

НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова»

УДК: 616.351-006.66-07:378.245.2

На правах рукописи

ИМАНБАЕВ НАУРЫЗБАЙ МАҚСОТҰЛЫ

**Диагностическая и прогностическая значимость микроокружения опухоли
при колоректальной аденокарциноме**

8D10102 – Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты
асс. проф., к.м.н. Изтлеуов Е.М.
проф., д.м.н. Бекмухамбетов Е.Ж.

Зарубежный консультант
проф., д.м.н. Расулов А.О.

Республика Казахстан
Актобе, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Внеклеточный матрикс: строение, свойства и ремоделирование злокачественными опухолями	13
1.2 Коллаген I типа и коллаген III типа как структурные компоненты внеклеточного матрикса	15
1.3 Реорганизация коллагена в строме опухоли	17
1.4 Роль микроокружения опухоли в метастазировании	20
1.5 Гистопатологические прогностические критерии при колоректальном раке	22
1.5.1 Соотношение «опухоль-строма» как прогностический фактор у пациентов с колоректальным раком	22
1.5.2 Классификация десмопластических реакций инвазивного края опухоли	26
1.5.3 Почкование опухоли, венозная, лимфатическая и периневральная инвазия	30
1.6 Иммунные клетки при колоректальном раке: характеристика и прогностическая значимость	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Дизайн исследования	39
2.1.1 Общая структура исследования	39
2.1.2 Конечные точки и определения	41
2.2 Гистологическое исследование	41
2.3 Гистохимическое исследование	42
2.4 Иммуногистохимическое исследование	42
2.5 Морфологическое и морфометрическое исследование	43
2.5.1 Морфометрическая оценка относительного количества келлоидоподобного коллагена	43
2.5.2 Морфометрическая оценка гистопаттерна ретикулиновых волокон	43
2.5.3 Морфометрическая оценка гистопатологических прогностических факторов	44
2.6 Морфометрическая оценка CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 положительных иммунных клеток	45
2.7 Мутации KRAS	46
2.8 Методы статистической обработки данных	46
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
3.1 Региональные особенности колоректального рака в Актюбинской области	48
3.1.1 Результаты одномерного регрессионного анализа взаимосвязи	49

между характером колоректального рака и демографическими показателями	
3.1.2 Результаты многомерного регрессионного анализа взаимосвязи между характером колоректального рака и демографическими показателями	53
3.2 Гистохимическое определение прогностически значимого уровня келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника	57
3.2.1 Определение порогового уровня относительного содержания келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника	59
3.2.2 Взаимосвязь относительного количества келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками пациентов и гистопатологическими признаками опухолей	62
3.2.3 Однофакторный и многофакторный анализ Кокса	63
3.3 Этаблирование метода гистофенотипирования келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией	69
3.3.1 Взаимосвязь келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками	70
3.3.2 Сравнительная характеристика относительного содержания келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с гистопатологическими и молекулярными характеристиками опухоли	72
3.3.2.1 Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и лимфоцитарной инфильтрацией (окраска гематоксилин, эозин)	74
3.3.3 Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости и безрецидивной выживаемости	77
3.3.4 Сравнительная характеристика гистопаттернов ретикулина (коллаген III) в группах с очаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена	88
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	104
ПРИЛОЖЕНИЯ	130

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
Закон Республики Казахстан. О науке: принят 18 февраля 2011 года, №407-IV МЗ РК.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. О внесении изменения в приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2009 года, №697 «Об утверждении Правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований: утв. 15 мая 2015 года, №348.

ГОСТ 7.32-2001 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины соответствующими определениями:

Безрецидивная выживаемость - время в месяцах между датой операции и датой рецидива рака или датой последнего наблюдения (с максимальным периодом 5 лет).

Венозная инвазия - наличие опухолевых клеток в мышечном слое кровеносных сосудов.

Время до прогрессирования - время от случайного распределения до прогрессирования заболевания, не включающее случаи смерти и подвергающиеся цензуре либо в момент смерти, либо при более раннем посещении.

Лимфатическая инвазия - наличие гнезд опухолевых клеток в лимфатических сосудах.

Общая выживаемость - продолжительность от операции до смерти или последнего наблюдения.

Периневральная инвазия - наличие опухолевых клеток в слоях оболочки нерва или в непосредственной близости от нерва, поражающих не менее 33% всей его окружности.

Почкование опухоли - изолированная раковая клетка или кластер, включающий <5 клеток на инвазивном крае.

Рецидив - рентгенологический или гистологический диагноз метастатического заболевания или местного рецидива опухоли после 90-дневного перерыва без лечения, начинающегося сразу после первичной операции.

Стандартизированный по возрасту коэффициент заболеваемости - это коэффициент заболеваемости населения, скорректированный до стандартного возрастного распределения.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БРВ	безрецидивная выживаемость
ВКМ	внеклеточный матрикс
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДР	десмопластическая реакция
КРР	колоректальный рак
ЛВИ	лимфоваскулярная инвазия
МЗ РК	Министерство здравоохранения Республики Казахстан
МРТ	магнитно-резонансная томография
ОВ	общая выживаемость
ОР	отношение рисков
ПНИ	периневральная инвазия
РК	Республика Казахстан
УЗИ	ультразвуковое исследование
БРВ	безрецидивная выживаемость
LOX	лизилоксидаза
TNM	международная классификация стадий злокачественных новообразований (аббревиатура от tumor, nodus и metastasis)
TSR	соотношение «строма-паренхима» опухоли

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Колоректальный рак (КРР) - заболевание с высокой заболеваемостью и смертностью, занимающее третье место в мире по распространенности [1]. По данным Международного агентства по изучению рака в 2020 году в мире было зарегистрировано около 1.93 миллиона новых случаев КРР, а стандартизированный по возрасту коэффициент заболеваемости КРР составлял 19.5 на 100.000 человек. При этом около 50,3% всех новых случаев КРР приходится на Азию: заболеваемость в этом регионе составляет 17.6 на 100.000 человек [2]. По данным Глобальной онкологической обсерватории, число новых случаев КРР в мире увеличится в 2040 году на 63% (около 3.15 млн). В Республике Казахстан данная проблема находит отражение в общенациональных приоритетах государственной политики, отраженных в Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года [3], Комплексном плане по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на 2023-2027 годы [4] и Постановлении Правительства Республики Казахстан «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация»» [5].

В настоящее время одной из основ для принятия решений клинициста о тактике ведения онкологических пациентов, в том числе и пациентов с КРР, служит классификация TNM, изначально разработанная с целью количественной оценки анатомического бремени рака [6]. Однако у пациентов с одной и той же стадией КРР по классификации TNM клинические исходы могут различаться. Так у значительного числа пациентов с КРР III стадии наблюдается благоприятное течение, при этом у пациентов с I/II стадией наблюдается более агрессивное течение заболевания [7]. Было показано, что примерно у 10-25% пациентов с ранней стадией КРР наблюдалось неблагоприятное течение заболевания [8]. Это актуализирует поиск дополнительных критериев и факторов для стратификации групп пациентов.

Пациенты с КРР делятся на разные группы для определения индивидуального лечения и наблюдения, ассоциирующиеся с прогностическими клиническими исходами. Для определения этих групп используются количественные биомаркеры, клинические данные, гистопатологический анализ опухолевой ткани и молекулярная патология опухолевых клеток [9-13]. Недавние открытия в области иммунологии опухолей показали, что микроокружение играет решающую роль в развитии опухоли. В связи с этим крайне актуален поиск дополнительных прогностических маркеров для дифференцировки онкологических пациентов и определения прогноза. Гистологическое исследование обладает высокой надежностью и относительно недорого, поэтому поиск дополнительных гистологических критериев и маркеров потенциально выглядит многообещающей стратегией.

Традиционно в гистологических исследованиях злокачественных опухолей ведущее место занимал эпителиальный компонент, однако современные исследовательские парадигмы постепенно сместились от эпителия опухоли к строме [14-16]. Еще Masson P. обратил внимание на пролиферирующие фибробласты среди воспалительного инфильтрата опухоли и описал реакции опухолевой стромы в зависимости от времени их появления [17]. Прогностическое значение стромы инвазивного края опухоли было продемонстрировано Уено Н. [18], выделившим зрелую, незрелую и промежуточную десмопластическую реакцию. Десмопластическая реакция считается многообещающим прогностическим параметром для колоректального рака. Промежуточная десмопластическая реакция характеризуется большой гетерогенностью стромы, включающей как небольшое количество келлоидоподобного коллагена (КПК) в фиброзированной строме, так и толстые пучки келлоидоподобного коллагена, циркулярно окружающие раковые гнезда и ремоделирующие внеклеточный матрикс.

Взаимодействие между клетками и окружающим внеклеточным матриксом (ВКМ) участвует в развитии и прогрессировании многих типов рака. Организация молекул ВКМ обеспечивает не только физические каркасы и динамическую сеть, в которую встроены клетки, но также позволяет контролировать многие клеточные поведения, включая пролиферацию, миграцию, дифференцировку и выживание, что приводит к регуляции гомеостаза и морфогенеза. Модификации состава ВКМ и механических свойств во время канцерогенеза имеют решающее значение для возникновения и прогрессирования опухоли. Недавние исследования показали, что опухоли могут напрямую использовать ремоделирование внеклеточного матрикса для создания микросреды, которая способствует онкогенезу и метастазированию [19,20]. Доминирующим компонентом внеклеточного матрикса является коллаген, и его структура все чаще признается в качестве надежного биомаркера для установления прогноза различных типов опухолей, таких как рак простаты и рак желудка [21,22]. Кроме того, предыдущие исследования показали, что структура коллагена в биопсии связана с ответом на лечение при раке прямой кишки и раке молочной железы [23-25]. Волокна коллагена I типа влияют на движение макромолекул во внеклеточном матриксе опухоли [26], а структурные характеристики этих волокон могут способствовать или препятствовать миграции раковых клеток [27]. Изменения коллагена в микроокружении опухоли коррелируют с диссеминацией рака и прогнозом. Коллаген регулирует опухоль-ассоциированную иммунную инфильтрацию и необходим для опухолевого ангиогенеза [28]. Повышенная плотность коллагена вокруг раковых клеток направляет местную инвазию и метастазирование [29]. Более того, радиальное выравнивание коллагена на границе опухоль-строма повышает инвазивность раковых клеток [30,31]. Прогрессия опухоли сопровождается аномальным ремоделированием коллагена ВКМ. Гистологически аномальное ремоделирование коллагена в основном приводит

к чрезмерному отложению, изменению пропорций и расположению коллагена [32-34]. Данные морфологические изменения могут отражать важные характеристики опухоли, влияющие на прогноз пациентов.

Патологи могут идентифицировать компоненты стромы, но их описание и количественная оценка не является рутинной процедурой и стромальные факторы не всегда учитываются при принятии решений о лечении. Это приводит к различному подходу в понимании природы отдельных опухолей между лабораторией и клиникой. Дополнительно проведение оценки на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, не всегда позволяет достигнуть наилучшего определения различных элементов внеклеточного матрикса. Следовательно, необходимо идентифицировать прогностические факторы для улучшения выживаемости пациентов. Отдельной проблемой является определение оптимального порогового уровня (точки отсечения) с максимальной дискриминирующей способностью для келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли. На основании вышеизложенного следует, что гистофенотипирование коллагеновых волокон экстрацеллюлярного матрикса колоректального рака имеет важное прикладное клиническое и научное значение. В этом контексте настоящее исследование было направлено на оценку келлоидоподобного коллагена в строме колоректального рака, интерпретируемого на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и трихромом Массона, и на проведение сравнительного анализа данных параметров с традиционными прогностическими факторами для установления их прогностической значимости. Результаты исследования, представляют интерес для онкологов и патоморфологов.

Цель исследования – оценить диагностическую и прогностическую значимость микроокружения (келлоидоподобного коллагена стромы) инвазивного края колоректальной аденокарциномы.

Задачи исследования

1. Определить региональные особенности колоректального рака в Актюбинской области;
2. Установить прогностически значимый уровень келлоидоподобного коллагена стромы инвазивного края для оценки исходов колоректальной аденокарциномы;
3. Изучить взаимосвязь келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае с гистопатологическими характеристиками опухоли, клиническими данными и вероятными исходами (общая и безрецидивной выживаемость);
4. Провести сравнительный анализ CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 положительных иммунных клеток с процентным содержанием КПК в микроокружении и связь с исходами колоректальной аденокарциномы.

Научная новизна

1. Методом гистохимического исследования определен прогностически значимый пороговый уровень относительного количества келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края колоректальной аденокарциномы с

промежуточной десмопластической реакцией на основе максимальной дискриминационной способности для общей и безрецидивной выживаемости.

2. Установлено, что наличие диффузного гистофенотипа келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией коррелирует с такими признаками как T-стадия, венозная и лимфатическая инвазия.

3. Выявлено, что колоректальных аденокарциномах с очаговым келлоидоподобным коллагеном в строме инвазивного края и промежуточной десмопластической реакцией выше частота случаев с высоким количеством CD3 и CD8 положительных иммунных клеток и выше частота случаев с низким количеством CD163 положительных иммунных клеток по сравнению с опухолями с диффузным келлоидоподобным коллагеном.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Промежуточная десмопластическая реакция в колоректальных аденокарциномах является гетерогенной группой, которая может быть дополнительно стратифицирована по относительной доле келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного фронта опухоли.

2. Уровень келлоидоподобного коллагена более 30% (диффузный) от внеклеточного матрикса инвазивного фронта опухоли с промежуточной десмопластической реакцией является независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода (рецидива и смерти) у пациентов с колоректальной аденокарциномой, а также ассоциируется с наличием неблагоприятных признаков (более высокая T-стадия, наличие венозной или лимфатической инвазии).

3. Уровень келлоидоподобного коллагена менее 30% (очаговый) от внеклеточного матрикса инвазивного фронта опухоли с промежуточной десмопластической реакцией ассоциируется с высокой степенью лимфоцитарной инфильтрации и большим количеством CD3 и CD8 положительных иммунных клеток и меньшим количеством CD163 положительных иммунных клеток.

Теоретическая значимость

1. Результаты представленных в диссертационной работе исследований, расширяют имеющиеся представления о гистофенотипе экстрацеллюлярного матрикса инвазивного края колоректальной аденокарциномы по типу «келлоидоподобный коллаген-ретикулин».

2. Установленное в настоящем исследовании влияние относительного количества келлоидоподобного коллагена на пролиферацию иммунных клеток может представлять собой новый иммуносупрессивный механизм в микроокружении опухоли, проявляющийся установленной взаимосвязью между плотностью келлоидоподобного коллагена в опухолях с промежуточной десмопластической реакцией и прогнозом для онкологических больных.

Практическая значимость

Определение относительного количества келлоидоподобного коллагена в колоректальных аденокарциномах с промежуточной десмопластической

реакцией в соответствии с установленным пороговым значением является новым дополнением к системе прогнозирования исходов у онкологических больных, способствующей улучшению стратификации риска, что имеет важное значение в практической деятельности для врачей онкологов и патоморфологов.

Внедрение в практику

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №1 от 26.06.2023 гг. «Определения микроокружения опухоли (CD3, CD4, CD20, CD56, CD163)» (Приложение А).

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №2 от 26.06.2023 гг. «Определение паренхиматозно - стромального соотношения в опухолях толстого кишечника при колоректальном раке». (Приложение Б).

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №3 от 26.06.2023 гг. «Определение микросателлитной нестабильности (MSI) как скрининговый тест для отбора пациентов с подозрением на синдром Линча» (Приложение В).

Личный вклад автора

Исследование проведено самостоятельно: набор, первичная и статистическая обработка материалов, анализ, обобщение результатов исследования и их описание, получение авторских свидетельств, актов внедрения, а также работа с публикациями от написания материала до подачи в научные журналы.

Автор непосредственно участвовал при проведении всех оперативных вмешательств больным, курировал после операции, обследовал в ближайшем и отдалённом послеоперационном периодах.

Под руководством научного руководителя проведено гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала с описанием микроскопических паттернов коллагена I типа и коллагена III типа. Самостоятельно проведен морфометрический анализ с подсчетом стромальных и клеточных структур с описанием гистологического материала и последующим микрофотографированием полученных объектов.

Весь материал систематизирован, документирован, оформлен в главы диссертационной работы лично автором.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

- XIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии 27-29 апреля 2021 выступил с докладом. Казахстан. г.Алматы - «Эпидемиологические аспекты структуры колоректального рака на примере приграничных областей».

- XIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии совместно с Ассоциацией директоров институтов онкологии и радиологии СНГ и Евразии (АДИОР) 29 апреля 2022 год выступил с докладом. Россия. г.Москва. (онлайн) - «Структура колоректального рака в Актюбинской области».

- X Ежегодная Международная Научно-Практическая Конференция «Актуальные вопросы медицины» 27-28 Апреля 2023 год, г.Баку, Азербайджан - «Состояние паренхиматозно-стромального соотношения опухоли в зависимости от локализации при колоректальном раке».

- IX съезд Онкологов и Радиологов Республики Казахстан с международным участием. 26-27 октября 2023 года, г.Астана - «Номограмма выживаемости у пациентов с колоректальным раком. Ретроспективный анализ за 2019-2021 годы».

Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, из них:

1 публикация в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК: «Паренхиматозно-стромальное соотношение в опухолях колоректального рака как индикатор метастазирования» // Онкология и Радиология Казахстана. - №3(69). - 2023. – С. 34-37.

5 публикации в международных научных изданиях, входящих на момент публикации статей в информационную базу Scopus и PubMed:

1. «Colorectal cancer and microbiota: systematic review» // Gastroenterology Review. – 2024. - Vol.19(1). 2023 IF-1,3. Q-1 Medicine. CiteScore 2023-2,2. Перцентиль-90-й.

2. «Parenchymal-Stromal Ratio in Colorectal Cancer Tumors: A Mini Review» // Journal of Family and Reproductive Health. – Vol.18(1) (March 2024). 2023 IF-0,0. Q-2. Medicine. CiteScore 2023-0,0. Перцентиль-55-й.

3. «Diagnostic and prognostic significance of keloid-like collagen remodeling patterns in the extracellular matrix of colorectal cancer» // Pathology and Oncology Research. 2024. – Vol.30. CiteScore 2023-6,3. Q-1. Перцентиль-80-й.

4. «Evolution of Colorectal Cancer Trends and Treatment Outcomes: A Comprehensive Retrospective Analysis (2019-2023) in West Kazakhstan» // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (APJCP). 2024. - Vol.25(8). CiteScore 2023-2,8. Перцентиль-46-й. Q-3.

5. «Brief review of colorectal cancer and its microenvironment» // Medical Journal of the Islamic Republic of Iran. – 2024. Vol.38(108). 2023 IF-2,4. Q-2. Medicine. CiteScore 2023-2,4. Перцентиль-54-й.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 21 таблиц и 13 рисунков. Диссертация включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы, приложения. Библиография включает 357 источников на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Внеклеточный матрикс: строение, свойства и ремоделирование злокачественными опухолями

Внеклеточный матрикс (ВКМ) - основной структурный компонент органа, состоящий из трехмерной сетиколлагенов, ламининов, эластина и эластических волокон, гликопротеинов и протеогликанов [20,р. 5120]. В нормальных тканях ВКМ обеспечивает структурную поддержку клеток, а также играет регуляторную роль во многих клеточных процессах, включая рост, миграцию, дифференцировку, выживание, гомеостаз и морфогенез [35]. Гомеостаз тканей зависит от жесткой регуляции между отложением, модификацией, деградацией и организацией ВКМ, которые приводят к изменению биохимических и биофизических свойств ВКМ.

На основании биохимических и структурных характеристик внеклеточный матрикс можно разделить на интерстициальный матрикс и базальную мембрану. Интерстициальный матрикс окружает клетки, тогда как базальная мембрана, представляющая тонкий листовидный внеклеточный матрикс, отграничивает строма от клеток различного происхождения (эпителиальных и эндотелиальных клеток, нейронов и мышечных клеток или адипоцитов) и окружает мышечные волокна, жировую ткань в составе миелиновых нервных волокон [36,37]. Интерстициальный матрикс играет ключевую роль в модуляции и поддержании развития тканей, поэтому нарушение строения и изменение механических особенностей ВКМ могут определять агрессивность рака и влиять на чувствительность к лекарственной терапии [38-40]. Ремоделированный, более жесткий ВКМ влияет практически на все признаки опухоли, включая предотвращение иммунного разрушения, воспаление, способствующее развитию опухоли, активацию инвазии и метастазирования и индуцирование ангиогенеза [41-43]. ВКМ не только влияет на поведение опухоли и гистопатологию, но также рассматривается как неотъемлемая особенность злокачественной опухоли [44].

Обычно нарушение регуляции гомеостаза ВКМ приводит к развитию рака посредством двух различных механизмов. С одной стороны, большое количество молекул индуцирует профибротический ответ и приводит к избыточному отложению ВКМ, тем самым защищая опухолевые клетки от иммунного разрушения и опосредуя терапевтическую резистентность. С другой стороны, непрерывное разрушение ВКМ способствует уменьшению адгезии раковых клеток к ВКМ, повышению инвазивной и миграционной способности опухолевых клеток и индуцированию интравазации злокачественных клеток [45-48]. Чтобы обеспечить инвазию и миграцию клеток, внеклеточный матрикс должен быть разрушен. ВКМ расщепляется и разрушается протеазами, специфичными для мишени, такими как матриксные металлопротеиназы, дезинтегрины и металлопротеиназы, дезинтегрины и металлопротеиназы с тромбоспондиновыми мотивами, катепсины и компоненты системы активации плазминогена.

Таким образом, хотя опухоли возникают в нативном внеклеточном матриксе первичного или метастатического участка, этот матрикс будет меняться по мере прогрессирования опухоли. Раковые клетки часто имеют измененную выработку белков ВКМ или ферментов ремоделирования матрикса. Кроме того, пролиферация и активация фибробластов до фенотипа рак-ассоциированных фибробластов приводит к значительному отложению внеклеточного матрикса.

В настоящее время признано, что чрезмерное отложение коллагена и сшивание фибриллярных коллагенов и эластина приводят к образованию плотного внеклеточного матрикса и увеличению жесткости стромы, что оказывает глубокое влияние на прогрессирование рака [49]. Повышенное отложение внеклеточного матрикса представляет собой важнейший физический барьер, который подавляет противоопухолевый иммунитет [50].

Поскольку клеточные и матриксные компоненты изменяются с развитием микроокружения опухоли, механика на тканевом и клеточном уровнях также меняется. На тканевом уровне изменение механики характеризуется увеличением объемной жесткости из-за увеличения отложения белков фибриллярного матрикса, таких как коллаген I, как часть фиброзной реакции [51,52]. На моделях рака молочной железы у мышей *in situ* жесткость увеличивается по мере прогрессирования опухоли, а ВКМ и связанная с опухолью сосудистая сеть являются движущими силами увеличения жесткости. У больных колоректальным раком с метастазами в печень строма метастазов была более жесткой, чем первичные опухоли у того же пациента, за счет активации высоко-сократительных фибробластов в метастатическом микроокружении и отложения ими фибриллярного матрикса [53]. Жесткость может усилить активацию фибробластов, создавая протуморогенную петлю положительной обратной связи. Эти данные подтверждают, что микроокружение зрелой опухоли постоянно усиливает фиброз, изменяя механику среды. Когда микроокружение опухоли исследуется на клеточном уровне, становится очевидным, что эти механические изменения также являются результатом увеличения перекрестных связей матрикса и реорганизации архитектуры волокон, изменений, которые могут физически направлять клетки и влиять на их поведение.

Таким образом, ВКМ представляет собой сложную и динамичную структуру, которая постоянно ремоделируется за счет синтеза и деградации многочисленных белков ВКМ [54]. Сложная сеть ВКМ состоит из фибриллярных или нефибриллярных коллагенов, протеогликанов, гликопротеинов, ламининов, фибронектинов и других макромолекул. Наиболее распространенными компонентами ВКМ являются коллагены [55]. ВКМ обеспечивает механическую поддержку и участвует в межклеточных спайках и коммуникации, а также в миграции клеток. Строма опухоли участвует в онкогенезе, прогрессировании рака и резистентности к терапии, а также оказывает глубокое влияние на многие признаки рака. Стромальные элементы содержат ВКМ, сосудистую сеть и различные клеточные компоненты, такие как

активированные фибробласты и перициты. Наиболее частым опухолевым изменением гомеостаза ВКМ является повышенное отложение фибриллярного коллагена, который обладает прямыми опухоль-способствующими свойствами. Кроме того, повышенное отложение основных компонентов ВКМ приводит к фиброзу фенотипу, называемому десмоплазией, который аналогичен изменениям, наблюдаемым при фиброзе органов. Десмоплазия является ключевой характеристикой различных видов рака и связана с плохим прогнозом. Точный состав и пространственная организация компонентов ВКМ определяют местное микроокружение опухоли. Биохимический состав, целостность, физические и механические свойства ВКМ влияют на все признаки рака, включая клеточные процессы, которые приводят к инициации, прогрессированию, инвазии и образованию метастатических ниш рака.

1.2 Коллаген I типа и коллаген III типа как структурные компоненты внеклеточного матрикса

В слизистой оболочке толстой и прямой кишки коллагены I и III типа локализируются преимущественно в интерстициальной строме [56].

Коллаген I типа является наиболее распространенным белком внеклеточного матрикса в организме, состоящим из тримеризации двух $\alpha 1$ - и одной $\alpha 2$ - цепи. Кости, сухожилия и связки — это все ткани, богатые коллагеном I типа, обеспечивающие места связывания для многочисленных молекул [57]. Коллаген I типа синтезируется в виде растворимой формы проколлагена содержащие глобулярные C- и N-пропептиды, соединенные с соответствующими концами в тройную спираль. Когда проколлагены секретируются из клетки, пропептиды расщепляются протеиназами, а затем мономеры коллагена самостоятельно собираются в фибриллу. Фибрилла состоит из микрофибрилл (5-мерных пучков мономеры), перекрывающих друг друга.

Помимо своей структурной роли, коллаген типа I обладает важным потенциалом связывания факторов роста и посредством его связывания с различными белками регулирует клеточный гомеостаз [58]. Коллаген - тип гликопротеина с правосторонней спиралью, содержащий три гомологичных или негомологичных α цепи с левой спиралью. Аминокислотные последовательности α -цепи характеризуются повторами глицин-X-Y с перерывами или без них, причем X и Y, скорее всего, представляют собой пролин или гидроксипролин, а содержание гидроксипролина в коллагене способствует его термической стабильности [59]. Возникающие α -цепи разными генами сначала кодируются, образуя N-конец. Следующий этап сборки в трехспиральную структуру начинается с C-конца образующихся α -цепей с образованием проколлагена, который сопровождается определенными белками-шаперонами, включая белок теплового шока, пролилгидроксилазу и протеин-дисульфидизомеразу для обеспечить точное выравнивание [60]. Гидроксирование и гликозилирование в эндоплазматическом ретикулуме являются двумя основными модификациями, которые происходят после

трансляции, причем модификация гидроксилирования регулируется метаболизмом витамина С и пирувата [61,62]. Проколлаген гидролизуеться с образованием коллагена проколлагеновой N-протеиназой и С-протеиназой в составе Ca^{2+} , окружающего эндоплазматический ретикулум, вместе с шаперонным белком теплового шока 47 и протеин-дисульфид-изомеразой. Эта важная реакция гидролиза является лимитирующей стадией биосинтеза коллагена. Кроме того, эндопептидазы и металлопротеиназы могут также удалять проколлаген как на N-конце, так и на С-конце, а удаленные пропептиды могут, наоборот, регулировать количество проколлагена, дополнительно влияя на выработку коллагена [63,64].

Коллаген высвобождается во внеклеточный матрикс образованием супрамолекулярной сборки фибрилл, которая может начинаться в носителях Гольджи-мембраны после удаления проколлагена или локализоваться на плазматической мембране фибробластов. На стабильность сборки коллагена влияют внутримолекулярные и межмолекулярные связи, особенно ковалентные связи, в основном включающие сшивки лизилоксидазы [65], сшивки гликозилирования [66] и трансглутаминазные сшивки [67], которые различаются в зависимости от типа коллагена.

Ряд исследований показал, что коллаген I типа играет значительную роль в заболеваниях костей, включая рак костей и метастазы в костях, связанные с раком. Особенно важным оказался обмен коллагена I типа [68-71]. Коллаген I типа также нарушается при других типах солидных опухолей и может влиять на поведение опухолевых клеток. По сравнению со здоровой тканью количество коллагена I типа увеличивается при раке поджелудочной железы, колоректального рака, яичников, молочной железы и легких [72-75]. Клетки рака поджелудочной железы, подвергшиеся воздействию коллагена I типа, демонстрируют повышенную пролиферацию, менее чувствительны к апоптозу, секретируют большее количество TGF- β и демонстрируют сильное снижение экспрессии E-кадгерина [76-78]. Интересно, что Gao H. обнаружил, что опухолевые клетки в ткани опухоли молочной железы мышей проявляют высокую пролиферативную активность, когда расположены рядом с коллагеном I типа, тогда как клетки, не контактирующие с коллагеном типа I, находятся в состоянии покоя [79]. Также было показано, что коллаген типа I влияет на метастазирование, поскольку воздействие коллагена I типа приводит к более инвазивному поведению в опухолевых клетках [77, р. 7427]. В модели рака молочной железы *in vivo* с накопленным распределением коллагена I типа количество циркулирующих опухолевых клеток было увеличено по сравнению с количеством у мышей дикого типа. Более того, метастатические поражения были больше, чем у дикого типа [80].

Коллаген III типа является вторым по распространенности коллагеном в тканях человека и обнаруживается преимущественно в тканях с эластичными свойствами, таких как кожа, кровь, сосуды и различные внутренние органы. Коллаген III типа представляет собой гомотример. Состоит из трех $\alpha 1$ -цепей и по своим свойствам напоминает другие фибриллярные коллагены. Его

эластичные свойства могут быть обусловлены дисульфидными связями и тот факт, что на С-конце не происходит зависимой от лизилоксидазы перекрестной сшивки.

Как и коллаген I типа, распределение коллагена III типа увеличивается при многих раковых заболеваниях, таких как плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак молочной железы, поджелудочной железы и колоректальный рак [81-85]. При раке толстой кишки распределение коллагена III типа особенно увеличивается рядом с неоваскулярной тканью [83,р. 262].

Клетки рака поджелудочной железы, выращенные на коллагене III типа, демонстрируют повышенную пролиферацию, миграцию и снижение экспрессии E-кадгерина [77,р. 7427]. Более того, коллаген III типа участвует в инвазии и метастазировании клеток глиобластомы. Эти клетки демонстрируют высокий инвазионный и миграционный ответ при воздействии коллагена III типа, а антитела против коллагена III типа ингибируют эти процессы [86]. Другое исследование показало, что коллаген III является одним из немногих генов, которые модифицируются, когда инвазивные клетки рака простаты взаимодействуют со стромальными клетками костного мозга в микроокружении кости. Это взаимодействие имеет решающее значение для процесса метастазирования, что дополнительно предполагает участие коллагена типа III в инвазии и метастазировании [87].

Таким образом, коллаген является одним из наиболее распространенных белков у животных и основным компонентом внеклеточного матрикса в тканях. Присутствие коллагенов в ВКМ необходимо для придания тканям механической прочности и эластичности и способствует формированию естественного субстрата для прикрепления клеток, пролиферации и дифференцировки. Анализ коллагенового матрикса использовался в качестве прогностического фактора при опухолях молочной железы, при опухолях головы и шеи, а также при опухолях предстательной железы, что подчеркивает важность исследования коллагенов в строме опухоли.

1.3 Реорганизация коллагена в строме опухоли

Повышенное отложение коллагена является наиболее частым изменением ВКМ при раке. В здоровых тканях интерстициальные коллагеновые волокна имеют волнистую структуру, тогда как коллагеновые волокна в опухолях часто выпрямляются [88,89], а также количественно и качественно реорганизуются [90].

При раке молочной железы человека были выявлены три различных ориентации и отложения коллагеновых волокон, названные опухоль-ассоциированными коллагеновыми сигнатурами (TACS): TACS-1, повышенное накопление коллагеновых волокон в области, окружающей небольшие опухоли; TACS-2, наличие выпрямленных коллагеновых волокон, натянутых вокруг опухоли в неинвазивных опухолях, и, наконец, TACS-3, наличие коллагеновых волокон, ориентированных перпендикулярно границе опухоли [89,р. 490]. Подобные структурные признаки коллагена были обнаружены при других

видах рака, таких как рак яичников [91,92], базальноклеточная карцинома [93,94], глиобластома [95], почечно-клеточная карцинома [88,р. 517] и аденокарцинома протоков поджелудочной железы [96,97]. Было показано, что TACS способствует очаговой инвазии и метастазированию [89,р. 490], влияет на состояние заболевания и инвазию опухоли [98,99] и коррелирует со значительно худшей выживаемостью пациентов при множественных типах опухолей [100,101].

Считается, что линейно выровненные коллагеновые волокна создают пути миграции, которые позволяют раковым клеткам инвазировать и распространяться [102]. Было продемонстрировано, что ВКМ, депонированный рак-ассоциированными фибробластами, выровнен по замечательному параллельному паттерну и способствует распространению злокачественных клеток *in vivo* [103]. Повышенная плотность коллагена и ферментативное сшивание коллагена во время прогрессирования опухоли могут привести к ужесточению матрикса, а ужесточенный сшитый фибриллярный коллаген способствует повышению активности киназы PI3 и индуцирует инвазию эпителия, инициированного онкогеном [104].

Для локальной деградации и проникновения через барьеры внеклеточного матрикса клетки используют богатые актином выступы, называемые инвадосомами, которые включают инвадоподии (в раковых клетках) или подосомы (в стромальных клетках) [105]. Было показано, что фибриллярный коллагеновый матрикс высокой плотности сам по себе может индуцировать образование инвадоподий посредством специфического сигнального пути интегрин даже в отсутствие значительно измененной экспрессии гена или специфического белка [106]. Было продемонстрировано, что коллаген I и IV способствует расширению инвадоподий и миграции опухолевых клеток, а также фибробластов, эндотелиальных клеток и макрофагов [107,108].

Некоторые коллагены также связывают и активируют рецепторы рецепторов тирозинкиназ дискоидинового домена, которые, как полагают, опосредуют метастазы и агрессивность рака [109-112]. Активация DDR1 индуцирует сигнальные пути Src, Notch и IKK, DDR2 способствует передаче онкогенных сигналов через пути mTORC2 и АКТ, а недавние результаты показали, что передача сигналов DDR-коллагена играет важную роль в прогрессировании и метастазировании рака [113-115].

Фибробласты поддерживают строение тканей и органов, обеспечивая микроокружению условия для выполнения нормальных функций [116]. Научные данные показывают, что повреждение структур ткани является предпосылкой развития и роста злокачественных опухолей. Более трех десятилетий назад Dolberg D.S. с коллегами обнаружили, что разрушение нормальной гистоархитектоники тканей в результате раневого повреждения способствует развитию опухолей у кур, инфицированных вирусом саркомы Рауса [117]. С другой стороны, мышцы развиваются нормально после инъекции клеток тератокарциномы мышцы в бластоциты мышцы-альбиноса, при этом мышцы несут небольшие колонии раковых клеток в нормальных органах на

протяжении всей своей жизни [118]. Участки опухолевых клеток также можно обнаружить у людей при тщательном обследовании тканей здоровых людей [119], что согласуется с представлением о том, что нормальное микроокружение может сдерживать развитие раковых клеток и злокачественный рост посредством подавления соседних клеток.

В физиологических условиях фибробласты — это низкопролиферативные веретенообразные клетки, расположенные в соединительной ткани большинства органов. Фибробласты являются одними из распространенных клеток стромы, производящими и реорганизуящими белки ВКМ [120]. Фибробласты секретируют компоненты ВКМ и ферменты, ремоделирующие ВКМ, для поддержания гомеостаза стромы и определения структурной целостности и механических свойств органов. Фибробласты также влияют на рекрутирование иммунных клеток через выработку медиаторов воспаления и повышение чувствительности иммунных клеток к бактериальным липополисахаридам [121]. В зависимости от локализации, а также стромальной ткани хозяина типа и состояния, фибробласты могут проявлять гетерогенные фенотипы, проявляя разные программы транскрипции, коллективно контролируемые эпигенетическими модификациями и локальными сигналами [122].

При контакте фибробласты могут ингибировать рост соседних аномальных или трансформированных клеток посредством «супрессии соседей» [123]. Stoker M. и его коллеги впервые обнаружили это явление, когда обнаружили, что фибробласты мыши при контакте ингибируют рост трансформированных Polyomaviridae клеток *in vitro* [124]. С тех пор в нескольких сообщениях описывалось подавляющее действие фибробластов на рост раковых клеток с помощью различных механизмов, включая зависимое и независимое от целевых контактов ингибирование роста [125-127].

Рецидив рака через десять лет после обнаружения и удаления первичной опухоли, в свою очередь, является примером пробуждения спящих раковых клеток в месте метастазирования. Было высказано предположение, что разрушение микросреды является одним из ключевых механизмов этого процесса [128]. Следовательно, нарушение способности фибробластов реорганизовать внеклеточный матрикс путем манипулирования их механическими и адгезивными свойствами может создать проопухолегенное микроокружение. RhoA является главным регулятором формы клеток, адгезии, сократительного поведения и конфигурации фокальных спаек [129]. Исследования показали, что нокаут гена RhoA в фибробластах нарушает организацию цитоскелета, увеличивает жесткость клеток и снижает сократимость клеток [130], которые являются важными свойствами, необходимыми для поддержания нормальной структуры и функции соединительной ткани. В результате фибробласты теряют свою функцию подавления опухоли и, скорее, обеспечивают нишу, стимулирующую рост, посредством индукции фенотипа, размножающегося раком, в 3D-коллагеновой культуре и ксенотрансплантатных опухолях *in vivo*. В целом эти результаты

показывают, что поддержание целостности тканей имеет решающее значение для предотвращения развития опухоли.

При раке фибробласты постоянно подвергаются воздействию различных стимулов, способствующих развитию уникальных особенностей, таких как чрезмерные и специфические фенотипы секреторного ремоделирования и ремоделирования внеклеточного матрикса. Кроме того, опухоль-ассоциированные фибробласты могут приобретать повышенную аутокринную сигнальную способность и пролиферативную эффективность [131].

Таким образом, фибробласты отвечают за синтез и ремоделирование ВКМ. Фибробласты, управляемые раковыми клетками, не только синтезируют, производят и откладывают значительные количества компонентов ВКМ, но также сжимают ткань, тем самым изменяя ВКМ опухолевой стромы качественно и количественно. Некоторые опухолевые клетки сами по себе также могут синтезировать компоненты ВКМ, такие как коллаген и другие белки, ассоциированные с ВКМ, включая секретируемые факторы и модуляторы матрикса. Опухолевый ВКМ напоминает наихудшую форму аномальной рубцовой ткани, которая резко отличается от нормальных органов по составу, архитектуре и механическим свойствам из-за нарушения баланса между синтезом и секрецией ВКМ и измененной экспрессии ферментов, ремоделирующих матрикс. ВКМ опухоли обеспечивает физические, механические, биохимические и клеточные сигналы, способствующие росту опухоли и злокачественности, регулированию течения заболевания и влиянию на реакцию на терапию.

1.4 Роль микроокружения опухоли в метастазировании

В ряде исследований было показано, что усиленное отложение коллагена связано с метастазированием [132,133]. Недавние результаты показывают, что системные факторы дистанционно активируют стромальные клетки в будущих метастатических органах, чтобы способствовать модуляциям ВКМ, которые создают перmissive нишу.

Перепрограммирование и активация стромальных клеток в метастатических органах предшествует образованию метастазов. Первичные опухоли могут удаленно активировать каждый тип стромальных клеток в отдельных органах посредством системной передачи сигналов [134,135]. Эти активированные стромальные клетки подготавливают почву для дальнейшего посева метастазов, привлекают опухолевые клетки к месту метастазирования, поддерживают покой раковых клеток или опосредуют выход из состояния покоя. Стромальные клетки могут способствовать инвазии опухолевых клеток в метастатические органы и поддерживать их выживание и пролиферацию, тем самым обеспечивая успешную колонизацию метастатических участков. Это сопровождается модуляцией иммунного микроокружения стромальными клетками, провоцированием воспаления, способствующего развитию опухоли, а также созданием иммуносупрессивного и дисфункционального микроокружения, что в итоге может привести к резистентности к терапии.

Во время метастатического каскада стромальные клетки получают множественные активирующие сигналы, что приводит к дисфункции: вместо устранения повреждения тканей, вызванного диссеминированными раковыми клетками, они становятся виновниками, поддерживающими метастатический рост. Стромальные клетки модулируют метастатическое иммунное микроокружение, провоцируя воспаление и способствуя формированию иммуносупрессивного метастатического микроокружения. Активированные стромальные клетки привлекают опухолевые клетки, способствуют спячке и пробуждению раковых клеток, а также способствуют инвазии, выживанию и пролиферации опухолевых клеток, поддерживая метастатический рост.

Dvorak H.F. [136] заявил 30 лет назад, что рак — это незаживающая рана; с тех пор во многих исследованиях инвазии и метастазирования рака изучался процесс заживления ран. Во время заживления ран в раковых тканях активированные фибробласты могут привести к нормальной реакции заживления ран и служить барьером для подавления распространения раковых клеток, однако атипичный раневой процесс, аналогичный келоидному процессу, может протекать и в строме опухоли, где избыток тучных волокон может накапливаться утолщенными фибробластами. Незрелый фиброз, такой как келоидный рубец, может способствовать инфильтративному росту опухоли, и у пациентов с раком толстой кишки с этим фенотипом может быть нежелательный прогноз [18, р. 1359].

Метастазы опухоли могут блокироваться плотной фиброзной тканью. Согласно современным представлениям, миграция и инвазия раковых клеток должны блокироваться рыхлой фиброзной тканью, состоящей из миксоидных и келоидных пучков коллагена [137]. Кроме того, рак толстой кишки со зрелым фиброзом высокой плотности предполагает благоприятный исход выживаемости [138]. Уeno Н. с командой оценили зрелость фиброзной ткани у пациентов с колоректальным раком и сообщили, что группа со зрелым фиброзом имела значительно более высокую выживаемость, что дает патологическую основу для давнего убеждения, что плотная структура зрелого фиброза действует как препятствие для метастазирования опухоли [139,140]. Однако экспериментальные исследования показали, что активация фибробластов и фиброз могут способствовать инвазии рака. Активированные фибробласты производят большое количество коллагеновых волокон, которые образуют фиброз высокой плотности вокруг раковых клеток [141]. Сокращение волокон и жесткость опухоли в зрелой фиброзной ткани приводят к инвазии раковых клеток *in vitro* [142-144].

Недавно было экспериментально доказано, что жесткость опухоли способствует метастазированию. Когда фиброз образует плотную структуру вокруг скоплений раковых клеток в аденокарциноме, внутреннее давление вызывает разрыв структуры железы, что приводит к быстрому распространению раковых клеток [101, р. 563]. Кроме того, волокна стромы опухоли высокой плотности действуют как железнодорожные пути, способствующие движению раковых клеток, тем самым способствуя инвазии и

метастазированию [139,р. 1506]. Экспрессия лизилоксидазы (LOX), фактора, участвующего в формировании коллагена во время заживления ран, может вызывать плотный фиброз. Когда LOX активируется в строме опухоли и массив коллагена выравнивается, жесткость опухоли способствует миграции, инвазии и метастазированию раковых клеток [145]. Различные результаты клинико-патологических и экспериментальных исследований могут быть обусловлены различиями в природе и гистологической структуре различных раковых клеток.

Таким образом, микроокружение опухоли является неотъемлемой частью опухолей и играет центральную роль на всех стадиях канцерогенеза и прогрессирования. Каждый орган имеет уникальное и неоднородное микроокружение, которое влияет на способность диссеминированных клеток расти в новой, а иногда и враждебной метастатической нише. Резидентные стромальные клетки, такие как фибробласты, являются важными виновниками модуляции метастатического прогрессирования: они превращаются из стражей целостности ткани в дисфункциональных виновников, поддерживающих метастатический рост.

1.5 Гистопатологические прогностические критерии при колоректальном раке

1.5.1 Соотношение «опухоль-строма» как прогностический фактор у пациентов с колоректальным раком

Морфологический критерий «опухоль-строма» (международная аббревиатура от англ. *tumour-stroma ratio (TSR)*) определяется как доля площади ремоделированной стромы, связанной с опухолевыми островками, по отношению к общей площади опухоли [146-150]. Проведение исследований критерия TSR на больших группах пациентов подтвердило прогностическую ценность данного показателя для нескольких типов опухоли, включая рак толстой кишки [151-156], молочной железы [157-161], пищевода [162,163], шейки матки [164], гепатоцеллюлярную карциному [165] и другие раки [166-168], преимущественно окрашенных гематоксилином и эозином, которое может быть выполнено за короткое время [169]. Для максимальной стандартизации данного метода Pelt G.W. [156,р. 1519] представил рекомендации по оценке TSR. В соответствии с данными рекомендациями вначале на увеличении $\times 2.5$ или $\times 5$ в поле зрения выбираются области с наибольшим количеством стромы. Затем выбирается поле зрения, в котором опухолевые клетки наблюдаются по всем краям выбранного поля при более высоком увеличении $\times 10$. В качестве порогового значения для разделения опухолей с низким или высоким содержанием стромы Pelt G.W. [156,р. 1519] предложил использовать порог отсечения 50%.

West N.P. [155,р. 15] исследовал роль соотношения эпителиальных и стромальных клеток опухоли в неблагоприятном исходе. Исследование проводилось путем подсчета точек на виртуальных сканированных предметных стеклах, окрашенных гематоксилином и эозином у пациентов с

колоректальным раком. Порог TSR классифицировался как высокий (>47% процентов стромы) или низкий (<47% процентов стромы). Более высокая доля стромы ассоциировалась с худшей выживаемостью при раке. Прогностический эффект оставался значимым при опухолях толстой кишки (OR=2,474, 95%ДИ=1,132-5,408, $p=0,019$) и метастазах в лимфатических узлах при III стадии заболевания (OR=3,48, 95%ДИ=0,325-9,136, $p=0,007$). Исследователи путем многофакторного регрессионного анализа Кокса установили, что TSR является независимым прогностическим маркером с поправкой на возраст, T-стадию, N-стадию и экстрамуральную сосудистую инвазию ($p=0,017$).

Группа исследователей под руководством Huijbers A. изучала связь между TSR и прогнозом при раке толстого кишечника [151, p. 925]. Исследование TSR проводили визуально методом световой микроскопии. Пороговое значение TSR было установлено на значении 50%, разделяя пациентов на подгруппы с большим содержанием стромы (29,2% пациентов) и малым содержанием стромы (70,8% пациентов). По результатам исследования пятилетняя выживаемость была значительно выше в группе со стромой менее 50% в сравнении с группой в которой строма составляла более 50% (83,4% против 69,0%, $p<0,001$). При многомерном анализе группа пациентов с преобладанием стромы в опухолях имела худший прогноз по сравнению с группой пациентов, в опухоли которых преобладала ткань карциномы (OR=1,96, 95%ДИ=1,41-2,74). Результаты данного исследования показали, что преобладание стромы в опухоли является независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода у пациентов с раком толстого кишечника.

Park J.H. с коллегами оценивали прогностическое значение TSP у 331 пациента с колоректальным раком, перенесшего лечебную резекцию толстого кишечника [170]. Расчет TSR проводился с помощью компьютерной программы, разделяя 331 пациента на группы с высоким TSP (преобладание стромы) и с низким TSP (преобладание ткани карциномы), используя пороговое значение TSP 50%. При анализе выживаемости большое количество стромы коррелировало со снижением специфической выживаемости при раке (OR=1,84, 95%ДИ=1,17-2,92, $p=0,01$). TSP был значимым предиктором выживаемости у пациентов, перенесших плановую лечебную резекцию, независимо от неблагоприятных патологических характеристик и воспалительных реакций хозяина. Кроме того, TSP был тесно связан с локальным ростом и инвазией опухоли.

Scheer R. с коллегами оценили прогностическую ценность TSR у 154 пациентов с раком прямой кишки [171], рассчитывая TSR на рутинных микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Исследователи разделили пациентов на три группы: TSR-низкий (<30%), куда было включено 23,4% пациентов, TSR-средний (40-60%) – 45,4% пациентов и TSR-высокий (>70%) – 31,2% пациентов. Пятилетняя выживаемость в группах с высоким, средним и низким TSR составила 64,6%, 50,0% и 55,6% соответственно. По данным многофакторного анализа, пациенты без метастазов в лимфатических узлах с низким и промежуточным TSR имели более высокий риск смерти от

рака прямой кишки (ОР=5,27, 95%ДИ=1,54-18,10) по сравнению с пациентами с отсутствием метастазов в лимфатических узлах и высоким TSR. По результатам исследования установлено, что TSR потенциально может выступать в качестве прогностического фактора выживаемости у пациентов с хирургическим лечением рака прямой кишки, особенно в случаях с отрицательным результатом в лимфатических узлах.

В исследовании Zunder S.M. изучался прогностический потенциал TSR у пациентов с раком толстой кишки [172]. TSR рассчитывали на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Среди 1213 пациентов 32,1% пациентов были отнесены к группе с большим количеством стромы, а 67,9% к группе с обедненной стромой. Общая и безрецидивная выживаемость были значительно меньше в группе с преобладанием стромы по сравнению с группой с низким содержанием стромы (ОР для безрецидивной выживаемости: 1,75, 95%ДИ=1,32-2,33, $p<0,001$; ОР для общей выживаемости: 1,54, 95%ДИ=1,04-2,29, $p=0,03$). Пациенты с опухолями с высокой стромой ($n=339$, 28%) имели значительно более короткую безрецидивную выживаемость ($p<0,001$) по сравнению с опухолями с низкой стромой ($N=824$, 68%). Это исследование предполагает значительно более низкую выживаемость в опухолях с небольшим количеством стромы в отличие от опухолей с преобладанием стромы.

Группа исследователей под руководством Eriksen A.C. оценивала прогностическую ценность TSR у 573 пациентов с раком толстой кишки II стадии, получивших адъювантную химиотерапию [173]. TSR оценивался на срезах гематоксилином и эозин как низкий TSR (<50% стромы) и высокий TSR (>50% стромы). Пятилетняя выживаемость в группах с низким TSR и высоким TSR составила 61,0% и 72,6% соответственно. В многофакторном анализе TSR был выбран в качестве значимого прогностического фактора (ОР=1,376, 95% ДИ=1,016-1,862, $p=0,039$). Результаты исследования показали, что TSR имеет прогностическое значение в общенациональной популяционной группе пациентов с колоректальным раком II стадии, а включение TSR в шкалу риска для II стадии колоректального рака обеспечивает лучшую стратификацию пациентов.

В работе Sandberg T.P. исследовали клиническую роль TSR у 71 пациента с колоректальным раком [174]. TSR оценивали на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, в инвазивной части опухоли с помощью световой микроскопии. Все пациенты были разделены на группу с высокой стромой (28,2% пациента) и группу с низкой стромой (71,8% пациентов). В группе с преобладанием стромы прогноз был значительно хуже, чем в группе с низким содержанием стромы (25% против 78,4%, ОР=4,586, 95%ДИ=1,96-10,75, $p=0,001$). Кроме того, они сообщили, что активированное микроокружение в высоких опухолях стромы сверх экспрессирует различные типы генов коллагена, включая THBS2 и 4, а также INHBA, COX71A и LGALS1/галектин-1.

Подводя итоги отметим, несмотря на большое количество опубликованных исследований основной механизм прогностического эффекта TSR остается неуточненным. ВКМ помогает раковым клеткам взаимодействовать со стромальными клетками, было показано, что аномальная экспрессия некоторых секретлируемых белковых факторов, активирующих ВКМ, может способствовать онкогенезу [175]. Матриксные металлопротеиназы, разрушающие ВКМ, также способствуют возникновению и инвазии опухоли [176]. Опухоли с большей долей реактивной стромы способны продуцировать больше факторов роста, тем самым увеличивая общую опухолевую нагрузку [177]. Было высказано предположение, что относительное количество фиброза может играть роль в снижении доступности опухолей для иммунного ответа [178] путем инкапсуляции злокачественных клеток и предотвращения их разрушения [179]. При некоторых типах рака активированные фибробласты, известные также как рак-ассоциированные фибробласты, являются преобладающим типом клеток в опухолевой ткани, а не раковыми клетками. На ранних стадиях опухолевой прогрессии рак-ассоциированные фибробласты действуют как супрессоры контактного торможения в раковых клетках, увеличивая образование щелевых контактов между активированными фибробластами. На более поздних стадиях рак-ассоциированные фибробласты действуют как промоторы роста и прогрессирования опухоли после активации несколькими факторами, секретлируемыми опухолью [180]. Стромальные клетки также способствуют ангиогенезу и метастазированию негативно влияя на прогноз [181]. Таким образом активированная опухолью строма вызывает интерференцию эпителиальных клеток, инвазию опухоли и иммунное уклонение от злокачественных клеток [182]. Нормальная строма может замедлить или предотвратить образование опухолей, тогда как аномальные стромальные компоненты могут способствовать росту опухоли [183]. Выяснение ассоциации между стромальным компонентом и раковыми клетками и влияние этой ассоциации на прогрессирование рака также может быть полезным для разработки новых терапевтических подходов в будущем [184]. Точный механизм роли стромальных клеток в прогрессировании опухолей до конца не понятен, однако высокий TSR связан с прогрессированием опухолей высокой степени злокачественности и с плохим прогнозом [185].

Для оптимизации TSR при клиническом использовании необходимо уточнить следующие моменты. Во-первых, необходимо подтвердить воспроизводимость оценки TSR в образцах биопсии, так как предыдущие исследования оценивали TSR в хирургических образцах. С другой стороны, недавно в лечении рака желудочно-кишечного тракта было внедрено предоперационное адьювантное лечение, такое как предоперационная химиотерапия и предоперационная лучевая терапия. Предоперационное адьювантное лечение уменьшает количество опухолевых клеток, увеличивает количество стромальных клеток и влияет на TSR. Следовательно, чтобы оценить TSR до лечения, необходимо использовать образцы биопсии для

оценки TSR. Courrech Staal E.F. сообщал о валидационном исследовании по определению корреляции между образцами эндоскопической биопсии и хирургическими образцами при раке пищевода [186]. Они сообщили, что существует воспроизводимость оценки TSR между образцами эндоскопической биопсии и хирургическими образцами. Таким образом, воспроизводимость между образцами эндоскопической биопсии и хирургическими образцами должна быть подтверждена при других видах рака желудочно-кишечного тракта.

Во-вторых, необходимо определить оптимальное время для оценки TSR. Предыдущие исследования оценивали TSR с использованием операционного материала. Для лечения рака желудочно-кишечного тракта было введено периоперационное адьювантное лечение. Периоперационное адьювантное лечение может повлиять на TSR, поэтому необходимо решить, следует ли использовать образцы до адьювантного лечения или после адьювантного лечения.

В-третьих, необходимо оптимальное пороговое значение TSR. Все предыдущие исследования установили пороговое значение TSR на уровне 50%. Хотя тип рака, характеристики пациентов, количество пациентов и метод лечения были разными, во всех исследованиях было установлено одинаковое пороговое значение. Вероятно, тип рака и стадия опухоли могут влиять на TSR, следовательно, оптимальное пороговое значение TSR необходимо устанавливать в зависимости от типа и стадии опухоли.

В-четвертых, необходимо разработать оптимальный метод оценки TSR. Предыдущие исследования оценивали TSR визуально, чтобы свести к минимуму проблемы, связанные с визуальными методами оценки TSR, разрабатываются компьютерные методы глубокого обучения для облегчения автоматизированной оценки [187].

Таким образом, оценка TSR при аденокарциномах толстой кишки проводится на микропрепарате из наиболее инвазивной части опухоли, используемом в рутинной патологии для определения T-статуса. TSR может использоваться для прогнозирования как краткосрочных, так и на отдаленных онкологических исходах, у пациентов с раком желудочно-кишечного тракта, однако пороговые значения TSR, методы оценки и оптимальный период для оценки TSR неясны. Оценка TSR — это надежный метод, который требует лишь небольшого дополнительного времени и затрат и имеет потенциал для внедрения в повседневной практике. Метод имеет высокую воспроизводимость и низкую вариабельность между наблюдателями, однако на сегодняшний день в заключения патологов не включены критерии оценки характеристик стромы.

1.5.2 Классификация десмопластических реакций инвазивного края опухоли

Десмопластическая реакция (ДР) — это реакция фиброзной ткани вокруг опухолевых клеток, отражающая взаимодействия опухоли с организмом «хозяина». Диагностическая значимость гистологической классификации ДР по

микропрепаратам, окрашенным гематоксилином и эозином, была впервые исследована на группе пациентов с раком прямой кишки [140,р. 1504]. На группе из шестисот двадцать семи пациентов с распространенной карциномой прямой кишки исследователи выделили три группы опухолей в зависимости от фиброзной стромы в инвазивной области:

- множественные тонкие и зрелые волокна были расслоены на слои;
- широкие полосы эозинофильного гиалинизированного коллагена («келоидного» коллагена);
- миксоидная строма.

Установлено, что десмопластическая реакция в строме коррелирует с выживаемостью: в группе, где множественные тонкие и зрелые волокна коллагена были расслоены на слои, пятилетняя выживаемость составила 80%, в группе с широкими полосами эозинофильного гиалинизированного коллагена пятилетняя выживаемость составила 54%, в группе с миксоидной стромой - 26%. На основании многофакторного анализа было установлено, что десмопластическая реакция является независимым прогностическим фактором выживаемости, а фиброзная строма опухоли играет важную роль в регуляции неопластического поведения. Выявлено, что патологическая категоризация фиброзной стромы полезна для прогнозирования прогностического исхода у пациентов с раком прямой кишки.

ДР включает три типа, основанных на специфических гистологических признаках, обнаруживаемых исключительно в инвазивном крае опухоли:

- гиалинизированном келоидоподобном коллагене,
- миксоидной строме.

Этот метод впоследствии был применен к КРР [188], включая КРР II стадии [189], КРР III стадии [190-192], операбельный КРР IV стадии [193] и неоперабельный КРР стадии IV [194], при которых с помощью этого метода последовательно обнаруживалась многоуровневая стратификация выживаемости. Более того, недавние многоцентровые ретроспективные исследования показали, что значительная стратификация пациентов по выживаемости может быть достигнута путем определения ДР у пациентов с КРР II стадии в Японии [195] и Великобритании [15,р. 15164]. В обоих этих исследованиях было показано, что ДР является наиболее значимой из всех проанализированных гистопатологических особенностей для прогнозирования результатов выживаемости.

Для определения категории ДР используются микропрепараты первичной опухоли, окрашенные гематоксилином и эозином, изготовленные в рутинной патологоанатомической практике. Оценивается фиброзная раковая строма за пределами собственного мышечного слоя. Находки в подслизистой оболочке и собственной мышечной оболочке не учитываются при классификации картины ДР. Очень важным полем для оценки являются фиброзная строма вдоль ведущего края первичной опухоли (десмопластический фронт), где чаще всего появляются миксоидная строма и келоидоподобный коллаген. Если опухолевые узелки располагаются в жировой ткани, прикрепленной к первичной опухоли,

фиброзную строму узла исследуют полностью. Участки стромы с локализованным воспалением, предположительно вызванным внешними патогенами, например, вокруг микроскопических абсцессов вследствие внутриопухолевой перфорации не учитываются.

Миксоидная строма — это строма с аморфным муцинозным веществом, представленным базофильным или амфифильным вакуолизированным внеклеточным материалом среди коллагеновых волокон. Соотношение стромального муцина и раковой стромы варьируется в зависимости от опухоли. Для определения минимального количества миксоидной стромы, которую можно считать незрелой, в качестве критерия используется поле микроскопа объектива $\times 40$. Как правило, миксоидная строма существует в относительно ограниченных областях на десмопластическом фронте даже в случаях с незрелой ДР.

Следует отличать стромальный муцин как компонент миксоидной стромы от утечки стромального муцина, связанной с муцинозным раком, поскольку он сопровождается другими компонентами ДР, включая фибробласты, коллагеновые волокна, воспалительные клетки и эндотелиальные клетки в стромальном муцине.

Келоидоподобный коллаген представляет собой толстый пучок гипоклеточного коллагена с яркой эозинофильной гиалинизацией. Чтобы отличать его от фрагментированных коллагеновых волокон, в качестве критерия минимальной толщины гиалинизированного коллагена можно использовать ширину 20 мкм. Хотя келоидоподобный коллаген появляется исключительно на десмопластическом фронте, а не в поверхностной части или центре опухоли, существует гетерогенность с точки зрения его анатомического распределения на десмопластическом фронте. Некоторое количество келоидоподобного коллагена распространено вблизи гнезд опухолей, а другое количество келоидоподобного коллагена обнаруживается на десмопластическом фронте, немного удаленном от гнезд опухолей.

Хотя биологические механизмы и пути, ведущие к морфологическому десмопластическому разнообразию, еще предстоит выяснить, предполагают некоторые возможные причины прогностической ценности характеристики ДР, о которой сообщается не только у пациентов с КРР, но и у пациентов с другими типами злокачественных новообразований, включая аденокарциному протоков поджелудочной железы [196], плоскоклеточный рак кожи [197], плоскоклеточный рак шейки матки [198] и внутрипеченочную холангиокарциному [199]. Во-первых, возможно, что ДР связана с эпителиально-мезенхимальным переходом неопластических клеток [194, p. 1380]. Например, келоидоподобный коллаген и миксоидная строма редко наблюдаются в центре опухолей, а появляются исключительно на инвазивном фронте опухолей, где происходит ремоделирование раковой среды. Одним из широко документированных свойств келоидоподобного коллагена является способность индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход в неопластических клетках и, таким образом, способствовать инвазивности [200].

Вышеупомянутая гипотеза согласуется с результатами исследований [138,р. 92-100], которые указывают на тесную связь между ДР и степенью почкования опухоли [201,202].

Толстые и гиалинизированные пучки коллагена, характеризующие промежуточную ДР, также наблюдаются при келлоидах, в которых фибробласты сверх экспрессируют различные факторы роста, включая трансформирующий фактор роста β (TGF- β) [203]. В микроокружении опухоли, окружающем эти пучки, TGF- β , хорошо зарекомендовавший себя индуктор ВКМ [204,205], с высокой вероятностью активируется. Кроме того, миксоидная строма, характеризующая незрелую ДР, связана с чрезмерным отложением компонентов внеклеточного матрикса, таких как фибронектин [139,р. 1506], влияющий на различные проопухолевые функции, включая активацию ВКМ [206]. Следовательно, вероятный механизм неблагоприятного прогностического воздействия незрелой ДР заключается в том, что она отражает активированный эпителиально-мезенхимальный переход, который способствует прогрессированию карциномы посредством различных механизмов, включая наделение клеток мигрирующими и инвазивными свойствами [207].

Гистологические особенности стромы, связанные с неблагоприятным типом ДР, включают меньшее количество иммунных клеток (включая инфильтрирующие опухоль Т-клетки и макрофаги, ассоциированные с опухолью) [208], ингибирование лимфоидной реакции, подобной болезни Крона [16,р. 1239] и изменение микрососудов [139,р. 1506]. Таким образом, второй возможный механизм агрессивности келлоидоподобного коллагена с неблагоприятным типом ДР заключается в том, что раковая строма и келлоидоподобный коллаген активно участвуют в модуляции иммунного ответа, помогая неопластическим клеткам избежать обнаружения [209]. Некоторые специфические компоненты, которые обеспечивают структурный каркас раковой стромы с незрелой ДР, например, фибронектин и тенасцин-С [139,р. 1506] могут физически мешать инфильтрации иммунных клеток, тем самым способствуя прогрессированию опухоли.

Десмопластическая реакция и фиброз - два разных, но связанных между собой патологических процесса, которые обычно наблюдаются при различных типах рака [49,р. 207]. Десмопластическая реакция - общий термин, используемый для описания пролиферации фиброзной ткани в области, окружающей опухоли. Эта ткань, состоящая из коллагена и других компонентов соединительной ткани, называется десмопластической стромой и служит для физического отделения опухоли от окружающей здоровой ткани. Фиброз — это термин, используемый для описания прогрессирующего накопления компонентов внеклеточного матрикса, таких как гиалуроновая кислота, в интерстициальном пространстве ткани, которая взаимодействует с коллагеном, влияя на активность раковых клеток. Считается, что такое накопление матриксного материала является реакцией на хроническое воспаление или травму и вызывает рубцевание и жесткость тканей [210]. Считается, что десмопластическая реакция способствует формированию

фиброза, поскольку десмопластическая строма может препятствовать диффузии питательных веществ и кислорода в окружающие ткани, тем самым создавая среду, способствующую накоплению компонентов внеклеточного матрикса и влияя на активность раковых клеток [49,р. 207].

ДР означает наличие избытка внеклеточного матрикса на инвазивном фронте опухоли [191,р. 39]. Предыдущие исследования, проведенные Ueno et al. показали, что ДР связана с неблагоприятными клинико-патологическими проявлениями (Т-стадия, лимфатическая или сосудистая инвазия) при КРР [211].

Келлоидоподобный коллаген усиливает «мезенхимально подобный» фенотип и способствуют метастазированию неопластических эпителиальных клеток, тогда как нормальные фибробласты придают «эпителиально подобный» фенотип и подавляют метастазирование [103,р. 63]. Это указывает на то, что келлоидоподобные фибробласты представляют собой совершенно отличный от нормальных фибробластов тип клеток, который оказывает сильное влияние на онкогенез [212].

Таким образом, научные исследования показали значительную корреляцию между ДР незрелого типа и лимфоваскулярной инвазией. Однако необходимы дополнительные исследования для анализа детального механизма, лежащего в основе развития ДР незрелого типа при КРР. Фиброз — это нормальная реакция, которая возникает во время заживления ран, и ожидается, что области зрелого фиброза с плотными коллагеновыми волокнами будут действовать как барьеры, препятствующие распространению раковых клеток. Десмопластические реакции вокруг опухоли могут иметь гистологическую структуру, аналогичную заживлению ран, и считаются благоприятным прогностическим фактором у пациентов с колоректальным раком [139,р. 1506]. Однако незрелые десмопластические реакции гистологически сходны с келоидными рубцами и могут способствовать инфильтрации опухоли, что указывает на неблагоприятный прогноз.

1.5.3 Почкование опухоли, венозная, лимфатическая и периневральная инвазия

Почкование опухоли определяется наличием одиночных опухолевых клеток или небольших скоплений клеток в центре опухоли («внутриопухолевое» почкование) или на инвазивном фронте опухоли («перитуморальное» почкование) [213].

Почкование опухоли происходит при большом количестве видов рака из разных органов [214]. Частоту образования опухолей высокой степени злокачественности сложно оценить из-за использования различных систем оценки, но ее можно обнаружить примерно в 40% случаев колоректального рака [210,р. 669], рака пищевода и рака желудка [215-219], а также более чем в 50% внутрипротоковых аденокарцином поджелудочной железы [220] и холангиокарцином [221]. Почкование опухоли встречается при многих других типах рака, таких как рак головы и шеи [222], аденокарцинома легких и

плоскоклеточный рак [223,224], а также рак молочной железы [225] и шейки матки [226].

Почкование опухоли отражает инвазивный характер роста с метастатическим потенциалом, который играет ключевую роль в микроокружении опухоли и эпителиально-мезенхимальном переходе (EMT). Еще в 1954 году Imai T. впервые сообщил о явлении почкования при различных солидных опухолях и его корреляции с прогнозом заболевания [227]. Последующие исследования также показали, что почкование служит независимым прогностическим биомаркером при КРР и наблюдается при различных солидных опухолях, включая язык, гортань, пищевод, желудок, грудь и внутрипеченочные холангиокарциномы. Было показано, что оно является предиктором прогрессирования рака [228,229]. Прогностическая роль почкования тщательно изучалась и в настоящее время влияет на принятие клинических решений у пациентов с КРР I и II стадии [230,231].

В настоящее время почкование высокой степени злокачественности является независимым предиктором для определения последующего хирургического лечения I стадии КРР [232]. В частности, третья степень почкования является сильным неблагоприятным прогностическим фактором, используемым для выявления пациентов с КРР II стадии с высокой частотой рецидивов и высокой смертностью для назначения адъювантного лечения [233]. В новых классификациях TNM 2017 года и Всемирной организации здравоохранения 2019 года почкование рассматривается как важный дополнительный биологический маркер для прогнозирования прогноза КРР [234,235]. Хотя прогностическое влияние почкования на I и II стадии КРР очевидно, применение этого критерия в клинической практике для принятия решения о лечении при III-IV стадиях КРР ограничено. В основном это связано с отсутствием соответствующих исследовательских данных в этом контексте [236].

Венозная инвазия, или инвазия «крупных сосудов», является известным независимым прогностическим индикатором отдаленного рецидива и выживаемости при колоректальном раке. Точная оценка венозной инвазии имеет особое значение на стадии II заболевания, поскольку она может повлиять на решение о назначении адъювантной терапии. Широко распространено мнение, что венозная инвазия является заниженным признаком со значительной вариабельностью зарегистрированной заболеваемости. В последнем протоколе сообщений о раке Коллегии американских патологов венозная инвазия не регистрируется отдельно от лимфоваскулярной инвазии или инвазии «мелких сосудов», что может быть нецелесообразно, поскольку эти признаки дают разную прогностическую информацию. Наличие экстрамуральной венозной инвазии является надежным предиктором неблагоприятного исхода, хотя прогностическое значение интрамуральной венозной инвазии остается неизвестным.

Венозная инвазия, или инвазия «крупных сосудов», является общепризнанным независимым прогностическим показателем рецидива

гематогенного заболевания и выживаемости при колоректальном раке [237-240].

В текущих рекомендациях отмечается, что на патологической стадии рака толстой кишки следует сообщать о двух опухоль-специфичных параметрах, включая лимфоваскулярную инвазию (ЛВИ) и периневральную инвазию (ПНИ) [241,242]. При ЛВИ опухолевые клетки вовлекаются в небольшие лимфатические или сосудистые каналы, выстланные эндотелием, что указывается как ранний и обязательный этап метастазирования опухоли [243,244].

Периневральная инвазия является одним из наиболее мощных взаимодействий между опухолями и нервами. Согласно J.G. Vatsakis, ПНИ определяется как «опухолевая инвазия в нервы, вокруг них и через них» [245]. Хотя это определение широко распространено, оно имеет определенные ограничения. Альтернативное и более широкое определение, предложенное Liebig et al., включает опухоли в непосредственной близости от нервов, занимающие не менее 33% окружности нерва или наличие опухолевых клеток в эпиневррии, периневррии и эндоневрии оболочки нерва [246]. Все что меньше 33% не является инвазией [247]. ПНИ представляет собой вершину взаимодействия опухоли и нерва, обеспечивая как опухолевым клеткам, так и нервам преимущество в выживании. В настоящее время большинство исследований сосредоточено на изучении прогностической роли двух патологических факторов при КРР I и II стадии и идентифицировано как показание к адъювантной химиотерапии [248,249]. Однако лишь в ограниченном количестве исследований сообщалось о прогностической ценности ЛВИ и ПНИ при раке толстой кишки III стадии [250,251]. Фактический прогностический эффект ЛВИ и ПНИ остается неясным у пациентов с раком толстой кишки III стадии, проходящих радикальное лечение.

Неблагоприятное прогностическое влияние ЛВИ и ПНИ у пациентов с колоректальным раком без лимфатических узлов хорошо известно [252]. Таким образом, адъювантная химиотерапия рекомендуется пациентам с раком толстой кишки II стадии с плохими прогностическими характеристиками, включая ЛВИ и ПНИ. Недавно Чжун J.W. и со авт. выявили, что ЛВИ является индикатором более агрессивного биологического поведения и неблагоприятного прогноза у пациентов с колоректальным раком III стадии [251,p. 1860]. Однако в исследовании Zhong J.W. et al. было два ограничения. это не могло подтвердить прогностическую ценность ЛВИ для рака толстой кишки III стадии. В исследование были включены не только больные раком толстой кишки, но и больные раком прямой кишки. Предыдущие исследования выявили различные модели рецидивов между ЛВИ-положительным раком толстой кишки и ЛВИ-положительным раком прямой кишки, указывая на то, что в прогностических свойствах ЛВИ существовали расхождения при раке толстой и прямой кишки [253].

Таким образом, лимфатическая инвазия, сосудистая инвазия и периневральная инвазия являются прогностическими факторами рака толстой

кишки. Было показано, что венозная инвазия увеличивает риск отдаленных метастазов, а также метастазов в регионарные лимфатические узлы у пациентов с колоректальным раком. Более того, венозная инвазия была в значительной степени связана с безрецидивной, онкологической и общей выживаемостью в однофакторных анализах и в многопараметрических анализах. Перинеуральная инвазия является сильным прогностическим индикатором колоректального рака. Почкование опухоли в значительной степени связано с локальным рецидивом. Однако дальнейшие исследования, сравнивающие прогностическую эффективность трех гистопатологических переменных, в этом отношении являются оправданными.

1.6 Иммунные клетки при колоректальном раке: характеристика и прогностическая значимость

Для роста, инвазии и метастазирования опухоль взаимодействует со своим микроокружением, состоящим из множества клеток различного происхождения, которые образуют опухолевый матрикс, ее васкуляризацию, ее лимфатическую и неврологическую сеть. Микроокружение также содержит клетки иммунной системы, включая воспалительные инфильтраты врожденной и адаптивной иммунной системы.

Взаимодействия между злокачественными клетками и местной иммунной инфильтрацией сложны и приводят к балансу между эффектами, способствующими развитию опухоли, и эффектами, контролирующими опухоль. Для клиницистов более глубокое понимание роли иммунного ответа хозяина во влиянии на естественное течение КРР может иметь важные последствия. Это позволяет лучше стратифицировать риски и может помочь в разработке рекомендаций относительно адъювантной терапии, а также разработке новых иммунных подходов к лечению КРР.

Степень лимфоцитарной инвазии в опухолевую ткань отражает иммунный статус хозяина и играет ключевую роль в прогрессировании опухоли [254]. Некоторые отчеты показали, что инфильтрация иммунными клетками является хорошим прогностическим фактором при КРР [255-257]. Хотя инфильтрация иммунными клетками коррелирует с прогнозом при КРР, для его оценки применялись различные методы. К ним относятся иммуногистохимическое окрашивание или окрашивание гематоксилином и эозином; оценка опухолевого центра или фронта инвазии; и процент площади, занимаемой клетками или абсолютное количество клеток. [258-266]. Klintrup K. и др. [259,р. 805] и Nuh J.W. и др. [254,р. 547] сообщили, что большее количество воспалительных клеток коррелирует с хорошим прогнозом при КРР в исследовании, в котором количество иммунных клеток оценивались по 4-степенной шкале. Canna K. с исследователями [256,р. 1595] показали, что потеря CD4⁺ Т-лимфоцитов коррелирует с плохой выживаемостью в исследовании, в котором проводилось иммуногистохимическое окрашивание на CD4. Funada Y. [257,р. 651] показал, что высокий уровень CD8⁺ Т-лимфоцитов достоверно коррелирует с хорошим прогнозом. Chiba T. измерили

количество иммунных клеток [266,р. 1839], с другой стороны, Klintrup K. et al. использовал четырехградусную шкалу [259,р. 805]. Ношо и др. измеряли клетки в опухолевом центре [262,р. 22047], тогда как Menon et al. измерили клетки в инвазивном крае [267].

CD3 представляет собой мультимерный белковый комплекс, состоящий из четырех различных полипептидных цепей: гамма, дельта, эпсилон и дзета. В структуру белка CD3 входят: N-концевой домен, распознающий чужеродные антигены, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, который содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы, распространяющие сигнальные каскады.

В 2018 году Общество иммунотерапии рака предложило использовать Immuno score (IS-ИС) для оценки риска рецидива у пациентов с раком толстой кишки, и их результаты доказали важную роль IS в оценке риска рецидива КРР [268]. IS основан на количественном определении CD3⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток в центре опухоли и на инвазивном крае с помощью ИГХ. Система оценок от IS0 (I0) до IS4 (I4) и высокий IS были связаны с длительной выживаемостью при КРР [269]. В исследовании Mlesnik et al. предполагается, что IS играет большую роль в прогнозировании выживаемости пациентов с КРР, чем MSI [270]. Однако IS как прогностический биомаркер иммунотерапии рака толстой кишки имеет определенные ограничения. Во-первых, анализы IS в основном выполняются с помощью ИГХ, который является полуколичественным тестом, и результаты могут быть субъективными. Во-вторых, тест IS требует одновременной оценки лимфоцитов в центре и на краях опухоли, чего трудно достичь при метастатических опухолях. Кроме того, внутриопухолевая гетерогенность также может влиять на точность IS. Например, гетерогенность Т-клеток наблюдалась в первичной опухоли и метастазах в печени у пациентов с КРР [271]. Наконец, текущие исследования показали, что на эффективность иммунотерапии опухолей влияет иммунный ландшафт, а не отдельная иммунная клетка [272-275].

CD4 представляет собой мономерный трансмембранный гликопротеин типа I с молекулярной массой 55 кДа, экспрессируемый Т-хелперами и на низких уровнях в макрофагах и дендритных клетках, но отсутствующий в В-клетках. Плотность CD4⁺ Т-клеток является неблагоприятным прогностическим фактором при других типах рака, например, раке легких, почек, простаты и молочной железы [276-279]. Напротив, исследование Kuwahara T. показало, что плотность CD4⁺ Т-клеток связана с благоприятными клиническими исходами [280]. Причина этого несоответствия остается неясной, но это может быть связано с тем, что функция CD4⁺ Т-клеток в микроокружении опухоли, то есть активация иммунного ответа или иммуносупрессия, может различаться в зависимости от типа рака.

CD8 представляет собой гетеродимерный трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 68 кДа, экспрессируемый цитотоксическими Т-клетками и на низких уровнях в НК-клетках и субпопуляции клеток костного мозга. CD8⁺ Т-клетки представляют собой цитотоксические Т-лимфоциты,

которые напрямую атакуют раковые клетки и играют центральную роль в противораковом иммунитете [281]. Предыдущие исследования выявили существенные доказательства того, что плотность CD8⁺ TIL связана с благоприятной выживаемостью у пациентов с различными типами рака [282-283]. CD8⁺ Т-клетки представляют собой наиболее большую подгруппу цитолитических клеток. Цитотоксические процессы осуществляются несколькими веществами, продуцируемыми CD8⁺ Т-клетками, такими как GZMB, перфорин, лиганд Fas (FasL) и TNF- α [284]. Подобно CD8⁺ Т-клеткам, цитотоксические CD4⁺ Т-клетки влияют на гибель клеток через пути Fas/FasL и GZMB/перфорин. В отличие от других подгрупп CD4⁺ Т, цитотоксические CD4⁺ Т-клетки имеют собственные программы развития. В ответ на опухолевые антигены количество цитотоксических CD4⁺ Т-клеток будет увеличиваться [285]. Более того, недавнее исследование подтвердило, что у пациентов с КРР с благоприятным прогнозом обычно наблюдаются инфильтраты опухолевых иммунных клеток с повышенной цитолитической активностью [286]. Однако количество цитотоксических Т-клеток уменьшается по мере увеличения стадии TNM при КРР [287].

У людей CD8⁺ цитотоксические Т-клетки [288], CD4⁺ цитотоксические Т-клетки [285,р. 323] и клетки Th1 являются наиболее важными подгруппами, продуцирующими IFN- γ . Этот цитокин действует, исключительно стимулируя путь JAK1/2-STAT1, который провоцирует несколько иммунологических процессов, включая активацию макрофагов, активацию пути MHC-I/II, стимуляцию, ингибирование Treg-клеток, а также дифференцировку и активацию клеток Th1 [289]. Все эти процессы относятся к IFN- γ -опосредованному иммунному ответу 1-го типа, который вызывает глубокую ремиссию опухоли. Наряду с цитотоксическими Т-клетками, высокая плотность опухолевых клеток Th1 предсказывает благоприятный прогноз при КРР [290]. Между тем, опухолевая инфильтрация цитотоксическими Т-клетками и клетками Th1, а также усиление регуляции IFN- γ служат признаками, указывающими на хороший ответ на ингибиторы иммунных контрольных точек [291], поскольку IFN- γ может усиливать экспрессию PD-L1 и MHC-I опухолевыми клетками [292]. Однако любой дефицит, приводящий к активации JAK1/2-STAT1, искажает терапевтическую эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек [293]. Это предполагает, что IFN- γ может синергизировать эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек.

CD20 составляет 33-36 кДа. негликозилированный трансмембранный белок, который экспрессируется на клетках В-линии экспрессия впервые отмечается на стадии пре-В-клеток и продолжается на всех стадиях созревания В-клеток. Немногие исследования изучали прогностическую роль В-лимфоцитов при КРР. Verntsson J. [294] в относительно большой когорте обнаружил независимую благоприятную прогностическую роль инфильтрации CD20⁺ В-лимфоцитов в первичных опухолях КРР. В своем исследовании они использовали метод оценки, при котором вручную подсчитывали инфильтрирующие опухоль клетки CD20⁺ и анализировали их

прогностическую ценность, разделяя их на группы с высокой и низкой инфильтрацией опухоли. Однако они не проводили комбинированный анализ инфильтратов В- и Т-лимфоцитов. Еще два исследования рассмотрели прогностическую роль CD20⁺ В-лимфоцитов при КРР и обнаружили нейтральную или отрицательную прогностическую роль [295,296]. Это были небольшие исследования с использованием полуколичественной шкалы инфильтрации, что может способствовать этим различиям. Исследование подтверждает положительную прогностическую роль В-лимфоцитов при первичном КРР. Была изучена инфильтрация CD20⁺ В-лимфоцитами при метастатическом КРР, а также было обнаружено благоприятное влияние на прогноз [297,298].

Молекула адгезии нервных клеток (NCAM), также известная как CD56, является членом суперсемейства иммуноглобулинов, участвующих как в так называемых гомофильных, так и в гетерофильных взаимодействиях [299]. CD56 часто считают маркером детерминации нейронных линий из-за места его обнаружения. Экспрессия CD56 обнаруживается и в кроветворной системе. Здесь экспрессия CD56 наиболее тесно связана с натуральными киллерами (НК), но не ограничивается ими [300]. В исследовании сообщалось о наличии субпопуляций НК-клеток у пациентов с КРР, с выводом о том, что «процент CD16⁺ НКТ-подобных клеток был независимо связан с более короткой безрецидивной выживаемостью у пациентов с КРР» [301]. Однако авторы включили только ограниченное число пациентов, а стратификация по разным стадиям, а также разделение популяции ярких НК-клеток CD56 и тусклых CD56 еще больше снизили достоверность их данных. Более того, некоторые из этих пациентов получили радиологическое лечение еще до сбора НК-клеток, что может внести гетерогенность (смесь пациентов, первоначально получавших лечение, и пациентов, прошедших лечение) в объединенную популяцию пациентов. В другом исследовании сообщалось об отрицательной корреляции между периферическими НК-клетками и стадией КРР по TNM, со значительной разницей в НК-клетках между здоровыми и стадиями I и II, а также здоровыми и стадией IV, но не между здоровыми и стадией III [302]. Эта противоречивая тенденция может быть связана с небольшим количеством включенных пациентов в каждую группу. CD56⁺ Т-клетки передают сигналы, усиливающие пролиферацию, после глобальной активации другим иммунным клеткам, опосредуя иммунные ответы контактно-зависимым образом.

Эти свойства делают CD56⁺ Т-клетки привлекательными потенциальными мишенями для терапии инфекционных и иммунно-опосредованных заболеваний, а также рака. Например, при метастатической меланоме отдельная популяция Т-клеток с высокой экспрессией HLA-DR и CD56 увеличилась в девять раз у пациентов, ответивших на терапию анти-PD-1 [303]. В соответствии с этим иммунорадиотерапия увеличила количество циркулирующих клеток CD8⁺ CD56⁺ у больных раком на поздних стадиях [304]. Интересно, что введение CD56⁺ пациентам, не ответившим на иммунолучевую терапию, в рецидивирующие метастатические поражения

приводило к 59% полных ремиссий в этих местах. Также не каждая CD56⁺ Т-клетка по определению обладает иммуностимулирующей способностью. В опухолевом ложе пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой была обнаружена популяция FOXP3⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD56⁺ с иммуносупрессивной функцией (аналогично регуляторным Т-клеткам) [305]. Для сравнения, клетки FOXP3⁺ редко обнаруживались в популяции CD3⁺ CD56⁺ из соседних нераковых тканей и полностью отсутствовали в нормальных тканях печени. Кроме того, было обнаружено, что распространенность FOXP3⁺ CD4⁺ CD56⁺ Т-клеток в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) обратно коррелирует с выживаемостью пациентов. Помимо FOXP3⁺ TIL, другие субпопуляции иммунных клеток также могут оказывать мощное регуляторное/подавляющее влияние на клеточно-опосредованный иммунный ответ. При глиобластоме человека значительная часть TIL представляла собой CD3⁺ CD4⁺ CD56⁺ иммуносупрессивные Т-клетки [306]. Здесь также только меньшинство CD3⁺ периферических лимфоцитов экспрессирует CD56. Однако в других неглиальных внутричерепных опухолях, включая менингиому и метастатический немелкоклеточный рак легкого, не наблюдалось накопления CD4⁺ CD56⁺ в опухоли. Поэтому необходимо принять во внимание, что благоприятный профиль CD56⁺ Т-клеток, возможно, зависит от субпопуляции Т-клеток и/или чувствителен к изменениям микроокружения опухоли с вариациями между типами рака.

CD163 представляет собой трансмембранный рецептор массой 130 кДа, экспрессируемый исключительно моноцитами и макрофагами, опосредующий эндоцитарное поглощение комплексов гаптоглобин-гемоглобин (Hr-Hb), которые образуются при внутрисосудистом гемолизе [307]. При интернализации комплексы Hr-Hb разрушаются в лизосомах, в результате чего образуются противовоспалительные метаболиты гема, которые ослабляют воспалительную реакцию моноцитов и макрофагов [308]. CD163⁺ может быть отщеплен от клеточной мембраны моноцитов и макрофагов протеазой ADAM17/TACE при активации провоспалительными стимулами [309]. Растворимый CD163⁺ (sCD163) является важным биомаркером при различных воспалительных заболеваниях, включая сепсис, заболевания печени и синдром активации макрофагов [310]. Кроме того, высокие уровни sCD163 связаны с прогрессированием заболевания и клиническим исходом при различных типах рака [311]. Когда моноциты покидают кровообращение и мигрируют в ткани, они дифференцируются в макрофаги. Было описано, что незафиксированные макрофаги M0 поляризуются в провоспалительные макрофаги (так называемый фенотип M1) с высокой индуцируемой экспрессией синтазы оксида азота (iNOS) или в макрофаги, связанные с ранозаживляющими и противовоспалительными функциями (так называемые фенотип M2) с высокой экспрессией CD163⁺ [312-314]. Сообщалось, что опухоль-ассоциированные макрофаги экспрессируют высокие уровни CD163⁺ (т.е. фенотип M2), и плотность этих клеток связана с неблагоприятным клиническим исходом при многих видах рака человека [315-317]. Таким образом, хотя CD163⁺ считается

прогностическим биомаркером при различных типах рака, его роль в КРР до сих пор неясна и требует дальнейшего изучения. Например, сообщалось, что высокая плотность CD163⁺ связана как с неблагоприятным [318-320], так и с благоприятным клиническим исходом [321-323] при КРР.

Подводя итоги, отметим иммунная реакция хозяина, представленная инфильтрирующими опухоль иммунными/воспалительными клетками, является одним из ведущих игроков в микроокружении опухоли. Плотность и пространственное распределение иммунных инфильтратов в опухолях до лечения связаны с выживаемостью пациентов и ответами на иммунную терапию. Степень инфильтрации внутриопухолевых иммунных клеток в любой момент времени отражает динамические процессы, включая экстравазацию иммунных клеток из сосудистой сети и распределение среди опухолевых клеток, пролиферацию, выживание и удержание в микроокружении опухоли.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

2.1.1 Общая структура исследования

Основная научно-исследовательская работа выполнена на базе Медицинского Центра НАО Западно-Казахстанский Медицинский Университет имени Марата Оспанова в отделение патоморфологии и на кафедре онкологии. Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами, установленными локальным этическим комитетом НАО Западно-Казахстанский Медицинский Университет имени Марата Оспанова (протокол №9 от 19.11.2021 г.).

По первой задаче исследование представляет собой ретроспективное когортное исследование, проведенное с целью анализа демографических и клинических характеристик пациентов с колоректальным раком (КРР) в Актюбинской области за период с 2019 по 2023 годы на базе Медицинского Центра НАО Западно-Казахстанский Медицинский Университет имени Марата Оспанова располагающегося по адресу г.Актобе, микрорайон Жанаконьс, 8. Была изучена медицинская документация пациентов с КРР.

Набор данных представлял полную информацию о пациентах, которая давала возможность провести комплексный анализ их состояния, факторов риска, лечения и исходов. Все данные были получены из Комплексной медицинской информационной системы «Damumed», а также после изучения амбулаторных карт пациентов.

Основные категории данных включали:

1. Демография: информация о возрасте, поле, месте проживания (город или село).

2. История болезни и факторы риска: данные о хронических заболеваниях, таких как гипертония, диабет или сердечно-сосудистые патологии, а также информация о вредных привычках (курение, алкоголь). Отдельно учитывались семейные случаи онкологических заболеваний и возможное влияние профессиональных и экологических факторов, например, работа с химическими веществами или радиацией.

3. Особенности заболевания: возраст пациента на момент постановки диагноза, продолжительность симптомов до обращения к врачу, основные проявления заболевания (боли, потеря веса, общая слабость), а также локализация опухоли в организме.

4. Патоморфология опухоли:

- Гистологический тип опухоли (например, аденокарцинома или плоскоклеточный рак).

- Степень злокачественности.

- Данные о глубине поражения, наличии инвазии в сосуды или нервы.

5. Стадия и распространённость: информация о размере опухоли, поражении лимфоузлов и наличии отдалённых метастазов, например, в лёгких, печени или костях.

6. Лечение: сведения о методах терапии, включая хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую или таргетную терапию. Учитывались объём операции, вид доступа, результаты лечения и комбинированные подходы.

7. Долгосрочные результаты: данные о выживаемости пациентов, рецидивах и прогрессировании болезни.

8. Дополнительные исследования: результаты визуализационных методов (КТ, МРТ, ПЭТ) и лабораторных анализов, включая онкомаркеры, биохимические показатели крови и данные жидкостной биопсии.

Эти данные давали возможность изучить взаимосвязи между характеристиками опухоли, факторами риска и результатами лечения, что позволяло глубже понять механизм заболевания, прогнозировать исходы и находить более эффективные подходы к диагностике и терапии.

Для достижения последующих задач (2, 3 и 4):

- Определить прогностически значимый уровень келлоидоподобного коллагена стромы инвазивного края колоректальной аденокарциномы;

- Изучить взаимосвязь келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с гистопатологическими характеристиками опухоли, клиническими данными и вероятными исходами (общая и безрецидивной выживаемость);

- Провести сравнительный анализ количества CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 положительных иммунных клеток в микроокружении (келлоидоподобный коллаген стромы) инвазивного края колоректальной аденокарциномы;

- диссертационной работы проведено ретроспективное слепое исследование гистохимического паттерна экстрацеллюлярного матрикса колоректальной аденокарциномы с определением прогностически значимого уровня келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с промежуточной десмопластической реакцией.

В структуре исследования было выделено 3 основных этапа:

1 этап исследования: исследование прогностически значимого уровня келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника с промежуточной десмопластической реакцией.

2 этап исследования: этаблирование метода гистофенотипирования келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника с промежуточной десмопластической реакцией.

3 этап исследования: стандартизация метода путем сравнительного анализа количества CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 положительных иммунных клеток в микроокружении (келлоидоподобный коллаген стромы) инвазивного края колоректальной аденокарциномы.

Все этапы данной работы на стадии планирования были проанализированы с позиции изучения нормативно-правовых актов, обеспечивающих соблюдение

этических принципов проведения исследований с участием человека. Исследование было проведено в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации. Одобрение исследования было получено от институциональных наблюдательных советов по этике (№9 от 19.11.2021).

2.1.2 Конечные точки и определения

Первичной конечной точкой исследования была безрецидивная выживаемость. Безрецидивная выживаемость определялась как время в месяцах между датой операции и датой рецидива рака (определяемой как первая дата рентгенологического или гистологического диагноза местного рецидива опухоли или метастаза рака толстой кишки) или дата последнего наблюдения (с максимальным периодом 5 лет).

Стандартные обследования проводились в соответствии с национальными рекомендациями по наблюдению за онкологическими заболеваниями при раке толстой кишки после радикальной резекции в течение 5 лет после операции [324]. Пациенты, умершие без рецидива рака, подвергались цензуре в день смерти.

Общая выживаемость определялась как продолжительность от операции до смерти или последнего наблюдения. Пациенты, живые на момент последнего наблюдения, регистрировались как цензурированные события.

Хирургическая резекция определялась как полное одноэтапное удаление всех опухолей с отрицательными хирургическими краями при микроскопическом исследовании. Отдаленные метастазы определялись с помощью предоперационного УЗИ брюшной полости или компьютерной томографии, рентгенографии грудной клетки или МРТ, а также интраоперационного исследования.

Классификация TNM использовалась для определения стадии первичной опухоли в соответствии с изданием, действующим на дату установления диагноза опухоли.

Проксимальный отдел толстой кишки определяли, как правую толстую кишку, расположенную проксимальнее печеночного изгиба, а левую толстую кишку определяли, как отдел толстой кишки дистальнее печеночного изгиба.

2.2 Гистологическое исследование

Перед гистологическим исследованием образцы тканей фиксировали в 10% забуферном нейтральном формалине при температуре 4°C в течение 24 часов, промывали водопроводной водой и обезвоживали, используя серию спиртов возрастающей концентрации (70%, 90%, 95%, 100%). Затем образцы тканей погружали в ксилол и заключали в парафиновые блоки. Срезы тканей толщиной 4 мкм вырезали с помощью микротомы и помещали на предметное стекло. Затем предметные стекла депарафинизировали и окрашивали.

Процедура окрашивания гематоксилином и эозином. Срезы ткани толщиной 4 мкм погружали в Автомат для окрашивания гистологических образцов «BIO-OPTICA-AUS140/AUS240» инвентарный номер № 241777001,

дата производства 2017 год (Италия), в гематоксилин Майера использовали коммерческий набор Bio-Vitrum (Астана, Казахстан) на четверть часа, а затем промывали водой в течение 5 минут. После этого срезы подвергали минутному окрашиванию эозином, далее покрывали покровными стеклами, после сушки готовые стеклопрепараты подвергались исследованию.

2.3 Гистохимическое исследование

Процедура окрашивания трихромом Массона. Пучки коллагеновых волокон окрашивали и отличали от клеточных компонентов с помощью трихромного красителя Массона. Для окраски трихромом Массона использовали коммерческий набор (Трихромный краситель (Массон) Bio-Optica (Италия)) по стандартному протоколу. Волокна коллагена определялись как темно-синие волокна с черными ядрами.

Процедура серебрения по Гомори. Для гистологической оценки ретикулиновых волокон использовали гистохимическое окрашивание *серебрение по Гомори*, набор красителей Reticulum (модифицированный Gomori's), Bio-Optica (Италия) по стандартному протоколу. Ретикулиновые волокна определялись как черные или темно-коричневые волокна с серыми ядрами.

2.4 Иммуногистохимическое исследование

Рядом с окрашенными гематоксилином и эозином срезами вырезали последовательные парафиновые срезы толщиной 2 мкм и монтировали на предметные стекла.

Иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, выявляли иммуногистохимически с использованием антител против CD3 (CD3, кроличье моноклональное антитело CONFIRM anti-CD3 (2GV6)), CD4 (CONFIRM anti-CD4 (SP35)), CD8 (UltraView Universal DAB Detection Kit (кат. №760-500 / 05269806001), CD20 (CONFIRM anti-CD20 (L26)), CD56 (CONFIRM anti-CD56 (L26)) и CD163 (CONFIRM anti-CD163).

Разведение каждого антитела составляет 1:100 для CD3, 1:50 для CD4 и CD8, и 1:200 для CD20, CD56 и CD163.

Лимфатические узлы использовали в качестве контроля.

Первичные антитела использовали для обработанных стандартно, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей. Для фиксации образцов ткани использовали 10% нейтральный забуференный формалин. Толщина срезов составляла 2 мкм. Срезы были помещены на положительно заряженные предметные стекла. Срезы ткани депарафинизировали и гидратировали, чтобы подготовить ткань к окрашиванию. Окрашивание проводили с использованием автоматического иммуноистийнера марки BenchMark ULTRA IHC/ISH, Ventana, Roche, заводской номер №320468 с соответствующей системой визуализации согласно протоколу производителя. После этого предметные стекла обезвоживали и монтировали вручную. Для контрастного окрашивания ядер использовали гематоксилин Майера

использовали коммерческий набор Bio-Vitrum (Астана, Казахстан). После процедуры иммуногистохимического окрашивания образцы тщательно исследовали.

2.5 Морфологическое и морфометрическое исследование

2.5.1 Морфометрическая оценка относительного количества келлоидоподобного коллагена

Все микропрепараты опухолей пациентов, отобранных для исследования, были повторно пересмотрены, на базе патологоанатомического отделения МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова, на микроскопе Nikon «ECLIPSE E200», инвентарный номер №241776997 (Актобе, Казахстан). Микропрепараты были анонимизированы до начала исследования и пересмотр микропрепаратов проводился без информации о клинических данных или результатах лечения пациентов.

Келлоидоподобный коллаген оценивали на инвазивном участке опухоли микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином и трихромом Массона. Для каждого случая определяли наиболее инвазивную часть удаленной опухоли («инвазивный фронт»), определяемую как область с наиболее глубокой инфильтрацией ткани опухолью или область, где опухолевая ткань граничит с неопухолевым тканью.

На микропрепарате наиболее инвазивного края опухоли выбирали 10 полей зрения при увеличении $\times 40$. Участки стромы с локализованным воспалением, предположительно вызванным внешними патогенами, например, вокруг микроскопических абсцессов вследствие внутриопухолевой перфорации не учитывались. Стромальные клетки в участках с артефактами размождения, некроза и воспаления не оценивались.

Поле микроскопа за вычетом ткани, которую необходимо визуально игнорировать устанавливалось равным 100%. Количество келлоидоподобного коллагена в строме оценивали с шагом 10% (10%, 20%, 30% и т. д.) на поле зрения. Относительное количество келлоидоподобного коллагена для каждого случая рассчитывали, как среднее арифметическое всех полученных значений

2.5.2 Морфометрическая оценка гистопаттерна ретикулиновых волокон

Ретикулиновые волокна определялись как черные или темно-коричневые волокна с серыми ядрами. При оценке волокон ретикулина оценивали их локализацию и характер расположения. Вся поверхность каждого среза была изучена при 100-кратном увеличении.

При гистопатологическом анализе ретикулина оценивалось его наличие в соответствии с полуколичественной системой оценки («<5%» – минимальное, «6-30%» – фокальное, «>30%» – диффузное) и нативная структура («тонкие нитевидные волокна/толстые, разволокнённые волокна», «четкие/размытые границы», «упорядоченное/хаотичное распределение волокон», «прерывистые/непрерывные»).

2.5.3 Морфометрическая оценка гистопатологических прогностических факторов

Соотношение «стромы-паренхима» (TSR) оценивали на окрашенных гематоксилином и эозином срезах ткани первичной опухоли толщиной 4 мкм анализировали с помощью световой микроскопии. Микропрепараты первичной опухоли отбирались из наиболее инвазивной части аденокарциномы толстой кишки.

На увеличении $\times 4$ выбирали участки опухоли с наибольшим количеством стромы. Использовалось поле микроскопа объектива $\times 40$, каждое из полей со всех сторон включало железы или опухолевые клетки (опухолевые клетки должны были присутствовать на всех границах поля изображения).

В опухолях с муцинозным компонентом из оценки визуально исключали участок с муцином, а также крупные сосудистые структуры и гладкомышечную ткань. Нервы, мелкие сосудистые структуры и лимфоцитарная инфильтрация не исключались из стромального компартмента. Области просветов желез не учитывались при подсчете.

Количество стромальной ткани оценивалось с шагом 10% (10%, 20%, 30% и т.д.) на поле изображения. Для статистического анализа группы стромального соотношения делились на группы с высокой и низкой стромой. Высокий уровень стромы определяется как $>50\%$ площади стромы, а низкий уровень стромы - как площадь стромы $\leq 50\%$ в гистологическом срезе, что априори определено как значение, имеющее максимальную дискриминационную способность [152,р. 179]. Даже если было только одно поле изображения с высоким показателем стромы, это поле изображения имело решающее значение для классификации. При наличии сомнительного участка высокой стромы для классификации случая рассматривался общий состав всего среза ткани с использованием объектива с увеличением $\times 40$.

Десмопластическую реакцию оценивали с использованием срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином, дифференцируя как зрелую, промежуточную и незрелую, как описано Hideki Ueno et al. [16,р. 1239]. Десмопластическую реакцию считали незрелой, если миксоидные изменения присутствовали в фиброзной строме независимо от келоидоподобного коллагена. В противном случае его классифицировали как промежуточный, если строма содержала келоидоподобный коллаген, но не имела миксоидных изменений, или зрелый, если строма не содержала ни келоидоподобного коллагена, ни миксоидных изменений.

Почкование опухоли определяли, как изолированную раковую клетку или кластер, включающий <5 клеток на инвазивном фронте, и классифицировали как степени BD1, BD2 и BD3 в соответствии с международными критериями [325].

Сосудистая инвазия определялась как наличие опухолевых клеток в мышечном слое кровеносных сосудов или инвазия в мышечный слой сосуда или эндотелий, инвазия лимфатических сосудов определялась как наличие гнезд опухолевых клеток в лимфатических сосудах [326].

Периневральная инвазия определялась как наличие опухолевых клеток в трех слоях оболочки нерва или в непосредственной близости от нерва, поражающих не менее 33% всей его окружности [327-329].

Следующие компоненты инфильтрации опухоли иммунными клетками оценивали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивая 10 полей зрения на увеличении $\times 400$:

- (1) лимфоциты, инфильтрирующие опухоль,
- (2) внутриопухолевая перигландулярная реакция,
- (3) перитуморальная лимфоцитарная реакция,
- (4) Кроноподобная лимфоидная реакция,
- (5) индекс Klintrup-Mäkinen,
- (6) процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, определяли, как лимфоциты поверх раковых клеток.

Внутриопухолевую перигландулярную реакцию определяли, как лимфоцитарную реакцию в строме опухоли в пределах опухолевой массы.

Перитуморальную лимфоцитарную реакцию определяли, как дискретную лимфоидную реакцию, окружающую опухолевую массу.

Кроноподобную лимфоидную реакцию определяли, как трансмуральную лимфоидную реакцию.

Четыре компонента лимфоцитарной реакции на опухоли (инфильтрирующие опухоль лимфоциты, внутриопухолевая перигландулярная реакция, перитуморальная лимфоцитарная реакция и Кроноподобная лимфоидная реакция) классифицировалась как отрицательная/низкая (0), умеренная (1+) или высокая (2+) [330].

Индекс Klintrup-Mäkinen оценивался в соответствии с критериями, установленными Klintrup K. [259, р. 805]. Воспалительная реакция оценивалась как низкая если иммунные клетки отсутствовали или отмечалось их незначительное увеличение на инвазивном фронте. Воспалительная реакция оценивалась как высокая если имелся лентообразный или чашеобразный инфильтрат воспалительных клеток на инвазивном крае опухоли с разрушением раковых клеток.

Процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов оценивали путем визуальной оценки площади, занимаемой мононуклеарными клетками, над площадью стромы на 10 полей зрения, на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, используя порог 42% в качестве предельного процента площади, занимаемой лимфоцитами в соответствии с точкой отсечения, установленной Iseki Y. [331].

2.6 Морфометрическая оценка CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163

Иммуногистохимическое исследование использовали для определения наличия инфильтратов CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 в опухоли.

Оценка иммуноокрашивания проводилась вслепую без предварительного знания патологической стадии или каких-либо других клинических или последующих данных для каждого случая.

Иммуноокрашивание считалось положительным, если наблюдалось окрашивание цитоплазмы и мембран. Отчетливое зернистое коричневое пятно было оценено как положительное.

Все микропрепараты сначала анализировали под микроскопом при 100-кратном увеличении для выбора репрезентативных участков. Затем полуколичественно анализировали десять полей высокого увеличения ($\times 200$) из каждой области опухоли, чтобы определить количество клеток, окрашивавшихся положительно для каждого маркера.

Для статистического анализа все опухоли разделяли на случаи с высоким или низким содержанием CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 в соответствии с медианным соотношением. Репрезентативные изображения были получены с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа Zeiss AxioLab 4.0 с программным обеспечением «Image».

2.7 Мутации KRAS

Блоки тканей у всех участников исследования были получены в результате первоначальной хирургической резекции и оценены на предмет мутационного статуса KRAS. При секвенировании KRAS репрезентативные участки опухоли отмечали гистологически, а соответствующие участки на неокрашенных предметных стеклах затем подвергали ручной микродиссекции. Рассеченные ткани собирали в микропробирки, содержащие лизирующий буфер и протеиназу K, и инкубировали при 55°C в течение до 2 дней. Мутации KRAS определяли с помощью стандартной ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру экзонов 2 и 3 KRAS.

2.8 Методы статистической обработки данных

Все статистические процедуры были выполнены с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 и IBM SPSS Statistic 27.0 (Inc., Chicago, IL, USA, an IBM Company).

Аналитические рамки были разработаны под руководством Союза по международному контролю рака и Руководства по клинической онкологии. Для обеспечения достоверности выводов был проведен анализ мощности для определения требуемого размера выборки для выявления значительных демографических связей с желаемыми результатами при соблюдении обычного статистического порогового значения мощности 0,80 или выше.

Результаты были проанализированы с использованием методов описательной статистики, определяя общее количество случаев и относительную частоту каждого клинико-патологического фактора. Все количественные переменные были проанализированы для оценки характера распределения (Тест Шапиро-Вилка, коэффициента Эксцесс и критерия Колмогорова-Смирнова). При критическом уровне значимости равном $p < 0,05$

нулевая гипотеза о нормальности распределения отклонялась. Для количественных признаков, если распределение признавалось нормальным - рассчитывались среднее и стандартное отклонение.

Категориальные данные представлены в виде абсолютных чисел и процентного соотношения ко всей группе. Для сравнения частот распределения пациентов по качественным признакам между группами использовался статистический критерий Хи-квадрат. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о наличии различий частот внутри групп.

Качественные и количественные переменные сравнивали с помощью критерия χ^2 или Стьюдента соответственно (критерий Манна-Уитни или Краскала-Уоллиса, когда условия достоверности критериев Стьюдента и χ^2 не были выполнены). Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Анализ выживаемости проводился с использованием кривых Каплана-Мейера, а статистически значимые различия определялись с помощью лог-рангового теста. Метод Каплана-Мейера использовался для расчета общей и безрецидивной выживаемости. Одномерный и многомерный анализ с использованием модели регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса был проведен для расчета HR и 95% CI.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Региональные особенности колоректального рака в Актюбинской области

В исследование включены 650 пациентов с диагнозом «колоректальный рак», что позволило получить полное представление о социально-демографических и клинических характеристиках данной популяции (таблица 1). Среди обследованных отмечается умеренное преобладание мужчин (59,7%) по сравнению с женщинами (40,3%).

Возрастное распределение показывает, что большинство пациентов (63,1%) находятся в возрастной группе от 24 до 65 лет, тогда как оставшиеся 36,9% старше 65 лет. Гендерных различий в возрастной структуре обнаружено не было ($p=0,965$). Кроме того, анализ статуса мутации гена KRAS выявил, что подавляющее большинство пациентов (76,0%) не имеют данной мутации. Существенных различий в распространенности мутации между мужчинами и женщинами также не зафиксировано ($p=0,86$). Эти результаты демонстрируют относительную однородность исследуемой группы по основным социально-демографическим и клиническим параметрам.

Морфологический анализ показал, что в 40% случаев встречается аденокарцинома ($p=0,02$), различной дифференцировки: высоко (G1), умеренно (G2) и низкой (G3) дифференцировки. Эти результаты указывают на гетерогенность опухолевой ткани и подчеркивают важность морфологических характеристик для оценки биологических свойств опухоли. Распределение стадий опухоли, глубины инфильтрации, вовлечения лимфатических узлов и наличия отдаленных метастазов демонстрировали выраженную вариабельность, что отражает разную степень прогрессирования заболевания в исследуемой популяции. Анализ подходов лечения выявил их значительное разнообразие ($p=0,01$), что подчеркивает неоднородность применяемых методов, среди которых хирургическая резекция и лучевая терапия несколько преобладали. Различия в уровнях летальности не достигли статистической значимости ($p=0,08$), но прослеживается тенденция к снижению показателя смертности, составляющего 34,92% среди пациентов, умерших от основного заболевания.

Таблица 1 - Демографические данные пациентов и исходные клинические характеристики

Характ-ка	Категория	Частота	Мужчины (%)	Женщины (%)	P-значение
1	2	3	4	5	6
Пол		650 (100)	388 (59,7)	262 (40,3)	-
Возраст	24-65 лет	410 (63,1)	245 (59,8)	165 (40,2)	0,965
	>65 лет	240 (36,9)	143 (59,6)	97 (40,4)	
KRAS-мутация	Обнаружено	156 (24,0)	94 (60,3)	62 (39,7)	0,86
	Не обнаружено	494 (76,0)	294 (59,5)	200 (40,5)	

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Морфология опухоли	Аденокарцинома G1, G2 и G3	260 (40,0)	158 (60,8)	102(39,2)	0,02
	Другие	390 (60,0)	230 (59,0)	160 (41,0)	
Стадия опухоли	I стадия	462 (71,1)	277 (60,0)	185 (40,0)	0,07
	IV стадия	188 (29,9)	111 (59,0)	77 (41,0)	
Опухолевая инфильтрация	Инфильтрация (слизистая оболочка + подслизистый слой)	282 (43,4)	171 (60,6)	111 (39,4)	0
	Инфильтрация (слизистая оболочка до серозной оболочки)	368 (56,6)	217 (59,0)	151 (41,0)	
Поражение лимфатических узлов	≤3 лимфатических узла	457 (70,3)	272(70,1)	185(29,9)	0,02
	>3 лимфатических узлов	193 (29,7)	116 (29,9)	77 (29,4)	
Метастазы	Да	542 (83,4)	322 (59,4)	220 (40,6)	0,04
	Нет	108 (16,6)	66 (61,1)	42 (38,9)	
Лечение	хирургическая резекция + химиотерапия	319 (49,1)	184 (47,4)	135 (51,5)	0,01
	хирургическая резекция + лучевая терапия	331 (50,9)	204 (61,6)	127 (38,4)	
Смерть	Нет	423 (65,1)	254 (60,0)	169 (40,0)	0,08
	Да	227 (34,92)	134 (59,0)	93 (41,0)	

3.1.1 Результаты одномерного регрессионного анализа взаимосвязи между характером КРР и демографическими показателями

Результаты одномерного регрессионного анализа показаны в таблице 2. Нами установлено множество связей между демографическими и клиническими факторами, и влияние этих связей на конечные результаты в исследовательской популяции. Такие факторы, как тип опухоли, её стадия, глубина инвазии, поражение региональных лимфатических узлов, метастазирование, были тесно связаны с отношениями шансов и доверительными интервалами. Но корреляции между полом, наличием или отсутствием мутации KRAS были менее различными или не имели статистической значимости.

Таблица 2 - Демографические характеристики пациентов и морфологические особенности опухоли

Переменная	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)	P-значение
Возраст	24–65 лет	0,122 (0,345–0,921)	0,041
	Старше 65 лет	—	—
Пол	Мужской	0,182 (0,695–1,421)	0,973
	Женский	—	—
Мутации гена KRAS	Положительный статус	1,102 (0,827–1,467)	0,506
	Отрицательный статус	—	—
Морфологический тип опухоли	Аденокарцинома	1,020 (0,839–1,239)	0,002
	Другие типы	0,987 (0,868–1,123)	0,843
Стадия опухолевого процесса	I стадия	1,021 (0,922–1,131)	0,686
	IV стадия	0,950 (0,743–1,216)	0,040
Степень инфильтрации опухоли	Низкая	1,106 (0,919–1,330)	0,283
	Высокая	0,927 (0,810–1,062)	0,030
Поражение регионарных лимфатических узлов	≤ 3 лимфатических узла	1,051 (0,947–1,168)	0,030
	> 3 лимфатических узлов	0,890 (0,701–1,131)	—
Наличие отдалённых метастазов	Положительное	0,991 (0,923–1,063)	0,010
	Отрицательное	1,049 (0,734–1,499)	0,878

Влияние демографических характеристик на прогрессирование КРР. В таблице 3 приводятся результаты одномерной логистической регрессии. Возраст стал важным фактором, влияющим на прогрессирование рака, при этом лица в возрасте от 24 до 65 лет показали снижение риска ($p=0,04$) по сравнению с лицами старше 65 лет. Гендер не показал статистически значимой связи, мужчины и женщины имели ОШ 0,745 (95% ДИ=0,253–1,425, $p=0,42$). Мутации KRAS показали незначительно значимую ассоциацию ($p=0,02$), с положительными мутациями, дающими ОШ 1,024 (95% ДИ=0,774–1,345). Морфология опухоли, стадия опухоли, инфильтрация опухоли, вовлечение лимфатических узлов и метастазы показали различные степени связи с прогрессированием рака, каждая из которых сопровождалась соответствующими ОШ, 95% ДИ и p -значениями. Эти статистические данные вносят важный вклад в изучение демографических детерминант прогрессирования колоректального рака, обеспечивая основу для целевых вмешательств и персонализированных стратегий лечения.

Таблица 3 - Влияние демографических факторов на прогрессирование колоректального рака

Переменные	Подкатегории	Отношение шансов (ОШ) (95% ДИ)	P-значение
Возраст (годы)	24–65	0,423 (0,52, 0,856)	0,04
	>65	-	-
Пол	Мужской	0,745 (0,253, 1,425)	0,42
	Женский	-	-
KRAS	Положительный (мутации)	1,024 (0,774, 1,345)	0,02
	Отрицательный (мутации)	-	-
Морфология опухоли	Аденокарцинома	1,046 (0,862, 1,269)	0,04
	Другое	0,97 (0,855, 1,102)	0,707
Стадия опухоли	I стадия	1,011 (0,915, 1,118)	0,02
	IV стадия	0,973 (0,762, 1,243)	0,04
Инфильтрация опухоли	Низкая	1,04 (0,869, 1,246)	0,667
	Высокая	0,970 (0,847, 1,112)	0,03
Поражение лимфоузлов	≤ 3	0,993 (0,897, 1,099)	0,06
	> 3	1,017 (0,799, 1,295)	0,04
Метастазы	Да	0,988 (0,922, 1,059)	0,02
	Нет	-	-

Влияние демографических характеристик КРР на выбор тактики лечения. В таблице 4 результаты одномерной логистической регрессии, которые показывают, что у лиц в возрасте 24-65 лет коэффициент вероятности (0,977) воздействия на лечение рака несколько ниже, чем у лиц старше 65 лет (ОШ=1,038). Гендерный фактор не оказал существенного влияния на лечение рака, при этом соотношение шансов мужчин и женщин составило соответственно 0,936 и 1,103. Была также проведена оценка морфологии опухоли, стадии опухоли, инфильтрации, участия лимфатических узлов и метастазов. Ни одна из переменных не продемонстрировала статистически значимого влияния на лечение рака, так как их соответствующие р-значения были выше традиционных пороговых значений (обычно 0,05). Примечательно, что наличие метастазов показало значительное воздействие, с $p=0,002$, что указывает на то, что у пациентов с отрицательным метастазом отношение шансов было значительно выше (ОШ=1,764) по сравнению с теми, у которых были положительные метастазы (ОШ=0,895). Интересно, что интерпретация соотношения шансов показывает, что пациенты без метастаза (отрицательного) имеют в 1,764 раза больше шансов на получение лечения рака по сравнению с теми, кто имеет метастаз (положительный). Это означает, что отсутствие метастазов ассоциируется со значительно возросшей вероятностью прохождения лечения рака, что подчеркивает важность рассмотрения метастатического состояния при оценке и лечении КРР пациентов.

Таблица 4 - Влияние демографических характеристик на лечение рака

Переменные	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)	P-значение
Возраст (годы)	24-65	0,977 (0,866, 1,103)	0,712
	>65	1,038 (0,853, 1,262)	0,712
Пол	Мужской	0,936 (0,824, 1,062)	0,305
	Женский	1,103 (0,915, 1,330)	0,344
Морфология опухоли	Аденокарцинома	0,991 (0,821, 1,196)	0,923
	Прочие	1,006 (0,887, 1,141)	0,987
Стадия опухоли	I стадия	0,977 (0,885, 1,077)	0,636
	IV стадия	1,060 (0,833, 1,349)	0,99
Инфильтрация опухоли	Низкая	0,994 (0,834, 1,185)	0,950
	Высокая	1,004 (0,878, 1,149)	1,000
Поражение лимфатических узлов	≤3	0,926 (0,730, 1,173)	0,523
	>3	1,033 (0,935, 1,143)	0,580
Метастазы	Да	0,895 (0,835, 0,960)	0,002
	Нет	1,764 (1,232, 2,526)	0,003

Связь смертности от КРР с демографическими характеристиками. В таблице 5 результаты одномерной логистической регрессии показывают, что возраст, является решающим фактором раковых исходов, и у лиц возрастной группы 24-65 лет ОШ=1,038 (95%ДИ=0,913-1,180) с незначительным p-уровнем 0,566, в то время как группа 65+ лет, имеют ОШ=0,942 (95%ДИ=0,769-1,154) со значением p=0,624. Гендерный фактор не оказывает существенного влияния на смертность, поскольку у мужчин ОШ=1,017 (95% ДИ=0,890-1,162), а у женщин – ОШ=0,975 (95%ДИ=0,802-1,185). Примечательно, что мутации KRAS, генетический фактор, не имеют существенной связи (p=0,776). Влияние морфологии опухоли значительно: при аденокарциноме, ОШ=1,086 (ДИ=0,887-1,329) и p=0,02, в то время как другие морфологии имеют более низкий ОШ=0,948 (95%ДИ=0,833-1,078) со значением p=0,007. Стадия опухоли, инфильтрация, вовлечение лимфатических узлов и метастазы демонстрируют различную степень значимости, подчеркивая сложное взаимодействие этих факторов в смертности, связанной с колоректальным раком. Подводя итог, можно сказать, что возраст, морфология опухоли, стадия заболевания и ряд других факторов способствуют смертности, связанной с колоректальным раком, давая ценную информацию для прогнозирования и возможного целевого вмешательства в клинических условиях.

Таблица 5 - Влияние демографических характеристик на смертность от КРР

Переменные	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)	P-значение
1	2	3	4
Возраст (годы)	24-65	1,038 (0,913, 1,180)	0,566
	>65	0,942 (0,769, 1,154)	0,624
Пол	Мужской	1,017 (0,890, 1,162)	0,801

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
	Женский	0,975 (0,802, 1,185)	0,867
KRAS (мутации)	Положительный	1,043 (0,781, 1,393)	0,776
	Отрицательный		
Морфология опухоли	Аденокарцинома	1,086 (0,887, 1,329)	0,020
	Прочие	0,948 (0,833, 1,078)	0,007
Стадия опухоли	I стадия	0,966 (0,873, 1,069)	0,007
	IV стадия	1,091 (0,843, 1,411)	0,046
Инфильтрация опухоли	Низкая	0,905 (0,756, 1,083)	0,002
	Высокая	1,082 (0,936, 1,251)	0,000
Поражение лимфатических узлов	≤ 3	1,016 (0,914, 1,129)	0,000
	> 3	0,964 (0,754, 1,234)	0,001
Метастазы	Да	1,030 (0,716, 1,481)	0,001
	Нет		

3.1.2 Результаты многомерного регрессионного анализа взаимосвязи между характером КРР и демографическими показателями

В таблице 6 представлены результаты многомерной логистической регрессии и показано, что отношение шансов для аденокарциномы составляет 1,032 (95%ДИ=0,745-1,429, $p=0,03$). Это наводит на мысль о незначительной связи с аденокарциномой, хотя результат не является статистически значимым. Что касается стадии опухоли, то отношение шансов для первой стадии составляет 0,935 (95%ДИ=0,658-1,327, $p=0,02$). Это указывает на более низкую вероятность оказаться на первой стадии по сравнению с последней стадией, и связь является статистически значимой. Что касается опухолевой инфильтрации, то отношение шансов на низкую степень инфильтрации составляет 1,216 (95%ДИ=0,880-1,680, $p=0,04$). Хотя соотношение шансов указывает на повышенную вероятность низкой инфильтрации, результат не является статистически значимым. Наконец, при поражении лимфатических узлов отношение шансов для ≤ 3 лимфатических узлов составляет 0,824 (95%ДИ=0,582-1,167, $p=0,03$). Это означает снижение вероятности поражения при поражении менее 3 лимфатических узлов, и связь является статистически значимой. Таким образом, многомерный логистический регрессионный анализ выявляет различное влияние демографических характеристик на различные признаки рака, при этом некоторые связи являются статистически значимыми, а другие - нет. Эти результаты дают ценную информацию о сложных взаимосвязях между демографическими показателями и характеристиками рака.

Таблица 6 - Колоректальный рак и демографические характеристики

Переменная	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)	P-значение
Морфология опухоли	Аденокарцинома	1,032 (0,745–1,429)	0,03
Стадия опухоли	Первая стадия	0,935 (0,658–1,327)	0,02
Инфильтрация опухоли	Низкая	1,216 (0,880–1,680)	0,04
Лимфатические узлы	≤ 3	0,824 (0,582–1,167)	0,03

Связь прогрессирования КРР с демографическими характеристиками. В таблице 7 представлен всесторонний анализ факторов, связанных с прогрессией колоректального рака (КРР), с использованием многомерной логистической регрессии для изучения влияния участия лимфатических узлов и их метастатического состояния. В этом случае прогрессия КРР определяется как рост рака, который включает увеличение количества пораженных лимфатических узлов и наличие метастазов.

Пациенты были разделены на две группы в зависимости от количества пораженных лимфатических узлов: одна группа имела 3 или менее пораженных лимфатических узлов, а другая группа имела более 3 пораженных лимфатических узлов. Коэффициент шансов (ОШ) для пациентов с 3 или менее задействованными лимфатическими узлами составляет 0,997 (95%ДИ=0,680-1,462). Эта операционная близка к 1, что означает, что вероятность прогрессирования рака среди пациентов с 3 или менее задействованными лимфатическими узлами почти равна тем, которые имеют более трёх лимфатических узлов. По этому сравнению, референтной категорией были пациенты с более чем тремя вовлеченными лимфатическими узлами. Однако, несмотря на наличие почти одинаковых шансов на прогрессию согласно ОШ, он достиг статистической значимости при $p=0,002$, указывающее на то, что даже такую незначительную разницу нельзя объяснить только случайными изменениями, но она может отражать некоторую связь между развитием КРР и количеством участвующих лимфатических узлов.

Пациенты были разделены на две группы в зависимости от их метастатического состояния, положительного или отрицательного. Отношение шансов для пациентов с положительными метастазами составляет 1,156 (95%ДИ= 0,724-1,846) по сравнению с пациентами без метастазов (референтная группа). Эта означает слегка повышенную вероятность прогрессирования рака у пациентов с положительным метастазом. Значение $p=0,005$ является статистически значимым, что указывает на то, что наблюдаемая связь между метастазами и прогрессией рака вряд ли связана с случайными изменениями. Это подчеркивает значение метастатического статуса в прогнозировании прогресса КРР.

Итогом этого анализа является оценка хода осуществления КРР. Это включает в себя такие вещи, как увеличение числа пораженных лимфатических узлов и наличие метастазов. Сообщенные ОШ получены из многомерной модели логистической регрессии, которая одновременно рассматривает

несколько переменных для обеспечения более точной оценки взаимосвязи между каждым фактором (вовлечение лимфатических узлов и метастатическое состояние) и результатом (прогрессия КРР).

Результаты этого анализа показывают, насколько важно учитывать участие лимфатических узлов и их метастатическое состояние в прогнозировании прогрессии КРР. Статистическое значение выводов (р-значения 0,002 и 0,005 для участия лимфатических узлов и метастазов, соответственно) подчеркивает, что эти ассоциации не случайны. Это еще более подчеркивает важность этих факторов для оценки прогресса КРР врачами, а также необходимость применения строгих статистических методов для проверки и толкования таких ассоциаций.

В заключение, мультимерный логистический регрессионный анализ показывает, что как вовлечение лимфатических узлов, так и метастатическое состояние являются существенными предсказателями прогрессии КРР. Эти выводы имеют важное значение для клинического лечения и планирования лечения пациентов с КРР, что требует тщательной оценки и рассмотрения этих факторов.

Таблица 7 - Влияние демографических характеристик на прогрессирование рака

Переменная	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)
Лимфатические узлы	≤3	0,997 (0,680–1,462)
Метастазы	Положительные	1,156 (0,724–1,846)

Связь смертности от КРР с демографические характеристики

В таблице 8 показан результат многомерной логистической регрессии и показано, что с точки зрения пола коэффициент вероятности для мужчин составляет 0,969 (95%ДИ=0,701-1,339) с $p=0,09$, что указывает на незначительную тенденцию к снижению смертности по сравнению с женщинами. Морфология опухоли, в частности аденокарцинома, показывает отношение шансов 1,037 (95%ДИ=0,749-1,434) и $p=0,07$, что указывает на пограничную несертифицированную связь со смертностью. Стадия опухоли представляет интересные выводы, первый этап показывает ОШ=0,934 (95%ДИ=0,658-1,324) и $p=0,01$, что указывает на потенциальный защитный эффект против смертности. И наоборот, последний этап не достигает статистической значимости, что указывает на более сложную взаимосвязь между стадией опухоли и смертностью. Инфильтрация опухоли показывает отношение шансов 1,195 (95%ДИ=0,867-1,648) со значением $p=0,03$ для категории "Низкий", что указывает на слабую склонность к увеличению смертности по сравнению с категорией "Высокий".

Таблица 8 - Влияние демографических характеристик на смертность при колоректальном раке

Переменная	Подкатегория	Отношение шансов (95% ДИ)	P-значение
Пол	Мужской	0,969 (0,701–1,339)	0,09
Морфология опухоли	Аденокарцинома	1,037 (0,749–1,434)	0,07
Стадия опухоли	Первая стадия	0,934 (0,658–1,324)	0,01
Инфильтрация опухоли	Низкая	1,195 (0,867–1,648)	0,03

Таким образом, исследование показало, что возраст играет решающую роль в развитии рака, при этом люди в возрасте от 24 до 65 лет демонстрируют меньший риск по сравнению с теми, кому 65 лет или старше. Это согласуется с предыдущими исследованиями, которые показали, что увеличение возраста является основным и наиболее важным фактором, определяющим рак как в целом, так и для многих конкретных форм рака. Заболеваемость раком возрастает после 50 лет, независимо от мутаций, наблюдаемых в этих злокачественных опухолях, и того факта, что рак может быть обнаружен в любом возрасте.

Исследование показало, что такие факторы, как возраст, пол и многочисленные признаки опухоли не оказывают существенного влияния на выбор терапии КРР, за исключением случаев метастазирования. Это подчеркивает важность учета метастатического состояния при оценке и лечении больных КРР. Предыдущие исследования показали, что клинические испытания рака, как правило, имеют непропорционально низкий уровень участия среди пожилых людей, а именно в возрасте 65 лет и старше несмотря на то, что на эту возрастную группу приходится примерно 50% всех раковых больных.

Настоящее исследование показало важность участия лимфатических узлов и метастазов в прогнозировании прогрессирования рака. Это подчеркивает важность понимания механизмов, с помощью которых опухолевые клетки распространяются на лимфатические узлы, и влияние метастазов на прогноз и лечение больных КРР. В конечном счете эти данные подчеркивают статистическую важность участия лимфатических узлов и метастазов в прогнозировании развития рака.

Таким образом, результаты исследования колоректального рака совпадают с результатами предыдущих исследований, свидетельствующими о более высоких показателях смертности среди мужчин по сравнению с женщинами. Кроме того, исследование показывает нюансированную связь между стадией опухоли и смертностью. Она подчеркивает важность оценки морфологии опухоли и инфильтрации для точной оценки риска смертности пациентов с колоректальным раком.

3.2 Гистохимическое определение прогностически значимого уровня келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника

Проведено предварительное (130 человек) моноцентрическое ретроспективное исследование, в которое были последовательно включены резецированные образцы опухоли толстой кишки с колоректальной аденокарциномой, полученные после хирургического лечения пациентов с КРР в Медицинском центре НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова (Актобе, Казахстан) в период с января 2001г. по декабрь 2023г.

Критерии исключения:

- (1) гистологический диагноз, отличный от диагноза «аденокарцинома»;
- (2) лучевая терапия, проводившаяся до оперативного вмешательства;
- (3) смерть пациента, последовавшая в течение 30 дней после операции;
- (4) злокачественные новообразования в анамнезе в течение пяти лет до установленного диагноза рака толстого кишечника (за исключением базальноклеточного рака кожи или рака шейки матки *in situ*);
- (5) отказ пациента от лечения, крайне тяжелое клиническое состояние пациента или пожилой возраст (>90 лет);
- (6) недостаточное количество материала для гистологической оценки.

Клинические данные были собраны с помощью программного обеспечения в комплексной информационной системе здравоохранения из медицинских записей пациентов. Эти данные включали пол и возраст пациентов, сопутствующие заболевания, семейный анамнез колоректального рака, дату операции, данные о сопутствующих заболеваниях и коморбидности до операции, расположение опухоли в правой или левой части толстой кишки, возникновение рецидива, дату его обнаружения и проведённое лечение.

Гистологические данные были получены в результате повторного анализа гистологических препаратов, а также собраны из медицинских карт пациентов, включая топографию; гистологический тип; гистологическую степень; глубину неопластической инвазии (Т-статус); метастазы в лимфатические узлы и отдалённые метастазы.

Все пациенты с колоректальным раком промежуточной десмопластической реакцией были разделены на две группы по относительному содержанию келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли в соответствии с определенным на первом этапе исследования пороговым значением по содержанию келлоидоподобного коллагена: группа с очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли, «тип А» (келлоидоподобный коллаген $\leq 0,3$); группа с диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли, «тип В» (келлоидоподобный коллаген $> 0,3$).

Клинические характеристики пациентов и гистопатологические признаки опухолей исследуемой выборки

Выборка исследования включала 130 человек. Клинические характеристики пациентов выборки представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Демографические и клинические характеристики пациентов и гистопатологические характеристики опухолей

Характеристики	Категории	n = 130 n (%)
Возраст, (лет)	ME ± SD	64,5±9,8
	диапазон	[43; 89]
	≤ 65 лет	77 (59,2)
	> 65лет	53 (40,8)
Пол, n (%)	Женский	61 (46,9)
	Мужской	69 (53,1)
Индекс коморбидности Чарлсона, n (%)	≤3	80 (61,5)
	>3	50 (38,5)
Диагноз злокачественной опухоли у близких родственников, n (%)	Нет	104 (80,0)
	Да	26 (20,0)
Госпитализация, n (%)	Плановая	107 (82,3)
	Экстренная	23 (17,7)
Локализация опухоли, n (%)	Левая часть	85 (65,3)
	Правая часть	45 (34,6)
Т-стадия, n (%)	T1	-
	T2	88 (67,7)
	T3	42 (32,3)
N-стадия, n (%)	N0	71 (54,6)
	N1	45 (34,6)
	N2	14 (10,8)
Степень дифференцировки (G), n (%)	G1	1 (0,8)
	G2	89 (68,5)
	G3	34 (26,1)
	Gx	6 (4,6)
Почкование опухоли, n (%)	Нет	59 (45,4)
	Низкое	26 (20,0)
Венозная инвазия, n (%)	Промежуточное	27 (20,8)
	Выраженное	18 (13,8)
Венозная инвазия, n (%)	Нет	115 (88,5)
	Да	15 (11,5)
Лимфатическая инвазия, n (%)	Нет	116 (89,2)
	Да	14 (10,8)
Перфорация опухоли, n (%)	Нет	119 (91,5)
	Да	11 (8,5)
Некроз опухоли, n (%)	Нет	123 (94,6)
	Да	7 (5,4)

Средний возраст пациентов составил 65 лет. Мужчины составляли 69 (53,1%) человек, женщины – 61 (46,9%) человек. При оценке сопутствующей патологии индекс коморбидности Чарлсона был ниже или равен трем баллам у 80 (61,5%) пациентов, выше 3 баллов у 50 (38,5%) пациентов. Близкие родственники пациентов имели верифицированный диагноз злокачественной опухоли в анамнезе у 26 (20,0%) пациентов. Планово были госпитализированы 107 (82,3%) пациентов, экстренно госпитализированы 23 (17,7%) человек.

Локализация опухоли в левой части толстого кишечника (дистальнее печеночного изгиба) наблюдалась у 85 (65,3%) пациентов, в правой части толстого кишечника проксимальнее печеночного изгиба – у 45 (34,6%) пациентов.

Из обследуемых пациентов стадия T2 по классификации TNM установлена у 88 (67,7%) пациентов, T3 – у 42 (32,3%) пациентов. Стадия N0 диагностирована у 71 (54,6%) пациентов, N1 – у 45 (34,6%) пациентов, N2 – у 14 (10,8%) пациента.

По гистологической степени злокачественности (Grade) высокодифференцированная опухоль (G1) наблюдалась в 1 (0,8%) случае, умеренно дифференцированная опухоль (G2) – в 89 (68,5%), низкодифференцированная опухоль (G3) – в 34 (26,1%), степень дифференцировки опухоли не определена в 6 (4,6%) случаях. Отсутствие почкования опухоли было определено в 59 (45,4%) случаях, наличие 0–4 клеток/кластеров (низкое почкование) выявлено в 26 (20,0%) случаях, 5–9 клеток/кластеров в 27 (20,8%) случаев (промежуточное почкование), 10 и более клеток/кластеров (выраженное почкование) в 18 (13,8%) случаях. Гистопатологические признаки наличия опухолевых клеток в мышечном слое кровеносных сосудов выявлены в 15 (11,5%) опухолях. Опухолевые клетки в лимфатических сосудах определялись в 14 (10,8%) опухолях. Перфорация опухоли была обнаружена в 11 (8,5%) случаях, гистопатологические признаки некроза наблюдались в 7 (5,4%) случаях.

3.2.1 Определение порогового уровня относительного содержания келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника

Оптимальный пороговый уровень был определен на основе максимальной дискриминационной способности с применением модели пропорциональных рисков Кокса для общей выживаемости и безрецидивной выживаемости (таблица 10).

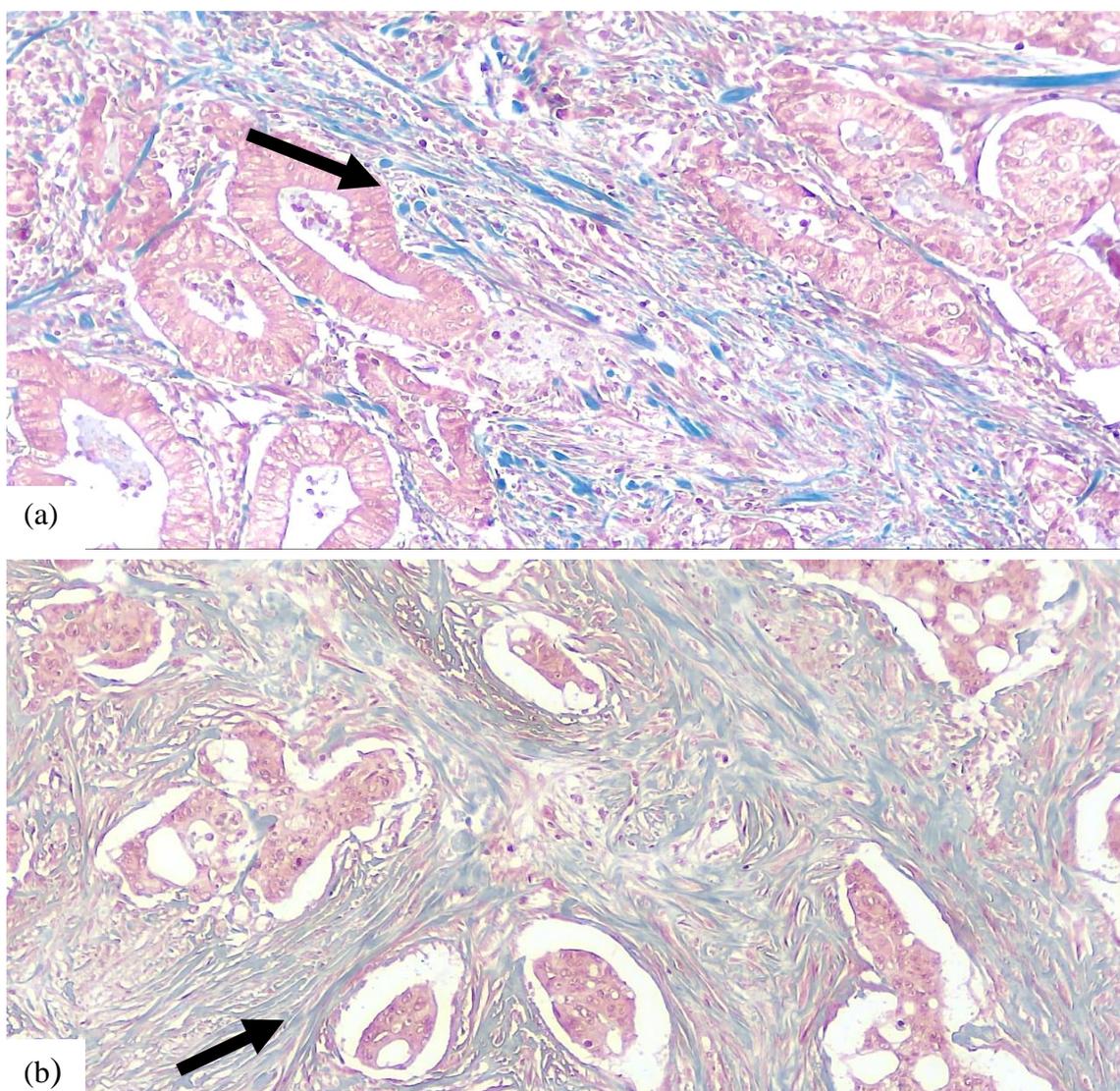
Таблица 10 - Определение порога отсечения содержания келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника

Параметры	%	N = 130			
		Общая выживаемость		Безрецидивная выживаемость	
Келлоидоподобный коллаген	≤10	1,505	p=0,499	1,637	p=0,291
Строма без КПК	>10	[0,461-4,915]		[0,656-4,086]	
Келлоидоподобный коллаген	≤20	2,320	p = 0,113	1,435	p =
Строма без КПК	>20	[0,819-6,572]		[0,748-2,753]	0,278
Келлоидоподобный коллаген	≤30	3,160	p=0,003	2,009	p=0,008
Строма без КПК	>30	[1,480-6,749]		[1,198-3,369]	
Келлоидоподобный коллаген	≤40	1,422	p = 0,363	1,688	p =
Строма без КПК	>40	[0,666-3,038]		[0,965-2,955]	0,067
Келлоидоподобный коллаген	≤50	0,975	p = 0,962	1,172	p =
Строма без КПК	>50	[0,344-2,673]		[0,558-2,464]	0,675

Регрессионный анализ общей выживаемости и безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что для пациентов, в опухоли которых относительное количество келоидоподобного коллагена в строме опухоли составило более 30% отношение рисков рецидива составило 3,16 (95%ДИ=1,480-6,749; $p=0,003$) и смерти 2,01 (95%ДИ=1,198-3,369; $p=0,008$) по сравнению с пациентами в опухоли которых определялось менее 30% келоидоподобного коллагена.

Для порога отсечения келоидоподобного коллагена в строме опухоли, отличного от 30%, статистически значимые различия в общей и безрецидивной выживаемости пациентов исследуемой выборки выявлены не были ($p>0,05$).

Гистохимические паттерны келоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли представлены на рисунках 1аb.



Трихром Массона, $\times 100$

Рисунок 1 - Келоидоподобный коллаген, представлен толстыми гиалинизированными пучками коллагена, занимающий менее 30% стромы (а) и более 30% стромы (б)

В группе с келлоидоподобным коллагеном, составляющим $\leq 30\%$ стромы определены следующие показатели безрецидивной выживаемости: одногодичная безрецидивная выживаемость, составила 84,6%, трехгодичная безрецидивная выживаемость – 70,7%, пятигодичная безрецидивная выживаемость – 64,6%. Одногодичная общая выживаемость составила 92,3%, трехгодичная общая выживаемость – 86,2%, пятигодичная общая выживаемость – 86,5%. В группе с келлоидоподобным коллагеном, составляющим $>30\%$ стромы определены следующие показатели безрецидивной выживаемости: одногодичная безрецидивная выживаемость, составила 78,4%, трехгодичная безрецидивная выживаемость – 49,2%, пятигодичная безрецидивная выживаемость – 40%. Одногодичная общая выживаемость составила 78,5%, трехгодичная общая выживаемость – 61,5%, пятигодичная общая выживаемость – 60%.

Пациенты были разделены на группы очаговый келлоидоподобный коллаген («тип А», $\leq 30\%$) и диффузный келлоидоподобный коллаген («тип В», $>30\%$). Кривые безрецидивной и общей выживаемости Каплана-Мейера для порога отсечения келлоидоподобного коллагена равного 30% представлены на рисунке 2.

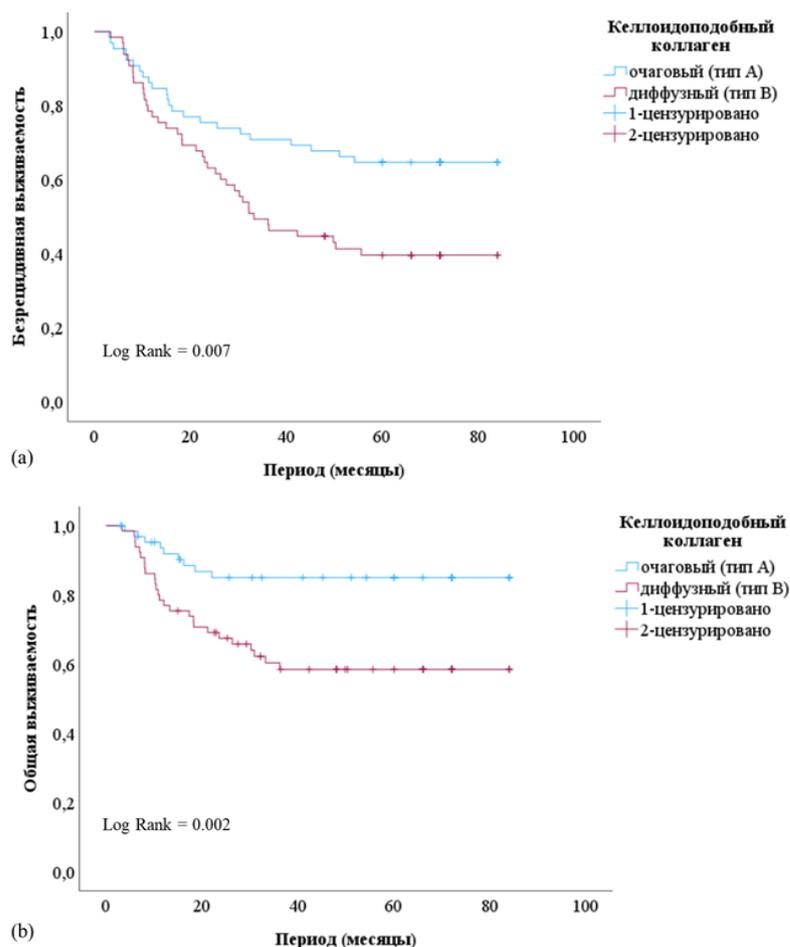


Рисунок 2 - Кривая Каплана-Мейера (а) безрецидивной выживаемости и (б) общей выживаемости пациентов для порога отсечения келлоидоподобного коллагена равного 30%

3.2.2 Взаимосвязь относительного количества келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками пациентов и гистопатологическими признаками опухолей

Взаимосвязь относительного количества келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками пациентов и гистопатологическими признаками опухолей представлена в таблице 11.

Статистически значимых различий по возрасту пациентов, их полу, расовой принадлежности, индексу коморбидности Чарлсона, типу госпитализации и локализации опухоли выявлено не было ($p > 0,05$). По гистопатологическим признакам опухоли, включая степень дифференцировки, почкованию, венозной и лимфатической инвазии, перфорации и некрозу опухоли выявлено не было ($p > 0,05$).

Выявлены статистически значимые отличия между группами по стадии Т по классификации TNM ($p = 0,009$). В группе с келлоидоподобным коллагеном $>30\%$ стадия Т3 установлена у 28 (43,1%) пациентов, в группе с келлоидоподобным коллагеном $\leq 30\%$ Т3 установлена у 14 (21,5%) пациентов.

Таблица 11 – Взаимосвязь келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками пациентов и гистопатологическими признаками опухолей

Характеристики	Категории	Келлоидоподобный коллаген, n = 130		p-value ^a
		$\leq 30\%$	$> 30\%$	
1	2	3	4	5
Возраст, (лет)	ME \pm SD	65,5 \pm 9,9	63,5 \pm 9,6	0,859
	диапазон	[44; 87]	[43; 89]	
	≤ 65 лет	39 (60,0)	38 (58,5)	
	> 65 лет	26 (40,0)	27 (41,5)	
Пол, n (%)	Женский	30 (46,2)	31 (47,7)	0,861
	Мужской	35 (53,8)	34 (52,3)	
Индекс коморбидности Чарлсона, n (%)	≤ 3	42 (64,5)	38 (58,5)	0,471
	> 3	23 (38,5)	27 (41,5)	
Диагноз злокачественной опухоли у близких родственников, n (%)	Нет	54 (83,1)	50 (76,9)	0,381
	Да	11 (16,9)	15 (23,1)	
Госпитализация, n (%)	Плановая	55 (84,6)	52 (80,0)	0,491
	Экстренная	10 (15,4)	13 (20,0)	
Локализация опухоли, n (%)	Левая часть	41 (63,1)	44 (67,7)	0,587
	Правая часть	24 (36,9)	21 (32,3)	
Т-стадия, n (%)	T1	-	-	0,009
	T2	51 (78,5)	37 (56,9)	
	T3	14 (21,5)	28 (43,1)	
N-стадия, n (%)	N0	39 (60,0)	32 (49,2)	0,411
	N1	19 (29,1)	26 (40,0)	
	N2	7 (10,8)	7 (10,8)	
Степень дифференцировки (G), n (%)	G1	1 (1,5)	-	0,216
	G2	49 (75,4)	40 (61,5)	
	G3	13 (20,0)	21 (32,3)	

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5
	Gx	2 (3,1)	4 (6,2)	
Почкование опухоли, n (%)	Нет	28 (43,1)	31 (47,7)	0,905
	Низкое	14 (21,5)	12 (18,5)	
	Промежуточное	13 (20,0)	14 (21,5)	
	Выраженное	10 (15,4)	8 (12,3)	
Венозная инвазия, n (%)	Нет	58 (89,2)	57 (87,7)	0,784
	Да	7 (10,8)	8 (12,3)	
Лимфатическая инвазия, n (%)	Нет	60 (92,3)	56 (86,2)	0,258
	Да	5 (7,7)	9 (13,8)	
Перфорация опухоли, n (%)	Нет	59 (90,8)	60 (92,3)	0,753
	Да	6 (9,2)	5 (7,7)	
Некроз опухоли, n (%)	Нет	62 (95,4)	61 (93,8)	0,698
	Да	3 (4,6)	4 (6,2)	

3.2.3 Однофакторный и многофакторный анализ Кокса

Однофакторный и многофакторный анализ Кокса проводили для оценки прогностической значимости всех клинико-патологических данных и келлоидоподобного коллагена (таблица 12, 13).

Однофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости показал, что среди заранее определенных клинических и гистопатологических прогностических факторов, оцененных в этом исследовании, венозная инвазия, лимфатическая инвазия и доля келлоидоподобного коллагена в строме опухоли оказали значительное влияние на безрецидивную выживаемость (таблица 12). Как видно из данных таблицы 12 пациентов очаговым келлоидоподобным коллагеном наблюдался более высокий риск рецидива ($OR=2,01$, $95\%ДИ=1,198-3,369$, $p=0,008$), чем у пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном.

После проведения однофакторного анализа значимые факторы были дополнительно оценены с помощью многомерной регрессионной модели Кокса для определения их независимой прогностической ценности для безрецидивной выживаемости. После поправки на другие ковариаты лимфатическая инвазия ($OR=2,195$, $95\%ДИ=1,132-4,255$; $p=0,02$) и доля келлоидоподобного коллагена в строме опухоли ($OR=1,888$, $95\%ДИ=1,122-3,179$; $p=0,017$) являлись прогностическими факторами для неблагоприятного исхода значимо связанными с безрецидивной выживаемостью (таблица 12).

В однофакторном регрессионном анализе прогностических факторов безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса установлено, что ряд клинических факторов (таких как возраст, пол, раса, индекс коморбидности Чарлсона, семейный анамнез онкологических заболеваний, тип госпитализации) и гистопатологических факторов (таких как степень дифференцировки опухоли, почкование опухоли, перфорация и некроз опухоли) не оказали статистически значимого влияния на общую выживаемость у пациентов исследуемых групп. Однофакторный

регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости показал, что среди заранее определенных клинических и гистопатологических прогностических факторов, оцененных в этом исследовании, венозная инвазия, лимфатическая инвазия и доля келлоидоподобного коллагена в строме опухоли оказали значительное влияние на общую выживаемость.

Таблица 12 - Одно- и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости

Характеристики	Категории	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
		ОР (95% ДИ)	P-value	ОР (95% ДИ)	P-value
1	2	3	4	5	6
Возраст, (лет)	≤ 65 лет				
	> 65 лет	1,372 (0,833-2,260)	0,214	-	-
Пол	Женский				
	Мужской	1,178 (0,713-1,946)	0,524	-	-
Рак у близких родственников, n (%)	Нет				
	Да	0,703 (0,357-1,383)	0,307	-	-
Локализация опухоли	Левая часть				
	Правая часть	0,916 (0,538-1,561)	0,748	-	-
Т-стадия	T2				
	T3	1,109 (0,659-1,866)	0,697	-	-
N-стадия	N0				
	N1				
	N2	1,179 (0,836-1,661)	0,348	-	-
Степень дифференцировки (G)	G1				
	G2				
	G3				
	Gx	1,015 (0,664-1,552)	0,944	-	-
Почкование опухоли	BD0				
	BD1				
	BD2				
	BD3	0,919 (0,780-1,083)	0,311	-	-
Венозная инвазия	Нет				
	Да	2,122 (1,078-4,178)	0,030	1,837 (0,924-3,652)	0,083
Лимфатическая инвазия	Нет				
	Да	2,457 (1,276-4,732)	0,007	2,195 (1,132-4,255)	0,020

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
Перфорация опухоли	Нет				
	Да	1,787 (0,848-3,764)	0,127	-	-
Некроз опухоли	Нет				
	Да	0,413 (0,136-2,273)	0,556	-	-
Келлоидоподобный коллаген	очаговый				
	диффузный	2,009 (1,198-3,369)	0,008	1,888 (1,122-3,179)	0,017

У пациентов венозной инвазией отношение рисков составило 2,798 (95%ДИ=1,221-6,413; $p=0,015$) по сравнению с пациентами без венозной инвазии. Лимфатическая инвазия (ОР=3,026, 95%ДИ=1,370-6,681, $p=0,006$) и доля келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (ОР=3,16, 95%ДИ=1,480-6,749), $p=0,003$) были значимым прогностическим фактором для общей выживаемости.

После проведения однофакторного анализа значимые факторы были дополнительно оценены с помощью многомерной регрессионной модели Кокса для определения их независимой прогностической ценности для общей выживаемости (таблица 13).

Таблица 13 - Одно- и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости

Характеристики	Категории	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
		ОР (95% ДИ)	P-value	ОР (95% ДИ)	P
1	2	3	4	5	6
Возраст, (лет)	≤ 65 лет				
	> 65лет	1,613 (0,831-3,130)	0,158	-	-
Пол	Женский				
	Мужской	1,345 (0,684-2,645)	0,390	-	-
CCI индекс	≤3				
	>3	1,495 (0,770-2,901)	0,235	-	-
Рак у близких родственников	Нет				
	Да	0,481 (0,170-1,361)	0,168	-	-
Локализация опухоли	Левая часть				
	Правая часть	1,008 (0,501-2,026)	0,982	-	-

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
Т-стадия	T2				
	T3	0,907 (0,445-1,853)	0,790	-	-
N-стадия	N0				
	N1				
	N2	0,920 (0,601-1,583)	0,975	-	-
Степень дифференцировки	G1				
	G2				
	G3				
	Gx	0,734 (0,391-1,378)	0,336	-	-
Почкование опухоли	BD0				
	BD1				
	BD2				
	BD3	0,972 (0,786-1,203)	0,795	-	-
Венозная инвазия	Нет				
	Да	2,798 (1,221-6,413)	0,015	2,902 (1,352-6,231)	0,006
Лимфатическая инвазия	Нет				
	Да	3,026 (1,370-6,681)	0,006	2,347 (1,013-5,438)	0,047
Некроз опухоли	Нет				
	Да	1,037 (0,249-4,324)	0,960	-	-
Келлоидоподобный коллаген	очаговый				
	диффузный	3,160 (1,480-6,749)	0,003	2,902 (1,352-6,231)	0,006

После поправки на другие ковариаты венозная инвазия (ОР=2,902, 95%ДИ=1,352-6,231; p=0,006), лимфатическая инвазия (ОР=2,347, 95%ДИ=1,013-5,438; p=0,047), являлись прогностическими факторами для неблагоприятного исхода. Многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что доля келлоидоподобного коллагена >30% является независимым фактором значимо связанными с общей выживаемостью (ОР=2,902, 95%ДИ=1,352-6,231, p=0,006) в многофакторном анализе.

Таким образом, результаты данного исследования определили прогностически значимый пороговый уровень относительного содержания келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией на основе максимальной дискриминационной способности для общей выживаемости и безрецидивной выживаемости. Этот подход привел к установлению точки

отсечения для относительного содержания келлоидоподобного коллагена на уровне 30%. Исследование показало, что содержание более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли связано с худшими исходами. Пациенты с колоректальным раком с содержанием более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли имели худшие показатели общей и безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами с опухолями с содержанием менее 30% келлоидоподобного коллагена. Следовательно, доля келлоидоподобного коллагена в строме опухоли является важным индикатором, отражающим тяжесть заболевания, который в перспективе может определять принятие клинических решений и даже облегчать прогнозирование рецидива.

Результаты показали, что наличие более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли коррелирует с наличием такого агрессивного клинического признака как T-стадия ($p=0,009$).

Установлено, что диффузное содержание келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае колоректального рака стратифицирует риск рецидива в этой группе пациентов. Анализ многофакторных моделей показал, что увеличение келлоидоподобного коллагена в строме является независимым фактором послеоперационного рецидива у пациентов с раком толстой кишки. Эти результаты согласуются с научными исследованиями [332-334] и предполагают тесную связь между келлоидным коллагеном и метастатическим поведением раковых клеток. Механизм, приводящий к ухудшению прогноза у пациентов с повышенным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме, еще не до конца понятен. По мере прогрессирования колоректального рака увеличение количества толстых коллагеновых волокон может первоначально быть связано с первичной фибропролиферативной реакцией, а на более поздних стадиях - с аномальной выработкой коллагена и дефектным созреванием, что может способствовать росту опухоли [335]. Мы полагаем, что строма опухоли изначально способна оказывать ингибирующее действие на злокачественные клетки. При продолжающемся росте опухоль может эксплуатировать свою строму, например, изменяя ее состав, что морфологически проявляется изменением количественных и качественных характеристик коллагена, с целью стимуляции роста опухоли и ее метастазирования. Этот процесс происходит параллельно прогрессированию опухоли и характеризуется сложной двунаправленной связью между опухолью и ее стромой [336,337]. Различная скорость прогрессирования, рецидивов и продолжающегося роста позволяет предположить, что в ряде случаев прогрессирование опухоли в группе с повышенным количеством келлоидоподобной коллагеновой стромы может быть обусловлено первичными стромальными изменениями, вызывающими развитие опухоли *de novo*. Однако это предположение является спекулятивным и требует дальнейших исследований.

Многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что пациенты с более чем 30% келлоидоподобного коллагена в строме

инвазивного края опухоли с промежуточной десмопластической реакцией имели значительно худшую выживаемость, чем пациенты с менее чем 30% келлоидноподобного коллагена ($p < 0,01$). Эти результаты позволяют предположить, что стромальная классификация может обеспечить надежные прогностические характеристики. Кроме того, интеграция гистофенотипа в многомерный анализ показала улучшенные прогностические возможности, указывая на то, что этот гистофенотип может быть потенциальным дополнением к системе прогнозирования исходов, одновременно способствуя улучшению стратификации риска неблагоприятных исходов. Наши результаты объясняются растущими знаниями о том, что строма опухоли играет активную роль в прогрессировании рака, поскольку она взаимодействует с опухолевыми и доброкачественными клетками на разных стадиях, от зарождения опухоли до инвазии и метастазирования [338,339]. Мы рекомендуем регистрировать наличие келлоидной коллагеновой стромы как высокую степень злокачественности, если она составляет более трети всего внеклеточного матрикса инвазивного края опухоли. Будущие исследования необходимы для обнаружения дополнительных особенностей коллагеновой матрицы, которые могли бы более точно прогнозировать результаты лечения пациентов.

Сильными сторонами этого исследования являются однородная популяция исследования и единая географическая область, где диагностика и лечение проводились в одной больнице без систематической ошибки отбора. Другими сильными сторонами были всесторонняя гистологическая оценка специализированными патологами и доступность подробной клинико-патологической информации. Ограничения включают относительно небольшой размер выборки по сравнению с другими исследованиями в этой области и отсутствие подробных данных о лечении рака. Однако мы скорректировали многомерные модели с учетом клинических и демографических характеристик. Кроме того, поскольку данные о гистоструктуре стромального коллагена обычно не были доступны лечащим врачам, решения о лечении не принимались на основе конкретных структурных особенностей коллагенов в десмопластической реакции. В это исследование также были включены пациенты, жившие 5-10 лет назад, и разработки в области лечения колоректального рака в этот период могли повлиять на прогноз. По этим причинам необходимы обширные многоцентровые исследования для дальнейшего изучения тенденций. Ручная оценка относительного количества келлоидоподобного коллагена может иметь относительно высокую вариабельность результатов, поэтому в будущем цифровая оценка белков внеклеточного матрикса колоректального рака значительно повысит точность и уменьшит вариабельность результатов.

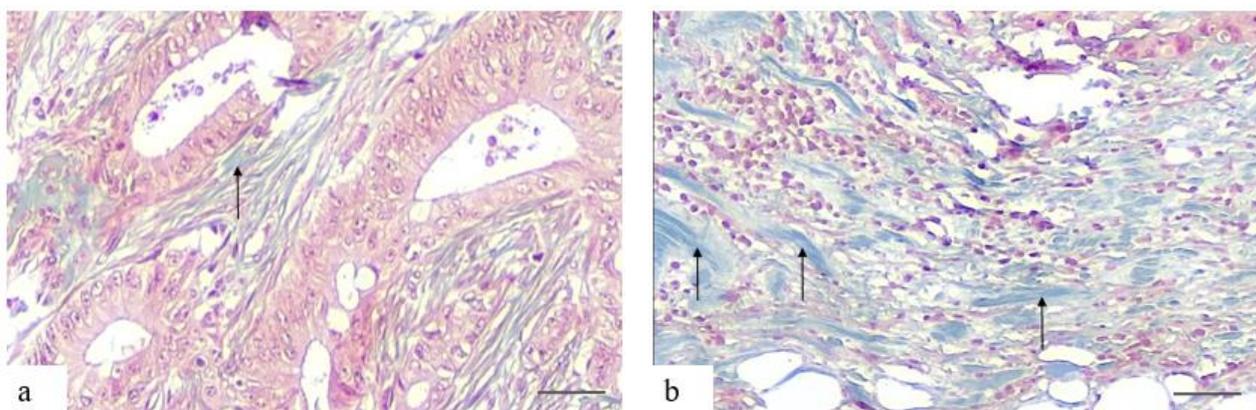
Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что диффузная келлоидоподобная коллагеновая строма, когда относительное количество келлоидноподобного коллагена увеличивается более чем на 30% от всего внеклеточного матрикса в инвазивном фронте опухоли, является независимым прогностическим фактором при пациентах с

колоректальным раком II или III стадии TNM, пролеченных хирургическим путем, с худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости. Определение гистофенотипа стромального келлоидоподобного коллагена поможет стратифицировать группы риска пациентов и улучшить индивидуальные терапевтические стратегии при колоректальном раке. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что классификация стромы, в частности гистофенотипа стромального коллагена, может обеспечить надежные прогностические характеристики для колоректального рака.

3.3 Эtablissement метода гистофенотипирования келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли толстого кишечника с промежуточной десмопластической реакцией

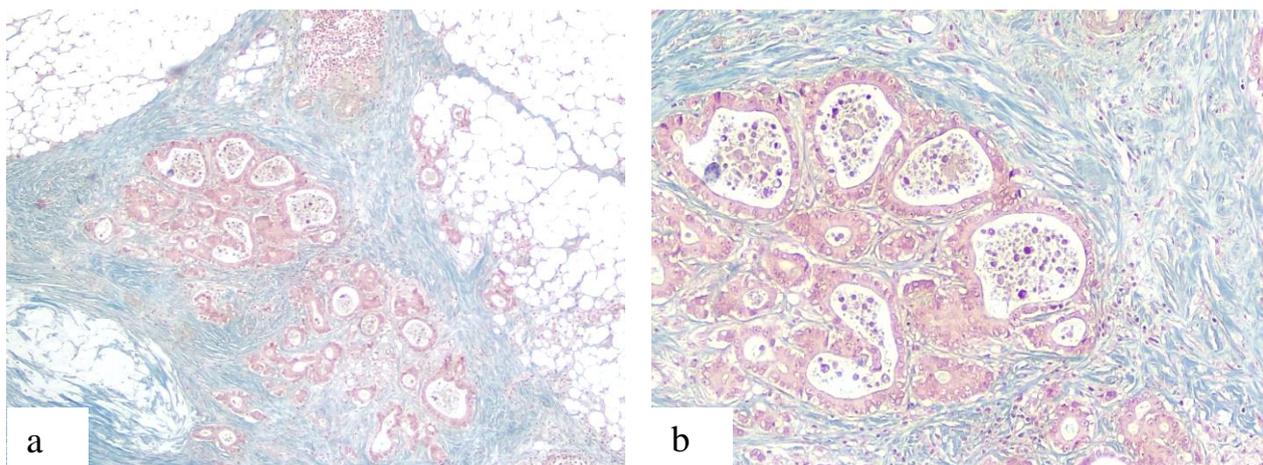
Для анализа взаимосвязи между клиническими характеристиками пациентов и количеством келлоидоподобного коллагена в строме опухоли, количество пациентов было доведено до 175. Пациенты были разделены на группы очаговый келлоидоподобный коллаген («тип А», $\leq 30\%$) и диффузный келлоидоподобный коллаген («тип В», $> 30\%$). На основании ранее определенной в пилотном исследовании точки отсечения 78 (44,6%) пациентов «тип А», 97 (55,4%) пациентов – «тип В».

Примеры репрезентативных микрофотографий инвазивного края опухолей пациентов исследуемых групп с гистофенотипом стромы тип А и тип В представлены на Рисунке 3а, а также тип В при различном увеличении (рисунок 4).



а – тип А, тонкие зрелые коллагеновые волокна (стрелки) и единичные волокна келлоидоподобного коллагена. (Трихром Массона, $\times 400$)
б – тип В, толстые пучки гипоклеточного келлоидоподобного коллагена (стрелки) гомогенного синего цвета, занимают более трети стромы инвазивного края опухоли. (Трихром Массона, $\times 400$)

Рисунок 3 - Микрофотографии репрезентативных срезов инвазивного края опухоли



а) Трихром Массона $\times 40$, б) Трихром Массона $\times 100$

Рисунок 4 - Пациентка Н, 56 лет, T₃N₀M₀. Гистохимический паттерн келлоидоподобного коллагена инвазивного края опухоли соответствует диффузному типу В

3.3.1 Взаимосвязь келлоидоподобного коллагена с клиническими характеристиками

Клинические характеристики пациентов исследуемых групп с очаговым и диффузным распределением келлоидоподобного коллагена в строме опухоли толстого кишечника с промежуточной десмопластической реакцией инвазивного края представлены в таблице 14.

Как видно из данных, представленных в таблице 14, в группу пациентов с очаговым распределением келлоидоподобного коллагена в строме опухоли вошло 78 (44,6%) пациентов. Средний возраст пациентов группы составил 63 года, при этом 35 (44,9%) пациентов были старше 65 лет, 43 (55,1%) пациента были младше 65 лет. Максимальный возраст пациентов в данной группе составил 89 лет, минимальный возраст - 38 лет. 34,6% группы составляли женщины, 65,4% - мужчины. Индекс коморбидности Чарлсона был ниже или равен трем у 44 (56,4%) пациентов, у 34 (43,6%) пациентов был выше 3. Семейный анамнез раковых заболеваний имели близкие родственники 18 (23,1%) пациентов. Планово были госпитализированы 64 (82,1%) пациента, экстренно - 14 (17,9%). Локализация опухоли в левой части толстого кишечника наблюдалась у 45 (57,7%) пациентов, в правой части толстого кишечника проксимальнее печеночного изгиба - у 33 (42,3%) пациентов. Стадия T₂ была установлена у 59 (75,6%) человек, T₃ - у 19 (24,4%) пациентов. Стадия N₀ диагностирована у 51 (65,4%) пациентов, N₁ - у 25 (32,1%) пациентов, N₂ - у 2 (2,5%) пациента.

В группу пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном было включено 97 (55,4%) пациентов. Средний возраст пациентов составил 63 года, при этом 40 (41,2%) пациентов были старше 65 лет, 57 (58,8%) пациента были младше 65 лет. Максимальный возраст пациентов в данной группе составил 82

года, минимальный возраст - 40 лет. 39,2% группы составляли женщины, 60,8% - мужчины. Индекс коморбидности Чарлсона был ниже или равен трем у 64 (66%) пациентов, у 33 (34%) пациентов был выше 3. Семейный анамнез раковых заболеваний имели близкие родственники 18 (18,6%) пациентов. Планово были госпитализированы 79 (81,4%) пациента, экстренно – 18 (18,6%). Локализация опухоли в левой части толстого кишечника наблюдалась у 67 (60,1%) пациентов, в правой части толстого кишечника проксимальнее печеночного изгиба – у 30 (30,9%) пациентов. Стадия T2 была установлена у 59 (60,8%) человек, T3 – у 38 (39,2%) пациентов. Стадия N0 диагностирована у 45 (46,4%) пациентов, N1 – у 33 (34%) пациентов, N2 – у 19 (19,6%) пациента.

Таким образом, статистически значимых различий по возрасту пациентов между группами с диффузным и очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена не наблюдается ($p=0,63$). В исследуемой выборке преобладающее большинство пациентов - мужчины, как в группе с келлоидоподобным коллагеном (62,9%) и в группе с диффузным типом (65,4%). Различия в распределении по полу не являются статистически значимыми ($p=0,535$). В обеих группах преобладают пациенты монголоидной расы, различия в распределении по расе также не являются статистически значимыми ($p=0,543$).

В обеих группах большинство пациентов имели индекс коморбидности ≤ 3 в обеих группах, различия не достигают статистической значимости ($p=0,196$). Наблюдается некоторая вариабельность в распределении по годам, но статистически значимых различий между группами по дате установления диагноза не выявлено ($p=0,553$). Большинство близких родственников пациентов не имели установленных диагнозов злокачественных опухолей, статистически значимых различий по установленному диагнозу злокачественной опухоли у близких родственников пациентов между группами выявлено не было ($p=0,463$). Различия в типе госпитализации пациентов между группами с диффузным и очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена не достигли статистической значимости ($p=0,918$). Большая часть опухолей располагалась в левой части толстого кишечника дистальнее печеночного изгиба. Различия в локализации опухоли между группами ($p=0,12$) и в применении химиотерапии ($p=0,352$) не являются статистически значимыми.

По результатам анализа, статистически значимые различия были выявлены по T-стадии ($p=0,038$) и N-стадии ($p=0,002$) между группами с очаговым и диффузным келлоидоподобным коллагеном в строме колоректальной аденокарциномы.

Таблица 14 - Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и клиническими характеристиками пациентов

Характеристики	Категории	Всего n = 175	Келлоидоподобный коллаген		p- value ^a
			Очаговый n = 78	Диффузный n =97	
Возраст, (лет)	ME ± SD	62,7 ±9,8	62,8±10,5	62,4±9,2	0,630
	диапазон	[38; 89]	[38; 89]	[40; 82]	
	≤ 65 лет	100 (57,1)	43 (55,1)	57 (58,8)	
	> 65лет	75 (42,9)	35 (44,9)	40 (41,2)	
Пол, n (%)	Женский	65 (37,1)	27 (34,6)	38 (39,2)	0,535
	Мужской	110 (62,9)	51 (65,4)	59 (60,8)	
Индекс коморбидности Чарлсона, n (%)	≤3	108 (61,7)	44 (56,4)	64 (66,0)	0,196
	>3	67 (38,3)	34 (43,6)	33 (34,0)	
Рак у близких родственников, n (%)	Нет	139 (79,4)	60 (76,9)	79 (81,4)	0,463
	Да	36 (20,6)	18 (23,1)	18 (18,6)	
Локализация опухоли, n (%)	Левая часть	112 (64,0)	45 (57,7)	67 (60,1)	0,120
	Правая часть	63 (36,0)	33 (42,3)	30 (30,9)	
Т-стадия, n (%)	T1	-	-	-	0,038
	T2	118 (67,4)	59 (75,6)	59 (60,8)	
	T3	57 (32,5)	19 (24,4)	38 (39,2)	
N-стадия, n (%)	N0	96 (54,8)	51 (65,4)	45 (46,4)	0,002
	N1	58 (33,1)	25 (32,1)	33 (34,0)	
	N2	21 (12,0)	2 (2,5)	19 (19,6)	
Химиотерапия	Нет	43 (24,6)	17 (20,2)	26 (26,8)	0,352
	Да	51 (29,2)	24 (28,6)	27 (27,8)	
	Нет данных	81 (46,3)	43 (51,2)	38 (39,2)	

Примечание - ^a - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия p < 0,05

3.3.2 Сравнительная характеристика относительного содержания келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с гистопатологическими и молекулярными характеристиками опухоли

Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и гистопатологическими и характеристиками опухоли представлена в таблице 15.

В группе пациентов с очаговым келлоидоподобным коллагеном, наличие менее 50% стромы наблюдалось в 41 (52,6%) опухоли, более 50% стромы было выявлено в 37 (47,4%) опухолей. Высокодифференцированная опухоль были выявлена в 1 (1,3%) случае, умеренно дифференцированные опухоли – в 59 (75,6%) случаях, низкодифференцированная опухоль – в 11 (14,1%) случаях, степень дифференцировки опухоли не была определена в 7 (9,0%) случаях.

Таблица 15 - Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и гистопатологическими характеристиками опухоли

Характеристики	Категории	Всего n = 175	Келлоидоподобный коллаген		p- value ^a
			Очаговый n = 78	Диффузный n =97	
TSR	<50% стромы	96 (54,9)	41 (52,6)	55 (56,7)	0,585
	>50% стромы	79 (45,1)	37 (47,4)	42 (43,3)	
Степень дифференцировки (G), n (%)	G1	2 (1,1)	1 (1,3)	1 (1,0)	0,034
	G2	114 (65,1)	59 (75,6)	55 (56,7)	
	G3	43 (24,6)	11 (14,1)	32 (33,0)	
	Gx	16 (9,2)	7 (9,0)	9 (9,3)	
Почкование опухоли, n (%)	Нет	75 (42,9)	36 (46,2)	39 (40,2)	0,163
	Низкое	36 (20,6)	20 (25,6)	16 (16,5)	
	Промежуточное	41 (23,4)	13 (16,7)	28 (28,9)	
	Выраженное	23 (13,1)	9 (11,5)	14 (14,4)	
Венозная инвазия, n (%)	Нет	106 (60,6)	56 (71,8)	50 (51,5)	0,007
	Да	69 (39,4)	22 (28,2)	47 (48,5)	
Лимфатическая инвазия, n (%)	Нет	115 (65,7)	60 (76,9)	55 (56,7)	0,006
	Да	60 (39,4)	18 (23,1)	42 (43,3)	
Периневральная инвазия, n (%)	Нет	158 (90,3)	70 (89,7)	88 (90,7)	0,829
	Да	17 (9,7)	8 (10,3)	9 (9,3)	
KRAS status, n (%)	Мутант	58 (33,1)	34 (43,6)	24 (24,7)	0,016
	Дикий тип	45 (25,7)	20 (25,6)	25 (25,8)	
	Нет данных	72 (41,2)	24 (30,8)	48 (49,5)	
Примечание - ^a - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия p < 0,05					

Опухолевые клетки в мышечном слое кровеносных сосудов или инвазия в мышечный слой сосуда или эндотелий были выявлены в 22 (28,2%) случаях. Гнезда опухолевых клеток в лимфатических сосудах определялось в 18 (23,1%) случаях. Опухолевые клетки в трех слоях оболочки нерва или в непосредственной близости от нерва, поражающих не менее 33% всей его окружности выявлены в 8 (10,3%) случаях. При определении KRAS-статуса мутантный тип был выявлен у 58 (33,1%) пациентов, дикий тип – у 45 (25,7%) пациентов.

В группе пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном, наличие менее 50% стромы наблюдалось в 55 (56,7%) опухолях, более 50% стромы было выявлено в 42 (43,3%) опухолей. Высокодифференцированная опухоль были выявлена в 1 (1,0%) случае, умеренно дифференцированные опухоли – в 55(56,7%) случаях, низкодифференцированная опухоль – в 32 (33%) случаях, степень дифференцировки опухоли не была определена в 9 (9,3%) случаях.

Опухолевые клетки в мышечном слое кровеносных сосудов или инвазия в мышечный слой сосуда или эндотелий были выявлены в 47 (48,5%) случаях. Гнезда опухолевых клеток в лимфатических сосудах определялось в 42 (43,3%) случаях. Опухолевые клетки в трех слоях оболочки нерва или в

непосредственной близости от нерва, поражающих не менее 33% всей его окружности выявлены в 9 (9,3%) случаях. При определении KRAS-статуса мутантный тип был выявлен у 24 (24,7%) пациентов, дикий тип – у 25 (25,8%) пациентов. Таким образом, результаты исследования показали, что различия по TSR ($p=0,585$), почкованию опухоли ($p=0,163$) и периневральной инвазии ($p=0,829$) между группами не являются статистически значимыми. Наблюдается статистически значимое различие по степени дифференцировки опухоли между очаговым и диффузным келлоидоподобным коллагеном ($p=0,034$), венозной инвазии ($p=0,007$) и лимфатической инвазии ($p=0,006$). Процент пациентов с мутантным KRAS статусом выше в группе с диффузным типом, чем в группе с келлоидоподобным коллагеном ($p=0,016$).

3.3.2.1 Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и лимфоцитарной инфильтрацией (окраска гематоксилин и эозин)

Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и лимфоцитарной инфильтрацией (гематоксилин и эозин) представлена в таблице 16.

В группе опухолей с очаговым келлоидоподобным коллагеном, составляющим менее трети площади стромы (тип А), лимфоциты поверх раковых клеток в большом количестве наблюдались в 10 (12,8%) опухолях, средняя степень инфильтрации наблюдалась в 19 (24,4%) случаях, низкая степень инфильтрации выявлена в 49 (62,8%) опухолях.

При оценке лимфоцитарной внутриопухолевой перигландулярной реакции выраженная лимфоцитарная реакция в строме опухоли в пределах опухолевой массы была выявлена в 13 (16,7%) опухолях, средняя степень инфильтрации наблюдалась в 54 (69,2%) опухолях, низкая степень инфильтрации определялась в 11 (14,1%) опухолях.

Высокая степень лимфоидной реакции, окружающей опухолевую массу, выявлена в 16 (20,5%) опухолях, средняя степени инфильтрации в 48 (61,5%) опухолях, низкая степень инфильтрации в 14 (17,9%) опухолях (рисунок 7,8).

Трансмуральная лимфоидная реакция высокой степени выявлена в 8 (10,3%) опухолях, средней степени - в 14 (17,9%) опухолях, низкая степень инфильтрации наблюдалась в 56 (71,8%) опухолях.

Таблица 16 - Взаимосвязь между келлоидоподобным коллагеном и лимфоцитарной инфильтрацией (гематоксилин и эозин)

Характеристики	Категории	Всего n = 175	Келлоидоподобный коллаген		P- valu e ^a
			Очаговый n = 78	Диффуз ный n =97	
1	2	3	4	5	6
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, n (%)	Отрицательный/низкий	136 (77,7)	49 (62,8)	87 (89,7)	0,00 1
	Средний	26 (14,9)	19 (24,4)	7 (7,2)	
	Высокий	13 (7,4)	10 (12,8)	3 (3,1)	

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
Внутриопухолевая перигландулярная реакция, n (%)	Отрицательный/низкий	35 (20,0)	11 (14,1)	24 (24,7)	0,00
	Средний	123 (70,3)	54 (69,2)	69 (71,1)	9
	Высокий	17 (9,7)	13 (16,7)	4 (4,1)	
Перитуморальная лимфоцитарная реакция, n (%)	Отрицательный/низкий	37 (21,1)	14 (17,9)	23 (23,7)	0,00
	Средний	120 (68,6)	48 (61,5)	72 (74,2)	1
	Высокий	18 (10,3)	16 (20,5)	2 (2,1)	
Кроноподобная лимфоидная реакция, n (%)	Отрицательный/низкий	130 (74,3)	56 (71,8)	74 (76,3)	0,60
	Средний	31 (17,7)	14 (17,9)	17 (17,5)	2
	Высокий	14 (8,0)	8 (10,3)	6 (6,2)	
Индекс Klintrup–Mäkinen, n (%)	Низкий	131 (74,9)	51 (65,4)	80 (82,5)	0,01
	Высокий	44 (25,1)	27 (34,6)	17 (17,5)	0
% инфильтрирующих опухоль лимфоцитов	Низкий	113 (65,6)	49 (62,8)	64 (66,0)	0,66
	Высокий	62 (35,4)	29 (37,2)	33 (34,0)	5
Примечание - ^a - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия $p < 0,05$.					

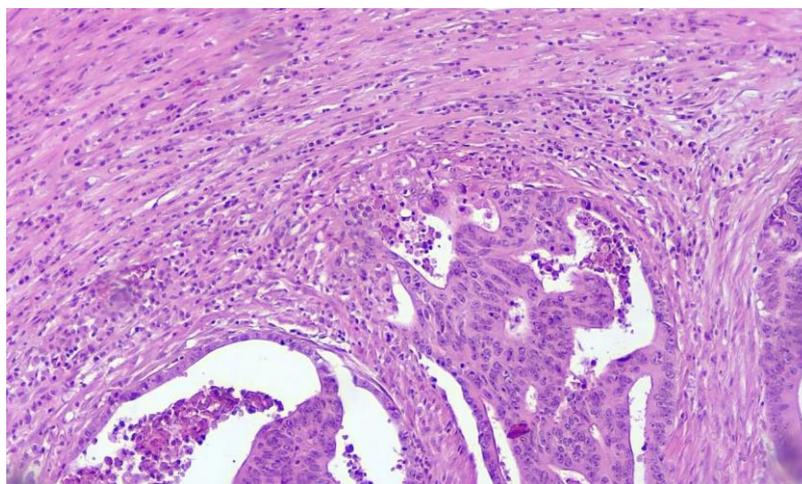


Рисунок 5 – Низкая степень перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации. (Гематоксилин и эозин, x100)

При оценке индекса Klintrup-Mäkinen лентообразный или чашеобразный инфильтрат воспалительных клеток на инвазивном крае опухоли с разрушением раковых клеток определялся в 27 (34,6%) случаях, иммунные клетки отсутствовали или отмечалось их незначительное увеличение на инвазивном фронте в 51 (65,4%) случае. Процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов был более 42% в 29 (37,2%) опухолях, менее 42% в 49 (62,8%) опухолях.

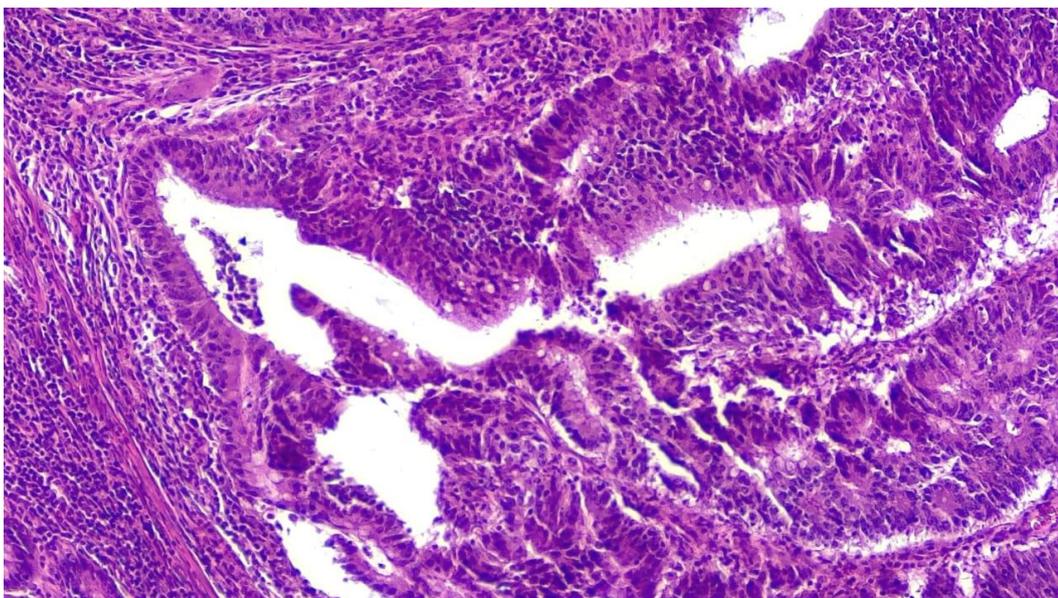


Рисунок 6 – Высокая степень перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации.
(Гематоксилин и эозин, x100)

В группе опухолей с диффузным келлоидоподобным коллагеном, составляющим более трети площади стромы (тип А), лимфоциты поверх раковых клеток в большом количестве наблюдались в 3 (3,1%) опухолях, средняя степень инфильтрации наблюдалась в 7 (7,2%) случаях, низкая степень инфильтрации выявлена в 87 (89,7%) опухолях. При оценке лимфоцитарной внутриопухолевой перигландулярной реакции выраженная лимфоцитарная реакция в строме опухоли в пределах опухолевой массы была выявлена в 4 (4,1%) опухолях, средняя степень инфильтрации наблюдалась в 69 (71,1%) опухолях, низкая степень инфильтрации определялась в 24 (24,7%) опухолях. Высокая степень лимфоидной реакции, окружающей опухолевую массу, выявлена в 2 (2,1%) опухолях, средняя степени инфильтрации в 72 (74,2%) опухолях, низкая степень инфильтрации в 23 (23,7%) опухолях. Трансмуральная лимфоидная реакция высокой степени выявлена в 6 (6,2%) опухолях, средней степени - в 17 (17,5%) опухолях, низкая степень инфильтрации наблюдалась в 74 (76,3%) опухолях.

При оценке индекса Klintrup-Mäkinen лентообразный или чашеобразный инфильтрат воспалительных клеток на инвазивном крае опухоли с разрушением раковых клеток определялся в 17 (17,5%) случаях, иммунные клетки отсутствовали или отмечалось их незначительное увеличение на инвазивном фронте в 80 (82,5%) случаях. Процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов был более 42% в 33 (34,0%) опухолях, менее 42% в 64 (66,0%) опухолях.

На рисунке 7 представлена микрофотография опухоли с диффузной лимфоцитарной инфильтрацией в опухолевой строме инвазивного края.

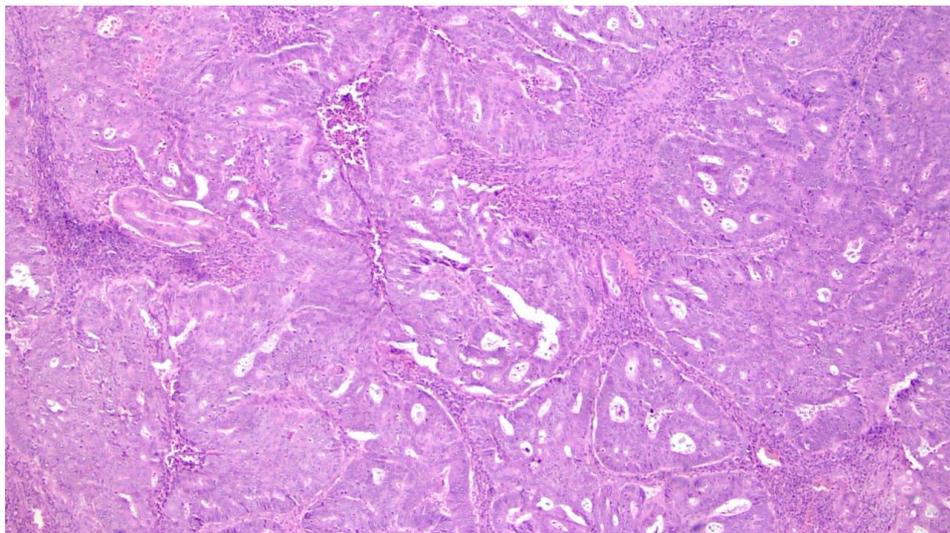


Рисунок 7 – Диффузная лимфоцитарная инфильтрация в опухолевой строме.
(Гематоксилин и эозин, x40)

Таким образом у большинства пациентов с очаговым келлоидоподобным коллагеном (менее 30% стромы) наблюдался высокий уровень лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в сравнении с пациентами с диффузным типом келлоидоподобным коллагеном (89,7% против 62,8%, $p < 0,001$). Средний и высокий уровни перигландулярной лимфоцитарной инфильтрации внутри опухоли были более характерны для очагового келлоидоподобного коллагена по сравнению с диффузным ($p = 0,009$). Опухоли с очаговым келлоидоподобным коллагеном имели значительно более высокие уровни перитуморальной лимфоцитарной реакции по сравнению с опухолями с диффузным келлоидоподобным коллагеном ($p = 0,001$). Высокий уровень индекса Klintrup-Mäkinen был более характерен для очагового келлоидоподобного коллагена (менее 30% стромы), чем для диффузного келлоидоподобного коллагена (более 30% стромы) ($p = 0,01$). Не было обнаружено статистически значимых различий в кроноподобной лимфоидной реакции между опухолями с очаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли ($p = 0,602$). Не наблюдалось статистически значимых различий в проценте инфильтрирующих опухоль лимфоцитов между опухолями с очаговым и диффузным келлоидоподобным коллагеном ($p = 0,665$).

3.3.3 Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости и безрецидивной выживаемости

Риск летального исхода у пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном был в 3,3 (95% ДИ=1,9-5,72) раз выше по сравнению с пациентами с очаговым келлоидоподобным коллагеном ($p < 0,001$, рисунок 8).

Безрецидивная выживаемость была статистически значимо ниже среди пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном по сравнению с

пациентами с очаговым келлоидоподобным коллагеном (OR=2,92, 95%ДИ=1,88-4,53, p<0,001), рисунок 9).

Таблица 17 - Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня келлоидоподобного коллагена

Период (мес)	Общая выживаемость		Безрецидивная выживаемость	
	очаговый (тип А)	Диффузный (тип В)	очаговый (тип А)	Диффузный (тип В)
6	98,7 [96,1; 100]	93,8 [89,1; 98,7]	97,3 [93,8; 100]	92,8 [87,8; 98,1]
12	86,5 [79,1; 94,6]	75,7 [67,5; 84,9]	86,5 [79,1; 94,7]	70,1 [61,6; 79,8]
18	85,2 [77,4; 93,6]	71,3 [62,6; 81,1]	81,1 [72,7; 90,5]	63,9 [55; 74,2]
24	80,9 [72,4; 90,4]	62,1 [52,9; 72,9]	74,3 [64,9; 85]	54,6 [45,6; 65,5]
30	78 [69; 88,2]	60,9 [51,6; 71,8]	72,9 [63,4; 83,8]	48,5 [39,5; 59,5]
36	78 [69; 88,2]	54,6 [45,2; 66,1]	71,5 [61,9; 82,6]	40,2 [31,5; 51,2]
42	78 [69; 88,2]	53,2 [43,7; 64,8]	70,1 [60,4; 81,4]	39,2 [30,6; 50,2]
48	78 [69; 88,2]	50,4 [40,8; 62,3]	70,1 [60,4; 81,4]	37,1 [28,6; 48,1]
54	78 [69; 88,2]	47,5 [37,8; 59,6]	68,7 [58,8; 80,2]	34,9 [26,6; 45,9]
60	76,3 [67,1; 86,9]	45,9 [36,3; 58,2]	64,2 [54; 76,3]	30,4 [22,4; 41,2]

В группе с келлоидоподобным коллагеном, составляющим Тип А ≤30% стромы определены следующие показатели: одногодичная общая выживаемость составила 86,5%, трехгодичная общая выживаемость – 78%, пятигодичная общая выживаемость – 76,3%; одногодичная безрецидивная выживаемость составила 86,5%, трехгодичная безрецидивная выживаемость – 71,5%, пятигодичная безрецидивная выживаемость – 64,2%.

В группе с келлоидоподобным коллагеном, составляющим Тип В >30% стромы определены следующие показатели: одногодичная общая выживаемость, составила 75,7%, трехгодичная общая выживаемость – 54,6%, пятигодичная общая выживаемость – 45,9%; одногодичная безрецидивная выживаемость составила 70,1%, трехгодичная безрецидивная выживаемость – 40,2%, пятигодичная безрецидивная выживаемость – 30,4%.

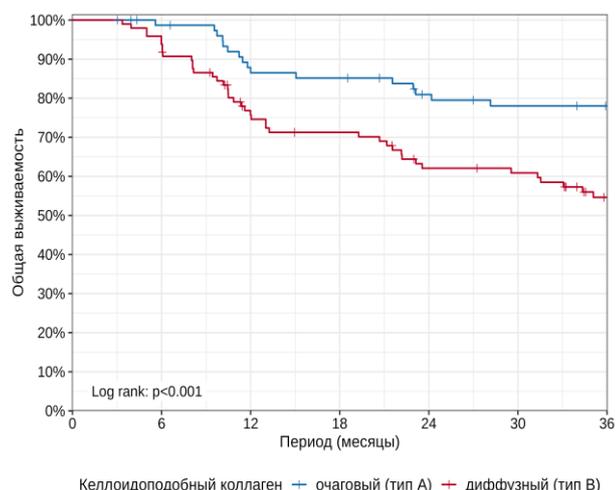
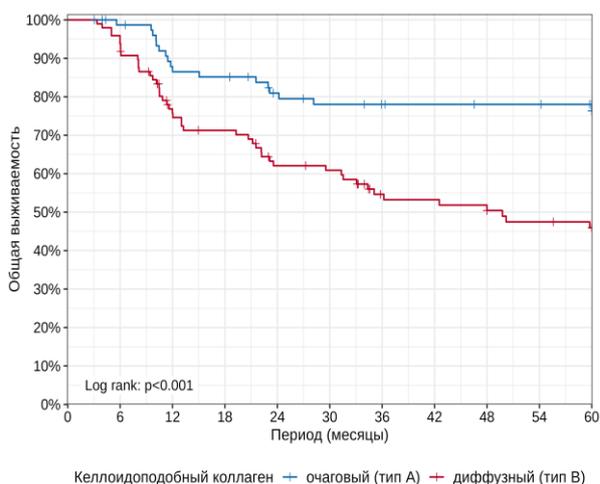


Рисунок 8 - Общая выживаемость в зависимости от уровня келлоидоподобного коллагена

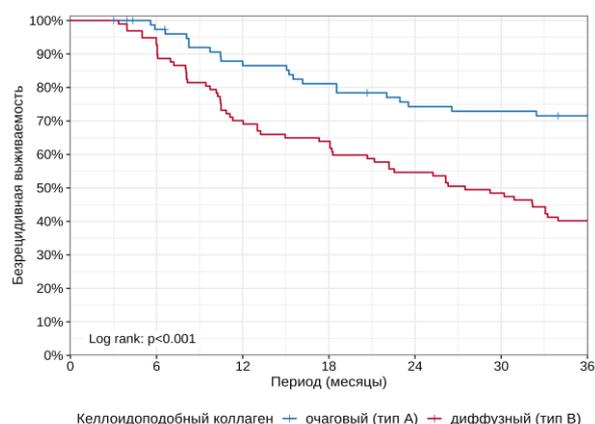
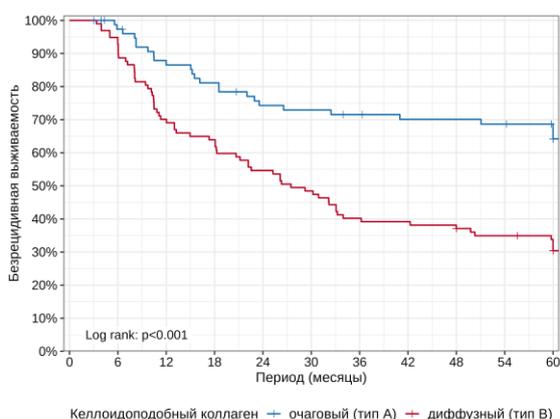


Рисунок 9 - Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня келлоидоподобного коллагена

Однофакторный регрессионный анализ Кокса проводили для оценки прогностической значимости клинических данных пациентов, гистопатологических характеристик опухолей и гистохимического паттерна келлоидоподобного коллагена, оцененного на всех микропрепаратах опухоли инвазивного края для рецидива опухоли (таблица 18).

Как видно из таблицы 18 в однофакторном регрессионном анализе прогностических факторов безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса установлено, что ряд клинических факторов (таких как возраст, пол, раса, индекс коморбидности Чарлсона, семейный анамнез онкологических заболеваний) и гистопатологических факторов (таких как степень дифференцировки опухоли, почкование опухоли и периневральная инвазия) не оказали статистически значимого влияния на безрецидивную выживаемость у пациентов исследуемых групп.

Однофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных

рисков Кокса показал, что среди заранее определенных клинико-патологических прогностических факторов, оцененных в этом исследовании, Т-стадия, TSR, венозная и лимфатическая инвазия, а также такие гистопатологические факторы как внутриопухолевая перигландулярная реакция, перитуморальная лимфоцитарная реакция, Кроноподобная лимфоидная реакция, индекс Klintrup-Mäkinen и процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов оказали значительное влияние на безрецидивную выживаемость.

У пациентов с Т3 стадией отношение рисков составило (ОР=1,626, 95%ДИ=1,079-2,451, $p=0,02$) по сравнению с пациентами со стадией Т2. TSR (ОР=1,602, 95%ДИ=1,074-2,388, $p=0,021$), венозная инвазия (ОР=2,184, 95%ДИ=1,461-3,265, $p=0,001$) и лимфатическая инвазия (ОР=2,003, 95%ДИ=1,460-3,265, $p=0,001$) также были значимыми прогностическими факторами для безрецидивной выживаемости.

Таблица 18 - Одно- и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости

Характеристики	Категори и	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
		ОР (95% ДИ)	P-value	ОР (95% ДИ)	P
1	2	3	4	5	6
Возраст, (лет)	≤ 65 лет				
	> 65лет	1,212 (0,812-1,808)	0,347	-	-
Пол	Женский				
	Мужской	0,945 (0,624-1,431)	0,790	-	-
Локализация опухоли	Левая часть				
	Правая часть	1,324 (0,877 -1,998)	0,182	-	-
Т-стадия	Т2				
	Т3	1,626 (1,079-2,451)	0,020	1,145 (0,742- 1,767)	0,54
N-стадия	N0				
	N1				
	N2	1,229 (0,930-1,623)	0,146	-	-
TSR	<50%				
	>50%	1,602 (1,074-2,388)	0,021	1,393 (0,910- 2,132)	0,127
Степень диффе ренцировки (G)	G1				
	G2				
	G3				
	Gx	1,229 (0,929-1,625)	0,149	-	-
KRAS status	Мутант				

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
	Дикий	1,139 (0,905-1,433)	0,267	-	-
Почкование опухоли	BD0				
	BD1				-
	BD2				-
	BD3	1,015 (0,891-1,157)	0,823	-	-
Венозная инвазия	Нет				
	Да	2,184 (1,461-3,265)	0,001	1,669(1,054-2,642)	0,029
Лимфатическая инвазия	Нет				
	Да	2,003 (1,460-3,265)	0,001	1,138 (0,699-1,851)	0,603
Периневральная инвазия	Нет				
	Да	1,552 (0,847-2,845)	0,155	-	-
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль	Отрицательный/низкий				
	Средний				
	Высокий	0,499 (0,318-0,785)	0,003	0,771 (0,474-1,253)	0,294
Внутриопухолевая перигландулярная реакция	Отрицательный/низкий				
	Средний				
	Высокий	0,687 (0,479-0,985)	0,041	1,283 (0,650-2,530)	0,472
Перитуморальная лимфоцитарная реакция	Отрицательный/низкий				
	Средний				
	Высокий	0,616 (0,434-0,875)	0,007	0,689 (0,364-1,302)	0,251
Кроноподобная лимфоидная реакция	Отрицательный/низкий				
	Средний				
	Высокий	0,686 (0,475-0,990)	0,044	0,977 (0,612-1,559)	0,922
Индекс Klintrup-Mäkinen	Низкий				
	Высокий	0,494 (0,292-0,835)	0,008	0,711 (0,401-1,259)	0,241
Процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов	Низкий				
	Высокий	0,570 (0,363-0,894)	0,014	0,603 (0,347-1,049)	0,073

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
Келлоидоподобный коллаген	$\leq 0,3$				
	$> 0,3$	2,741 (1,753-4,286)	0,000	2,019 (1,201-3,395)	0,008
Примечание - ^a - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия $p < 0,05$					

У пациентов с высокой инфильтрацией лимфоцитами (OR=0,499, 95%ДИ=0,318-0,785, $p=0,003$) по сравнению с пациентами, в опухоли которых определялся более низкий уровень лимфоцитарной инфильтрации.

Перитуморальная лимфоцитарная реакция (OR=0,616, 95%ДИ=0,434-0,875, $p=0,007$), Кроноподобная лимфоидная реакция (OR=0,686, 95%ДИ=0,475-0,990, $p=0,044$), индекс Klintrup–Mäkinen (OR=0,494, 95%ДИ=0,292-0,835, $p=0,008$) и процент лимфоцитов, инфильтрующих опухоль (OR=0,570, 95%ДИ=0,363-0,894, $p=0,014$) также были значимыми прогностическими факторами для безрецидивной выживаемости.

У пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном в строме опухоли (гистофенотип стромы Тип В (келлоидоподобный коллаген $>30\%$) наблюдался заметно более высокий риск рецидива (OR=2,741, 95%ДИ=1,753-4,286, $p=0,004$), чем у пациентов с очаговым келлоидоподобным коллагеном (гистофенотип стромы тип А (келлоидоподобный коллаген $\leq 0,3$)).

После проведения однофакторного анализа значимые факторы были дополнительно оценены с помощью многомерной регрессионной модели Кокса для определения их независимой прогностической ценности для безрецидивной выживаемости. После поправки на другие ковариаты Т-стадия, процент стромы опухоли, лимфатическая инвазия, лимфоцитарная инфильтрация опухоли, внутриопухолевая перигландулярная реакция, перитуморальная лимфоцитарная инфильтрация,

Кроноподобная лимфоидная реакция, индекс Klintrup–Mäkinena и процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов не являлись прогностическими факторами для неблагоприятного исхода в отличие от структурного паттерна венозной инвазии (OR=1,669, 95%ДИ=1,054-2,642, $p=0,029$) и распределения келоидоподобного коллагена в строме опухоли.

Многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов безрецидивной выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что диффузное распределение коллагена в строме инвазивного края опухоли (гистофенотип стромы Тип В (келлоидоподобный коллаген $\geq 0,3$) является независимым фактором значимо связанными с безрецидивной выживаемостью (OR=2,019, 95%ДИ=1,201-3,395, $p=0,008$) (таблица 18).

Данные регрессионного анализа Кокса, проведенного для оценки прогностической значимости клинических данных пациентов, гистопатологических характеристик опухолей и гистохимического паттерна

келлоидоподобного коллагена, оцененного на всех микропрепаратах опухоли инвазивного края для общей выживаемости пациентов представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Одно- и многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости

Характеристики	Категории	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
		ОР (95% ДИ)	P-value	ОР (95% ДИ)	P-value ^a
1	2	3	4	5	6
Возраст, (лет)	≤ 65 лет				
	> 65 лет	1,231 (0,769-1,972)	0,387	-	-
Пол	Женский				
	Мужской	1,093 (0,663-1,801)	0,727	-	-
CCI индекс	≤3				
	>3	0,685 (0,413-1,135)	0,142	-	-
Рак у близких родственников, n (%)	Нет				
	Да	1,304 (0,754-2,255)	0,343	-	-
Локализация опухоли	Левая часть				
	Правая часть	1,586 (0,985 -2,553)	0,058	-	-
T-стадия	T2				
	T3	1,494 (0,917-2,436)	0,107	-	-
N-стадия	N0				
	N1				
	N2	1,405 (1,022-1,932)	0,036	1,173 (0,834-1,648)	0,359
TSR	<50%				
	>50%	2,073 (1,284-3,346)	0,003	1,878 (1,124-3,140)	0,016
Степень дифференцировки (G)	G1				
	G2				
	G3				
	Gx	1,326 (0,962-1,827)	0,085	-	-
KRAS status	Мутант				
	Дикий	1,022 (0,782-1,337)	0,872	-	-
Почкование опухоли	BD0				
	BD1				-

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6
	BD2				-
	BD3	1,032 (0,875-1,203)	0,688	-	-
Венозная инвазия	Нет				
	Да	2,217 (1,380-3,561)	0,001	1,639 (0,950-2,827)	0,076
Лимфатическая инвазия	Нет				
	Да	2,163 (1,347-3,474)	0,001	0,936 (0,527-1,662)	0,821
Периневральная инвазия	Нет				
	Да	1,184 (0,541-2,590)	0,672	-	-
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль	Отрицательный/ низкий				
	Средний				
	Высокий	0,332 (0,167-0,661)	0,002	0,559 (0,276-1,133)	0,107
Внутриопухолевая перигландулярная реакция	Отрицательный/ низкий				
	Средний				
	Высокий	0,637 (0,417-0,973)	0,037	0,852 (0,491-1,478)	0,568
Перитуморальная лимфоцитарная реакция	Отрицательный/ низкий				
	Средний				
	Высокий	0,676 (0,447-1,021)	0,063	-	-
Кроноподобная лимфоидная реакция	Отрицательный/ низкий				
	Средний				
	Высокий	0,628 (0,397-0,992)	0,046	1,069 (0,608-1,880)	0,816
Индекс Klintrup–Mäkinen	Низкий				
	Высокий	0,401 (0,205-0,785)	0,008	0,553 (0,267-1,143)	0,110
Процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов	Низкий				
	Высокий	0,546 (0,319-0,933)	0,027	0,583 (0,303-1,123)	0,107

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6
Келлоидоподобный коллаген	$\leq 0,3$				
	$> 0,3$	3,248 (1,873-5,631)	0,001	2,325 (1,241-4,354)	0,008
Примечание - а - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия $p < 0,05$					

Как видно из таблицы 19 в однофакторном регрессионном анализе прогностических факторов общей выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса установлено, что ряд клинических факторов (таких как возраст, пол, раса, индекс коморбидности Чарлсона, семейный анамнез онкологических заболеваний) и гистопатологических факторов (таких как степень дифференцировки опухоли, почкование опухоли и периневральная инвазия) не оказали статистически значимого влияния на общую выживаемость у пациентов исследуемых групп.

Однофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что среди заранее определенных клинико-патологических прогностических факторов, оцененных в этом исследовании, N-стадия, TSR, венозная и лимфатическая инвазия, а также такие гистопатологические факторы как лимфоциты, инфильтрующая опухоль, внутриопухолевая перигландулярная реакция, Кроноподобная лимфоидная реакция, индекс Klintrup-Mäkinen и процент инфильтрирующей опухоли лимфоцитов показали значительное влияние на общую выживаемость.

N-стадия (OR=1,405, 95%ДИ=1,022-1,932, $p=0,036$), TSR (OR=2,073, 95%ДИ=1,284-3,346, $p=0,003$), венозная инвазия (OR=2,217, 95%ДИ=1,380-3,265, $p=0,001$) и лимфатическая инвазия (OR=2,163, 95%ДИ=1,347-3,474, $p=0,001$) также были значимыми прогностическими факторами для общей выживаемости.

У пациентов с высокой инфильтрацией лимфоцитами (OR=0,332, 95%ДИ=0,167-0,661, $p=0,002$) по сравнению с пациентами, в опухоли которых определялся более низкий уровень лимфоцитарной инфильтрации.

Внутриопухолевая перигландулярная реакция (OR=0,637, 95%ДИ=0,417-0,973, $p=0,037$), Кроноподобная лимфоидная реакция (OR=0,628, 95%ДИ=0,397-0,992, $p=0,046$), индекс Klintrup-Mäkinen (OR=0,401, 95%ДИ=0,205-0,785, $p=0,008$) и процент лимфоцитов, инфильтрующих опухоль (OR=0,546, 95%ДИ=0,19-0,933, $p=0,027$) также были значимыми прогностическими факторами для смерти. У пациентов с диффузным келлоидоподобным коллагеном в строме опухоли (гистофенотип стромы Тип В (келлоидоподобный коллаген $>30\%$) наблюдался заметно более высокий риск смерти (OR=3,248, 95%ДИ=1,873-5,631, $p=0,001$), чем у пациентов с очаговым келлоидоподобным коллагеном (гистофенотип стромы тип А (келлоидоподобный коллаген $\leq 0,3$)).

После проведения однофакторного анализа значимые факторы были дополнительно оценены с помощью многомерной регрессионной модели Кокса для определения их независимой прогностической ценности для общей выживаемости. После поправки на другие ковариаты N-стадия, лимфатическая инвазия, лимфоцитарная инфильтрация опухоли, внутриопухолевая перигландулярная реакция, перитуморальная лимфоцитарная инфильтрация, Кроноподобная лимфоидная реакция, индекс Klintrup–Mäkinen и процент инфильтрирующих опухоль лимфоцитов не являлись прогностическими факторами для неблагоприятного исхода в отличие от соотношения стромы и паренхимы опухоли (OR=1,878, 95% ДИ=1,124-3,140, p=0,016) и распределения келлоидоподобного коллагена в строме опухоли. Многофакторный регрессионный анализ прогностических факторов общей выживаемости с применением модели пропорциональных рисков Кокса показал, что диффузное распределение коллагена в строме инвазивного края опухоли (гистофенотип стромы Тип В (келлоидоподобный коллаген $\geq 0,3$) является независимым фактором значимо связанными с общей выживаемостью (OR=2,325, 95% ДИ=1,241-4,354, p=0,008) (таблица 19).

Таким образом, данные результаты продемонстрировали, что большое количество (более 30%) келлоидоподобного коллагена в строме колоректальной аденокарциномы независимо связано с плохим прогнозом для пациентов.

Основные результаты данного этапа исследования были следующими:

Установлено, что относительное количество более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли коррелирует с наличием таких агрессивных признаков как T-стадия (p=0,038), N-стадия (p=0,002), G (степень дифференцировки) (p=0,034), венозная (p=0,007) и лимфатическая инвазия (p=0,006).

Выявлено что содержание более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли обратно коррелирует с наличием таких гистопатологических признаков как высокая степень лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (p=0,001), высокая степень внутриопухолевой периграндулярной инфильтрации (p=0,009) и перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации (p=0,001) и высоким индексом Klintrup-Mäkinen (p=0,01). Оценка на основе окрашивания гематоксилина и эозина не позволяет различить разные типы лимфоцитов, тем не менее, мы обнаружили, что высокая плотность стромальных лимфоцитов обратно коррелирует с содержанием келлоидоподобного коллагена в строме. Полученные результаты согласуются с известными данными, показавшими, что в прогрессировании опухоли и выживаемости пациентов с колоректальным раком большую роль играют иммунные клетки [340-347]. Установленное в настоящем исследовании влияние относительного количества келлоидоподобного коллагена на пролиферацию иммунных клеток может представлять собой новый иммуносупрессивный механизм в микроокружении опухоли и дать объяснение корреляции между

плотностью келлоидоподобного коллагена в опухолях с промежуточной десмопластической реакцией и прогнозом для онкологических больных.

Результаты нашего исследования подтверждают независимый прогностический эффект TSR на общую выживаемость у пациентов с раком толстой кишки, так как пациенты с высоким уровнем стромы имеют меньшую выживаемость, чем пациенты с низким уровнем стромы.

Келлоидоподобный коллаген в строме колоректальной аденокарциномы является независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода. Опухоли сочаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме и промежуточной десмопластической реакцией отличаются по опухолевой прогрессии и рецидиву. Пациенты с очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (менее 30%) характеризовались более длительным безрецидивным периодом, чем пациенты с диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (более 30%) ($p < 0,01$). Также мы выявили, что при гистохимическом паттерне диффузного келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли чаще наблюдался продолженный рост опухоли. Мы полагаем, что разная скорость прогрессирования, рецидива и продолженного роста в культе в группах с очаговым и диффузным келлоидоподобным коллагеном позволяют предположить, что развитие раковых клеток может быть вызвано первичными стромальными изменениями, вызывающими развитие опухоли. Наше исследование показывает, что гистохимический диффузного келлоидоподобного коллагена в строме опухоли с промежуточной десмопластической реакцией, даже если он обнаруживается лишь в небольшой части общей массы опухоли, может быть связан с неблагоприятным прогнозом независимо от других прогностических параметров. Мы полагаем, что более обильный, плотный и жесткий внеклеточный матрикс, связанный с увеличенным содержанием келлоидоподобного коллагена, взаимодействуя с опухолевыми клетками и стромальными клетками, не только может индуцировать онкогенез, регулировать метаболизм опухоли, облегчает ангиогенез, индуцирует внеклеточный матрикс для инвазии, образует преметастатические и метастатические ниши для облегчения метастазирования.

Пациенты с очаговым келлоидоподобным коллагеном в строме имели более низкий риск смерти, чем пациенты с диффузным келлоидоподобным коллагеном в строме колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией. Влияние стромы колоректального рака на выживаемость, продемонстрированное в этом исследовании, согласуется с другими исследованиями по прогностическому влиянию стромы при колоректальном раке и других злокачественных новообразованиях [334, р. 284]. Связь между прогнозом и гистотипом опухоли можно объяснить патофизиологически. Мы полагаем, что строма опухоли на первых порах способна оказывать тормозящее воздействие на злокачественные клетки. При продолжающемся росте опухоли опухоль может эксплуатировать свою строму, например, изменяя ее состав (например, сосудистую сеть), чтобы

стимулировать рост опухоли и метастазирование. Процесс, называемый стромагенезом, который происходит параллельно с прогрессированием опухоли. Стромагенез характеризуется сложной двунаправленной связью между опухолью и ее стромой [337,р. 239]. Несмотря на эту сложность, можно заключить, что стромальная ткань не является пассивным компонентом, окружающим опухоль. Достаточное количество стромы в ряде случаев способствует более агрессивному фенотипу опухоли (тип В), что показано и в настоящем исследовании.

Наше исследование подтверждает результаты первого этапа о том, что келлоидоподобный коллаген в строме инвазивного края опухоли с промежуточной десмопластической реакцией является независимым фактором прогноза пациентов с колоректальным раком, расширяя и уточняя их. Увеличение относительного количества келлоидоподобного коллагена более чем на 30% от всего внеклеточного матрикса в инвазивном фронте опухоли, является независимым прогностическим фактором для пациентов с колоректальным раком II или III стадии TNM, пролеченных хирургическим путем, с худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости. Определение гистофенотипа стромального келлоидоподобного коллагена поможет стратифицировать группы риска пациентов и улучшить индивидуальные терапевтические стратегии при колоректальном раке. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что стромальная классификация, в частности по гистофенотипу стромального коллагена, может обеспечить надежные прогностические характеристики и улучшить классификацию TNM для колоректального рака.

3.3.4 Сравнительная характеристика гистопаттернов ретикулина (коллаген III) в группах с очаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена

Характеристика гистопаттернов ретикулина (коллаген III) в группах с очаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Взаимосвязь келлоидоподобного коллагена с гистофенотипами ретикулина в строме опухоли

Характеристики	Категории	Келлоидоподобный коллаген		p-value ^a
		Очаговый ≤0,3 n=78	Диффузный >0,3 n=97	
1	2	3	4	5
Количество ретикулина	минимальное	4 (5,1)	12(12,4)	0,031
	очаговое	55 (70,5)	74 (76,3)	
	диффузное	19 (24,4)	11 (11,3)	
Волокна ретикулина в строме	тонкие нитевидные волокна	71 (91,0)	84 (86,6)	0,767

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5
	толстые разволокнённые волокна	7 (9,0)	13 (13,4)	
Границы волокон	четкие	49 (62,8)	57 (58,8)	0,531
	размытые	29 (37,2)	41 (42,3)	
Распределение	упорядоченное	52 (66,7)	39 (40,2)	0,001
	хаотичное	26 (33,3)	58 (59,8)	
Волокна ретикулина, вблизи желез	преимущественно непрерывные, длинные	48 (61,5)	17 (17,5)	0,001
	преимущественно короткие, прерывистые	30 (38,5)	80 (82,5)	
Примечание - ^a - жирным шрифтом выделены статистически значимые различия $p < 0,05$				

Как видно из данных, представленных в таблице 20, в группе с очаговым келлоидоподобным коллагеном в строме инвазивного края опухоли ретикулин был представлен преимущественно фокально 55 (70,5%) случаев и диффузно 19 (24,4%) случаев. Волокна ретикулина в строме были преимущественно тонкими и нитевидными в 71 (91,0%) случаях.

Границы волокон ретикулина определялись отчетливо в 49 (62,8%) случаях. В строме волокна ретикулина распределялись преимущественно упорядоченно в 52 (66,7%) случаях, хаотично – в 26 (33,3%) случаях. Вблизи желез волокна ретикулина были преимущественно непрерывными, длинными в 48 (61,5%) опухолях, короткими и прерывистыми волокнами ретикулина в 30 (38,5%) опухолях.

В группе с диффузным келлоидоподобным коллагеном в строме инвазивного края опухоли ретикулин был представлен очагово в 74 (76,3%) случаев и диффузно 11 (11,3%) случаев.

Волокна ретикулина в строме были представлены преимущественно тонкими нитевидными волокнами в 84 (86,6%) случаях. Границы волокон ретикулина определялись отчетливо в 57 (58,8%) случаях.

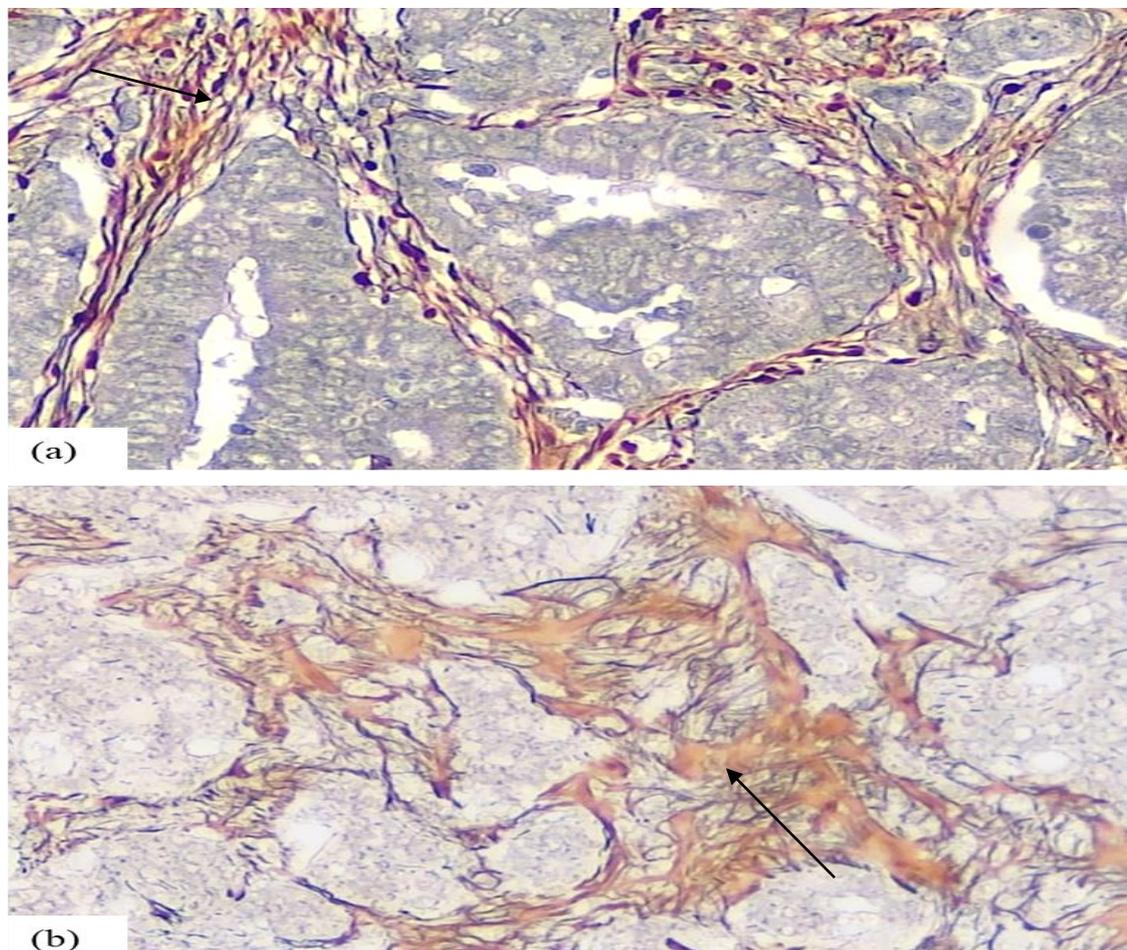
В строме волокна ретикулина распределялись равномерно в 39 (40,2%) случаях, хаотично – в 58 (59,8%) случаях. Вблизи желез волокна ретикулина были преимущественно непрерывными, длинными в 17 (17,5%) опухолях, короткими и прерывистыми волокнами ретикулина в 80 (82,5%) опухолях.

Таким образом, колоректальные аденокарциномы с очаговым типом келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края в сравнении с диффузным типом келлоидоподобного коллагена характеризовались относительно большим количеством тонких ретикулиновых волокон с более равномерным распределением волокон и большим количеством волокон ретикулина вблизи желез, окруженных непрерывной или фокально прерывистой линией.

Диффузный гистофенотип келлоидоподобного коллагена (>30% в стромы инвазивного края опухоли колоректальной аденокарциномы с промежуточной

десмопластической реакцией) представлен плохо организованным, фрагментированным ретикулином, расположенным хаотично, с фокально прерывистой линией или отсутствующим.

Микрофотографии репрезентативных гистологических срезов представлены рисунке 10.



(a) Группа очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли. Волокна ретикулина (коллагена III типа) в строме представлены в умеренном количестве, хорошо организованы, тонкие, нитевидные, также окружают железы фокально прерывистой линией. Серебрение по Гомори. $\times 200$

(b) Группа диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли. Волокна ретикулина (коллагена III типа) (черные стрелки) в умеренном количестве, плохо организованы, фрагментированы, вокруг желёз представлены фокально прерывистой линией или отсутствуют. Серебрение по Гомори. $\times 200$

Рисунок 10 – Микрофотографии репрезентативных гистологических срезов

Результаты исследования показали, что в группе пациентов с диффузным фенотипом келоидоподобного коллагена количество случаев с относительным количеством диффузного ретикулина меньше в сравнении с группой с относительно фокальным (<30%) паттерном коллагена ($p=0,031$). Ретикулин

базальной мембраны в инвазивном фронте карциномы, часто отсутствует в мембране инвазивного эпителия.

В строме опухоли ретикулин имеет преимущественно однотипный гистотип, коррелирующий с относительным количеством стромы и часто с формированием грануляционной ткани в очагах воспаления и некротического изменения. Полагаем, что это связано с тем, что келлоидоподобный коллаген является структурным компонентом формирования мономорфности, монолитности, стромы с низкой сенсibilизацией к повреждению, высокой иммунной толерантностью, что в целом повышает выживаемость и прогрессию раковой ткани. Относительно низкая сенсibilизация и высокая толерантность связана с ранней теорией злокачественных опухолей, которые рассматриваются как незаживающие раны [348].

В условиях стресса опухоли используют реакцию заживления ран, чтобы создать строму, необходимую для поддержания и роста, что приводит к образованию плотной волокнистой соединительной ткани, которая называется рубцовой тканью при ранах и десмоплазией при раке.

Келлоидоподобный коллаген представляет собой наихудшую форму аномального рубца, гораздо более плотный и жесткий, и функционально менее желательный, чем его аналог в нормальной ткани. Мы предполагаем, что дальнейшие методы диагностики ремоделирования стромы опухоли могут помочь в разработке новых терапевтических стратегий, направленных на контролируемое ремоделирование внеклеточной матрицы с целью улучшения эффективности терапии рака.

3.3.5 Сравнительный анализ CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 и CD163 положительных иммунных клеток в группах с очаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае колоректальной аденокарциномы

Результаты гистохимического исследования иммунных клеток в строме колоректального рака, стратифицированных по содержанию келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли, представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Плотность иммунных клеток

Иммунные клетки	Категории	Келлоидоподобный коллаген		P-value ^a
		Очаговый $\leq 0,3$ n=78	Диффузный $>0,3$ n=97	
1	2	3	4	5
CD3	низкий	29 (37,2)	58 (59,8)	0,003
	высокий	49 (62,8)	39 (40,2)	
CD4	низкий	37 (47,4)	50 (51,5)	0,199
	высокий	41 (52,6)	47 (48,5)	
CD8	низкий	19 (24,4)	68 (70,1)	0,0001
	высокий	59 (75,6)	29 (29,9)	

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5
CD20	низкий	38 (48,7)	49 (50,5)	0,814
	высокий	40 (51,3)	48 (49,5)	
CD56	низкий	8 (10,3)	9 (9,3)	0,733
	высокий	9 (11,5)	8 (8,2)	
	отсутствует	61 (78,2)	80 (82,5)	
CD163	низкий	61 (78,2)	26 (26,8)	0,0001
	высокий	17 (21,8)	71 (73,2)	

Примечание - ^a жирным шрифтом выделены статистически значимые различия $p < 0,05$

Как видно из данных, представленных в таблице 21, в подгруппе с очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с промежуточной десмопластической реакцией CD3 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы ($n=175$) в 44 (62,5%) опухолей, ниже – в 29 (37,2%) опухолей.

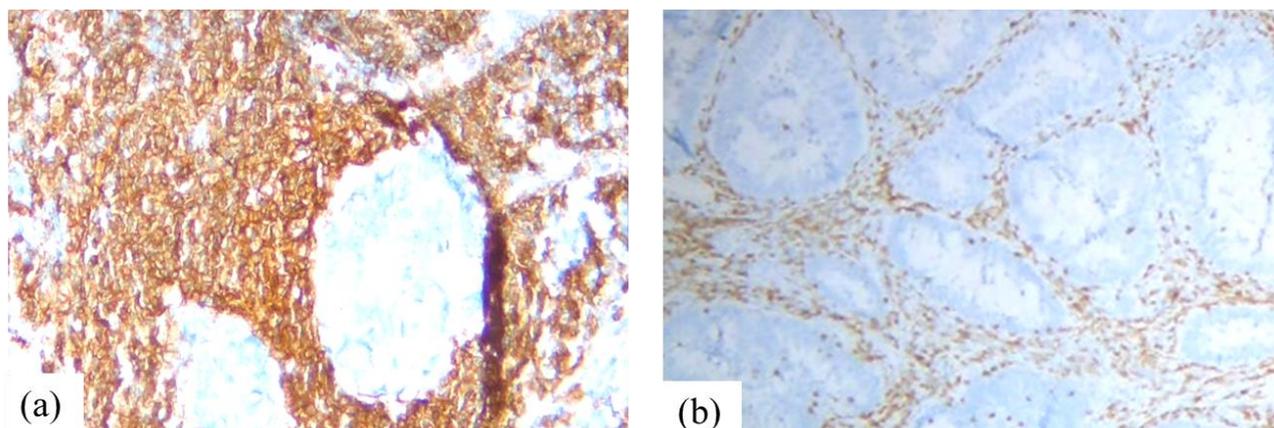


Рисунок 11 – Репрезентативные данные иммуногистохимии для инфильтрирующей опухоль иммунных клеток CD8 в группах с очаговым (a) и диффузным (b) распределением келлоидоподобного коллагена в строме ($\times 400$)

CD4 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 41 (52,6%) случаев, ниже – в 37 (47,4%) случаях. CD8 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 59 (75,6%) случаев, ниже – в 19 (24,4%) случаях. CD20 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 40 (51,3%) случаев, ниже – в 38 (24,4%) случаях. CD56 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 9 (11,5%) случаях, ниже – в 8 (10,3%) случаях. CD163 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 17 (21,8%) случаях, ниже – в 61 (78,2%) случаях.

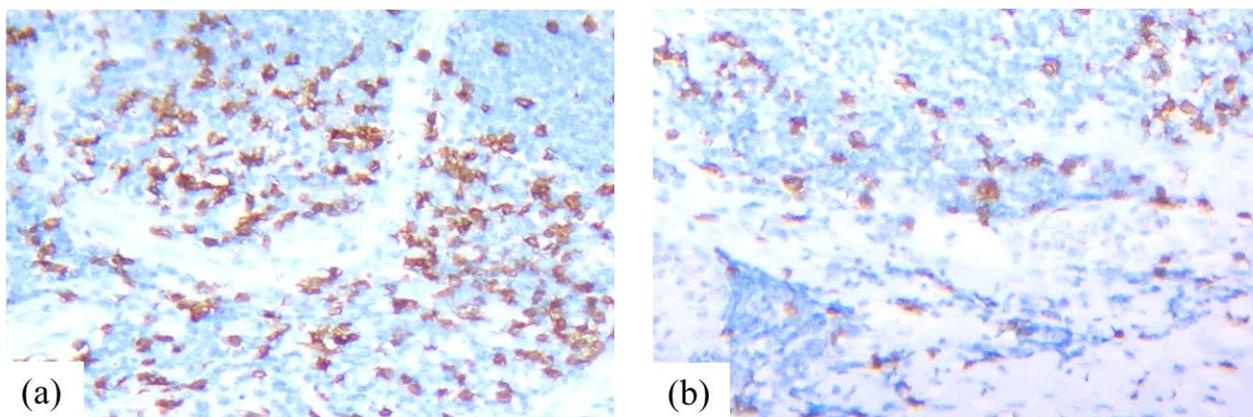


Рисунок 12 – Репрезентативные данные иммуногистохимии для инфильтрирующей опухоли иммунных клеток CD8 в группах с очаговым (a) и диффузным (b) распределением келлоидоподобного коллагена в строме ($\times 400$)

В подгруппе с диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в инвазивном крае опухоли с промежуточной десмопластической реакцией CD3 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы ($n=175$) в 39 (40,2%) опухолей, ниже – в 58 (59,8%) опухолей. CD4 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 47 (48,5%) случаях, ниже – в 50 (51,5%) случаях. CD8 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 29 (29,9%) случаях, ниже – в 68 (70,1%) случаях. CD20 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 48 (49,5%) случаях, ниже – в 49 (50,5%) случаях. CD56 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 8 (8,2%) случаях, ниже – в 9 (9,3%) случаях, не определялись в 80 (82,5%) случаях. CD163 положительные иммунные клетки были выше медианного значения группы в 71 (73,2%) случаях, ниже – в 26 (26,8%) случаях.

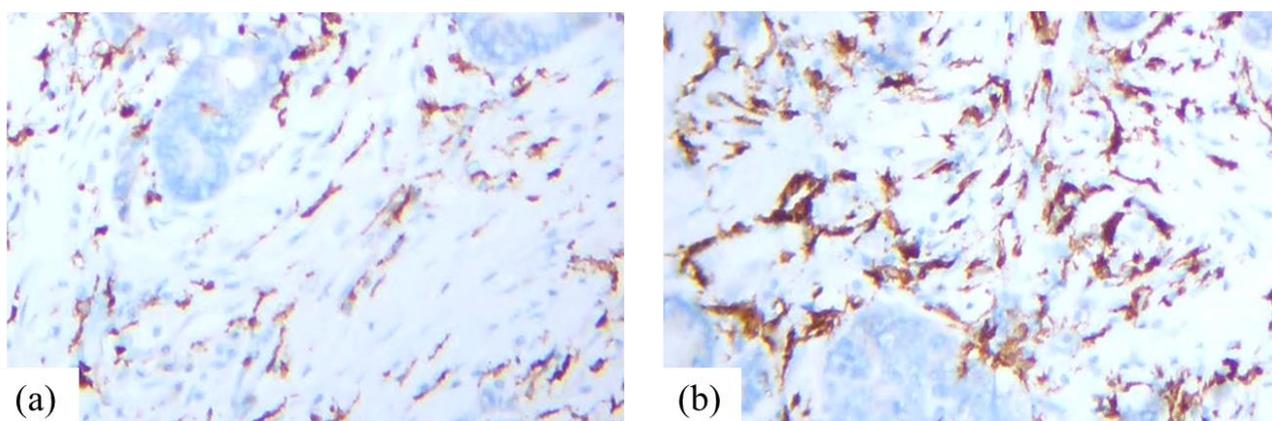


Рисунок 13 – Репрезентативные данные иммуногистохимии для инфильтрирующей опухоли иммунных клеток CD163 в группах с очаговым (a) и диффузным (b) распределением келлоидоподобного коллагена в строме ($\times 400$)

Таким образом, результаты показывают, что в опухолях с очаговым келлоидоподобным коллагеном иммунные клетки CD3 и CD8 имели статистически значимо более высокую экспрессию по сравнению с опухолями группы диффузногекеллоидоподобного коллагена ($p=0,003$ и $p<0,0001$ соответственно). В опухолях с диффузным келлоидоподобным коллагеном иммунные клетки CD163 имели статистически значимо более высокую экспрессию по сравнению с опухолями группы очагового келлоидоподобного коллагена ($p<0,0001$) (рисунки 11-13).

Установлено, что высокая экспрессия CD3 и CD8 связана с очаговым келлоидоподобным коллагеном, который по результатам данного исследования характеризуется более благоприятными характеристиками опухоли, такими как более длительный период общей и безрецидивной выживаемости. Полученные данные подтверждают известные данные, что положительный эффект рак-специфической иммунной реакции связан с лучшим исходом, тогда как более низкий иммунный ответ связан с худшим прогнозом [349-351]. Настоящее исследование не претендовало на изучение прогностических результатов, а скорее проверяло связь между специфическими иммунными клетками, обнаруженными во внутриопухолевой ткани и относительным количеством келлоидоподобного коллагена в строме опухоли. Установленное в настоящем исследовании влияние относительного количества келлоидоподобного коллагена на пролиферацию иммунных клеток может представлять собой новый иммуносупрессивный механизм в микроокружении опухоли и дать объяснение корреляции между плотностью келлоидоподобного коллагена в опухолях с промежуточной десмопластической реакцией и прогнозом для онкологических больных. Иммунный ответ на раковые антигены проявляется как накопление иммунных клеток, индуцированных хемокинами [352]. Однако микроокружение опухоли также может содержать многочисленные иммуносупрессивные факторы, и крайне важно понимать их взаимодействие с противоопухолевыми иммунными клетками. При промежуточной десмопластической реакции коллаген играет решающую роль в развитии десмопластической реакции и формируют иммунное микроокружение опухоли посредством экспрессии иммунорегуляторных молекул [353,354]. Фибробласты могут прямо или косвенно влиять на противоопухолевую иммунную реакцию посредством привлечения протуморогенных воспалительных клеток [355]. Результат исследования подтверждает важность келлоидоподобного коллагена как нового прогностического и предсказательного маркера.

Более низкая экспрессия CD163 ассоциировалась с гистофенотипом очагового распределения келлоидоподобного коллагена в строме колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией. Полученные результаты согласуются с научными данными, показавшими что высокие уровни экспрессии CD163 в сыворотке коррелировали с худшей выживаемостью [356], а экспрессия CD163 была выше в опухолевых тканях с высокой инфильтрацией макрофагов и ассоциировалась с худшим прогнозом [318,р. 425].

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Колоректальный рак — это заболевание, которое во всем мире имеет высокую заболеваемость и смертность [1,р. 209]. Согласно Глобальной онкологической обсерватории, число новых случаев КРР к 2040 году увеличится на 63% во всем мире и составит около 3.15 млн. человек. Для принятия решений о тактике лечения, клиницисты используют классификацию TNM, однако, примерно у 10-25% пациентов с ранней стадией КРР наблюдалось неблагоприятное течение заболевания [8,р. 703]. Это актуализирует поиск дополнительных критериев и факторов для стратификации групп пациентов. Для определения этих групп используются количественные биомаркеры, клинические данные, гистопатологический анализ опухолевой ткани и молекулярная патология опухолевых клеток [12,р. 431]. Последние открытия в области иммунологии опухолей показали, что микроокружение играет одну из главных ролей в развитии опухоли. Традиционно в гистологических исследованиях злокачественных опухолей ведущее место занимал эпителиальный компонент, но современные исследовательские парадигмы смещаются в сторону стромы [16,р. 1239]. Прогностическое значение стромы инвазивного края опухоли было продемонстрировано Ueno H. [18,р. 1359], выделившим зрелую, незрелую и промежуточную десмопластическую реакцию. Промежуточная десмопластическая реакция характеризуется большой гетерогенностью стромы, включающей как небольшое количество келлоидоподобного коллагена (КПК) в фиброзированной строме. Взаимодействие между клетками и окружающим внеклеточным матриксом (ВКМ) участвует в развитии и прогрессировании многих типов рака. Организация молекул ВКМ обеспечивает физические каркасы и динамическую сеть, в которую встроены клетки, что позволяет контролировать клеточное поведение: пролиферацию, миграцию, дифференцировку и выживание. Состав ВКМ имеют решающее значение для возникновения и прогрессирования опухоли. Недавние исследования показали, что опухоли могут напрямую использовать ремоделирование внеклеточного матрикса для создания микросреды, которая способствует онкогенезу и метастазированию [19,р. 581]. Предыдущие исследования показали, что структура коллагена связана с ответом на лечение при раке прямой кишки и раке молочной железы [23,р. 179]. Волокна коллагена I типа влияют на движение макромолекул во внеклеточном матриксе опухоли [26,р. 2409], а структурные характеристики этих волокон могут способствовать или препятствовать миграции раковых клеток [27,р. 81]. Изменения коллагена в микроокружении опухоли коррелируют с диссеминацией рака и прогнозом. Коллаген регулирует опухоль-ассоциированную иммунную инфильтрацию и необходим для опухолевого ангиогенеза [28,р. 931]. Повышенная плотность коллагена вокруг раковых клеток направляет местную инвазию и метастазирование [29,р. 155]. Более того, радиальное выравнивание коллагена на границе опухоль-stroma повышает инвазивность раковых клеток [31,р. 138]. Прогрессия опухоли

сопровождается аномальным ремоделированием коллагена ВКМ. Гистологически аномальное ремоделирование коллагена в основном приводит к чрезмерному отложению, изменению пропорций и расположению коллагена [32,р. 1221]. Данные морфологические изменения могут отражать важные характеристики опухоли, влияющие на прогноз пациентов.

Изучение региональных особенностей колоректального рака по данным Актюбинской области показало следующее, что возраст играет решающую роль в развитии онкологии, при этом население в возрасте от 24 до 65 лет демонстрируют меньший риск по сравнению с группой 65+. Это согласуется с исследованиями, которые показано, что возраст является основным и наиболее важным фактором, определяющим развитие онкологичекких заболеваний. Заболеваемость колоректальным раком возрастает после 50 лет, независимо от мутаций KRAS, наблюдаемых в этих злокачественных опухолях.

При проведении одномерного и многомерного регрессионного анализа, было установлено, что такие факторы, как возраст, пол, характеристика опухоли не оказывают существенного влияния на выбор тактики лечения КРР, за исключением наличия метастазов. Наше исследование показало важность участия лимфатических узлов и метастазов в прогнозировании прогрессировании рака. Необходимо понимания механизмы, с помощью которых опухолевые клетки распространяются на лимфатические узлы, влияние метастазов на прогноз и исходы лечение пациентов с КРР. Наш данные подчеркивают статистическую важность поражения лимфатических узлов и наличия метастазов в прогнозе исходов рака: общую и безрецидивную выживаемость.

Таким образом, полученные результаты исследования КРРР совпадают с результатами предыдущих исследований, свидетельствующими о более высоких показателях смертности среди мужчин по сравнению с женщинами, подчеркивают важность оценки морфологии опухоли и инфильтрации для точной оценки риска смертности пациентов.

Далле в нашем исследовании мы изучили диагностическую и прогностическую значимость структурных гистохимических особенностей келоидоподобного коллагена в строме при колоректальном раке. Проанализировали влияние клинических и гистопатологических прогностических факторов на метастазирование и выживаемость пациентов с колоректальным раком. Гистопатологическая картина рака толстой кишки между левым и правым отделами толстой кишки не выявила существенных различий, поэтому в данном исследовании основными результатами сравнительной клинико-морфологической оценки являются представлены в виде общих данных по всем отделам толстой кишки с относительно равномерным числом случаев. Во-первых, наши результаты показали, что повышенное содержание келоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли коррелирует с наличием агрессивных признаков, таких как дифференцировка опухоли (G3) ($p=0,02$), рост опухоли (BD3) ($p=0,036$), лимфатическая инвазия ($p=0,02$) и венозная инвазия ($p=0,023$). Во-вторых, мы

обнаружили, что классификация келоидоподобного коллагена по инвазивным границам колоректального рака стратифицирует риск рецидива у этой группы пациентов. Анализ многомерных моделей показал, что увеличение келоидоподобного коллагена в строме является независимым фактором послеоперационного рецидива у пациентов со II-III стадиями рака толстой кишки. В частности, отдаленные метастазы и послеоперационные рецидивы в течение 5 лет после операции в группе с содержанием келоидоподобного коллагена более 30% были выявлены у 39,5% пациентов, а в группе с содержанием келоидоподобного коллагена менее 30% - у 15,5% пациентов. Эти результаты соответствуют научным исследования [332,р. 192] указывают на тесную взаимосвязь между келоидоподобным коллагеном и метастатическим поведением раковых клеток. Механизм, приводящий к ухудшению прогноза у пациентов с повышенным содержанием келоидоподобного коллагена в строме, до конца не изучен. По мере прогрессирования колоректального рака увеличение количества толстых коллагеновых волокон первоначально может быть связано с первичной фибропролиферативной реакцией, а на более поздних стадиях – с аномальной выработкой коллагена и дефектным созреванием, что может способствовать росту опухоли [335,р. 492]. Мы считаем, что строма опухоли изначально способна оказывать ингибирующее действие на злокачественные клетки.

При продолжающемся росте опухоль может использовать свою строму, например, путем изменения ее состава, что морфологически проявляется изменениями количественных и качественных характеристик коллагена, для стимуляции роста опухоли и метастазирования. Этот процесс протекает параллельно с прогрессированием опухоли и характеризуется сложной двунаправленной связью между опухолью и ее стромой [337,р. 239]. Различные скорости прогрессирования, рецидива и продолжения роста позволяют предположить, что в некоторых случаях прогрессирование опухоли в группе с увеличенным количеством келоидоподобной коллагеновой стромы может быть вызвано первичными изменениями стромы, вызывающими развитие опухоли *de novo*. Однако это предположение является умозрительным и требует дальнейших исследований.

В-третьих, анализ Каплана-Мейера показал, что пациенты с более чем 30% келоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли имели значительно худшую выживаемость, чем пациенты с менее чем 30% келоидоподобного коллагена ($p < 0,01$). Наши результаты показывают, что прогностическая сила келоидоподобных классификация коллагена по инвазивному признаку при колоректальном раке может не зависеть от анатомической степени заболевания по TNM. Эти результаты позволяют предположить, что стромальная классификация может обеспечить надежные прогностические характеристики и улучшить классификацию по TNM при колоректальном раке. Кроме того, интеграция гистофенотипа в многомерный анализ продемонстрировала улучшенные прогностические возможности, указывая на то, что этот гистофенотип может быть потенциальным

дополнением к системе прогнозирования исходов, одновременно способствуя улучшению стратификации риска для неблагоприятных исходов. Наши результаты объясняются растущими знаниями о том, что строма опухоли играет активную роль в прогрессировании рака, поскольку она взаимодействует с опухолевыми и доброкачественными клетками на разных стадиях, от инициации опухоли до инвазии и метастазирования [339,р. 1350]. Мы рекомендуем регистрировать наличие келоидоподобной коллагеновой стромы как высокую степень злокачественности, если она составляет более трети всего внеклеточного матрикса инвазивного края опухоли. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выявить дополнительные

Особенности коллагенового матрикса, которые позволили бы более точно прогнозировать результаты лечения пациентов.

Сильными сторонами этого исследования являются однородность исследуемой популяции и единый географический регион, где диагностика и лечение проводились в одной и той же больнице без предвзятого отношения к выборке. Другими преимуществами были всесторонняя гистологическая оценка, проведенная специализированными патологоанатомами, и доступность подробной клинико-патологической информации. К недостаткам можно отнести относительно небольшой размер выборки по сравнению с другими исследованиями в этой области и отсутствие подробных данных о лечении рака. Однако мы скорректировали многомерные модели с учетом клинических и демографических особенностей характеристики. Кроме того, поскольку данные о гистологической структуре стромального коллагена, как правило, были недоступны лечащим врачам, решения о лечении принимались не на основе специфических структурных особенностей коллагенов в десмопластической реакции. В это исследование также были включены пациенты 5-10-летней давности, и изменения в лечении колоректального рака за этот период могли повлиять на прогноз. По этим причинам необходимы обширные многоцентровые исследования для изучения тенденций дальнейшей. Ручная оценка относительного количества келоидоподобного коллагена может привести к относительно высокой вариабельности результатов, поэтому в будущем цифровая оценка белков внеклеточного матрикса при колоректальном раке значительно повысит точность и уменьшит вариабельность результатов.

Таким образом, данные результаты продемонстрировали, что большое количество (более 30%) келлоидоподобного коллагена в строме колоректальной аденокарциномы независимо связано с плохим прогнозом для пациентов. Содержание более 30% келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли обратно коррелирует с наличием таких гистопатологических признаков как высокая степень лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль ($p=0,001$), высокая степень внутриопухолевой перигранулярной инфильтрации ($p=0,009$) и перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации ($p=0,001$) и высоким индексом Klintrup-Mäkinen ($p=0,01$). Результаты согласуются с известными данными, показавшими, что в прогрессировании опухоли и выживаемости пациентов с колоректальным

раком большую роль играют иммунные клетки [340,р. 1423]. Установленное влияние относительного количества келлоидоподобного коллагена на пролиферацию иммунных клеток может представлять новый иммуносупрессивный механизм в микроокружении опухоли, объяснить корреляции между плотностью келлоидоподобного коллагена в опухолях с промежуточной десмопластической реакцией и исходами заболевания.

Результаты нашего исследования подтверждают независимый прогностический эффект TSR на общую выживаемость у пациентов с раком толстой кишки, так как пациенты с высоким уровнем стромы имеют меньшую выживаемость, чем пациенты с низким уровнем стромы.

Келлоидоподобный коллаген в строме колоректальной аденокарциномы является независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода. Опухоли сочаговым и диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме и промежуточной десмопластической реакцией отличаются по опухолевой прогрессии и рецидиву. Пациенты с очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (менее 30%) характеризовались более длительным безрецидивным периодом, чем пациенты с диффузным содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (более 30%) ($p < 0,01$).

Установлено, что при диффузном содержании келлоидоподобного коллагена в строме инвазивного края опухоли чаще наблюдался продолженный рост опухоли. Разная скорость прогрессирования, рецидива и продолженного роста в культе в группах с очаговым и диффузным келлоидоподобным коллагеном позволяют предположить, что развитие раковых клеток может быть вызвано первичными стромальными изменениями, вызывающими развитие опухоли. Диффузный тип КПК в строме опухоли с промежуточной десмопластической реакцией, связан с неблагоприятным прогнозом независимо от других прогностических параметров. Мы полагаем, что более обильный, плотный и жесткий внеклеточный матрикс, связанный с увеличенным содержанием келлоидоподобного коллагена, взаимодействуя с опухолевыми клетками и стромальными клетками, может индуцировать онкогенез, регулировать метаболизм опухоли, облегчает ангиогенез, индуцирует внеклеточный матрикс для инвазии, образует преметастатические и метастатические ниши для облегчения метастазирования.

Пациенты с очаговым келлоидоподобным коллагеном в строме имели более низкий риск смерти, по сравнению с диффузным типом. Влияние стромы колоректального рака на выживаемость, согласуется с другими исследованиями по прогностическому влиянию стромы при КРР и других злокачественных новообразованиях [334,р. 284]. Мы полагаем, что строма опухоли на первых порах способна оказывать тормозящее воздействие на злокачественные клетки, но при продолжающемся росте опухоли, последняя может эксплуатировать строму: изменяя ее сосудистую сеть, чтобы стимулировать рост опухоли и метастазирование. Процесс, называемый стромагенезом, который происходит параллельно с прогрессированием

опухоли. Стромагенез характеризуется сложной двунаправленной связью между опухолью и ее стромой [337,р. 239]. Стромальная ткань не является пассивным компонентом, окружающим опухоль, и в ряде случаев способствует более агрессивному фенотипу опухоли (тип В), что показано и в настоящем исследовании.

В настоящее исследование, результаты показали, что в опухолях с очаговым келлоидоподобным коллагеном иммунные клетки CD3 и CD8 имели статистически значимо более высокую экспрессию по сравнению с опухолями группы диффузногеллоидоподобного коллагена ($p=0,003$ и $p<0,0001$). В опухолях с диффузным келлоидоподобным коллагеном иммунные клетки CD163 имели статистически значимо более высокую экспрессию по сравнению с опухолями группы очагового келлоидоподобного коллагена ($p<0,0001$).

Нами установлено, что высокая экспрессия CD3 и CD8 связана с очаговым келлоидоподобным коллагеном, который характеризуется более благоприятными исходами заболевания. Полученные данные подтверждают, что положительный эффект рак - специфической иммунной реакции связан с лучшим исходом [351,р. 327]. Данным изучением количества иммунных клеток, мы проверяли связь между специфическими иммунными клетками, находящимися в опухолевой ткани и относительным количеством келлоидоподобного коллагена в строме опухоли. Полученные данные взаимосвязей количества келлоидоподобного коллагена с пролиферацией иммунных клеток могут представлять собой новый иммуносупрессивный механизм в микроокружении опухоли и объяснить связь между плотностью КПК в опухолях с промежуточной десмопластической реакцией и прогнозом заболевания. Иммунный ответ на раковые антигены проявляется как накопление иммунных клеток, индуцированных хемокинами [352,р. 228]. Более низкая экспрессия CD163 ассоциировалась с гистофенотипом очагового распределения КПК в строме колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией. Наши результаты согласуются с научными данными, показавшими, что высокие уровни экспрессии CD163 в сыворотке коррелировали с худшей выживаемостью [356], а экспрессия CD163 была выше в опухолевых тканях с высокой инфильтрацией макрофагов и ассоциировалась с худшим прогнозом [318,р. 425]. Микроокружение опухоли может содержать многочисленные иммуносупрессивные факторы, и важно понимать их взаимодействие с противоопухолевыми иммунными клетками. При промежуточной десмопластической реакции коллаген играет решающую роль в развитии десмопластической реакции и формируют иммунное микроокружение опухоли посредством экспрессии иммунорегуляторных молекул [354,р. 964]. Фибробласты могут влиять на противоопухолевую иммунную реакцию посредством привлечения протуморогенных воспалительных клеток [355,р. 18-24]. Результат исследования подтверждает важность келлоидоподобного коллагена как нового прогностического и предсказательного маркера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что обширные ретроспективные когортные исследования, дают важную информацию по нескольким аспектам колоректального рака, включая демографические и клиничко-патологические особенности, модели лечения и прогностические переменные. Результаты подчеркивают сложный характер КРР, необходимость индивидуальной терапии и тактики в клинической практике. Исследование клиничко-патологических особенностей, включая морфологию опухоли, стадию, инфильтрацию лимфатических узлов и метастазы, даёт жизненно важные данные для прогнозирования развития рака. Установленная взаимосвязь между этими характеристиками и смертью подчеркивает необходимость тонкого подхода к выбору лечения.

В исследовании было выявлено, что количество КПК в строме инвазивного края колоректальной аденокарциномы с промежуточной десмопластической реакцией характеризуется гетерогенностью количественной распространенности. В зависимости от относительного количества келлоидоподобного коллагена в строме на основе максимальной дискриминационной способности для общей и безрецидивной выживаемости пациенты были разделены на две группы. Этот подход привел к установлению точки отсечения для относительного содержания келлоидоподобного коллагена на уровне 30%.

Увеличение относительного количества келлоидоподобного коллагена более чем на 30% от всего внеклеточного матрикса в инвазивном фронте опухоли, является независимым прогностическим фактором для пациентов с колоректальным раком II или III стадии TNM, пролеченных хирургическим путем, с худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости. Определение гистотипа стромального келлоидоподобного коллагена поможет стратифицировать группы риска пациентов и улучшить индивидуальные терапевтические стратегии при колоректальном раке.

Установлено, что высокая экспрессия CD3⁺ и CD8⁺ связана с очаговым келлоидоподобным коллагеном, который по результатам данного исследования характеризуется более благоприятными характеристиками опухоли, такими как более длительный период общей и безрецидивной выживаемости. Полученные данные подтверждают известные данные, что положительный эффект рак - специфической иммунной реакции связан с лучшим исходом, тогда как более низкий иммунный ответ связан с худшим прогнозом. Результат исследования подтверждает важность келлоидоподобного коллагена как нового прогностического и предсказательного маркера.

Выводы

1. В Актюбинской области на основе данных 650 пациентов, среди которых 59,7% – мужчины и 40,3% – женщины. Возраст (>65 лет, $p=0,04$), стадия опухоли (IV стадия, $p=0,046$), глубина инфильтрации ($p=0,001$) и метастатический статус (83,4% пациентов имели метастазы, $p=0,02$) оказывают

значительное влияние на прогрессию заболевания и смертность. Основными методами лечения были хирургическая резекция в сочетании с химиотерапией (49,1%) или лучевой терапией (50,9%), при этом отсутствие метастазов повышало вероятность успешного лечения (ОШ=1,764, $p=0,002$). Полученные результаты подчеркивают необходимость индивидуализированного подхода к диагностике и терапии КРР, учитывающего ключевые прогностические факторы.

2. Установлен прогностически значимый пороговый уровень относительного содержания КПК в строме инвазивного края с промежуточной десмопластической реакцией на основе максимальной дискриминационной способности для общей выживаемости и безрецидивной выживаемости - 30%. Содержание КПК более 30% связано с худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами с опухолями с содержанием менее 30% КПК.

3. Диффузный гистофенотип КПК (>30%) является независимым фактором риска послеоперационного рецидива (ОР=2,019 95%ДИ=1,201-3,395, $p=0,008$); риска смерти (ОР=2,325, 95%ДИ=1,241-4,354, $p=0,008$). Он коррелирует со T-стадией ($p=0,038$), N-стадией ($p=0,002$), G ($p=0,034$), венозной ($p=0,007$) и лимфатической инвазией ($p=0,006$); обратно коррелирует с высокой степенью лимфоцитарной ($p=0,001$), внутриопухолевой перигранулярной ($p=0,009$) и перитуморальной лимфоцитарной инфильтрацией ($p=0,001$), высоким индексом Klintrup-Mäkinen ($p=0,01$). Пациенты с очаговым содержанием келлоидоподобного коллагена в строме опухоли (<30%) характеризовались более длительным безрецидивным периодом, чем пациенты с диффузным содержанием (более 30%) ($p < 0,01$).

4. При очаговом типе КПК (<30%) процент высокого количества CD3⁺ и CD8⁺ клеток встречаются чаще по сравнению с диффузным ($p=0,003$ и $p < 0,0001$), что характеризуется более длительными сроками общей и безрецидивной выживаемости. В опухолях с диффузным типом КПК (>30%) чаще встречается количество случаев с высоким содержанием CD163⁺ клеток по сравнению с очаговым ($p < 0,0001$), это согласуется с данными о связи высокой экспрессии CD163 с большей инфильтрацией макрофагами и ассоциируется с худшим прогнозом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение гистофенотипа стромального келоидоподобного коллагена поможет стратифицировать группы риска пациентов и улучшить индивидуальные терапевтические стратегии при колоректальном раке. Рекомендуем регистрировать наличие келоидной коллагеновой стромы как высокую степень злокачественности, если она составляет более трети всей стромы инвазивного края опухоли с промежуточной десмопластической реакцией.

2. Интеграция гистофенотипа в многомерный анализ улучшила прогностические возможности, гистофенотип келлоидоподобного коллагена в соответствии с установленным пороговым значением может быть потенциальным дополнением к системе прогнозирования исходов, одновременно способствуя улучшению стратификации риска неблагоприятных исходов. Будущие исследования необходимы для обнаружения дополнительных особенностей коллагеновой матрицы, которые могли бы более точно прогнозировать результаты лечения пациентов.

3. Эффективность лечения пациентов с КРР напрямую зависит от гистопаттерна, стадии, возраста, инфильтрации, метастазирования. Для персонифицированного подхода врачам патоморфологам и онкологам проводить обучение и тренинги, направленные на изучение микроокружения аденокарциномы, предоставление им необходимой информации, оценку степени понимания полученной информации, а также выявление индивидуальных потребностей. Это позволит реализовать стратегию пациент-ориентированной помощи и улучшить результаты лечения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – Vol. 71, №3. – P. 209-249.
- 2 Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview // *Int J Cancer.* – 2021. - Vol. 5. – P. 18-24.
- 3 Постановление Правительства Республики Казахстан «Об утверждении Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года» от 24 ноября 2022 года, №945 <https://medruk.mcfr.kz/?from=id2cabinet#/document/93/19240/bssPhr10> 17.06.2023.
- 4 Постановление Правительства Республики Казахстан «Об утверждении Комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на 2023- 2027 годы» от 5 октября 2023 года, №874 <https://medruk.mcfr.kz/?from=id2cabinet#/document/93/21971/bssPhr10> 17.06.2023.
- 5 Постановление Правительства Республики Казахстан «Об утверждении национального проекта «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация»» от 12 октября 2021 года, №725.
- 6 Приказ Министерства здравоохранения РК от 31.03.2021, №181 О создании рабочей группы по разработке национального проекта "Здоровая нация" <https://medruk.mcfr.kz/?from=id2cabinet#/document/93/15033/bssPhr1> 16.05.2023.
- 7 Li J., Yi C.H., Hu Y.T. et al. TNM Staging of Colorectal Cancer Should be Reconsidered According to Weighting of the T Stage: Verification Based on a 25-Year Follow-Up // *Medicine.* – Baltimore, 2016. - Vol. 95, №6. – P. 2711.
- 8 Dema A.L.C., Tăban S., Jurescu A. et al. Paving the way to tumor budding assessment using digital pathology: a pilot study in Timișoara City // *Rom J Morphol Embryol.* – 2018. - Vol. 59, №3. – P. 703-713.
- 9 Hari D.M., Leung A.M., Lee J.H. et al. AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: do the complex modifications improve prognostic assessment? // *J Am Coll Surg.* – 2013. - Vol. 217, №2. – P. 181-190.
- 10 Kurland B.F., Gerstner E.R., Mountz J.M. et al. Promise and pitfalls of quantitative imaging in oncology clinical trials // *Magn Reson Imaging.* – 2012. - Vol. 30, №9. – P. 1301-1312.
- 11 Prezja F., Äyrämö S., Pölönen I. et al. Improved accuracy in colorectal cancer tissue decomposition through refinement of established deep learning solutions // *Sci Rep.* – 2023. - Vol. 13, №1. – P. 15879.
- 12 Spratlin J.L., Serkova N.J., Eckhardt S.G. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review // *Clin Cancer Res.* – 2009. - Vol. 15, №2. – P. 431-440.
- 13 O'Connor J.P., Jackson A., Asselin M.C., Buckley D.L., Parker G.J., Jayson G.C. Quantitative imaging biomarkers in the clinical development of targeted

therapeutics: current and future perspectives // *Lancet Oncol.* – 2008. - Vol. 9, №8. – P. 766-776.

14 Waldman A.D., Jackson A., Price S.J. et al. Quantitative imaging biomarkers in neuro-oncology // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2009. - Vol. 6, №8. – P. 445-454.

15 Son G.M., Kwon M.S., Shin D.H., Shin N., Ryu D., Kang C.D. Comparisons of cancer-associated fibroblasts in the intratumoral stroma and invasive front in colorectal cancer // *Medicine.* – 2019. - Vol. 98, №18. – P. 15164.

16 Nearchou I.P., Kajiwarra Y., Mochizuki S., Harrison D.J., Caie P.D., Ueno H. Novel Internationally Verified Method Reports Desmoplastic Reaction as the Most Significant Prognostic Feature For Disease-specific Survival in Stage II Colorectal Cancer // *Am J Surg Pathol.* – 2019. - Vol. 43, №9. – P. 1239-1248.

17 Ueno H., Kajiwarra Y., Ajioka Y. et al. Histopathological atlas of desmoplastic reaction characterization in colorectal cancer // *Jpn J Clin Oncol.* – 2021. - Vol. 51, №6. – P. 1004-1012.

18 Sidney D. Kobernick. *Human Tumors: Histology, Diagnosis, and Technique.* - 2d Ed. Rev. and Enl. - Wayne State University Press, 1970. – 1359 p.

19 Ueno H., Jones A.M., Wilkinson K.H., Jass J.R., Talbot I.C. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer // *Gut.* – 2004. - Vol. 53, №4. – P. 581-586.

20 Winkler J., Abisoye-Ogunniyan A., Metcalf K.J., Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis // *Nat Commun.* – 2020. - Vol. 11, №1. – P. 5120.

21 Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2016. - Vol. 97. – P. 4-27.

22 Penet M.F., Kakkad S., Pathak A.P. et al. Structure and Function of a Prostate Cancer Dissemination-Permissive Extracellular Matrix // *Clin Cancer Res.* – 2017. - Vol. 23, №9. – P. 2245-2254.

23 Chen D., Liu Z., Liu W. et al. Predicting postoperative peritoneal metastasis in gastric cancer with serosal invasion using a collagen nomogram // *Nat Commun.* – 2021. - Vol. 12, №1. – P. 179.

24 Desa D.E., Bhanote M., Hill R.L. et al. Second-harmonic generation directionality is associated with neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer core needle biopsies // *J Biomed Opt.* – 2019. - Vol. 24, №8. – P. 1-9.

25 Jiang W., Li M., Tan J. et al. A Nomogram Based on a Collagen Feature Support Vector Machine for Predicting the Treatment Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer Patients // *Ann Surg Oncol.* – 2021. - Vol. 28, №11. – P. 6408-6421.

26 Jiang W., Wang S., Wan J. et al. Association of the collagen signature with pathological complete response in rectal cancer patients // *Cancer Sci.* – 2022. - Vol. 113, №7. – P. 2409-2424.

27 Kakkad S.M., Penet M.F., Akhbardeh A. et al. Hypoxic tumor environments exhibit disrupted collagen I fibers and low macromolecular transport // *PLoS One.* – 2013. - Vol. 8, №12. – P. 81-869.

- 28 Wolf K., Alexander S., Schacht V. et al. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo // *Semin Cell Dev Biol.* – 2009. - Vol. 20, №8. – P. 931-941.
- 29 Egeblad M., Ewald A.J., Askautrud H.A. et al. Visualizing stromal cell dynamics in different tumor microenvironments by spinning disk confocal microscopy // *Dis Model Mech.* – 2008. - Vol. 1, №2-3. – P. 155-165.
- 30 Han W., Chen S., Yuan W. et al. Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2016. - Vol. 113, №40. – P. 11208-11213.
- 31 Conklin M.W., Gangnon R.E., Sprague B.L. et al. Collagen Alignment as a Predictor of Recurrence after Ductal Carcinoma In Situ // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2018. - Vol. 27, №2. – P. 138-145.
- 32 Conklin M.W., Eickhoff J.C., Riching K.M. et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma // *Am J Pathol.* – 2011. - Vol. 178, №3. – P. 1221-1232.
- 33 Najafi M., Farhood B., Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers // *J Cell Biochem.* – 2019. - Vol. 120, №3. – P. 2782-2790.
- 34 Brauchle E., Kasper J., Daum R. et al. Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas // *Matrix Biol.* – 2018. - Vol. 68-69. – P. 180-193.
- 35 Paul C.D., Hruska A., Staunton J.R. et al. Probing cellular response to topography in three dimensions // *Biomaterials.* – 2019. - Vol. 197. – P. 101-118.
- 36 Karamanos N.K., Theocharis A.D., Piperigkou Z., Manou D., Passi A., Skandalis S.S. et al. A Guide to the Composition and Functions of the Extracellular Matrix // *FEBS J.* – 2021. - Vol. 288. – P. 6850–6912.
- 37 Jayadev R., Sherwood D.R. Basement Membranes // *Curr. Biol.* – 2017. - Vol. 27. – P. 207–211.
- 38 Yurchenco P.D. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. Cold Spring Harb // *Perspect. Biol.* – 2011. - Vol. 3. - P. 4911.
- 39 Kai F., Drain A.P., Weaver V.M. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey // *Dev Cell.* – 2019. - Vol. 49, №3. – P. 332-346.
- 40 Mammoto T., Ingber D.E. Mechanical control of tissue and organ development // *Development.* – 2010. - Vol. 137, №9. – P. 1407-1420.
- 41 Garde A., Sherwood D.R. Fueling Cell Invasion through Extracellular Matrix // *Trends Cell Biol.* – 2021. - Vol. 31, №6. – P. 445-456.
- 42 Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. - Vol. 144, №5. -P. 646-674.
- 43 Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer // *EMBO Rep.* – 2014. - Vol. 15, №12. – P. 1243-1253.
- 44 Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // *Cancer Discov.* – 2022. - Vol. 12. – P. 31–46.
- 45 Petersen E.V., Chudakova D.A., Skorova E.Y., Anikin V., Reshetov I.V., Mynbaev O.A. The Extracellular Matrix-Derived Biomarkers for Diagnosis,

Prognosis, and Personalized Therapy of Malignant Tumors // *Front Oncol.* – 2020. - Vol. 10. – P. 575569.

46 Eble J.A., Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis // *Clin Exp Metastasis.* – 2019. - Vol. 36, №3. – P. 171-198.

47 Martins Cavaco A.C., Dâmaso S., Casimiro S., Costa L. Collagen biology making inroads into prognosis and treatment of cancer progression and metastasis // *Cancer Metastasis Rev.* – 2020. - Vol. 39, №3. – P. 603-623.

48 Poltavets V., Kochetkova M., Pitson S.M., Samuel M.S. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity // *Front Oncol.* – 2018. - Vol. 8. – P. 431.

49 Yuzhalin A.E., Lim S.Y., Kutikhin A.G., Gordon-Weeks A.N. Dynamic matrix: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2018. - Vol. 1870, №2. – P. 207-228.

50 Xu S., Xu H., Wang W. et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside // *J Transl Med.* – 2019. - Vol. 17, №1. – P. 309.

51 Ahmad R.S., Eubank T.D., Lukomski S., Boone B.A. Immune Cell Modulation of the Extracellular Matrix Contributes to the Pathogenesis of Pancreatic Cancer // *Biomolecules.* – 2021. - Vol. 11, №6. – P. 901.

52 Lopez J.I., Kang I., You W.K., McDonald D.M., Weaver V.M. In situ force mapping of mammary gland transformation // *Integr Biol.* – 2011. - Vol. 3, №9. – P. 910-921.

53 Pearce O.M.T., Delaine-Smith R.M., Maniati E. et al. Deconstruction of a Metastatic Tumor Microenvironment Reveals a Common Matrix Response in Human Cancers // *Cancer Discov.* – 2018. - Vol. 8, №3. – P. 304-319.

54 Shen Y., Wang X., Lu J. et al. Reduction of Liver Metastasis Stiffness Improves Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer // *Cancer Cell.* – 2020. - Vol. 37, №6. – P. 800-817.

55 Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance // *J Cell Sci.* – 2010. - Vol. 123, №24. – P. 4195-4200.

56 Cox T.R. The matrix in cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2021. - Vol. 21, №4. – P. 217-238.

57 Van Huizen N.A., Burgers P.C., Saintmont F. et al. Identification of 4-Hydroxyproline at the Xaa Position in Collagen by Mass Spectrometry // *J Proteome Res.* – 2019. - Vol. 18, №5. – P. 2045-2051.

58 Magnon C., Galaup A., Mullan B. et al. Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with α 5 β 1 and α 5 β 3 integrins [published correction appears in *Cancer Res* // *Cancer Res.* – 2005. - Vol. 65, №10. – P. 4353-4361.

59 Kanematsu A., Marui A., Yamamoto S. et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor // *J Control Release.* – 2004. - Vol. 99, №2. – P. 281-292.

60 Gu L., Shan T., Ma Y.X., Tay F.R., Niu L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen // *Trends Biotechnol.* – 2019. - Vol. 37, №5. – P. 464-491.

- 61 Ishikawa Y., Rubin K., Bächinger H.P., Kalamajski S. The endoplasmic reticulum-resident collagen chaperone Hsp47 interacts with and promotes the secretion of decorin, fibromodulin, and lumican // *J Biol Chem.* – 2018. - Vol. 293, №35. – P. 13707-13716.
- 62 Shi R., Hu W., Zhang Y. et al. Ascorbate inducible N259 glycans on prolyl 4-hydroxylase subunit $\alpha 1$ promote hydroxylation and secretion of type I collagen // *Cell Mol Life Sci.* – 2019. - Vol. 76, №17. – P. 3449-3464.
- 63 Elia I., Rossi M., Stegen S. et al. Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche // *Nature.* – 2019. - Vol. 568, №7750. – P. 117-121.
- 64 Scietti L., Chiapparino A., De Giorgi F. et al. Molecular architecture of the multifunctional collagen lysyl hydroxylase and glycosyltransferase LH3 // *Nat Commun.* – 2018. - Vol. 20, №9(1). – P. 3912.
- 65 Bekhouche M., Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology // *Matrix Biol.* – 2015. - Vol. 44, №46. – P. 46-53.
- 66 Tjin G., White E.S., Faiz A. et al. Lysyl oxidases regulate fibrillar collagen remodelling in idiopathic pulmonary fibrosis // *Dis Model Mech.* – 2017. - Vol. 10, №12. – P. 1545.
- 67 Gautieri A., Passini F.S., Silván U. et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue // *Matrix Biol.* – 2017. - Vol. 59. – P. 95-108.
- 68 Scarpellini A., Huang L., Burhan I. et al. Syndecan-4 knockout leads to reduced extracellular transglutaminase-2 and protects against tubulointerstitial fibrosis // *J Am Soc Nephrol.* – 2014. - Vol. 25, №5. – P. 1013-1027.
- 69 Zhao H., Han K.L., Wang Z.Y. et al. Value of C-telopeptide-cross-linked Type I collagen, osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase and procollagen Type I N-terminal propeptide in the diagnosis and prognosis of bone metastasis in patients with malignant tumors // *Med Sci Monit.* – 2011. - Vol. 17, №11. – P. 626-633.
- 70 Cloos P.A., Fledelius C., Christgau S. et al. Investigation of bone disease using isomerized and racemized fragments of type I collagen // *Calcif Tissue Int.* – 2003. - Vol. 72, №1. – P. 8-17.
- 71 Hall C.L., Dai J., Van Golen K.L., Keller E.T., Long M.W. Type I collagen receptor (alpha 2 beta 1) signaling promotes the growth of human prostate cancer cells within the bone // *Cancer Res.* – 2006. - Vol. 66, №17. – P. 8648-8654.
- 72 Ferreira A.R., Alho I., Shan N. et al. N-Telopeptide of Type I Collagen Long-Term Dynamics in Breast Cancer Patients With Bone Metastases: Clinical Outcomes and Influence of Extraskelatal Metastases // *Oncologist.* – 2016. - Vol. 21, №12. – P. 1418-1426.
- 73 Bager C.L., Willumsen N., Leeming D.J. et al. Collagen degradation products measured in serum can separate ovarian and breast cancer patients from healthy controls: A preliminary study // *Cancer Biomark.* – 2015. - Vol. 15, №6. – P. 783-788.

- 74 Willumsen N., Bager C.L., Leeming D.J. et al. Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer // *Cancer Med.* – 2014. - Vol. 3, №5. – P. 1136-1145.
- 75 Kehlet S.N., Sanz-Pamplona R., Brix S., Leeming D.J., Karsdal M.A., Moreno V. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients // *Sci Rep.* – 2016. - Vol. 6. – P. 30599.
- 76 Zou X., Feng B., Dong T., Yan G., Tan B., Shen H. et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis // *J Proteomics.* – 2013. - Vol. 94. – P. 473–485.
- 77 Armstrong T., Packham G., Murphy L.B. et al. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2004. - Vol. 10, №21. – P. 7427-7437.
- 78 Menke A., Philippi C., Vogelmann R. et al. Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines // *Cancer Res.* – 2001. - Vol. 61, №8. – P. 3508-3517.
- 79 Cheng J.C., Leung P.C. Type I collagen down-regulates E-cadherin expression by increasing PI3KCA in cancer cells // *Cancer Lett.* – 2011. - Vol. 304, №2. – P. 107-116.
- 80 Gao H., Chakraborty G., Zhang Z. et al. Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling // *Cell.* – 2016. - Vol. 166, №1. – P. 47-62.
- 81 Barcus C.E., O'Leary K.A., Brockman J.L. et al. Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells // *Breast Cancer Res.* – 2017. - Vol. 19, №1. – P. 9.
- 82 Willumsen N., Bager C.L., Leeming D.J. et al. Extracellular matrix specific protein fingerprints measured in serum can separate pancreatic cancer patients from healthy controls // *BMC Cancer.* – 2013. - Vol. 13. – P. 554.
- 83 Kauppila S., Stenbäck F., Risteli J., Jukkola A., Risteli L. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo // *J Pathol.* – 1998. - Vol. 186, №3. – P. 262-268.
- 84 Hilska M., Collan Y., Peltonen J., Gullichsen R., Paaajanen H., Laato M. The distribution of collagen types I, III, and IV in normal and malignant colorectal mucosa // *Eur J Surg.* – 1998. - Vol. 164, №6. – P. 457-464.
- 85 Nurmenniemi S., Koivula M.K., Nyberg P. et al. Type I and III collagen degradation products in serum predict patient survival in head and neck squamous cell carcinoma // *Oral Oncol.* – 2012. - Vol. 48, №2. – P. 136-140.
- 86 Basso D., Belluco C., Mazza S. et al. Colorectal cancer metastatic phenotype stimulates production by fibroblasts of N-terminal peptide of type III collagen: clinical implications for prognosis // *Clin Chim Acta.* – 2001. - Vol. 312, №1-2. – P. 135-142.

- 87 Chintala S.K., Sawaya R., Gokaslan Z.L., Rao J.S. The effect of type III collagen on migration and invasion of human glioblastoma cell lines in vitro // *Cancer Lett.* – 1996. - Vol. 102, №1-2. – P. 57-63.
- 88 Hirai K., Shimada H., Ogawa T., Taji S. The spread of human lung cancer cells on collagens and its inhibition by type III collagen // *Clin Exp Metastasis.* – 1991. - Vol. 9, №6. – P. 517-527.
- 89 Best S.L., Liu Y., Keikhosravi A., Drifka C.R., Woo K.M., Mehta G.S. et al. Collagen Organization of Renal Cell Carcinoma Differs between Low and High Grade Tumors // *BMC Cancer.* – 2019. - Vol. 19. – P. 490.
- 90 Provenzano P.P., Eliceiri K.W., Campbell J.M., Inman D.R., White J.G., Keely P.J. Collagen Reorganization at the Tumor-Stromal Interface Facilitates Local Invasion // *BMC Med.* – 2006. - Vol. 4. – P. 38.
- 91 Zhou Z.H., Ji C.D., Xiao H.L., Zhao H.B., Cui Y.H., Bian X.W. Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis // *J. Cancer.* – 2017. - Vol. 8. – P. 1466–1476.
- 92 Fleszar A.J., Walker A., Porubsky V., Flanigan W., James D., Campagnola P.J., Weisman P.S., Kreeger P.K. The Extracellular Matrix of Ovarian Cortical Inclusion Cysts Modulates Invasion of Fallopian Tube Epithelial Cells // *APL Bioeng.* – 2018. - Vol. 2. – P. 31902.
- 93 Nadiarnykh O., LaComb R.B., Brewer M.A., Campagnola P.J. Alterations of the Extracellular Matrix in Ovarian Cancer Studied by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy // *BMC Cancer.* – 2010. - Vol. 10. – P. 94.
- 94 Cicchi R., Massi D., Sestini S., Carli P., Giorgi V.D., Lotti T., Pavone F.S. Multidimensional Non-Linear Laser Imaging of Basal Cell Carcinoma // *Opt. Express.* – 2007. - Vol. 15. – P. 10135–10148.
- 95 Keikhosravi A., Shribak M., Conklin M.W., Liu Y., Li B., Loeffler A., Levenson R.M., Eliceiri K.W. Real-Time Polarization Microscopy of Fibrillar Collagen in Histopathology // *Sci. Rep.* – 2021. - Vol. 11. – P. 19063.
- 96 Pointer K.B., Clark P.A., Schroeder A.B., Salamat M.S., Eliceiri K.W., Kuo J.S. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival // *J Neurosurg.* – 2017. - Vol. 126, №6. – P. 1812-1821.
- 97 Drifka C.R., Loeffler A.G., Mathewson K., Keikhosravi A., Eickhoff J.C., Liu Y., Weber S.M., Kao W.J., Eliceiri K.W. Highly Aligned Stromal Collagen Is a Negative Prognostic Factor Following Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Resection // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7. – P. 76197–76213.
- 98 Drifka C.R., Tod J., Loeffler A.G., Liu Y., Thomas G.J., Eliceiri K.W., Kao W.J. Periductal Stromal Collagen Topology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Differs from That of Normal and Chronic Pancreatitis // *Mod. Pathol.* – 2015. - Vol. 28. – P. 1470–1480.
- 99 Provenzano P.P., Inman D.R., Eliceiri K.W. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression // *BMC Med.* – 2008. - Vol. 6. – P. 11.
- 100 Zhang K., Corsa C.A., Ponik S.M., Prior J.L., Piwnica-Worms D., Eliceiri K.W., Keely P.J., Longmore G.D. The Collagen Receptor Discoidin Domain

Receptor 2 Stabilizes SNAIL1 to Facilitate Breast Cancer Metastasis // *Nat. Cell Biol.* – 2013. - Vol. 15. – P. 677–687.

101 Chen W., Dong S., Liu X., Wang G., Xu S., Lei S., Zhuo S., Yan J. Association of the Collagen Signature in the Tumor Microenvironment With Recurrence and Survival of Patients With T4N0M0 Colon Cancer // *Dis. Colon Rectum.* – 2021. - Vol. 64. – P. 563–575.

102 Hanley C.J., Noble F., Ward M., Bullock M., Drifka C., Mellone M. et al. A Subset of Myofibroblastic Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Collagen Fiber Elongation, Which Is Prognostic in Multiple Cancers // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7. – P. 6159–6174.

103 Ray A., Provenzano P.P. Aligned Forces: Origins and Mechanisms of Cancer Dissemination Guided by Extracellular Matrix Architecture // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2021. - Vol. 72. – P. 63–71.

104 Dumont N., Liu B., Defilippis R.A., Chang H., Rabban J.T., Karnezis A.N. et al. Breast Fibroblasts Modulate Early Dissemination, Tumorigenesis, and Metastasis through Alteration of Extracellular Matrix Characteristics // *Neoplasia.* – 2013. - Vol. 15. – P. 249–262.

105 Levental K.R., Yu H., Kass L., Lakins J.N., Egeblad M., Erler J.T., Fong S.F.T. et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling // *Cell.* – 2009. - Vol. 139. – P. 891–906.

106 Chen W.T. Proteolytic Activity of Specialized Surface Protrusions Formed at Rosette Contact Sites of Transformed Cells // *J. Exp. Zool.* – 1989. - Vol. 251. – P. 167–185.

107 Artym V.V., Swatkoski S., Matsumoto K., Campbell C.B., Petrie R.J., Dimitriadis E.K. et al. Dense Fibrillar Collagen Is a Potent Inducer of Invadopodia via a Specific Signaling Network // *J. Cell Biol.* – 2015. - Vol. 208. – P. 331–350.

108 Juin A., Billottet C., Moreau V., Destaing O., Albiges-Rizo C., Rosenbaum J., Génot E., Saltel F. Physiological Type I Collagen Organization Induces the Formation of a Novel Class of Linear Invadosomes // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. - Vol. 23. – P. 297–309.

109 Yan T., Zhang A., Shi F., Chang F., Mei J., Liu Y., Zhu Y. Integrin $\text{Av}\beta 3$ -Associated DAAM1 Is Essential for Collagen-Induced Invadopodia Extension and Cell Haptotaxis in Breast Cancer Cells // *J. Biol. Chem.* – 2018. - Vol. 293. – P. 10172–10185.

110 Azemikhah M., Ashtiani H.A., Aghaei M., Rastegar H. Evaluation of discoidin domain receptor-2 (DDR2) expression level in normal, benign, and malignant human prostate tissues // *Res Pharm Sci.* – 2015. - Vol. 10, №4. – P. 356–363.

111 Hur H., Ham I.H., Lee D., Jin H., Aguilera K.Y., Oh H.J. et al. Discoidin Domain Receptor 1 Activity Drives an Aggressive Phenotype in Gastric Carcinoma // *BMC Cancer.* – 2017. - Vol. 17. – P. 87.

112 Jin H., Ham I.H., Oh H.J., Bae C.A., Lee D., Kim Y.B. et al. Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Prevents Stroma-Induced Peritoneal Metastasis in Gastric Carcinoma. *Mol Cancer Res.* – 2018. - Vol. 16. – P. 1590–1600.

- 113 Romayor I., Badiola I., Benedicto A., Márquez J., Herrero A., Arteta B., Olaso E. Silencing of Sinusoidal DDR1 Reduces Murine Liver Metastasis by Colon Carcinoma // *Sci. Rep.* – 2020. - Vol. 10. – P. 18398.
- 114 Gadiya M., Chakraborty G. Signaling by Discoidin Domain Receptor 1 in Cancer Metastasis // *Cell Adh. Migr.* – 2018. - Vol. 12. – P. 315–323.
- 115 Majo S., Auguste P. The Yin and Yang of Discoidin Domain Receptors (DDR): Implications in Tumor Growth and Metastasis Development // *Cancers.* – 2021. - Vol. 13. – P. 1725.
- 116 Mehta V., Chander H., Munshi A. Complex Roles of Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases in Cancer // *Clin. Transl. Oncol.* – 2021. - Vol. 23. – P. 1497–1510.
- 117 Buckley C.D., Filer A. Fibroblasts and fibroblast-like synoviocytes // *Kelley and Firestein’s Textbook of Rheumatology.* – 2017. - Vol. 2, №44. – P. 231–249.
- 118 Dolberg D.S., Hollingsworth R., Hertle M., Bissell M.J. Wounding and its role in rsv-mediated tumor formation // *Science.* – 1985. - Vol. 230. – P. 676–678.
- 119 Mintz B., Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. - Vol. 72. – P. 3585–3589.
- 120 Folkman J., Kalluri R. Cancer without disease // *Nature.* – 2004. - Vol. 427. – P. 787.
- 121 Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound // *Adv Wound Care.* – 2016. - Vol. 5, №3. – P. 119-136.
- 122 Fukuda K., Ishida W., Fukushima A., Nishida T. Corneal Fibroblasts as Sentinel Cells and Local Immune Modulators in Infectious Keratitis // *Int J Mol Sci.* – 2017. - Vol. 18, №9. – P. 1831.
- 123 Rinn J.L., Bondre C., Gladstone H.B., Brown P.O., Chang H.Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs // *PLoS Genet.* – 2006. - Vol. 2, №7. – P. 119.
- 124 Klein G. Evolutionary aspects of cancer resistance. *Semin // Cancer Biol.* – 2014. - Vol. 25. – P. 10–14.
- 125 Stoker M.G., Shearer M., O’Neill C. Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts // *J. Cell Sci.* – 1966. - Vol. 1. – P. 297–310.
- 126 Martin W., Zempel G., Hulser D., Willecke K. Growth inhibition of oncogene-transformed rat fibroblasts by cocultured normal cells: Relevance of metabolic cooperation mediated by gap junctions // *Cancer Res.* – 1991. - Vol. 51. – P. 5348–5351.
- 127 Mehta P.P., Bertram J.S., Loewenstein W.R. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells // *Cell.* – 1986. - Vol. 44. – P. 187–196.

- 128 Allard D., Stoker M., Gherardi E. A G2/M cell cycle block in transformed cells by contact with normal neighbours // *Cell Cycle*. – 2003. - Vol. 2. – P. 482–485.
- 129 Miki H., Tsunemi K., Toyoda M., Senzaki H., Yonemura Y., Tsubura A. A case report of surgical resections with local and systemic chemotherapy for three recurrences of colon cancer occurring ten years after colectomy // *Case Rep. Oncol.* – 2012. - Vol. 5. – P. 373–379.
- 130 Lessey E.C., Guilluy C., Burridge K. From mechanical force to rhoa activation // *Biochemistry*. – 2012. - Vol. 51. – P. 7420–7432.
- 131 Alkasalias T., Alexeyenko A., Hennig K., Danielsson F., Lebbink R.J., Fielden M. et al. Rhoa knockout fibroblasts lose tumor-inhibitory capacity in vitro and promote tumor growth in vivo. *Proc // Natl. Acad. Sci. USA*. – 2017. - Vol. 114. – P. 1413–1421.
- 132 Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. – 2016. - Vol. 16. – P. 582–598.
- 133 Kieffer Y., Hocine H.R., Gentric G. et al. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer // *Cancer Discov.* – 2020. - Vol. 10, №9. – P. 1330-1351.
- 134 Cox T.R., Erler J.T. Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis // *Clin Cancer Res*. – 2014. - Vol. 20, №14. – P. 3637-3643.
- 135 Gener Lahav T., Adler O., Zait Y. et al. Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment // *Int J Cancer*. – 2019. - Vol. 145, №9. – P. 2521-2534.
- 136 Hao X., Shen Y., Chen N. et al. Osteoprogenitor-GMP crosstalk underpins solid tumor-induced systemic immunosuppression and persists after tumor removal // *Cell Stem Cell*. – 2023. - Vol. 30, №5. – P. 648-664.
- 137 Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing // *N Engl J Med*. – 1986. - Vol. 315. – P. 1650–1659.
- 138 Zhang X.F., Dong M., Pan Y.H., Chen J.N., Huang X.Q., Jin Y. et al. Expression pattern of cancer-associated fibroblast and its clinical relevance in intrahepatic cholangiocarcinoma // *Hum Pathol*. – 2017. - Vol. 65. – P. 92–100.
- 139 Ueno H., Kanemitsu Y., Sekine S. et al. Desmoplastic Pattern at the Tumor Front Defines Poor-prognosis Subtypes of Colorectal Cancer // *Am J Surg Pathol*. – 2017. - Vol. 41, №11. – P. 1506-1512.
- 140 Ueno H., Shinto E., Shimazaki H. et al. Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis // *Ann Surg Oncol*. – 2015. - Vol. 22, №5. – P. 1504-1512.
- 141 Ueno H., Jones A., Jass J.R., Talbot I.C. Clinicopathological significance of the 'keloid-like' collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer // *Histopathology*. – 2002. - Vol. 40, №4. – P. 327-334.
- 142 Wei S.C., Yang J. Forcing through Tumor Metastasis: The Interplay between Tissue Rigidity and Epithelial-Mesenchymal Transition // *Trends Cell Biol*. – 2016. - Vol. 26. – P. 111–120.

- 143 Malik R., Lelkes P.I., Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer // *Trends Biotechnol.* – 2015. - Vol. 33, №4. – P. 230-236.
- 144 Yu H., Mouw J.K., Weaver V.M. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution // *Trends Cell Biol.* – 2011. - Vol. 21, №1. – P. 47-56.
- 145 Karagiannis G.S., Poutahidis T., Erdman S.E., Kirsch R., Riddell R.H., Diamandis E.P. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue // *Mol Cancer Res.* – 2012. - Vol. 10, №11. – P. 1403-1418.
- 146 Sakuma Y. Epithelial-to-mesenchymal transition and its role in EGFR-mutant lung adenocarcinoma and idiopathic pulmonary fibrosis // *Pathol Int.* – 2017. - Vol. 67, №8. – P. 379-388.
- 147 Gao J., Shen Z., Deng Z., Mei L. Impact of Tumor-Stroma Ratio on the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review // *Front Oncol.* – 2021. - Vol. 16, №11. – P. 738080.
- 148 Almangush A., Alabi R.O., Troiano G. et al. Clinical significance of tumor-stroma ratio in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis // *BMC Cancer.* – 2021. - Vol. 21, №1. – P. 480.
- 149 Kemi N., Eskuri M., Kauppila J.H. Tumour-stroma ratio and 5-year mortality in gastric adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis // *Sci Rep.* – 2019. - Vol. 9, №1. – P. 16018.
- 150 Zhang X., Ma H., Zhang L., Li F. Predictive Role of Tumor-Stroma Ratio for Survival of Patients With Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis // *Pathol Oncol Res.* – 2022. - Vol. 21, №27. – P. 1610021.
- 151 Almangush A., Bello I.O., Heikkinen I., Hagström J., Haglund C. et al. Stromal categorization in early oral tongue cancer // *Virchows Arch.* – 2021. - Vol. 478, №5. – P. 925-932.
- 152 Huijbers A., Tollenaar R.A., Pelt G.W., Zeestraten E.C., Dutton S., McConkey C.C. et al. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial // *Ann Oncol.* – 2013. - Vol. 24, №1. – P. 179–185.
- 153 Mesker W.E., Junggeburst J.M., Szuhai K. et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage // *Cell Oncol.* – 2007. - Vol. 29, №5. – P. 387-398.
- 154 Mesker W.E., Liefers G.J., Junggeburst J.M., Van Pelt G.W., Alberici P., Kuppen P.J. et al. Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I–II colon cancer patients // *Cell Oncol.* – 2009. - Vol. 31, №3. – P. 169–178.
- 155 Van Pelt G.W., Hansen T.B., Kjaer-Frifeldt S., Van Krieken J.H.J.M., Tollenaar R.A.E.M., Mesker W.E. Stroma-high lymph node involvement predicts poor survival more accurately for patients with stage III colon cancer // *J Med Surg Pathol.* – 2000. - №1. – P. 15-29.

156 West N.P., Dattani M., McShane P., Hutchins G., Grabsch J., Mueller W., Treanor D., Quirke P., Grabsch H. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients // *Br J Cancer*. – 2010. - Vol. 102, №10. – P. 1519–1523.

157 Van Pelt G.W., Kjær-Frifeldt S., Van Krieken J.H.J.M. et al. Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations // *Virchows Arch*. – 2018. - Vol. 473, №4. – P. 405-412.

158 Kruijf E.M., Van Nes J.G., van de Velde C.J., Putter H., Smit V.T., Liefers G.J., Kuppen P.J., Tollenaar R.A., Mesker W.E. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients // *Breast Cancer Res Treat*. – 2011. - Vol. 125, №3. – P. 687–696.

159 Dekker T.J., van de Velde C.J., van Pelt G.W., Kroep J.R., Julien J.P., Smit V.T., Tollenaar R.A., Mesker W.E. Prognostic significance of the tumor-stroma ratio: validation study in node-negative premenopausal breast cancer patients from the EORTC perioperative chemotherapy (POP) trial (10854) // *Breast Cancer Res Treat*. – 2013. - Vol. 139, №2. – P. 371–379.

160 Roeke T., Sobral-Leite M., Dekker T.J.A., Wesseling J., Smit V., Tollenaar R., Schmidt M.K., Mesker W.E. The prognostic value of the tumour-stroma ratio in primary operable invasive cancer of the breast: a validation study // *Breast Cancer Res Treat*. – 2017. - Vol. 166. – P. 435–445.

161 Moorman A.M., Vink R., Heijmans H.J., van der Palen J., Kouwenhoven E.A. The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer // *Eur J Surg Oncol*. – 2012. - Vol. 38, №4. – P. 307–313.

162 Gujam F.J., Edwards J., Mohammed Z.M., Going J.J., McMillan D.C. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer // *Br J Cancer*. – 2014. - Vol. 111, №1. – P. 157–165.

163 Courrech Staal E.F., Wouters M.W., Van Sandick J.W., Takkenberg M.M., Smit V.T., Junggeburst J.M., Spitzer-Naaykens J.M., Karsten T., Hartgrink H.H., Mesker W.E., Tollenaar R.A. The stromal part of adenocarcinomas of the oesophagus: does it conceal targets for therapy? // *Eur J Cancer*. – 2010. - Vol. 46, №4. – P. 720–728.

164 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. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma // *J Thorac Oncol*. – 2012. - Vol. 7, №9. – P. 1457–1461.

165 Liu J., Liu J., Li J., Chen Y., Guan X., Wu X., Hao C., Sun Y., Wang Y., Wang X. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in early cervical carcinoma // *Gynecol Oncol*. – 2014. - Vol. 132, №1. – P. 81–86.

166 Lv Z., Cai X., Weng X., Xiao H., Du C., Cheng J., Zhou L., Xie H., Sun K., Wu J., Zheng S. Tumor-stroma ratio is a prognostic factor for survival in hepatocellular carcinoma patients after liver resection or transplantation // *Surgery*. – 2015. - Vol. 158, №1. – P. 142–150.

- 167 Zhang T., Xu J., Shen H., Dong W., Ni Y., Du J. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in NSCLC // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. - Vol. 8, №9. – P. 11348-11355.
- 168 Zhang X.L., Jiang C., Zhang Z.X., Liu F., Zhang F., Cheng Y.F. The tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in nasopharyngeal cancer // *Oncol Res Treat.* – 2014. - Vol. 37, №9. – P. 480–484.
- 169 Chen Y., Zhang L., Liu W., Liu X. Prognostic significance of the tumor-stroma ratio in epithelial ovarian cancer // *Biomed Res Int.* – 2015. - №2. – P. 589301.
- 170 Zhang H., Sheng X., Zhang S., Gu X. The prognostic value of tumor budding in laryngeal squamous cell carcinoma // *Transl Cancer Res.* – 2020. - Vol. 9, №1. – P. 119-127.
- 171 Park J.H., Richards C.H., McMillan D.C., Horgan P.G., Roxburgh C.S.D. The relationship between tumour stroma percentage, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer // *Ann Oncol.* – 2014. - Vol. 25, №3. – P. 644-651.
- 172 Scheer R., Baidoshvili A., Zoidze S., Elferink M.A.G., Berkel A.E.M., Klaase J.M., Van Diest P.J. Tumor-stroma ratio as prognostic factor for survival in rectal adenocarcinoma: A retrospective cohort study // *World J Gastrointest Oncol.* – 2017. - Vol. 9, №12. – P. 466-474.
- 173 Zunder S.M., Van Pelt G.W., Gelderblom H.J., Mancao C., Putter H., Tollenaar R.A., Mesker W.E. Predictive potential of tumour-stroma ratio on benefit from adjuvant bevacizumab in high-risk stage II and stage III colon cancer // *Br J Cancer.* - 2018. - Vol. 119, №2. – P. 164-169.
- 174 Eriksen A.C., Sørensen F.B., Lindebjerg J., Hager H., dePont Christensen R., Kjær-Frifeldt S., Hansen T.F. The prognostic value of tumour stroma ratio and tumour budding in stage II colon cancer. A nationwide population-based study // *Int J Colorectal Dis.* – 2018. - Vol. 33, №8. – P. 1115-1124.
- 175 Sandberg T.P., Oosting J., van Pelt G.W., Mesker W.E., Tollenaar R.A.E.M., Morreau H. Molecular profiling of colorectal tumors stratified by the histological tumor-stroma ratio – Increased expression of galectin-1 in tumors with high stromal content // *Oncotarget.* – 2018. - Vol. 9, №59. - P. 31502-31515.
- 176 Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization // *Nat Rev Cancer.* – 2009. - Vol. 9, №4. – P. 274-84.
- 177 Luo H., Tu G., Liu Z., Liu M. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression // *Cancer Lett.* – 2015. - Vol. 361, №2. – P. 155-163.
- 178 De Wever O., Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion // *J Pathol.* – 2003. - Vol. 200, №4. – P. 429-447.
- 179 Kouniavsky G., Khaikin M., Zvibel I., Zippel D., Brill S., Halpern Z., Papa M. Stromal extracellular matrix reduces chemotherapy-induced apoptosis in colon cancer cell lines // *Clin Exp Metastasis.* – 2002. - Vol. 19, №1. – P. 55-60.
- 180 Liotta L.A., Rao C.N., Barsky S.H. Tumor invasion and the extracellular matrix // *Lab Invest.* – 1983. - Vol. 49, №6. – P. 636-649.

- 181 Cirri P., Chiarugi P. Cancer-associated fibroblasts and tumor cells: a diabolic liaison driving cancer progression // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. - Vol. 31, №1-2. – P. 195-208.
- 182 Krishna Priya S., Nagare R.P., Sneha V.S., Sidhanth C., Bindhya S., Manasa P. et al. Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels // *Int J Cancer.* – 2016. - Vol. 139, №4. – P. 729-735.
- 183 Giatromanolaki A., Sivridis E., Koukourakis M.I. The Pathology of Tumor Stromatogenesis // *Cancer Biol Ther.* – 2007. - Vol. 6. – P. 639–645.
- 184 Bissell M.J., Radisky D. Putting tumours in context // *Nat Rev Cancer.* – 2001. - Vol. 1, №1. – P. 46-54.
- 185 Wu J., Liang C., Chen M., Su W. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7, №42. – P. 68954-68965.
- 186 Shimoda M., Mellody K.T., Orimo A. Carcinoma-Associated Fibroblasts are a Rate-Limiting Determinant for Tumour Progression // *Semin Cell Dev Biol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 19–25.
- 187 Courrech Staal E.F., Smit V.T., van Velthuisen M.L., Spitzer-Naaykens J.M., Wouters M.W., Mesker W.E., Tollenaar R.A., Van Sandick J.W. Reproducibility and validation of tumour stroma ratio scoring on oesophageal adenocarcinoma biopsies // *Eur J Cancer.* – 2011. - Vol. 47, №3. – P. 375-382.
- 188 Geessink O.G.F., Baidoshvili A., Klaase J.M., Ehteshami Bejnordi B., Litjens G.J.S., van Pelt G.W., Mesker W.E., Nagtegaal I.D., Ciompi F., Van der Laak J.A.W.M. Computer aided quantification of intratumoral stroma yields an independent prognosticator in rectal cancer // *Cell Oncol (Dordr).* – 2019. - Vol. 42, №3. – P. 331-341.
- 189 Kajiwara Y., Ueno H., Hashiguchi Y., Mochizuki H., Hase K. Risk factors of nodal involvement in T2 colorectal cancer // *Dis Colon Rectum.* – 2010. - Vol. 53, №10. – P. 1393-1399.
- 190 Crispino P., De Toma G., Ciardi A. et al. Role of desmoplasia in recurrence of stage II colorectal cancer within five years after surgery and therapeutic implication // *Cancer Invest.* – 2008. - Vol. 26, №4. – P. 419-425.
- 191 Zippi M., De Toma G., Minervini G., Cassieri C., Pica R., Colarusso D., Stock S., Crispino P. Desmoplasia influenced recurrence of disease and mortality in stage III colorectal cancer within five years after surgery and adjuvant therapy // *Saudi J Gastroenterol.* – 2017. - Vol. 23, №1. – P. 39-44.
- 192 Ueno H., Sekine S., Oshiro T. et al. Disentangling the prognostic heterogeneity of stage III colorectal cancer through histologic stromal categorization // *Surgery.* – 2018. - Vol. 163, №4. – P. 777-783.
- 193 Konishi T., Shimada Y., Lee L.H. et al. Poorly Differentiated Clusters Predict Colon Cancer Recurrence: An In-Depth Comparative Analysis of Invasive-Front Prognostic Markers // *Am J Surg Pathol.* – 2018. - Vol. 42, №6. – P. 705-714.
- 194 Ueno H., Konishi T., Ishikawa Y. et al. Histologic categorization of fibrotic cancer stroma in the primary tumor is an independent prognostic index in

resectable colorectal liver metastasis // *Am J Surg Pathol.* – 2014. - Vol. 38, №10. – P. 1380-1386.

195 Ueno H., Shinto E., Kajiwara Y., Fukazawa S., Shimazaki H., Yamamoto J., Hase K. Prognostic impact of histological categorisation of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer // *Br J Cancer.* – 2014. - Vol. 111, №11. – P. 2082-2090.

196 Ueno H., Kanemitsu Y., Sekine S. et al. A Multicenter Study of the Prognostic Value of Desmoplastic Reaction Categorization in Stage II Colorectal Cancer // *Am J Surg Pathol.* – 2019. - Vol. 43, №8. – P. 1015-1022.

197 Wang L.M., Silva M.A., D'Costa Z. et al. The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7, №4. – P. 4183-4194.

198 Hernández-Ruiz E., Hernández-Muñoz I., Masferrer E. et al. A Myxoid Fibrotic Reaction Pattern is Associated with Metastatic Risk in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma // *Acta Derm Venereol.* – 2019. - Vol. 99, №1. – P. 89-94.

199 Cao L., Sun P.L., He Y., Yao M., Gao H. Desmoplastic Reaction and Tumor Budding in Cervical Squamous Cell Carcinoma are Prognostic Factors for Distant Metastasis: A Retrospective Study // *Cancer Manag Res.* – 2020. - Vol. 12. – P. 137-144.

200 Kojima S., Hisaka T., Midorikawa R. et al. Prognostic Impact of Desmoplastic Reaction Evaluation for Intrahepatic Cholangiocarcinoma // *Anticancer Res.* – 2020. - Vol. 40, №8. – P. 4749-4754.

201 Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2006. - Vol. 6, №5. – P. 392-401.

202 De Smedt L., Palmans S., Andel D. et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching // *Br J Cancer.* – 2017. - Vol. 116, №1. – P. 58-65.

203 Zlobec I., Lugli A. Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation // *Nat Rev Cancer.* – 2018. - Vol. 18, №4. – P. 203-204.

204 Bran G.M., Goessler U.R., Hormann K., Riedel F., Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis (review) // *Int J Mol Med.* – 2009. - Vol. 24, №3. – P. 283-293.

205 Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nat Rev Cancer.* – 2002. - Vol. 2, №6. – P. 442-454.

206 Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. - Vol. 15, №3. – P. 178-196.

207 Tzanakakis G., Kavasi R.M., Voudouri K. et al. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon // *Dev Dyn.* – 2018. - Vol. 247, №3. – P. 368-381.

208 Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // *Cell.* – 2009. - Vol. 139, №5. – P. 871-890.

- 209 Ueno H., Shinto E., Hashiguchi Y. et al. In rectal cancer, the type of desmoplastic response after preoperative chemoradiotherapy is associated with prognosis // *Virchows Arch.* – 2015. - Vol. 466, №6. – P. 655-663.
- 210 Turley S.J., Cremasco V., Astarita J.L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment // *Nat Rev Immunol.* – 2015. - Vol. 15, №11. – P. 669-682.
- 211 Kenny F.N., Drymoussi Z., Delaine-Smith R. et al. Tissue stiffening promotes keratinocyte proliferation through activation of epidermal growth factor signaling // *J Cell Sci.* – 2018. - Vol. 131, №10. – P. 215-780.
- 212 Ueno H., Kajiwara Y., Shimazaki H. et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer // *Am J Surg Pathol.* – 2012. - Vol. 36, №2. – P. 193-201.
- 213 Van Zijl F., Mair M., Csiszar A. et al. Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge // *Oncogene.* – 2009. - Vol. 28, №45. – P. 4022–4033.
- 214 Lugli A., Kirsch R., Ajioka Y. et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016 // *Mod Pathol.* – 2017. - Vol. 30, №9. – P. 1299-1311.
- 215 Berg K.B., Schaeffer D.F. Tumor budding as a standardized parameter in gastrointestinal carcinomas: more than just the colon // *Mod Pathol.* – 2018. - Vol. 31, №6. – P. 862-872.
- 216 Davison J.M., Landau M.S., Luketich J.D. et al. A Model Based on Pathologic Features of Superficial Esophageal Adenocarcinoma Complements Clinical Node Staging in Determining Risk of Metastasis to Lymph Nodes // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2016. - Vol. 14, №3. – P. 369-377.
- 217 Almangush A., Karhunen M., Hautaniemi S., Salo T., Leivo I. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis // *Histopathology.* – 2016. - Vol. 68, №2. – P. 173-182.
- 218 Thies S., Guldener L., Slotta-Huspenina J. et al. Impact of peritumoral and intratumoral budding in esophageal adenocarcinomas // *Hum Pathol.* – 2016. - Vol. 52. – P. 1-8.
- 219 Guo Y.X., Zhang Z.Z., Zhao G., Zhao E.H. Prognostic and pathological impact of tumor budding in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis // *World J Gastrointest Oncol.* – 2019. - Vol. 11, №10. – P. 898-908.
- 220 Gulluoglu M., Yegen G., Ozluk Y. et al. Tumor Budding Is Independently Predictive for Lymph Node Involvement in Early Gastric Cancer // *Int J Surg Pathol.* – 2015. - Vol. 23, №5. – P. 349-358.
- 221 Karamitopoulou E., Wartenberg M., Zlobec I. et al. Tumour budding in pancreatic cancer revisited: validation of the ITBCC scoring system // *Histopathology.* – 2018. - Vol. 73, №1. – P. 137-146.
- 222 Tanaka M., Yamauchi N., Ushiku T. et al. Tumor Budding in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Predictor of Postsurgery Outcomes // *Am J Surg Pathol.* – 2019. - Vol. 43, №9. – P. 1180-1190.

- 223 Ho Y.Y., Wu T.Y., Cheng H.C., Yang C.C., Wu C.H. The significance of tumor budding in oral cancer survival and its relevance to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system // *Head Neck*. – 2019. - Vol. 41, №9. – P. 2991-3001.
- 224 Neppl C., Zlobec I., Schmid R.A., Berezowska S. Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016 recommendation in squamous cell carcinoma of the lung-a single-center analysis of 354 cases // *Mod Pathol*. – 2020. - Vol. 33, №5. – P. 802-811.
- 225 Kadota K., Yeh Y.C., Villena-Vargas J., Cherkassky L., Drill E.N., Sima C.S. et. al. Tumor Budding Correlates With the Protumor Immune Microenvironment and Is an Independent Prognostic Factor for Recurrence of Stage I Lung Adenocarcinoma // *Chest*. – 2015. - Vol. 148, №3. – P. 711-721.
- 226 Li X., Wei B., Sonmez C., Li Z., Peng L. High tumor budding count is associated with adverse clinicopathologic features and poor prognosis in breast carcinoma // *Hum Pathol*. – 2017. - Vol. 66. – P. 222-229.
- 227 Jesinghaus M., Strehl J., Boxberg M. et al. Introducing a novel highly prognostic grading scheme based on tumour budding and cell nest size for squamous cell carcinoma of the uterine cervix // *J Pathol Clin Res*. – 2018. - Vol. 4, №2. – P. 93-102.
- 228 Imai T. Growth patterns in human carcinoma. Their classification and relation to prognosis // *Obstet Gynecol*. – 1960. - Vol. 16. – P. 296-308.
- 229 Voutsadakis I.A. Prognostic role of tumor budding in breast cancer // *World J Exp Med*. – 2018. - Vol. 8, №2. – P. 12-17.
- 230 Beer A., Reber A., Paireder M., Schoppmann S.F., Heber S., Schiefer A.I. Tumor cell budding in preoperative biopsies of esophageal and gastroesophageal junction carcinoma independently predicts survival in a grade-dependent manner // *Surgery*. – 2022. - Vol. 172, №2. – P. 567-574.
- 231 Cappellesso R., Luchini C., Veronese N. et al. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis // *Hum Pathol*. – 2017. - Vol. 65. – P. 62-70.
- 232 Ueno H., Ishiguro M., Nakatani E., Ishikawa T., Uetake H., Matsuda C., Nakamoto Y. et. al. Prospective Multicenter Study on the Prognostic and Predictive Impact of Tumor Budding in Stage II Colon Cancer: Results From the SACURA Trial // *J Clin Oncol*. – 2019. - Vol. 37. – P. 1886-1894.
- 233 Bosch S.L., Teerenstra S., de Wilt J.H., Cunningham C., Nagtegaal I.D. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions // *Endoscopy*. – 2013. - Vol. 45, №10. – P. 827-834.
- 234 Rogers A.C., Winter D.C., Heeney A. et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer // *Br J Cancer*. – 2016. - Vol. 115, №7. – P. 831-840.
- 235 Nagtegaal I.D., Odze R.D., Klimstra D. et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system // *Histopathology*. – 2020. - Vol. 76, №2. – P. 182-188.

- 236 Luo Y.H., Yan Z.C., Liu J.Y., Li X.Y., Yang M., Fan J. et al. Association of tumor budding with clinicopathological features and prognostic value in stage III-IV colorectal cancer // *World J Gastroenterol.* – 2024. - Vol. 30, №2. – P. 158-169.
- 237 Akabane S., Shimizu W., Takakura Y. et al. Tumor budding as a predictive marker for 5-fluorouracil response in adjuvant-treated stage III colorectal cancer // *Int J Clin Oncol.* – 2021. - Vol. 26, №7. – P. 1285-1292.
- 238 Freedman L., Macaskill P., Smith A. Multivariate analysis of prognostic factors for rectal cancer // *Lancet.* – 1984. - Vol. 324. – P. 733-736.
- 239 Knudsen J.B., Nilsson T., Sprechler M. et al. Venous and nerve invasion as prognostic factors in post-operative survival of patients with resectable cancer of the rectum // *Dis Colon Rectum.* – 1983. - Vol. 26. – P. 613-617.
- 240 Sato T., Ueno H., Mochizuki H. et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer // *Am J Surg Pathol.* – 2010. - Vol. 34, №4. – P. 454-462.
- 241 Morris M., Platell C., de Boer B., McCaul K., Iacopetta B. Population-based study of prognostic factors in stage II colonic cancer // *Br J Surg.* – 2006. - Vol. 93, №7. – P. 866-871.
- 242 Labianca R., Nordlinger B., Beretta G.D. et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann Oncol.* – 2013. - Vol. 24, №6. – P. 64-72.
- 243 Benson A.B., Venook A.P., Al-Hawary M.M. et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018 // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2018. - Vol. 16, №4. – P. 359-369.
- 244 Achen M.G., Stacker S.A. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge // *Int J Cancer.* – 2006. - Vol. 119, №8. – P. 1755-1760.
- 245 Harris E.I., Lewin D.N., Wang H.L. et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study // *Am J Surg Pathol.* – 2008. - Vol. 32, №12. – P. 1816-1821.
- 246 Batsakis J.G. Nerves and neurotropic carcinomas // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 1985. - Vol. 94, №4. – P. 426-427.
- 247 Liebig C., Ayala G., Wilks J.A., Berger D.H., Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature // *Cancer.* – 2009. - Vol. 115, №15. – P. 3379-3391.
- 248 Bockman D.E., Büchler M., Beger H.G. Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage // *Gastroenterology.* – 1994. - Vol. 107, №1. – P. 219-230.
- 249 Barresi V., Reggiani Bonetti L., Vitarelli E., Di Gregorio C., Ponz de Leon M., Barresi G. Immunohistochemical assessment of lymphovascular invasion in stage I colorectal carcinoma: prognostic relevance and correlation with nodal micrometastases // *Am J Surg Pathol.* – 2012. - Vol. 36, №1. – P. 66-72.
- 250 Cienfuegos J.A., Martínez P., Baixauli J. et al. Perineural Invasion is a Major Prognostic and Predictive Factor of Response to Adjuvant Chemotherapy in Stage I-II Colon Cancer // *Ann Surg Oncol.* – 2017. - Vol. 24, №4. – P. 1077-1084.

- 251 Fujita S., Nakanisi Y., Taniguchi H. et al. Cancer invasion to Auerbach's plexus is an important prognostic factor in patients with pT3-pT4 colorectal cancer // *Dis Colon Rectum*. – 2007. - Vol. 50, №11. – P. 1860-1866.
- 252 Zhong J.W., Yang S.X., Chen R.P., Zhou Y.H., Ye M.S., Miao L., Xue Z.X., Lu G.R. Prognostic Value of Lymphovascular Invasion in Patients with Stage III Colorectal Cancer: A Retrospective Study // *Med Sci Monit*. – 2019. - Vol. 25. – P. 6043-6050.
- 253 Skancke M., Arnott S.M., Amdur R.L., Siegel R.S., Obias V.J., Umapathi B.A. Lymphovascular Invasion and Perineural Invasion Negatively Impact Overall Survival for Stage II Adenocarcinoma of the Colon // *Dis Colon Rectum*. – 2019. - Vol. 62, №2. – P. 181-188.
- 254 Hogan J., Chang K.H., Duff G. et al. Lymphovascular invasion: a comprehensive appraisal in colon and rectal adenocarcinoma // *Dis Colon Rectum*. – 2015. - Vol. 58, №6. – P. 547-555.
- 255 Huh J.W., Lee J.H., Kim H.R. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer // *Arch Surg*. – 2012. - Vol. 147, №4. – P. 366-372.
- 256 Mei Z., Liu Y., Liu C. et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis // *Br J Cancer*. – 2014. - Vol. 110, №6. – P. 1595-1605.
- 257 Canna K., McArdle P.A., McMillan D.C., McNicol A.M., Smith G.W., McKee R.F. et al. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer // *Br J Cancer*. – 2005. - Vol. 92, №4. – P. 651-654.
- 258 Funada Y., Noguchi T., Kikuchi R., Takeno S., Uchida Y., Gabbert H.E. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer // *Oncol Rep*. – 2003. - Vol. 10, №2. – P. 309-313.
- 259 Li H., Fan X., Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer // *J Cell Biochem*. – 2007. - Vol. 101, №4. – P. 805–815.
- 260 Klintrup K., Mäkinen J.M., Kauppila S. et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer // *Eur J Cancer*. – 2005. - Vol. 41, №17. – P. 2645-2654.
- 261 Teng F., Mu D., Meng X. et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) before and after neoadjuvant chemoradiotherapy and its clinical utility for rectal cancer // *Am J Cancer Res*. – 2015. - Vol. 5, №6. – P. 2064-2074.
- 262 Chew A., Salama P., Robbshaw A. et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer // *PLoS One*. – 2011. - Vol. 6, №7. – P. 22047.
- 263 Nosho K., Baba Y., Tanaka N. et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review // *J Pathol*. – 2010. - Vol. 222, №4. – P. 350-366.
- 264 Correale P., Rotundo M.S., Del Vecchio M.T., Remondo C., Migali C., Ginanneschi C. et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy // *J Immunother*. – 2010. - Vol. 33, №4. – P. 435-441.

265 Pagès F., Berger A., Camus M. et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer // *N Engl J Med.* – 2005. - Vol. 353, №25. – P. 2654-2666.

266 Väyrynen J.P., Tuomisto A., Klintrup K., Mäkelä J., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer // *Br J Cancer.* – 2013. - Vol. 109, №7. – P. 1839-1847.

267 Chiba T., Ohtani H., Mizoi T., Naito Y., Sato E., Nagura H. et.al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis // *Br J Cancer.* – 2004. - Vol. 91, №9. – P. 1711-1717.

268 Menon A.G., Janssen-van Rhijn C.M., Morreau H. et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis // *Lab Invest.* – 2004. - Vol. 84, №4. – P. 493-501.

269 Pagès F., Mlecnik B., Marliot F. et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study // *Lancet.* – 2018. - Vol. 391, №10135. – P. 2128-2139.

270 Stanton S.E., Disis M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast 843 cancer // *J immunotherapy cancer.* – 2016. - Vol. 4. – P. 59.

271 Mlecnik B., Bindea G., Angell H.K. et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability // *Immunity.* – 2016. - Vol. 44, №3. – P. 698-711.

272 Chakrabarti S., Huebner L.J., Finnes H.D. et al. Intratumoral CD3+ and CD8+ T-Cell Densities in Patients With DNA Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer Receiving Programmed Cell Death-1 Blockade // *JCO Precis Oncol.* – 2019. - Vol. 3. – P. 1-7.

273 Picard E., Verschoor C.P., Ma G.W., Pawelec G. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer // *Front Immunol.* – 2020. - Vol. 11. – P. 369.

274 Bruni D., Angell H.K., Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy // *Nat Rev Cancer.* – 2020. - Vol. 20, №11. – P. 662-680.

275 de Vries N.L., van Unen V., Ijsselsteijn M.E. et al. High-dimensional cytometric analysis of colorectal cancer reveals novel mediators of antitumour immunity // *Gut.* – 2020. - Vol. 69, №4. – P. 691-703.

276 Bindea G., Mlecnik B., Tosolini M. et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer // *Immunity.* – 2013. - Vol. 39, №4. – P. 782-795.

277 Kinoshita T., Muramatsu R., Fujita T. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer // *Ann Oncol.* – 2016. - Vol. 27, №11. – P. 2117-2123.

278 McArdle P.A., Canna K., McMillan D.C., McNicol A.M., Campbell R., Underwood M.A. The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and

survival in patients with prostate cancer // *Br J Cancer*. – 2004. - Vol. 91, №3. – P. 541-543.

279 Bromwich E.J., McArdle P.A., Canna K. et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer // *Br J Cancer*. – 2003. - Vol. 89, №10. – P. 1906-1908.

280 Droeser R., Zlobec I., Kilic E., Güth U., Heberer M., Spagnoli G., Oertli D., Tapia C. Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers // *BMC Cancer*. – 2012. - Vol. 12. – P. 134.

281 Kuwahara T., Hazama S., Suzuki N. et al. Intratumoural-infiltrating CD4+ and FOXP3+ T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer // *Br J Cancer*. – 2019. - Vol. 121, №11. – P. 983-984.

282 Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome // *Nat Rev Cancer*. – 2012. - Vol. 12, №4. – P. 298-306.

283 Noble F., Mellows T., McCormick Matthews L.H., Bateman A.C., Harris S., Underwood T.J. et al. Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma // *Cancer Immunol Immunother*. – 2016. - Vol. 65, №6. – P. 651-662.

284 Pagès F., Kirilovsky A., Mlecnik B. et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer // *J Clin Oncol*. – 2009. - Vol. 27, №35. – P. 5944-5951.

285 Russell J.H., Ley T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity // *Annu Rev Immunol*. – 2002. - Vol. 20. – P. 323-370.

286 Mucida D., Husain M.M., Muroi S. et al. Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes // *Nat Immunol*. – 2013. - Vol. 14, №3. – P. 281-289.

287 Narayanan S., Kawaguchi T., Yan L., Peng X., Qi Q., Takabe K. Cytolytic Activity Score to Assess Anticancer Immunity in Colorectal Cancer // *Ann Surg Oncol*. – 2018. - Vol. 25, №8. – P. 2323-2331.

288 Mlecnik B., Tosolini M., Kirilovsky A. et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction // *J Clin Oncol*. – 2011. - Vol. 29, №6. – P. 610-618.

289 Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting // *Nat Rev Immunol*. – 2006. - Vol. 6, №11. – P. 836-848.

290 Xu X., Xu J., Wu J. et al. Phosphorylation-Mediated IFN- γ R2 Membrane Translocation Is Required to Activate Macrophage Innate Response // *Cell*. – 2018. - Vol. 175, №5. – P. 1336-1351.

291 Zhang Y., Luo Y., Qin S.L. et al. The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients // *Oncoimmunology*. – 2016. - Vol. 5, №5. – P. 1141857.

292 Masucci G.V., Cesano A., Hawtin R. et al. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer - pre-analytical and analytical validation // *J Immunother Cancer*. – 2016. - Vol. 1, №4. – P. 76.

- 293 Zhang J., Dang F., Ren J., Wei W. Biochemical Aspects of PD-L1 Regulation in Cancer Immunotherapy // Trends Biochem Sci. – 2018. - Vol. 43, №12. – P. 1014-1032.
- 294 Syn N.L., Teng M.W.L., Mok T.S.K., Soo R.A. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting // Lancet Oncol. – 2017. - Vol. 18, №12. – P. 731-741.
- 295 Berntsson J., Nodin B., Eberhard J., Micke P., Jirström K. Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer // Int J Cancer. – 2016. - Vol. 139, №5. – P. 1129-1139.
- 296 Baeten C.I., Castermans K., Hillen H.F., Griffioen A.W. Proliferating endothelial cells and leukocyte infiltration as prognostic markers in colorectal cancer // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2006. - Vol. 4, №11. – P. 1351-1357.
- 297 Kasajima A., Sers C., Sasano H. et al. Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer // Hum Pathol. – 2010. - Vol. 41, №12. – P. 1758-1769.
- 298 Edin S., Kaprio T., Hagström J. et al. The Prognostic Importance of CD20+ B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets // Sci Rep. – 2019. - Vol. 9, №1. – P. 19997.
- 299 Mlecnik B., Van den Eynde M., Bindea G. et al. Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on Survival // J Natl Cancer Inst. – 2018. - Vol. 110, №1. – P. 10.
- 300 Ditlevsen D.K., Povlsen G.K., Berezin V., Bock E. NCAM-induced intracellular signaling revisited // J Neurosci Res. – 2008. - Vol. 86, №4. – P. 727-743.
- 301 Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases // Cell Mol Immunol. – 2013. - Vol. 10, №3. – P. 230-252.
- 302 Krijgsman D., de Vries N.L., Skovbo A. et al. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile // Cancer Immunol Immunother. – 2019. - Vol. 68, №6. – P. 1011-1024.
- 303 Wang Y., Sun J., Gao W. et al. Preoperative Tim-3 expression on peripheral NK cells is correlated with pathologic TNM staging in colorectal cancer // Mol Med Rep. – 2017. - Vol. 15, №6. – P. 3810-3818.
- 304 Ribas A., Shin D.S., Zaretsky J. et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells // Cancer Immunol Res. – 2016. - Vol. 4, №3. – P. 194-203.
- 305 Hasumi K., Aoki Y., Wantanabe R., Mann D.L. Clinical response of advanced cancer patients to cellular immunotherapy and intensity-modulated radiation therapy // Oncoimmunology. – 2013. - Vol. 2, №10. – P. 26381.
- 306 Li X., Peng J., Pang Y. et al. Identification of a FOXP3(+)CD3(+)CD56(+) population with immunosuppressive function in cancer tissues of human hepatocellular carcinoma // Sci Rep. – 2015. - Vol. 5. – P. 14757.

- 307 Waziri A., Killory B., Ogden A.T. et al. Preferential in situ CD4+CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma // *J Immunol.* – 2008. - Vol. 180, №11. – P. 7673-7680.
- 308 Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor // *Nature.* – 2001. - Vol. 409, №6817. – P. 198-201.
- 309 Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K., Bach F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme // *Trends Immunol.* – 2003. - Vol. 24, №8. – P. 449-455.
- 310 Etzerodt A., Maniecki M.B., Møller K., Møller H.J., Moestrup S.K. Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163 // *J Leukoc Biol.* – 2010. - Vol. 88, №6. – P. 1201-1205.
- 311 Moller H.J. Soluble CD163. *Scand // J. Clin. Lab. Investig.* – 2012. - Vol. 72. – P. 1–13.
- 312 Kazankov K., Rode A., Simonsen K. et al. Macrophage activation marker soluble CD163 may predict disease progression in hepatocellular carcinoma // *Scand J Clin Lab Invest.* – 2016. - Vol. 76, №1. – P. 64-73.
- 313 Ding D., Yao Y., Yang C., Zhang S. Identification of mannose receptor and CD163 as novel biomarkers for colorectal cancer // *Cancer Biomark.* – 2018. - Vol. 21, №3. – P. 689-700.
- 314 Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends Immunol.* – 2004. - Vol. 25, №12. – P. 677-686.
- 315 Porcheray F., Viaud S., Rimaniol A.C. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation // *Clin Exp Immunol.* – 2005. - Vol. 142, №3. – P. 481-489.
- 316 Lissbrant I.F., Stattin P., Wikstrom P., Damber J.E., Egevad L., Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival // *Int J Oncol.* – 2000. - Vol. 17, №3. – P. 445-451.
- 317 Koide N., Nishio A., Sato T., Sugiyama A., Miyagawa S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus // *Am J Gastroenterol.* – 2004. - Vol. 99, №9. – P. 1667-1674.
- 318 Tsutsui S., Yasuda K., Suzuki K., Tahara K., Higashi H., Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density // *Oncol Rep.* – 2005. - Vol. 14, №2. – P. 425-431.
- 319 Shabo I., Olsson H., Elkarim R., Sun X.F., Svanvik J. Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer // *Cancer Microenviron.* – 2014. - Vol. 7, №1-2. – P. 61-69.
- 320 Waniczek D., Lorenc Z., Śnietura M., Wesecki M., Kopec A., Muc-Wierzgoń M. Tumor-Associated Macrophages and Regulatory T Cells Infiltration

and the Clinical Outcome in Colorectal Cancer // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2017. - Vol. 65, №5. – P. 445-454.

321 Shibutani M., Maeda K., Nagahara H. et al. The peripheral monocyte count is associated with the density of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of colorectal cancer: a retrospective study // BMC Cancer. – 2017. - Vol. 17, №1. – P. 404.

322 Forssell J., Oberg A., Henriksson M.L., Stenling R., Jung A., Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer // Clin Cancer Res. – 2007. - Vol. 13, №5. – P. 1472-1479.

323 Gulubova M., Ananiev J., Yovchev Y., Julianov A., Karashmalakov A., Vlaykova T. The density of macrophages in colorectal cancer is inversely correlated to TGF- β 1 expression and patients' survival // J Mol Histol. – 2013. - Vol. 44, №6. – P. 679-692.

324 Koelzer V.H., Canonica K., Dawson H. et al. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome // Oncoimmunology. – 2015. - Vol. 5, №4. – P. 1106677.

325 Протокол Объединенной комиссии по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения РК от 01.07.2022, №164 Клинический протокол диагностики и лечения "Злокачественные новообразования ободочной кишки" (одобрен Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 1 июля 2022 года протокол, №164) <https://medruk.mcfk.kz/#/document/93/19266/bssPhr2> 17.06.2023.

326 Imai T. Histological comparison of cancer of the stomach in autopsy and operation cases // Jpn J Cancer Res. – 1949. - Vol. 40. – P. 199-201.

327 Lim S.B., Yu C.S., Jang S.J., Kim T.W., Kim J.H., Kim J.C. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer // Dis Colon Rectum. – 2010. - Vol. 53, №4. – P. 377-384.

328 Huh J.W., Kim H.R., Kim Y.J. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer // Ann Surg Oncol. – 2010. - Vol. 17, №8. – P. 2066-2072.

329 Fagan J.J., Collins B., Barnes L., D'Amico F., Myers E.N., Johnson J.T. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 1998. - Vol. 124, №6. – P. 637-640.

330 Yilmaz T., Hosal A.S., Gedikoğlu G., Onerci M., Gürsel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx // Am J Otolaryngol. – 1998. - Vol. 19, №2. – P. 83-88.

331 Haruki K., Kosumi K., Li P. et al. An integrated analysis of lymphocytic reaction, tumour molecular characteristics and patient survival in colorectal cancer // Br J Cancer. – 2020. - Vol. 122, №9. – P. 1367-1377.

332 Iseki Y., Shibutani M., Maeda K. et al. A new method for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)-stained tumor sections // PLoS One. – 2018. - Vol. 13, №4. – P. 192744.

- 333 Akimoto N., Väyrynen J.P., Zhao M. et al. Desmoplastic Reaction, Immune Cell Response, and Prognosis in Colorectal Cancer // *Front Immunol.* – 2022. - Vol. 13. – P. 840198.
- 334 Sandberg T.P., Stuart M.P.M.E., Oosting J., Tollenaar R.A.E.M., Sier C.F.M., Mesker W.E. Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer // *BMC Cancer.* – 2019. - Vol. 19, №1. – P. 284.
- 335 Brown K.M., Xue A., Smith R.C., Samra J.S., Gill A.J., Hugh T.J. Cancer-associated stroma reveals prognostic biomarkers and novel insights into the tumour microenvironment of colorectal cancer and colorectal liver metastases // *Cancer Med.* – 2022. - Vol. 11, №2. – P. 492-506.
- 336 Arun Gopinathan P., Kokila G., Jyothi M., Ananjan C., Pradeep L., Humaira Nazir S. Study of Collagen Birefringence in Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma Using Picrosirius Red and Polarized Light Microscopy // *Scientifica.* – Cairo, 2015. - Vol. 5. – P. 802980.
- 337 Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis // *Nat Rev Cancer.* – 2009. - Vol. 9, №4. -P. 239-252.
- 338 Beacham D.A., Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression // *Semin Cancer Biol.* – 2005. - Vol. 15, №5. – P. 329-341.
- 339 Guinney J., Dienstmann R., Wang X. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer // *Nat Med.* – 2015. - Vol. 21, №11. – P. 1350-1356.
- 340 Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis // *Nat Med.* – 2013. - Vol. 19, №11. – P. 1423-1437.
- 341 Shunyakov L., Ryan C.K., Sahasrabudhe D.M., Khorana A.A. The influence of host response on colorectal cancer prognosis // *Clin Colorectal Cancer.* – 2004. - Vol. 1. – P. 38–45.
- 342 Loose D., Van de Wiele C. The immune system and cancer // *Cancer Biother Radiopharm.* – 2009. - Vol. 3. – P. 369–376.
- 343 Watson N.F, Ramage J.M., Madjd Z., Spendlove I., Ellis I.O., Scholefield J.H. et. al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis // *Int J Cancer.* – 2006. - Vol. 1. – P. 6–10.
- 344 Titu L.V., Monson J.R., Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer // *Cancer Immunol Immunother.* – 2002. - Vol. 5. – P. 235–247.
- 345 Ropponen K.M., Eskelinen M.J., Lipponen P.K., Alhava E., Kosma V.M. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer // *J Pathol.* – 1997. - Vol. 182, №3. – P. 318-324.
- 346 Di Caro G., Marchesi F., Laghi L., Grizzi F. Immune cells: plastic players along colorectal cancer progression // *J Cell Mol Med.* – 2013. - Vol. 17, №9. – P. 1088-1095.

- 347 Deschoolmeester V., Baay M., Lardon F., Pauwels P., Peeters M. Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI // *Cancer Microenvironment*. – 2011. - Vol. 4. – P. 377–392.
- 348 Kuczek D.E., Larsen A.M.H., Thorseth M.L. et al. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells // *J Immunother Cancer*. – 2019. - Vol. 7, №1. – P. 68.
- 349 Harold F., Dvorak M. Tumors: wounds that do not heal // *N Engl J Med*. – 1986. - Vol. 315. – P. 1650–1659.
- 350 Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // *Science*. – 2006. - Vol. 313, №5795. – P. 1960-1964.
- 351 Mlecnik B., Bindea G., Kirilovsky A. et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis // *Sci Transl Med*. – 2016. - Vol. 8, №327. – P. 327.
- 352 Mlecnik B., Bindea G., Angell H.K. et al. Functional network pipeline reveals genetic determinants associated with in situ lymphocyte proliferation and survival of cancer patients // *Sci Transl Med*. – 2014. - Vol. 6, №228. – P. 228.
- 353 Jhunjhunwala S., Hammer C., Delamarre L. Antigen Presentation in Cancer: Insights Into Tumour Immunogenicity and Immune Evasion // *Nat Rev Cancer*. – 2021. - Vol. 21. – P. 298–312.
- 354 Koliaraki V., Pallangyo C.K., Greten F.R., Kollias G. Mesenchymal Cells in Colon Cancer // *Gastroenterology*. – 2017. - Vol. 152, №5. – P. 964-979.
- 355 Mochizuki S., Ao T., Sugiura T. et al. Expression and Function of a Disintegrin and Metalloproteinases in Cancer-Associated Fibroblasts of Colorectal Cancer // *Digestion*. – 2020. - Vol. 101, №1. – P. 18-24.
- 356 Zhang J., Liu J. Tumor stroma as targets for cancer therapy // *Pharmacol Ther*. – 2013. - Vol. 137, №2. – P. 200-215.
- 357 Krijgsman D., De Vries N.L., Andersen M.N., Skovbo A., Tollenaar R.A., Møller H.J. et al. CD163 as a Biomarker in Colorectal Cancer: The Expression on Circulating Monocytes and Tumor-Associated Macrophages, and the Soluble Form in the Blood // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. - Vol. 21. – P. 5925.
- 358 Gruber E.S., Oberhuber G., Pils D., Stork T., Sinn K., Gruber S. et al. The determination of immunomodulation and its impact on survival of rectal cancer patients depends on the area comprising a tissue microarray // *Cancers*. – 2020. - Vol. 12. – P. 563.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №1 от 26.06.2023 гг. «Определения микроокружения опухоли (CD3, CD4, CD20, CD56, CD163)»

СОГЛАСОВАНО
Руководитель Актобинского
Областного управления
Здравоохранения
Исаев Р.К.
2023 г.

СОГЛАСОВАНО
И.о. Проректора по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова
Н.М.Мусин
2023 г.

АКТ № 1

внедрения научно-исследовательской работы
Медицинский центр НАО Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения ___ Определение микроокружения опухоли (CD3, CD4, CD20, CD56, CD163) при колоректальном раке.

Работа включена из ___ внедрена в инициативном порядке

(республиканского, областного планов внедрения:

___ планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов, внедрена в

инициативном порядке;

Форма внедрения ___ подготовка на рабочем месте

(лекции, семинары, подготовка на рабочем месте и прочее – указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель Иманбаев Н.М., Изтлеуов Е.М., Жумашева А.В.

Эффективность внедрения ___ лечебно-диагностическая: клетки опухоли могут избежать воздействие иммунного ответа через выделение интерлейкина 10, который блокирует активность Т-лимфоцитов. Увеличение CD3 в опухолевом микроокружении связано с более благоприятным прогнозом, приводит к уменьшению метастазов. CD4 регулирует иммунный ответ, секрецию цитокинов для управления иммунологическими процессами, стимулирует созревание В-клеток и активацию цитотоксических Т-клеток (CD8) и макрофагов. CD20 - регулирует активацию и пролиферацию В-лимфоцитов. CD 56 - маркер естественных киллеров CD4, CD8. CD163 - активирует макрофаги.

(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать)

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение ___ внедрять определение других клеток в микроокружении опухоли и при различных локализациях

Срок внедрения ___ 2023 год

Председатель комиссии
Руководитель МЦ НАО ЗКМУ им.М.Оспанова

Члены (ответственные за внедрение):

Исполнитель



Изтлеуов Е.М.

Жумашева А.В.

Иманбаев Н.М.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №2 от 26.06.2023 гг. «Определение паренхиматозно - стромального соотношения в опухолях толстого кишечника при колоректальном раке»

СОГЛАСОВАНО
Руководитель Актобинского
Областного управления
Здравоохранения

Исаев Р.К.

26.06.2023 г.



СОГЛАСОВАНО
И.о. Проректора по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова

Н.М.Мусин

26.06.2023 г.



АКТ № 2

внедрения научно-исследовательской работы
Медицинский центр НАО Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения — Определение паренхиматозно-стромального соотношения в опухолях толстого кишечника при колоректальном раке.

Работа включена из — внедрена в инициативном порядке

(республиканского, областного планов внедрения:

планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов, внедрена в

инициативном порядке;

Форма внедрения — подготовка на рабочем месте

(лекции, семинары, подготовка на рабочем месте и прочее – указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель Иманбаев Н.М., Изтлеуов Е.М., Жумашева А.В.

Эффективность внедрения — лечебно-диагностическая: Способность к построению разных пространственных клеточных структур отражает фенотипическое разнообразие инфильтрирующего рака, что обусловлено составом и свойствами молекул адгезии, обеспечивающих взаимодействие клеток между собой и с межклеточным матриксом. Изменения такого рода находятся в русле представлений об эпителиально-мезенхимальном переходе, своеобразной «мезенхимации» клеток опухоли в процессе ее опухолевой трансформации и приобретения способности к инвазивному росту и метастазированию.

(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать)

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение — внедрять определение паренхиматозно-стромального соотношения при различных локализациях

Срок внедрения — 2023 год

Председатель комиссии
Руководитель МЦ НАО ЗКМУ им. М.Оспанова

Члены (ответственные за внедрение):

Исполнитель

Изтлеуов Е.М.

Жумашева А.В.

Иманбаев Н.М.



Н ПРО БКМУ 605-03-2020. Ғылыми-зерттеу жұмысын ендіру акті. Алтыншы баслым.
Ф ПРО ЗКМУ 605-03-2020. Акт внедрения научно-исследовательской работы. Издание шестое.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт внедрения в практическую деятельность на базе МЦ НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова №3 от 26.06.2023 гг. «Определение микросателлитной нестабильности (MSI) как скрининговый тест для отбора пациентов с подозрением на синдром Линча»

СОГЛАСОВАНО
Руководитель Актюбинского
Областного управления
Здравоохранения
Исаев Р.К.
2023 г.

СОГЛАСОВАНО
И.о. Проректора по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова
Н.М.Мусин
26 июня 2023 г.

АКТ № 3
внедрения научно-исследовательской работы
Медицинский центр НАО Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова
(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения — Определение микросателлитной нестабильности (MSI) как скрининговый тест для отбора пациентов с подозрением на синдром Линча.

Работа включена из — внедрена в инициативном порядке
(республиканского, областного планов внедрения: _____ планов
внедрения научно-исследовательских, учебных институтов, внедрена в
инициативном порядке;
заимствована из методических рекомендаций,

журнальных статей, диссертацией, монографий – указать)
Форма внедрения — подготовка на рабочем месте
(лекции, семинары, подготовка на рабочем месте и прочее – указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель Иманбаев Н.М., Изглеуов Е.М., Жумашева А.В.

Эффективность внедрения — лечебно-диагностическая: Высокая степень MSI является показанием для назначения ингибиторов рецептора PD-1, пембролизумаба и ниволумаба, при метастатическом раке толстой кишки
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать)

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение _____ внедрять
определение и других генных мутации _____
Срок внедрения — 2023 год

Председатель комиссии
Руководитель МЦ НАО ЗКМУ им.М.Оспанова

Изглеуов Е.М.

Члены (ответственные за внедрение):

Жумашева А.В.

Исполнитель

Иманбаев Н.М.

Н ПРО БҚМУ 605-03-2020. Ғылыми-зерттеу жұмысын ендіру акті. Алматы қаласы.
Ф ПРО ЗКМУ 605-03-2020. Акт внедрения научно-исследовательской работы. Издание шестое.