pembrolizumab Monotherapy in PD-L1 Expression $\geq$ 50% Advanced NSCLC. *Clinical lung cancer*, 25(6), 502–508.e3. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2024.05.002>
142. Shi, S. J., Wang, L. J., Wang, G. D., Guo, Z. Y., Wei, M., Meng, Y. L., Yang, A. G., & Wen, W. H. (2013). B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PloS one*, 8(10), e76012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076012>
143. Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
144. Benson, A. B., Venook, A. P., Adam, M., Chang, G., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., Cohen, S. A., Cooper, H. S., Deming, D., Garrido-Laguna, I., Grem, J. L., Haste, P., Hecht, J. R., Hoffe, S., Hunt, S., Hussan, H., Johung, K. L., Joseph, N., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., ... Jones, F. (2024). Colon Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 22(2 D), e240029. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2024.0029>

145. Benedix, F., Kube, R., Meyer, F., Schmidt, U., Gastinger, I., Lippert, H., & Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group (2010). Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Diseases of the colon and rectum*, 53(1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4>
146. Hyngstrom, J. R., Hu, C. Y., Xing, Y., You, Y. N., Feig, B. W., Skibber, J. M., Rodriguez-Bigas, M. A., Cormier, J. N., & Chang, G. J. (2012). Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Annals of surgical oncology*, 19(9), 2814–2821. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2321-7>
147. Afrăsânie, V. A., Marinca, M. V., Alexa-Stratulat, T., Gafton, B., Păduraru, M., Adavidoaiei, A. M., Miron, L., & Rusu, C. (2019). KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiology and oncology*, 53(3), 265–274. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0033>
148. Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Martinelli, E., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(10), 1291–1305. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>
149. Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., Martinelli, E., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org (2023). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>

150. Quintana, J. M., Gonzalez, N., Anton-Ladislao, A., Redondo, M., Bare, M., Fernandez de Larrea, N., Briones, E., Escobar, A., Sarasqueta, C., Garcia-Gutierrez, S., Aguirre, U., & REDISSEC-CARESS/CCR group (2016). Colorectal cancer health services research study protocol: the CCR-CARESS observational prospective cohort project. *BMC cancer*, 16, 435. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2475-y>
151. Deijen, C. L., Vasmel, J. E., de Lange-de Klerk, E. S. M., Cuesta, M. A., Coene, P. L. O., Lange, J. F., Meijerink, W. J. H. J., Jakimowicz, J. J., Jeekel, J., Kazemier, G., Janssen, I. M. C., Pahlman, L., Haglind, E., Bonjer, H. J., & COLOR (COLon cancer Laparoscopic or Open Resection) study group (2017). Ten-year outcomes of a randomised trial of laparoscopic versus open surgery for colon cancer. *Surgical endoscopy*, 31(6), 2607–2615. <https://doi.org/10.1007/s00464-016-5270-6>
152. Cuk, P., Simonsen, R. M., Komljen, M., Nielsen, M. F., Helligsø, P., Pedersen, A. K., Mogensen, C. B., & Ellebæk, M. B. (2021). Improved perioperative outcomes and reduced inflammatory stress response in malignant robot-assisted colorectal resections: a retrospective cohort study of 298 patients. *World journal of surgical oncology*, 19(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02263-w>
153. Zhu, X. L., Yan, P. J., Yao, L., Liu, R., Wu, D. W., Du, B. B., Yang, K. H., Guo, T. K., & Yang, X. F. (2019). Comparison of Short-Term Outcomes Between Robotic-Assisted and Laparoscopic Surgery in Colorectal Cancer. *Surgical innovation*, 26(1), 57–65. <https://doi.org/10.1177/1553350618797822>
154. Kim, J. C., Lee, J. L., Yoon, Y. S., Kim, C. W., Park, I. J., & Lim, S. B. (2018). Robotic left colectomy with complete mesocolectomy for splenic flexure and descending colon cancer, compared with a laparoscopic procedure. *The international journal of medical robotics + computer assisted surgery : MRCAS*, 14(5), e1918. <https://doi.org/10.1002/rcs.1918>
155. Auclin, E., Zaanani, A., Vernerey, D., Douard, R., Gallois, C., Laurent-Puig, P., Bonnetain, F., & Taieb, J. (2017). Subgroups and prognostication in stage III colon

cancer: future perspectives for adjuvant therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(5), 958–968. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx030>

156. Shi, Q., Sobrero, A. F., Shields, A. F., Yoshino, T., Paul, J., Taieb, J., Sougklakos, I., Kerr, R., Labianca, R., Meyerhardt, J. A., Bonnetain, F., Watanabe, T., Boukovinas, I., Renfro, L. A., Grothey, A., Niedzwiecki, D., Torri, V., Andre, T., Sargent, D. J., & Iveson, T. (2017). Prospective pooled analysis of six phase III trials investigating duration of adjuvant (adjuv) oxaliplatin-based therapy (3 vs 6 months) for patients (pts) with stage III colon cancer (CC): The IDEA (International Duration Evaluation of Adjuvant chemotherapy) collaboration. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), LBA1–LBA1. https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.15_suppl.lba1

157. Antoniotti, C., Rossini, D., Pietrantonio, F., Catteau, A., Salvatore, L., Lonardi, S., Boquet, I., Tamberi, S., Marmorino, F., Moretto, R., Ambrosini, M., Tamburini, E., Tortora, G., Passardi, A., Bergamo, F., Kassambara, A., Sbarrato, T., Morano, F., Ritorto, G., Borelli, B., ... GONO Foundation Investigators (2022). Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab with or without atezolizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (AtezoTRIBE): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 23(7), 876–887. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00274-1)

158. André, T., Vernerey, D., Im, S. A., Bodoky, G., Buzzoni, R., Reingold, S., Rivera, F., McKendrick, J., Scheithauer, W., Ravit, G., Fountzilas, G., Yong, W. P., Isaacs, R., Österlund, P., Liang, J. T., Creemers, G. J., Rakez, M., Van Cutsem, E., Cunningham, D., Tabernero, J., ... de Gramont, A. (2020). Bevacizumab as adjuvant treatment of colon cancer: updated results from the S-AVANT phase III study by the GERCOR Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(2), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.12.006>

159. Zunder, S. M., van Pelt, G. W., Gelderblom, H. J., Mancao, C., Putter, H., Tollenaar, R. A., & Mesker, W. E. (2018). Predictive potential of tumour-stroma ratio on benefit from adjuvant bevacizumab in high-risk stage II and stage III colon cancer. *British journal of cancer*, 119(2), 164–169. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0083-0>
160. Chalabi, M., Verschoor, Y. L., Tan, P. B., Balduzzi, S., Van Lent, A. U., Grootscholten, C., Dokter, S., Büller, N. V., Grotenhuis, B. A., Kuhlmann, K., Burger, J. W., Huibregtse, I. L., Aukema, T. S., Hendriks, E. R., Oosterling, S. J., Snaebjornsson, P., Voest, E. E., Wessels, L. F., Beets-Tan, R. G., Van Leerdam, M. E., ... Haanen, J. B. (2024). Neoadjuvant Immunotherapy in Locally Advanced Mismatch Repair-Deficient Colon Cancer. *The New England journal of medicine*, 390(21), 1949–1958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2400634>
161. Morano, F., Raimondi, A., Pagani, F., Lonardi, S., Salvatore, L., Cremolini, C., Murgioni, S., Randon, G., Palermo, F., Antonuzzo, L., Pella, N., Racca, P., Prisciandaro, M., Niger, M., Corti, F., Bergamo, F., Zaniboni, A., Ratti, M., Palazzo, M., Cagnazzo, C., ... Pietrantonio, F. (2022). Temozolomide Followed by Combination With Low-Dose Ipilimumab and Nivolumab in Patients With Microsatellite-Stable, O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase-Silenced Metastatic Colorectal Cancer: The MAYA Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 40(14), 1562–1573. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02583>
162. Gaissmaier, L., Elshiaty, M., & Christopoulos, P. (2020). Breaking Bottlenecks for the TCR Therapy of Cancer. *Cells*, 9(9), 2095. <https://doi.org/10.3390/cells9092095>
163. Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 62–68. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4967>

164. Johdi, N. A., & Sukor, N. F. (2020). Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Frontiers in immunology*, 11, 1624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01624>
165. Tran, E., Robbins, P. F., Lu, Y. C., Prickett, T. D., Gartner, J. J., Jia, L., Pasetto, A., Zheng, Z., Ray, S., Groh, E. M., Kriley, I. R., & Rosenberg, S. A. (2016). T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *The New England journal of medicine*, 375(23), 2255–2262. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609279>
166. Clinicaltrials.gov. (n.d.). Clinicaltrials.gov. Retrieved February 15, 2025, from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01174121>
167. Clinicaltrials.gov. (n.d.-b). Clinicaltrials.gov. Retrieved February 16, 2025, from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04842812>
168. Henderson, R. H., French, D., Maughan, T., Adams, R., Allemani, C., Minicozzi, P., Coleman, M. P., McFerran, E., Sullivan, R., & Lawler, M. (2021). The economic burden of colorectal cancer across Europe: a population-based cost-of-illness study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 6(9), 709–722. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00147-3)
169. Baxter, N. N., Kennedy, E. B., Bergsland, E., Berlin, J., George, T. J., & Gill, S. (2022). Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*, 40(8), 892–910.
170. Lonardi, S., Sobrero, A., Rosati, G., Di Bartolomeo, M., Ronzoni, M., Aprile, G., Massida, B., Scartozzi, M., Banzi, M., Zampino, M. G., Pasini, F., Marchetti, P., Cantore, M., Zaniboni, A., Rimassa, L., Ciuffreda, L., Ferrari, D., Barni, S., Zagonel, V., Maiello, E., ... TOSCA (Three or Six Colon Adjuvant) Investigators (2017). Phase III trial comparing 3-6 months of adjuvant FOLFOX4/XELOX in stage II-III colon cancer: safety and compliance in the TOSCA trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(12), 3110. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx021>

171. Dey, A., Mitra, A., Pathak, S., Prasad, S., Zhang, A. S., Zhang, H., Sun, X. F., & Banerjee, A. (2023). Recent Advancements, Limitations, and Future Perspectives of the use of Personalized Medicine in Treatment of Colon Cancer. *Technology in cancer research & treatment*, 22, 15330338231178403. <https://doi.org/10.1177/15330338231178403>
172. van Pelt, G. W., Kjær-Frifeldt, S., van Krieken, J. H. J. M., Al Dieri, R., Morreau, H., Tollenaar, R. A. E. M., Sørensen, F. B., & Mesker, W. E. (2018). Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 473(4), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2408-z>
173. Guo, X., Fan, Y., Lang, R., Gu, F., Chen, L., Cui, L., Pringle, G. A., Zhang, X., & Fu, L. (2008). Tumor infiltrating lymphocytes differ in invasive micropapillary carcinoma and medullary carcinoma of breast. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(9), 1101–1107. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.72>
174. Frančina, M., Mikuš, M., Mamić, M., Jovanović, T., Ćorić, M., Lovrić, B., Vukoja, I., Zukanović, G., Matković, K., Rajc, J., Slišurić, F., Jurić-Marelja, M., Augustin, G., & Tomaš, I. (2024). Evaluation of PD-L1 Expression in Colorectal Carcinomas by Comparing Scoring Methods and Their Significance in Relation to Clinicopathologic Parameters. *Diagnostics*, 14(10), 1007. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14101007>
175. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48:452–458.
176. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248–57.

ДОДАТОК А

Інтегрована шкала оцінки індивідуального ризику пацієнтів за сукупністю прогностичних факторів (метастази в лімфатичних вузлах, пухлино-інфільтруючі лімфоцити та пухлино-стромальне співвідношення)

Фактор (змінна)	Категорія	Бали
Статус pN (наявність метастазів в лімфатичних вузлах)	N0	0
	N1	1
	N2	2
Пухлино-стромальне співвідношення	Високий ПСС ($\geq 50\%$)	1
	Низький ПСС ($< 50\%$)	0
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити	Група А (0-9%)	2
	Група В (10-39%)	1
	Група С ($> 40\%$)	0
Сума Балів		
0-1 бал	Низький ризик	
2-3 бали	Помірний ризик	
4-5 балів	Високий ризик	

ДОДАТОК Б

Наукові публікації за темою дисертації

1. Zakhartseva, L., & Shkurupii, B. (2021). Tumor-infiltrating lymphocytes as easily accessible prognostic tool in adenocarcinoma of the colon. *Experimental oncology*, 43(4), 331–335. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.16991>
2. Shkurupii, B., & Zakhartseva, L. (2024). Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes and its association with clinical-morphological features of colon adenocarcinomas. *Experimental oncology*, 46(1), 45–52. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.01.045>
3. Роль пухлинного мікрооточення в прогнозуванні виживаності пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки I–III стадій. Б.М. Шкурупій. 2024, Т. 14, № 2 (54): 1–6. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.54-2.32616

ДОДАТОК В

Відомості про апробацію результатів дисертації

4. B.M. Shkurupii, S.V. Klymenko, L.M. Zakhartseva, B.T. Klimuk, L.A. Rybchenko, L.O. Poluben Frequency of KRAS mutation in patients with colorectal cancer in Ukraine. Матеріали конф. молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (м. Київ, 4–5 лютого 2019 р.) (тези). — Онкология. 2019, T21, №1:74.
5. Shkurupii B., Zakhartseva L., Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma as an additional prognostic tool for patient outcome assessment. Міжнародна медична онлайн конф. «Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку», Київ, 22–23 квітня 2021 р. (тези та усна доповідь). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 2(123):45–46.
6. Shkurupii B., Role of Tumor-infiltrating lymphocytes and tumor stroma in colorectal carcinoma for prognosis of patients outcome. онлайн конф. «Патологічна анатомія — основа всіх клінічних дисциплін: вимоги сьогодення». Київ, 18–19 лист., 2021 р. (тези). — Ukr. Scientific Medical Youth Journal. 2021; suppl. 3(126):8–9.
7. Zakhartseva L.M., Shkurupii B.M., The prognostic value of tumour – infiltrating lymphocytes in MSS/MSI adenocarcinomas of colon, stage II-IV. (36th European Congress of Pathology in Florence). Florence, Italy 7–11 September, 2024 (poster). 36th European Congress of Pathology in Nice (Final Programme) — P.207.