

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Наумов Сергей Сергеевич

**ЭКСПРЕССИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ PD-L1, CTLA-4,
LAG3 И ПАРАМЕТРЫ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ РАКЕ
ТОЛСТОЙ КИШКИ**

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Вторушин Сергей Владимирович

Томск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	15
1.1 Эпидемиология рака толстой кишки.	15
1.2 Современная морфологическая классификация злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки.	18
1.3 Молекулярно-генетические аспекты рака толстой кишки.	24
1.4 Иммунное микроокружение при раке толстой кишки.	29
1.5 Значение экспрессии иммунорегуляторных белков PD-L1, CTLA-4 и LAG-3 при раке толстой кишки.	38
1.5.1 Роль белка PD-L1 в опухолевом микроокружении и прогнозе рака толстой кишки.	38
1.5.2 Значение экспрессии CTLA-4 при раке толстой кишки.	43
1.5.3 Регуляторная роль LAG-3 при злокачественных опухолях и раке толстой кишки.	47
1.6 Заключение.	51
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	53
2.1 Клиническая характеристика пациентов.	53
2.2 Патоморфологические методы исследования.	57
2.2.1 Гистологическое исследование.	57
2.2.2 Иммуногистохимическое исследование.	59
2.3 Статистическая обработка результатов.	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.	69
3.1. Взаимосвязь патоморфологических характеристик и клинических параметров при раке толстой кишки.	69
3.2 Оценка взаимосвязи pMMR/dMMR статуса опухоли с клиничко- морфологическими параметрами рака толстой кишки.	93
3.3 Мультиплексный иммуногистохимический анализ клеток опухолевого микроокружения и экспрессии молекул иммунных контрольных точек при	

раке толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса.	101
3.4 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у больных раком толстой кишки.	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	129
ВЫВОДЫ.	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	144
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Рак толстой кишки (РТК) представляет собой одну из наиболее значимых проблем современной онкологии, занимая третье место в структуре онкологической заболеваемости в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодная заболеваемость РТК превышает 1,1 миллиона новых случаев, что составляет 11 % от всех впервые диагностированных злокачественных новообразований [90]. В Российской Федерации в 2023 году было зарегистрировано более 74 тысяч новых случаев РТК, что соответствует 10,6 % в структуре онкологической заболеваемости [1].

Современное понимание биологии РТК основывается на комплексной оценке как клинических параметров (возраст пациентов, локализация опухоли, стадия TNM), так и патоморфологических характеристик новообразования. Стандартизированный протокол патоморфологического исследования включает определение гистологического типа, степени дифференцировки карциномы, статуса краев резекции, наличия экстрамуральной и перитуморальной сосудистой инвазии, периневральной инвазии, оценку феномена «опухолевого почкования» (tumor budding), а также определение статуса системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR) или микросателлитной нестабильности (MSI) [2].

Особую значимость в прогнозировании течения РТК имеет определение статуса MMR/MSI. Опухоли с дефицитом системы репарации (dMMR/MSI) составляют до 20 % всех случаев [148] и характеризуются более благоприятным прогнозом по сравнению с опухолями с профицитом системы репарации (pMMR/MSS) [27, 135]. Данное различие может быть обусловлено особенностями опухолевого микроокружения, в частности, более выраженной иммунной инфильтрацией, связанной с повышенной неоантигенной нагрузкой в dMMR/MSI опухолях [135].

Иммунное микроокружение РТК характеризуется сложной архитектурой и включает как противоопухолевые, так и проопухолевые компоненты [111].

Ключевыми элементами противоопухолевого иммунитета являются опухолинфильтрирующие лимфоциты (TILs), представленные различными субпопуляциями CD3⁺ Т-клеток, включая CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты [64]. Количественная оценка CD3⁺ и CD8⁺ TILs легла в основу разработки прогностического индекса Immunoscore [88, 118]. Проопухолевый компонент микроокружения представлен преимущественно опухоль-ассоциированными макрофагами (TAM) M2 фенотипа [178], высокая плотность которых коррелирует с неблагоприятным прогнозом и резистентностью к терапии [31, 219].

Особое значение в регуляции противоопухолевого иммунного ответа имеют молекулы иммунных контрольных точек (ИКТ), включая CTLA-4, LAG-3 и PD-L1. Конститутивная экспрессия данных молекул ассоциирована с истощением Т-клеточного звена иммунитета [48, 76]. В настоящее время ингибиторы контрольных точек (анти-PD-1/PD-L1, анти-CTLA-4) успешно применяются в клинической практике [5, 30, 85, 104, 105], а LAG-3 рассматривается как перспективная терапевтическая мишень [107].

Несмотря на достигнутые успехи в области иммунотерапии, существенной проблемой остается первичная и приобретенная резистентность к ингибиторам контрольных точек. По данным клинических исследований, частота объективного ответа на анти-PD-1/PD-L1 терапию у пациентов с MSI-H/dMMR колоректальным раком составляет 33–55 %, в то время как у значительной части пациентов эффект отсутствует, несмотря на благоприятный молекулярный статус опухоли [17]. Это указывает на необходимость поиска дополнительных предиктивных биомаркеров эффективности иммунотерапии. В современной литературе представлены противоречивые данные относительно прогностической значимости различных компонентов иммунного микроокружения. В частности, отсутствует консенсус в отношении пороговых значений плотности TILs и TAM, а также их пространственного распределения в строме и паренхиме опухоли [22, 39, 43, 106]. Кроме того, остается дискуссионным вопрос о прогностическом значении коэкспрессии различных иммунных контрольных точек и их лигандов в контексте различных молекулярных подтипов колоректального рака. На сегодняшний день

отсутствует унифицированная система комплексной оценки иммунного микроокружения, которая бы интегрировала данные о количественном составе иммунных клеток, их пространственном распределении и функциональном статусе. Разработка такой системы представляется критически важной для персонализации лечения пациентов с РТК, особенно в контексте выбора оптимальной тактики иммунотерапии и прогнозирования ее эффективности. Существующие методы оценки, такие как Immunoscore, учитывают лишь отдельные параметры иммунного ответа и не отражают всей сложности взаимодействий в опухолевом микроокружении [89].

Таким образом, комплексное изучение патоморфологических характеристик РТК в сочетании с детальным анализом компонентов иммунного микроокружения и экспрессии молекул иммунных контрольных точек представляется необходимым для более глубокого понимания гетерогенности иммунного ландшафта данного заболевания. Полученные результаты могут способствовать разработке персонализированных подходов к прогнозированию течения заболевания и оптимизации тактики лечения пациентов с РТК.

Степень разработанности темы диссертации

Существующие современные данные о гетерогенности молекулярно-генетических характеристик рака толстой кишки позволили расширить понимание о биологии опухоли и сформулировать новые подходы к лечению пациентов с данным заболеванием [138, 218]. Однако механизмы прогрессии опухоли и формирования резистентности опухоли к терапии продолжают изучаться. В связи с этим в последнее время нарастает интерес к иммунному микроокружению опухоли как к субстрату, который способен запускать механизмы как ингибирования опухоли, так и ее прогрессии, что особенно актуально в связи с активным внедрением в клиническую практику препаратов ингибиторов контрольных точек [98, 107, 111].

В настоящее время особого внимания заслуживает исследование экспрессии молекул контрольных точек PD-L1, CTLA-4, LAG-3, что обусловлено их

значением в развитии и прогрессии злокачественных новообразований [98]. Изучение роли данных белков при раке толстой кишки заслуживает особого внимания ввиду гетерогенного иммунного ландшафта опухолей данной локализации.

На сегодняшний день существующие данные позволяют сделать вывод о том, что причиной неоднородности иммунного профиля опухолей толстой кишки может являться MMR статус карциномы, определение которого на диагностическом этапе носит прогностический и предиктивный характер для ответа на назначаемую терапию [135, 138].

Тем не менее, работ, направленных на исследование популяционного состава опухолевого иммунного микроокружения и анализа экспрессии ключевых белков иммунных контрольных точек (PD-L1, CTLA-4, LAG-3) в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли при раке толстой кишки, остается крайне мало, что, безусловно, ограничивает формирование новых критериев прогноза течения заболевания и понимание дополнительных механизмов прогрессии.

Следовательно, изучение экспрессии иммунных контрольных точек и состава опухолевого микроокружения, а также их взаимосвязи с рядом патоморфологических характеристик, вероятно, позволит повысить значимость морфологического и иммуногистохимического методов исследования, что является важным шагом к персонифицированному подходу в лечении пациентов с раком толстой кишки.

Цель исследования

Исследовать популяционный состав опухолевого микроокружения, экспрессию иммунорегуляторных белков PD-L1, CTLA-4, LAG3 в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли и клинико-патоморфологических параметров рака толстой кишки.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-морфологические особенности рака толстой кишки в зависимости от гистологического типа и pMMR/dMMR статуса опухоли.
2. Исследовать феномен опухолевого почкования, его связь с перинеуральной и лимфоваскулярной инвазией, pMMR/dMMR статусом опухоли, а также оценить влияние данного феномена на частоту регионарного и гематогенного метастазирования.
3. Определить особенности экспрессии иммунных контрольных точек (PD-L1, CTLA-4, LAG-3) в клетках микроокружения опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса, а также проанализировать связь между экспрессией этих белков и плотностью CD3+ и CD8+ лимфоцитов.
4. Провести сравнительный анализ соотношения CD3+/CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и количества CD163+ макрофагов в центре и на инвазивном крае опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса при раке толстой кишки.
5. Изучить взаимосвязь между плотностью инфильтрации и популяционным составом лимфоцитов в строме опухоли, экспрессией иммунных контрольных точек и параметрами регионарного метастазирования при раке толстой кишки.

Научная новизна

Впервые установлено, что феномен опухолевого почкования ассоциирован с более частым выявлением лимфоваскулярной инвазии и большей частотой регионарного метастазирования при раке толстой кишки и не связан с pMMR/dMMR статусом опухоли. Степень выраженности этого феномена сопряжена с повышенной частотой развития отдаленных метастазов у больных раком толстой кишки.

Впервые показано, что экспрессия иммунных контрольных точек (PD-L1, CTLA-4, LAG-3) в клетках опухолевого микроокружения значительно выше в инвазивном фронте аденокарцином толстой кишки с dMMR статусом по

сравнению с pMMR опухолями.

Впервые выявлено, что количество CD163+ макрофагов достоверно преобладает в центре и на инвазивном крае карцином с дефицитом белков системы репарации неспаренных оснований по сравнению с pMMR опухолями.

Выявлена взаимосвязь между экспрессией белков иммунных контрольных точек и плотностью инфильтрации CD3+ лимфоцитами в dMMR опухолях. В карциномах с pMMR-статусом установлена связь между экспрессией PD-L1, CTLA-4, LAG-3 и плотностью CD8+ лимфоцитов.

Установлено, что соотношение CD3+/CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов выше в опухолях с dMMR статусом по сравнению с pMMR карциномами.

Показана обратная корреляционная связь между количественной плотностью CD8+PD-L1+ и CD8+LAG3+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении, экспрессией PD-L1 в иммунных клетках центра опухоли и числом метастатически пораженных регионарных лимфатических узлов при раке толстой кишки.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования расширяют современные представления о патогенезе рака толстой кишки, углубляя знания о роли микроокружения опухоли, включая феномен опухолевого почкования, экспрессию иммунных контрольных точек (PD-L1, CTLA-4, LAG-3) и клеточный состав микроокружения в зависимости от MMR статуса опухоли. Выявленные корреляции между гистологическими характеристиками опухоли, микросателлитным статусом, особенностями иммунного ответа и прогностическими факторами (включая глубину инвазии pT и регионарное метастазирование pN) способствуют уточнению молекулярных механизмов прогрессии опухоли. Полученные данные могут служить основой для дальнейших фундаментальных исследований, направленных на разработку новых подходов к персонализированной диагностике и терапии рака толстой кишки.

Выявленные прогностические значения плотности CD8+PD-L1+ и CD8+LAG3+ лимфоцитов и экспрессии PD-L1 в иммунных клетках центра опухоли могут использоваться для определения благоприятного прогноза и потенциального ответа на иммунотерапию.

В результате проведённого научного исследования были разработаны и валидированы две прогностические модели для оценки риска формирования отдалённых метастазов у пациентов с колоректальной карциномой. Первая модель, базирующаяся на патоморфологических параметрах (включая количество метастатически изменённых лимфатических узлов, феномен опухолевого почкования и сосудистую инвазию), демонстрирует высокую предиктивную точность в отношении вероятности отдалённого метастазирования с показателями чувствительности и специфичности 80,0 % и 85,0 % соответственно. Вторая разработанная модель, инкорпорирующая данные об экспрессии CD163+PD-L1+ и CD163+PD-L1– макрофагальных популяций в неопластической ткани, предоставляет дополнительные возможности для стратификации риска метастатического прогрессирования с чувствительностью 70,0 % и специфичностью 70,0 %. Полученные результаты имеют потенциал для интеграции в стандартизированные протоколы патоморфологической верификации колоректального рака, что может способствовать повышению диагностической точности и оптимизации персонализированных терапевтических стратегий для данной категории пациентов.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологический фундамент данного диссертационного исследования базируется на актуальных научных концепциях, касающихся клинико-патоморфологических параметров карциномы толстой кишки и особенностей её иммунного микроокружения. Исследовательский подход интегрирует современные представления о структурно-функциональной организации неопластического процесса и иммунологических характеристиках рака толстой кишки. Исследование проводилось поэтапно. На первом этапе осуществлялся

набор операционного материала, морфологическая оценка гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, а также анализ ключевых клинико-патологических параметров заболевания у пациентов с раком толстой кишки. На втором этапе проводилось ретроспективное иммуногистохимическое исследование с целью оценки экспрессии белков репарации неспаренных нуклеотидов. Следует отметить, что исследуемые группы были сформированы искусственно, с учетом задач работы, поскольку доля карцином с дефицитом белков системы репарации неспаренных оснований (dMMR) в общей популяции значительно ниже. Такой подход позволил обеспечить достаточное количество случаев для достоверного анализа и сравнений между группами. На заключительном этапе в сформированных группах выполнялся мультиплексный иммуногистохимический анализ для оценки экспрессии молекул иммунных контрольных точек и характеристик клеток опухолевого микроокружения в различных компартментах опухолевой ткани.

Полученные данные были подвергнуты анализу с использованием корректных статистических методов. Дизайн исследования разработан в соответствии с принципами добровольности и конфиденциальности. Работа выполнена с соблюдением научных стандартов и принципов биоэтики.

Положения, выносимые на защиту

1. Микросателлитный статус рака толстой кишки (pMMR/dMMR) определяет особенности иммунного микроокружения опухоли с характерной высокой экспрессией иммунных контрольных точек (PD-L1, CTLA-4, LAG-3) в инвазивном фронте опухолей с dMMR статусом, преобладанием соотношения CD3⁺/CD8⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и повышенным количеством CD163⁺ макрофагов.

2. Степень опухолевого почкования является значимым прогностическим фактором при раке толстой кишки, коррелирующим с перинеуральной и лимфоваскулярной инвазией, частотой регионарного и гематогенного метастазирования, и не зависит от pMMR/dMMR статуса опухоли.

3. Высокая плотность CD8+PD-L1+, CD8+LAG3+ лимфоцитов в строме опухоли и экспрессия PD-L1 в иммунных клетках центра опухоли являются благоприятными прогностическими факторами, связанными с меньшим числом пораженных регионарных лимфатических узлов при раке толстой кишки.

Степень достоверности

Валидность полученных научных результатов обоснована адекватным объемом исследованного гистологического материала, применением современного аналитического инструментария и высокотехнологичных методологических подходов, включающих комплексные морфологические и иммуногистохимические исследования, а также мультиплексный анализ. Достоверность выводов дополнительно подтверждается корректно проведенными методами статистической обработки данных с использованием соответствующих алгоритмов анализа.

Апробация работы

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на 6-м Международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради Жизни – FOR LIFE!» (Москва 2023); 27-м Российском онкологическом конгрессе (Москва 2023); 12-й Научно-практической конференции с международным участием «ПУТЬ В НАУКУ» (Москва 2023); 8-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. В. Донских (Новосибирск, 2023); 36-м Европейском конгрессе патологов (Флоренция, 2024).

Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и отделения общей и молекулярной патологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, 2025).

Внедрение результатов исследования

Результаты проведённого исследования внедрены в образовательный процесс кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России в рамках дисциплины «Патологическая анатомия, клиническая патологическая анатомия», в разделе «Злокачественные опухоли». Полученные данные используются для углубленного изучения молекулярных характеристик опухолей, оценки микроокружения и его влияния на течение заболевания. Кроме того, результаты исследования внедрены в практическую деятельность отделения общей и молекулярной патологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», где они применяются для совершенствования диагностики и прогнозирования течения злокачественных опухолей на основе морфологических и молекулярных критериев.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 4 статьи в журналах категории K1, входящих в список изданий, распределённых по категориям K1, K2, K3, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственные результаты, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Список

литературы представлен 244 источниками, из которых 241 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 36 Таблиц и 43 Рисунков.

Личный вклад автора

Автор осуществлял самостоятельный набор клинического материала, проводил комплексный анализ клинических параметров и терапевтических исходов у пациентов, включенных в исследовательскую когорту. Принимал непосредственное участие в разработке дизайна исследования, методологических протоколов морфологического и иммуногистохимического исследования, анализе первичных результатов, их статистической верификации, интерпретации полученных данных и их последующей презентации в формате научных публикаций и устных докладов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология рака толстой кишки

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак толстой кишки является одним из наиболее распространённых в мире злокачественных новообразований, занимая пятое место в структуре онкологической заболеваемости. Количество впервые диагностируемого РТК среди лиц обоих полов ежегодно составляет 1,1 млн, а число летальных исходов превышает 570 тысяч [90].

В Российской Федерации рак толстого кишечника также является одной из самых распространенных онкологических нозологий. Так, за 2023 год на территории было зарегистрировано свыше 74 тысяч новых случаев РТК, что составляет 10,6 % от всех злокачественных новообразований. При этом количество летальных исходов в течение года с момента установления диагноза составило более 19 % [1].

В настоящее время особое значение уделяется ранней диагностике рака толстой кишки. Было показано, что в случае выявления опухоли на первой клинической стадии пятилетняя выживаемость достигает 99 %. В случаях, когда опухоль была обнаружена на II клинической стадии, показатели пятилетней выживаемости составляют 68–83 %; при III клинической стадии пятилетней выживаемости достигают 45–65 % больных; в то время как для пациентов с наличием отдаленных метастазов – четвертая клиническая стадия – пятилетняя выживаемость составляет менее 12 % [138, 191]. Однако общая продолжительность жизни у пациентов с РТК не превышает 60 %, поскольку данное заболевание в большинстве случаев выявляется на поздних клинических стадиях [138]. При этом также была установлена связь между безрецидивной выживаемостью и стадией заболевания: так, среди пациентов со II стадией частота рецидивов в течение 5 лет составляет 12–38 %. В свою очередь, у больных с III стадией пятилетняя безрецидивная выживаемость не превышает 50 % [138].

С позиции этиологии можно выделить следующие группы карцином толстой кишки: спорадический рак – 70 % случаев, семейный рак – 20 % и наследственный синдромальный рак – 10 % [50]. Наиболее распространенный спорадический вариант РТК встречается среди населения старше 65 лет. Рак толстой кишки, выявленный среди лиц данной возрастной группы, принято характеризовать так же, как рак с поздним началом, поскольку его развитие напрямую сопряжено с модифицируемыми факторами риска, к которым относятся: употребление в пищу красного мяса и алкоголя, курение, гиподинамия и ожирение [26, 29, 175]. При этом было установлено, что избыточная масса тела является наиболее значимым фактором риска. Так, согласно метаанализу 13 когортных исследований, было показано, что прибавка в весе на 5 кг была связана с увеличением риска развития колоректального рака на 3 % [36]. В свою очередь, сочетание немодифицируемого фактора риска (мужской пол) в сочетании с модифицируемым (ожирение) может увеличивать риск развития рака толстой кишки до 50 %, при этом для женщин этот показатель составляет 20 % [36]. Немодифицируемыми факторами в развитии спорадического рака являются: мужской пол, возраст, этническая принадлежность, однако наиболее значимым считается наличие в анамнезе воспалительных заболеваний толстого кишечника, а именно неспецифического язвенного колита (НЯК) и болезни Крона, поскольку данные патологии обладают кумулятивным риском в отношении развития РТК [52, 191]. В свою очередь, рак толстой кишки, возникший в возрастной группе до 50 лет при условии наличия у пациента родственников первой линии, у которых был также выявлен колоректальный рак, следует рассматривать как семейный вариант РТК. Стоит отметить, что факт наличия РТК у родственника первой линии родства увеличивает риск развития рака толстой кишки в 3–6 раз [191]. Наименее распространенной этиологической формой является наследственный синдромальный рак толстой кишки, развитие которого может быть обусловлено синдромом Линча, семейным аденоматозным полипозом, МҮН-ассоциированным полипозом, а также синдромом гамартоматозного полипоза [99].

Определение групп населения, наиболее подверженных риску развития РТК, а также онкогенных факторов риска, к сожалению, не привели к глобальному снижению заболеваемости и смертности от данной патологии. Отмечается рост заболеваемости РТК во всех возрастных группах, однако наибольший ежегодный прирост за последнее 10 лет наблюдается у лиц в возрастном диапазоне 50–54 года [54]. Данная тенденция объяснима тем, что скрининговые программы захватывают все большее количество населения, а возрастной диапазон включения в них снижается [53]. При этом в западном полушарии отмечается рост заболеваемости РТК с ранним началом: к данной группе относятся все случаи впервые выявленного РТК у пациентов младше 50 лет [70, 120]. Согласно математической модели, полученной Baily SE с соавторами, в период с 2015 по 2030 год ожидается прирост заболеваемости раком толстой кишки на 90 % в возрастной группе 20–34 года и на 27,7 % среди лиц 35–39 лет [116]. В структуре рака толстой кишки с ранним началом также преобладают спорадические карциномы (50 %), в то время как наследственный синдромальный рак составляет 30 %, остальные 20 % являются семейными вариантами заболевания [72]. Однако, в отличие от рака с поздним началом, карциномы у пациентов в молодом возрасте, как правило, выявляются на IV клинической стадии и представлены преимущественно аденокарциномами high-grade (низкодифференцированными), а также муцинозными аденокарциномами, что обуславливает их более высокий метастатический потенциал [15, 42, 209]. При этом ряд ретроспективных исследований демонстрирует противоречивые данные сравнительного анализа пятилетней выживаемости пациентов с РТК с ранним и поздним началом. Согласно одним данным, пациенты молодого возраста с наличием регионарных и отдаленных метастазов имеют больший процент выживаемости в сравнении с пациентами среднего и пожилого возрастов, что, вероятно, связано с меньшим количеством сопутствующих заболеваний, более высокой толерантностью к химиотерапевтическому лечению и низким процентом послеоперационных осложнений [230]. В то же время, ряд других исследований не выявил

значительных различий в выживаемости между пациентами с метастатическим раком толстой кишки с ранним и поздним началом [4, 213].

В настоящее время, несмотря на понимание различных факторов риска, выявления этиологических групп, наиболее подверженных развитию рака толстой кишки, внедрение в рутинную практику скрининговых методов исследования, в том числе, высокотехнологичных, в случае выявления рака – ключевым критерием прогноза течения и формирования подхода к лечению по-прежнему остается патоморфологическое и молекулярно-генетическое исследование опухоли. Современный протокол патоморфологической оценки неопластических процессов толстой кишки характеризуется интеграцией множественных диагностически значимых параметров, включающих: топографические характеристики опухолевого очага, стадирование по системе pTNM, гистологическую классификацию, степень гистологической дифференцировки неоплазии, статус границ резекции, наличие экстрамуральной и перитуморальной васкулярной инвазии, периневральной инвазии. Особое внимание уделяется исследованию инфильтративного края опухоли для идентификации феномена «опухолевого почкования» (tumor budding). Неотъемлемым компонентом диагностического алгоритма является определение статуса белков системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR – mismatch repair) и/или оценка микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability), что имеет принципиальное значение для молекулярной стратификации опухолей данной локализации [138].

1.2 Современная морфологическая классификация злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки

В настоящее время в практическом здравоохранении используется 5-я классификация опухолей толстой и прямой кишки Всемирной Организации здравоохранения (2019), которая значительно отличается от издания 2010 г. [67]. Основные изменения заключаются в том, что классификация 2019 г. является

менее емкой в сравнении с предыдущим изданием и включает следующие группы: доброкачественные и злокачественные опухоли эпителиального происхождения, нейроэндокринные опухоли и нейроэндокринные карциномы. Стоит отметить, что из настоящей классификации исключены мезенхимальные опухоли и лимфомы, поскольку они были вынесены в отдельные разделы.

Современная морфологическая классификация злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки представлена одиннадцатью морфологическими вариантами, 8 из которых представляют собой подтипы аденокарциномы неспецифического типа (англ. NOS – not otherwise specified), частота встречаемости которой может составлять до 90 % от всех выявляемых в рутинной практике случаев. Однако морфологические подтипы аденокарциномы неспецифического типа представляют собой гетерогенную популяцию опухолей, имеющих различные молекулярные профили и, соответственно, механизмы развития, что определяет прогноз течения заболевания.

Одним из наиболее распространенных по частоте встречаемости подтипов является зубчатая аденокарцинома (до 12 % от всех раков ободной кишки) [154]. Опухоли данного подтипа морфологически характеризуются наличием эпителиальных зубцов и зубчатого просвета, что придает схожесть с зубчатыми образованиями, но в отличие от последних в карциноме могут встречаться участки муцинообразования и участки некроза, по площади не более чем 10 % всего среза. Зубчатым аденокарциномам свойственны также базально расположенные ядра с конденсацией хроматина по периферии ядра.

При данном гистологическом варианте карциномы наблюдается высокая частота мутаций в онкогенах *KRAS* (33 % случаев) и *BRAF* (45 % случаев), что дополняется микросателлитной нестабильностью, выявляемой приблизительно в 20 % случаев [84]. Зубчатая аденокарцинома характеризуется более неблагоприятным прогнозом по сравнению с аденокарциномой неспецифического типа, что обусловлено повышенной частотой лимфогенного метастазирования, наличием феномена опухолевого почкования, а также редуцированной перитуморальной лимфоцитарной инфильтрацией [45, 236]. Данные

молекулярно-генетические и морфологические особенности опухоли существенно влияют на клиническое течение заболевания и определяют более агрессивный биологический потенциал зубчатых неоплазий толстой кишки.

Муцинозная аденокарцинома, так же как зубчатая, является наиболее встречаемым морфологическим вариантом рака толстого кишечника, составляя до 10–15 % от всех выявленных опухолей данной локализации [224]. Согласно современной классификации, для постановки диагноза муцинозной аденокарциномы в пределах исследованной опухоли необходимо, чтобы было обнаружено 50 % и более внеклеточного муцина от всей площади. В случае, если количество муцина меньше указанного порога, опухоль представляет собой аденокарциному с муцинообразованием [67]. Установлено, что, муцинозная аденокарцинома чаще имеет правостороннюю локализацию и более неблагоприятный прогноз, чем аденокарцинома неспецифического типа, что связано с меньшей пятилетней выживаемостью [11,145]. Муцинозная аденокарцинома характеризуется высокой частой мутаций гена *KRAS*, а также *BRAF* [155]. Стоит также отметить, что в 15 % случаев среди муцинозных аденокарцином обнаруживается микросателлитная нестабильность, как правило данные опухоли имеют выраженную лимфоидную инфильтрацию с формированием «Крона-подобной» реакции по периферии опухоли [145].

Медуллярная аденокарцинома представляет собой одну из наиболее редких форм рака толстого кишечника, частота встречаемости которой составляет 0,29–3,0 % [57, 143, 189]. Морфологически данные опухоли характеризуются синцитиальным характером роста и наличием неопластических клеток с везикулярными ядрами, выступающими ядрышками и обильной эозинофильной цитоплазмой, расположенной в виде плотных пластинок. По периферии опухоли определяется выраженная лимфоидная инфильтрация. Медуллярная карцинома может быть дифференцирована с нейроэндокринными опухолями, однако в ней будет утрачена экспрессия нейроэндокринных маркеров [67]. Медуллярный рак, как правило, имеет правостороннюю локализацию и чаще выявляется у пациентов женского пола [189]. Данные опухоли характеризуется преобладанием

микросателлитной нестабильности, а также низким уровнем экспрессии белка p53. Клинически имеют более благоприятный прогноз в сравнении с низкодифференцированной карциномой неспецифического типа [65].

Микропапиллярная аденокарцинома является одним из наиболее редких гистологических вариантов рака толстого кишечника. Данная опухоль характеризуется наличием мелких папиллярных скоплений клеток, которые окружены плотной фиброзной стромой и лакунарными пространствами, наличие которых должно составлять более 5 % от площади опухоли для постановки диагноза [67]. С прогностической точки зрения данный морфологический подтип является крайне агрессивным и характеризуется лимфогенным метастазированием даже на ранних стадиях, а также перинеуральной инвазией [55]. Было установлено, что пациенты с микропапиллярной аденокарциномой клинической стадии I-II имеют более низкую пятилетнюю выживаемость, чем больные с аденокарциномой неспецифического типа [147].

Несмотря на то, что описание и критерии постановки диагноза дискогезивной аденокарциномы, также имеющей место в классификации ВОЗ 5-го пересмотра, не приведены, стоит отметить, что данный морфологический вариант обладает идентичным ICD-O (8 490/3) кодом с перстневидно-клеточной карциномой желудка. В данном контексте отсутствие четко установленных диагностических критериев, вероятно, не представляет собой критического ограничения, однако с точки зрения практического применения этот факт существенно затрудняет имплементацию данной морфологической дефиниции в клиническую практику. Диагностические критерии рассматриваемого морфологического варианта предположительно имеют сходство с таковыми при карциноме желудка и могут включать: наличие изолированных опухолевых клеток или их организацию в мелкие кластеры, при этом клеточный полиморфизм может проявляться не только в виде классических перстневидных форм, но также в виде клеток, морфологически напоминающих гистиоциты, лимфоциты, полиморфные элементы с выраженным ядерным атипизмом или интенсивно эозинофильной цитоплазмой, сопровождающихся выраженной стромальной

реакцией [3, 67].

Перстневидно-клеточная аденокарцинома является редким морфологическим вариантом, составляя 0,6–2,7 % от общего количества аденокарцином толстой кишки в популяции [228]. Данный подтип характеризуется наличием клеток с большим количеством внутриклеточного муцина, за счет которого ядро расположено эксцентрично, в связи с чем клетка становится схожа с «перстнем». При этом для постановки диагноза необходимо, чтобы количество таких клеток превышало 50 %. Опухоли данного морфологического подтипа выявляются у пациентов более молодого возраста на поздних клинических стадиях, как правило локализируются в левой половине кишечника, характеризуются высоким процентом лимфоваскулярной инвазии и обладают более агрессивным течением [37]. При молекулярно-генетическом методе исследования данные опухоли характеризуются микросателлитной нестабильностью и мутацией гена *BRAF*, а также отсутствием мутации гена *KRAS* [223].

Аденоплоскоклеточная аденокарцинома встречается в 0,06–0,18 % случаев РТК, для данных опухолей характерна смешанная морфология, которая включает в себя железистый и плоскоклеточный компоненты [46, 181]. При данном варианте непосредственно в плоскоклеточном компоненте определяется положительная экспрессия CK5/6 [9]. Локализация опухоли преимущественно затрагивает левую половину толстого кишечника, при этом не было установлено взаимосвязи между данным подтипом рака толстого кишечника и полом, возрастом больных, а клинически данные опухоли характеризуются более агрессивным течением [46, 154]. При молекулярно-генетическом исследовании Ye. F. с коллегами установили, что для аденоплоскоклеточных карцином в 57,1 % случаев характерна мутация гена *KRAS*, а также наличием микросателлитной нестабильности характеризуются 27,3 % опухолей [46].

Аденомоподобная аденокарцинома является также одним из морфологических вариантов рака толстой кишки. Для морфологического подтверждения данного варианта необходимо, чтобы более 50 % от площади

опухоли имело аденомоподобную морфологию, при этом десмоплазия стромы отсутствует или минимальная [67]. Аденомоподобная аденокарцинома, как правило, локализуется в правой половине толстой кишки, характеризуется благоприятным клиническим прогнозом, а также высокой частотой мутаций гена *KRAS* [8].

Карциномы с саркоматоидным компонентом являются редкими и агрессивными опухолями, для установления такого морфологического диагноза необходимо наличие в опухоли саркомоподобных признаков с наличием веретенновидноклеточных фокусов и признаков рабдоидной дифференцировки. Опухолевые клетки характеризуются значительным увеличением размеров и локализуются в миксоидном матриксе, демонстрируя наличие внутрицитоплазматических рабдоидных включений. Морфологическая картина может варьировать с присутствием плеоморфных гигантских или веретенновидных клеточных элементов, сосуществующих с участками железистой дифференцировки. Ключевым диагностическим иммуногистохимическим критерием является отсутствие ядерной экспрессии белка SMARCB1 (INI1), что служит важным молекулярным маркером данного гистологического варианта и отражает специфические генетические альтерации, лежащие в основе его патогенеза [67].

Недифференцированная аденокарцинома является диагнозом исключения и устанавливается в случае, если опухоль лишена морфологических и иммуногистохимических признаков, указывающих на принадлежность к кому-либо подтипу, а также по результатам молекулярно-генетического анализа с использованием метода секвенирования нового поколения (англ. NGS-next generation sequencing) [67].

1.3 Молекулярно-генетические аспекты рака толстой кишки

Клиническое течение заболевания напрямую обусловлено морфологической гетерогенностью рака толстой кишки, что, в свою очередь, связано с локализацией опухоли и ее молекулярно-генетическими характеристиками. Так, установлено, что опухоли с правосторонней локализацией преимущественно встречаются среди пациентов женского пола и являются карциномами с поздним началом, которые представлены морфологически преимущественно муцинозными аденокарциномами с эндофитным характером роста, при этом опухоли данной локализации характеризуются дефицитом белков мисматч репарации, что приводит к высокой антигенной нагрузке [66]. Опухоли с правосторонним расположением устойчивы к традиционной адъювантной химиотерапии 5-фторурацил (5-ФУ), при этом за счет высокой антигенной нагрузки отмечается значимая эффективность применения ингибиторов контрольных точки в целях терапии данных опухолей [19, 160, 173]. В свою очередь, для карцином левой половины характерно преобладание пациентов мужского пола преимущественно молодого возраста. Данные опухоли характеризуются экзофитным характером роста, морфологически представлены аденокарциномами неспецифического типа с наличием мутацией в генах: *KRAS*, *APC*, *PIK3CA*, *p53* [66]. Опухоли с левосторонней локализацией чувствительны к адъювантной терапии 5-фторурацилом (5-ФУ), а также к химиотерапии с включением анти-EGFR ингибиторов [59].

В настоящее время протокол морфологического исследования карцином толстой кишки включает дополнительно оценку экспрессии белков, отвечающих за систему мисматч-репарации, что позволяет определить MMR-статус опухоли и/или выявить наличие микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability). Причиной тому является факт того, что микросателлитная нестабильность представляет собой важную молекулярно-генетическую характеристику РТК, в основе развития которой лежит нарушение репарации неспаренных нуклеотидов в микросателлитах [79, 149]. Микросателлиты

представляют собой фрагменты ДНК, которые состоят из повторяющихся нуклеотидов (наиболее часто от 1–6), которые равномерно распределены по всему геному. Нарушение последовательности нуклеотидов в микросателлитах приводит к возникновению дефектов репликации ДНК, которые устраняются за счет системы репарации неспаренных нуклеотидов (англ. mismatch repair system). Данная система представлена следующими белками: MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2, их взаимодействие позволяет идентифицировать и устранить некомплементарные последовательности нуклеотидов, возникшие при построении ДНК [150]. Утрата одного из четырех белков приводит к возникновению дефицита системы репарации неспаренных нуклеотидов с дальнейшим развитием микросателлитной нестабильности, что впоследствии приводит к возникновению мутаций сдвига рамки считывания, а также к инактивации таких генов-онкосупрессоров, как *TGFBR2*, *Bax*, *Casp5*, тем самым обуславливая развитие злокачественных новообразований. Опухоли, которые несут в себе утрату одного или нескольких белков, являются карциномами с дефицитом белков мисматч репарации, то есть являются опухолями с dMMR статусом (англ. deficient mismatch repair). В свою очередь, отсутствие утраты белков системы репарации неспаренных нуклеотидов в опухоли свидетельствует о ее pMMR статусе (англ. proficient mismatch repair). Полученные в результате ряда исследований данные позволили установить, что микросателлитная нестабильность обуславливает развитие не только рака толстого кишечника в 12–15 % случаев, но и таких опухолей как эндометриоидная карцинома (30 % случаев), а также рак желудка (19 % от всех случаев) [41, 200]. Микросателлит-стабильные опухоли (англ. MSS-microsatellite stability) характеризуются хромосомной нестабильностью, которая проявляется генной амплификацией, анеуплоидией и потерей гетерозиготности [244].

Определение pMMR/dMMR, или MSI/MSS, статуса опухоли является одним из ключевых предикторов течения колоректального рака (КРР). Согласно данным мировой литературы, опухоли с dMMR/MSI статусом составляют до 20 % от опухолей как толстой, так и прямой кишки [148]. При этом анализ существующих

исследований показывает, что опухоли данной группы имеют более благоприятное течение в сравнении с pMMR/MSS карциномами [27, 135]. Существует предположение, что причиной тому является различие в опухолевом микроокружении, в том числе, более плотная инфильтрация стромы опухоли и ее инвазивного края иммунными клетками, что обусловлено большей неоантигенной нагрузкой карцином dMMR/MSI в сравнении с pMMR/MSS карциномами [135].

Дальнейшее изучение молекулярно-генетического ландшафта колоректального рака позволило создать молекулярную классификацию «консенсус молекулярных субгрупп», которая обобщила ранее полученные молекулярно-генетические данные о раке толстой кишки [218]. Guinney J. и его соавторы, основываясь на сходстве биологических и молекулярных характеристик, выделили четыре молекулярных подтипа карцином толстой кишки (CMS – consensus molecular subtypes), каждому из которых впоследствии была присвоена клиническая значимость [218].

Первый молекулярный подтип (CMS1), известный как иммунный, включает опухоли, составляющие 14 % всех случаев карцином толстой кишки. Для них характерны эпигенетические мутации, такие как микросателлитная нестабильность (MSI), гиперметилирование CpG-островков (CIMP – CpG island methylator phenotype), а также мутация BRAFV600E. Морфологически эти опухоли отличаются выраженной инфильтрацией иммунными клетками, включающими CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, а также NK-клетки. Чаще всего данный подтип выявляется в правой половине толстой кишки [61]. Согласно результатам исследований, опухоли с иммунным фенотипом демонстрируют благоприятный прогноз на ранних стадиях, однако у пациентов с отдалёнными метастазами или рецидивами заболевание протекает крайне агрессивно [44, 61, 182, 218].

Второй молекулярный подтип, обозначаемый как канонический (CMS2), характеризуется микросателлитной стабильностью и высоким уровнем изменений в ДНК, включая дупликации нуклеотидных последовательностей. В опухолях данной группы часто встречаются мутации в генах APC, P53 и RAS, что приводит

к активации сигнального пути WNT/ β -катенина. Канонический подтип отличается избыточной активностью эпителиального фактора роста, сопровождающейся высокой экспрессией EGFR и активацией его лигандов, таких как амфирегулин и эпирегулин. Эти опухоли составляют 37 % случаев, преимущественно обнаруживаются в левой половине толстой кишки и обладают благоприятным прогнозом при локализованном процессе. Кроме того, они демонстрируют хорошую чувствительность к терапии в случае рецидива или появления отдалённых метастазов [44, 64, 113, 182, 218].

Третий молекулярный подтип – метаболический (CMS3) – характеризуется усиленными процессами глутаминолиза и липогенеза, обусловленными генетическими и эпигенетическими изменениями в генах *KRAS* и *PIK3CA*. Эти изменения также приводят к нарушениям в сигнальном пути WNT/ β -катенина. В отличие от других подтипов, опухоли CMS3 не имеют мутации *BRAF*, но демонстрируют повышенную экспрессию белка IGBP3 [60, 218]. Данный подтип встречается в 13 % случаев и может локализоваться как в правых, так и в левых отделах толстой кишки. Выживаемость пациентов с этим подтипом ниже, чем у больных с каноническим подтипом [182].

Четвёртый молекулярный подтип – мезенхимальный (CMS4) – получил своё название благодаря усиленной экспрессии трансформирующего фактора роста β (TGF- β – Transforming Growth Factor Beta). Данный фактор влияет на внеклеточный матрикс, способствуя эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT – Epithelial-Mesenchymal Transition), что сопровождается усиленным неоангиогенезом [182]. Мезенхимальный подтип определяется в 23 % случаев, как правило опухоли имеют левостороннюю локализацию [60, 218]. Четвертый подтип является наиболее агрессивным, в большинстве случаев карциномы устойчивы к химиотерапии и иммунотерапии, что объясняется развитием эпителиально-мезенхимального перехода [60, 61, 218].

Исследование, проведенное Berg с соавторами, в ходе которого была оценена воспалительная инфильтрация стромы опухоли в зависимости от ее молекулярного подтипа, показало выраженную экспрессию иммунных сигнатур

среди подтипа CMS1 и CMS4, в то время как подтипы CMS2 и CMS3 были признаны иммуно-холодными [156]. Стоит отметить, что несмотря на выраженную стромальную иммунную инфильтрацию опухолей первого и четвертого подтипов, была отмечена значительная разница в прогнозе течения заболевания, которая определялась, в том числе, гетерогенностью иммунного микроокружения. В отличие от подгруппы CMS1, где в опухолевом микроокружении преобладают преимущественно различные формы Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+), подгруппа CMS4 характеризуется преобладанием в опухолевом микроокружении неблагоприятной иммунной среды, которая представлена преимущественно макрофагами типа M2, миелоидными клетками, и Т-регуляторными клетками [196].

Изучение молекулярно-генетического ландшафта колоректальной карциномы позволило установить ряд прогностических групп, которые потенциально отражают клиническое течение рака толстой кишки. Однако в отличие от оценки pMMR/dMMR или MSI/MSS статуса колоректальной карциномы исследование молекулярных подтипов рака толстого кишечника не внедрено в клиническую практику в виду высокой стоимости проведения исследования для определения конкретного подтипа. Отмечается также, что полученные данные свидетельствуют о внутриопухолевой гетерогенности каждого молекулярного подтипа, что вероятно ограничивает ее клиническое применение, свидетельствуя о необходимости дальнейшего изучения молекулярно-генетического ландшафта каждого из подтипов [183].

Таким образом, с учетом постоянного изучения молекулярно-генетического ландшафта и, как следствие, формирования понимания о новых механизмах прогрессии колоректального рака, возникла необходимость изучения других субстратов опухоли с целью повышения прогностической точности течения заболевания и формирования индивидуального подхода к лечению.

1.4 Иммунное микроокружение при раке толстой кишки

Совершенствование морфологической классификации и появление новых данных о гетерогенности молекулярно-генетических характеристик колоректального рака позволило более детально понять биологию рака толстой кишки и сформулировать новые подходы к лечению пациентов с данным заболеванием. Однако, существующие данные о морфогенетической гетерогенности карцином толстой кишки не позволяют до конца выявить механизмы прогрессии и формирования резистентности опухоли к терапии. В связи с этим параллельно изучению молекулярно-генетического ландшафта рака толстой кишки исследуются также механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы для разработки новых терапевтических подходов [51, 92, 141].

На сегодняшний день установлено, что иммунная система организма способна ликвидировать опухолевые клетки посредством цепочки сложных иммунных реакций, которые носят название раково-иммунный цикл [216]. Однако, как было показано в ряде исследований, эффективность противоопухолевого ответа иммунной системы со временем зачастую снижается, что обусловлено формированием опухолью собственного иммунного микроокружения [112]. В частности, исследование Bingzhe LV с соавторами подтверждает, что иммунное микроокружение опухоли играет ключевую роль в развитии механизмов ускользания от иммунного ответа, а также было доказано, что именно оно способствует развитию резистентности к химио- и лучевой терапии и, как следствие, рецидиву опухоли [89, 112, 220, 221]. При этом портрет клеточной и молекулярной популяции иммунного микроокружения злокачественной опухоли, вне зависимости от локализации, не претерпевает столь значительных изменений в отличие от морфологических характеристик и молекулярно-генетического ландшафта злокачественного новообразования [112]. Несмотря на то, что, как было ранее отмечено, иммунное опухолевое микроокружение позволяет прогрессировать злокачественным новообразованиям, в нем принято выделять два компонента: противоопухолевой и про-опухолевой

[111]. Соответственно, преобладание того или иного компонента иммунного микроокружения за счет популяции иммунных клеток и продукции медиаторов определяет течение и исход заболевания [112]. Про-опухолевый иммунный компонент представлен регуляторными Т-клетками (англ. Tregs – regulatory T cells), миелоидными клетками-супрессорами (англ. MDSCs – myeloid-derived suppressor cells), ассоциированными с опухолью макрофагами второго типа (TAM – tumor associated macrophages) и врожденными лимфоидными клетками группы 2 (англ. ILC2s – type 2 innate lymphoid cells). Именно данными группами клеток обеспечивается ухудшение противоопухолевых иммунных реакций организма и формирование иммуносупрессивной микросреды [112].

Регуляторным Т-клеткам отводится значительная роль в иммунном гомеостазе, основной их задачей является подавление воспалительных иммунных реакций, что в норме предотвращает развитие аутоиммунных заболеваний [121]. При этом в опухолевом микроокружении эффект от их воздействия заключается в механизме работы по типу обратной связи, в результате чего происходит ингибирование противоопухолевого иммунного ответа посредством продукции Treg иммуносупрессивных цитокинов, таких как TGF- β , интерлейкина-10 и интерлейкина-35 (англ. IL – interleukin) [192]. Кроме того, Treg ингибируют опосредованное цитотоксическими лимфоцитами уничтожение опухоли посредством активации TGF- β зависимого клеточного контакта, способствуя поляризации макрофагов M2 за счет ингибирования секреции интерферона гамма (англ. INF γ – Interferon gamma), что приводит к последующему ингибированию генерации памяти CD8⁺ Т-клеток за счет продукции цитотоксического лимфоцит-ассоциированного протеина 4 (англ. CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) [25, 190, 231]. Другим механизмом уклонения от иммунного надзора опухолью за счет Treg клеток является активация белка Т-клеточного иммуноглобулина и домена 3 муцина (англ. TIM-3 – cell immunoglobulin and mucin domain 3), что приводит к ингибированию пролиферации натуральных клеток киллеров (англ. NK – natural killer cells), а также продукции IFN- γ , что, как следствие, вызывает снижение опухолюсупрессивного эффекта [7].

Существующие работы также показали, что активация белка TIM-3, в том числе при колоректальной карциноме, приводит к продукции Tregs гранзима В и перфорина, что вызывает гибель NK и CD8+Т-клеток [94, 95]. Важно также упомянуть, что регуляторные Т-клетки индуцируют функциональное ингибирование дендритных клеток за счет связывания белка CTLA-4 с мембранными протеинами CD80/CD86 дендритных клеток, что приводит к подавлению ко-стимулирующего сигнала [242]. Кроме того, установлено, что белок активации гена лимфоцитов-3 (англ. LAG3 – Lymphocyte-activation gene 3), продуцируемый Treg, может связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости II (англ. МНС II – major histocompatibility complex II), тем самым ингибируя его антигенпрезентирующие функции, дополнительно снижая противоопухолевый иммунный ответ [195]. Ряд клеток иммунного микроокружения опухоли, взаимодействуя друг с другом, усиливают толерантность опухоли по отношению к иммунной системе организма. Установлено, что продукция Treg иммунным микроокружением опухоли может достигаться за счет факторов TGF- β , IL-10 и IFN- γ , секретируемых миелоидными клетками супрессорами, в свою очередь, продукция TGF- β и IL-35 регуляторными Т клетками усиливает функцию миелоидных клеток-супрессоров, тем самым поддерживая иммуносупрессивное состояние опухоли [195].

Миелоидсупрессивные клетки (MDSCs) представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток с различной транскрипционной активностью и степенью дифференцировки, которые способствуют иммуномодуляции, в норме принимая участие в эффекторных реакциях иммунной системы [87, 157]. Данный тип клеток в настоящее время принято разделять на две популяции: гранулоцитарные (полиморфноядерные) MDSC (англ. PMN – MDSC polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells) и моноцитарные MDSC (англ. M-MDSC – Monocytic myeloid-derived suppressor cells). Гранулоцитарные миелоидсупрессивные клетки могут продуцировать ROS и снижать реакции, угнетая ответ Т-клеток на антигены, в основе чего лежит механизм развития цитотоксического апоптоза через ось Fas/FasL [87]. В свою

очередь, моноцитарные миелоидсупрессивные клетки продуцируют оксид азота для ингибирования противоопухолевого иммунного ответа [240]. Kwak T с соавторами в своей работе показали, что моноцитарные миелоидсупрессивные клетки также могут дифференцироваться в иммуносупрессивные макрофаги, тем самым ингибируя активацию Т-клеток [68]. Установлено, что моноцитарные миелоидсупрессивные клетки экспрессируют галектин 9, который связывается с TIM-3 на опухолевых лимфоцитах, вызывая апоптоз-программируемую гибель аутологичных Т-клеток [74].

Одним из компонентов иммунного микроокружения опухоли являются врожденные лимфоидные клетки группы 2 (ILC2s), они имеют специфические маркеры и экспрессируют транскрипционный фактор – GATA-связывающий белок 3 (GATA3) [227]. Врожденные лимфоидные клетки группы 2 секретируют также цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) и привлекают иммуносупрессивные клетки для формирования иммунного микроокружения опухоли [97]. Секреция IL-13 способствует агрегации моноцитарных миелоидсупрессивных клеток, а также ILC2s индуцируют выработку TGF- β из MDSC, что способствует поляризации макрофагов M2 [103, 215]. Врожденные лимфоидные клетки группы 2 продуцируют молекулу, подобную эпидермальному фактору роста – амфирегулин (AREG), ко-стимулирующий ICOSL/ICOS иммунный комплекс, который непосредственно участвует в создании и поддержании иммуносупрессивной микросреды и способствует активации и накоплению Treg в ней [119, 142]. Более того, существуют данные о том, что ILC2s способны ингибировать активность NK-клеток, однако данный механизм требует дальнейшего изучения [102].

Одним из не менее важных компонентов иммунного микроокружения опухоли являются опухоль-ассоциированные макрофаги (англ. TAM – tumor associated macrophages), которые, в отличие от опухоли инфильтрирующих лимфоцитов (англ. TILs – tumor infiltrated lymphocytes), способствуют ее прогрессии [205]. Выделяют два фенотипа опухоль-ассоциированных макрофагов: провоспалительный фенотип M1 и противовоспалительный фенотип

M2 [178]. Считается, что в проопухолевом микроокружении преобладает второй фенотип, что связано с повышенной экспрессией маркера CD163+. Было показано, что его преобладание в ткани опухоли способствует ее росту и метастазированию [219]. Полученные данные Shuwen Ma с соавторами свидетельствуют о том, что преобладание TAM в опухолевом микроокружении колоректальной карциномы коррелирует с плохим прогнозом и устойчивостью к лечению [31].

Следовательно, проопухолевый компонент микроокружения позволяет злокачественным клеткам быть невосприимчивым к противоопухолевому воздействию иммунной системы за счет различных механизмов ускользания от иммунного надзора, в том числе, нарушения антигенного презентирования, усиления негативных иммунных регуляторных путей, рекрутирования иммунных клеток, что, в конечном итоге, приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа и является определяющим фактором развития и прогрессии опухоли [229].

Противоопухолевый компонент иммунного микроокружения представлен CD3+ лимфоцитами и их кластерами: Т-цитотоксическими лимфоцитами и Т-хелперными клетками [112, 234]. CD3+ лимфоциты представляют собой сложную структуру, состоящую из трех различных полипептидных димеров: $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ и $\zeta\zeta$. CD3+ лимфоциты преимущественно продуцируют рецептор Т-клеток (англ. TCR – T-cell receptor), что в последующем при взаимодействии с другими Т-клетками образует комплекс, основной функцией которого является распознавание антигенов. Молекулы TCR представляют собой два различных гетеродимера: $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$. Подавляющее большинство зрелых Т-клеток несут TCR $\alpha\beta$, тогда как только около 5 % Т-клеток экспрессируют TCR $\gamma\delta$. Поверхностный мембранный CD3 является пан-Т-клеточным маркером и экспрессируется тимоцитами и всеми зрелыми Т-клетками периферической крови и лимфоидных тканей. Стоит отметить, что CD4+ и CD8+ лимфоциты широко распространены и встречаются во всех кроветворных и лимфоидных тканях, при этом Т-клетки с отрицательной экспрессией CD4– или CD8– в основном встречаются в селезенке

и слизистой оболочке кишечника [20]. Было установлено, что для эффективной активации Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов) требуется минимальный уровень CD3⁺, а также взаимодействие с белком TCR с последующим образованием комплекса CD3+TCR [239].

Цитотоксические CD8⁺ Т-клетки адаптивной иммунной системы являются наиболее значимыми эффекторами в противораковом иммунном ответе. Ряд исследований показали, что наличие в опухолевом микроокружении CD8⁺ лимфоцитов при таких злокачественных новообразованиях, как рак толстой кишки, предстательной железы, а также рак молочной железы, коррелирует с благоприятным течением заболевания [100, 185, 212]. В основе механизма, за счет которого достигается противоопухолевый ответ, лежит распознавание цитотоксическими лимфоцитами экспрессируемых опухолевыми клетками молекул главного комплекса гистосовместимости I, с последующей адгезией злокачественных клеток и их инактивацией посредством образования пор в эндосомальной мембране за счет действия гранулизина и перфорина с последующим высвобождением гранзимов в цитоплазму, что приводит к гибели опухолевой клетки [63, 93]. Кроме того, CD8⁺ лимфоциты экспрессируют лиганд Fas (FASL). Его связывание с рецепторами Fas на клетках-мишенях активирует домены FADD (Fas-ассоциированный белок с доменами смерти), что, в свою очередь, активирует каспазы и эндонуклеазы, приводя к фрагментации ДНК опухолевых клеток и, следовательно, их гибели [210].

В то же время стоит отметить, что постоянное воздействие опухолевых неоантигенов на CD8⁺ Т-клетки способно вызвать устойчивую экспрессию молекул иммунных контрольных точек, что может приводить к истощению Т-клеток. Так, воздействие антигенов на CD8⁺ клетки способно приводить к экспрессии CTLA-4, что вызывает уклонение опухоли от иммунного надзора. При этом истощенные CD8⁺ Т-лимфоциты, сохраняя свою митотическую активность, способствуют поддержанию иммуносупрессивной среды за счет гиперпродукции CTLA-4, способствуя прогрессии опухоли [69]. На сегодняшний день установлено, что блокада рецептора CTLA-4 с применением анти-CTLA-4

препаратов приводит к реактивации цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов [117].

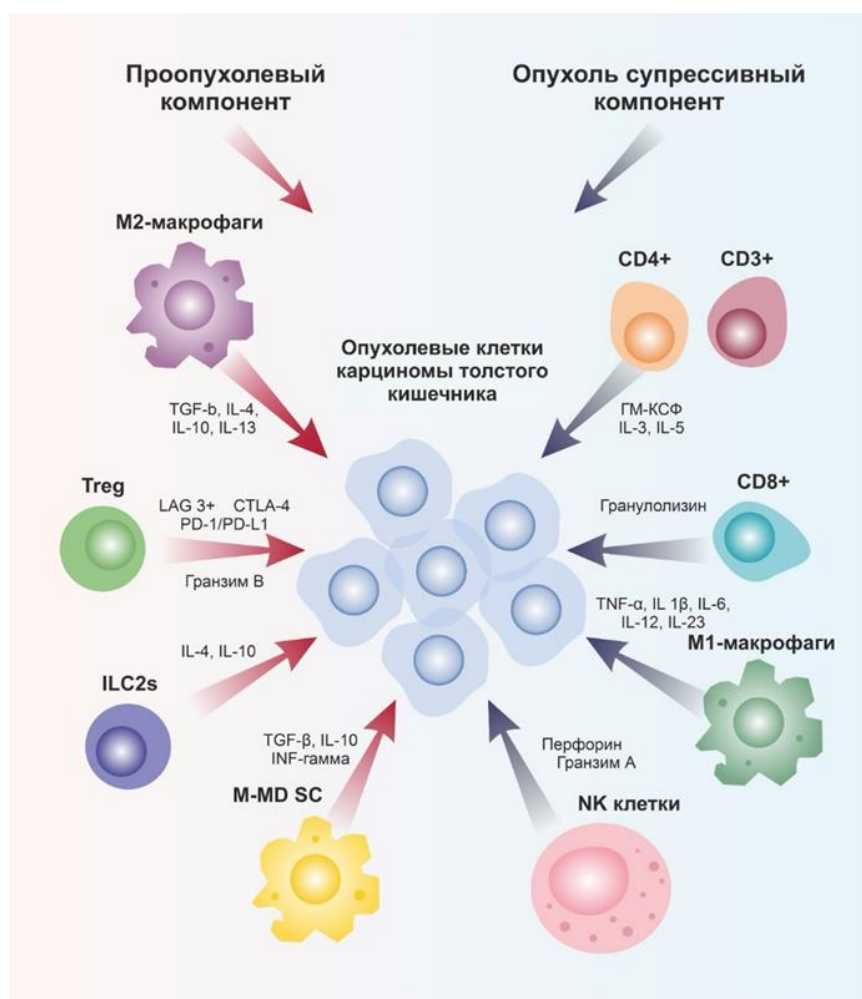
Изучение состава клеточного микроокружения и его функции позволили установить, что Т-клетки CD4⁺ наряду с CD8⁺ лимфоцитами играют решающую роль в развитии и поддержании противоопухолевого ответа [214]. В настоящее время показано, что CD4⁺ Т-хелперы (Th) определяют значение в координации адаптивных иммунных реакций, как непосредственно напрямую за счет секреции IL-3, IL-5 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (англ. GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), что приводит к гибели опухолевых клеток, так и косвенно за счет продукции IFN γ , TNF α , что способствует привлечению цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток [33]. Было показано, что на ранних стадиях развития заболевания в опухолевом микроокружении непосредственно преобладают CD4⁺ лимфоциты, а именно их Th2 форма, однако по мере прогрессии заболевания количество Th-2 лимфоцитов снижается, а в опухолевом микроокружении отмечается преобладание CD 8⁺ лимфоцитов. Предполагается, что количество CD4⁺ лимфоцитов в опухолевом микроокружении определяет степень иммуногенности карциномы, что позволяет разделить их на опухоли с «холодным» и «горячим» иммунофенотипом [146]. Стоит отметить, что на сегодняшний день, несмотря на значительную противоопухолевую роль CD4⁺ лимфоцитов в иммунном микроокружении, их значение и функции требуют дальнейшего изучения. Помимо опухоль-ассоциированных лимфоцитов, важным противоопухолевым элементом иммунного микроокружения являются макрофаги M1-типа (CD86⁺, провоспалительные) [205, 226]. Установлено, что их активация происходит под воздействием цитокинов, секретируемых Т-хелперами, в частности INF γ , а также липополисахарида. Эти факторы активируют толл-подобные рецепторы (TLR), способствуя развитию воспалительного ответа [205]. Макрофаги фенотипа M1 имеют внутренние функции захвата, фагоцитоза и лизиса опухолевых клеток, что приводит к их гибели [101]. В настоящее время противоопухолевая функция M1 макрофагов интенсивно изучается.

Исследования, проведённые Renman D и соавторами, продемонстрировали,

что особенности течения колоректальной карциномы во многом определяются составом опухолевого иммунного микроокружения, ключевым компонентом которого являются опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TILs). Эти клетки представлены различными субпопуляциями CD3⁺ Т-лимфоцитов, включая CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [64]. Согласно ряду исследований, преобладание в опухолевом микроокружении CD3⁺ и CD8⁺ TIL ассоциировано с благоприятными клиническими исходами при некоторых формах карцином [88, 222]. Изучение строения самой опухоли и ее микроокружения привело к выделению следующих областей: инвазивный край, являющийся областью, расположенной на границе между центром опухоли, которая отделяет неопухолевую ткань от опухолевых гнезд на протяжении 1 мм; центр опухоли: ткань внутри инвазивного края; перитуморальная область: зона за пределами инвазивного края [18]. Дальнейшее исследование соотношения количества CD3⁺ и CD8⁺ TILs как в центре опухоли, так и на границе инвазии, привело к созданию индекса Immunoscore, который потенциально может быть использован как прогностический маркер течения ряда злокачественных новообразований, в том числе колоректального рака [88, 222].

Таким образом, наряду с изучением молекулярно-генетического ландшафта, исследование иммунного микроокружения при раке толстой кишки несет важную прогностическую значимость, а его роли отводится все большее внимание ввиду определения новых иммунных контрольных точек с разработкой и широким внедрением в клиническую практику ингибиторов для их блокады.

На схеме (Рисунок 1) представлено взаимодействие опухоли с клетками её микроокружения, демонстрирующее баланс между проопухолевыми и противоопухолевыми механизмами. Иммунные контрольные точки (PD-1/PD-L1, CTLA-4, LAG-3), а также широкий спектр цитокинов, факторов роста и цитотоксических молекул играют ключевую роль в модуляции иммунного ответа и формировании микросреды опухоли. Соотношение этих факторов определяет возможности иммунной системы в контроле опухолевого роста и эффективность иммунотерапии.



Примечание: Проопухолевый компонент: M2-макрофаги – секретируют TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13, обладают выраженным иммуносупрессивным потенциалом, способствуют инвазии и метастазированию. Регуляторные Т-клетки (Treg) – экспрессируют LAG-3, CTLA-4, PD-1/PD-L1, ингибируют цитотоксический иммунитет за счёт продукции IL-4, IL-10 и секреции гранзима В. Врождённые лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2s) – продуцируют IL-4 и IL-10, подавляют противоопухолевый ответ. Миелоидные супрессорные клетки (M-MDSC) – секретируют TGF- β , IL-10 и INF- γ , подавляют активность CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток. Опухоль-супрессивный компонент: CD4⁺ и CD3⁺ Т-лимфоциты – секретируют ГМ-КСФ, IL-3, IL-5, модулируют иммунный ответ. CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты – продуцируют гранулолизин, провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, способствуют уничтожению опухолевых клеток. M1-макрофаги – обладают противоопухолевым потенциалом за счёт продукции TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23. NK-клетки – осуществляют прямую цитотоксическую активность за счёт высвобождения перфорина и гранзима А, что приводит к лизису опухолевых клеток.

Рисунок 1 – Схема проопухолевого и опухоль супрессивного компонентов иммунного микроокружения при раке толстой кишки

1.5 Значение экспрессии иммунорегуляторных белков PD-L1, CTLA-4 и LAG-3 при раке толстой кишки

Взаимодействие опухолевой ткани и иммунного микроокружения опухоли, как ранее было отмечено, может сопровождаться экспрессией молекул, которые или снижают иммунный ответ или полностью его угнетают [69]. Способностью к экспрессии данных протеинов обладают как непосредственно сами опухолевые клетки, так и компоненты иммунного микроокружения, в том числе, истощенные цитотоксические лимфоциты [38]. В настоящее время считается, что наибольший вклад в развитие и прогрессию опухоли вносят следующие молекулы контрольных точек: PD-L1, CTLA-4 и LAG-3 [98]. На сегодняшний день функция этих белков продолжает изучаться (в особенности это относится к LAG3), но использование ингибиторов контрольных точек для блокады молекул PD-L1, CTLA-4 уже успешно применяется при следующих злокачественных новообразованиях: меланома, рак легкого, рак мочевого пузыря и рак толстой кишки [30,85,104,105,107,131].

1.5.1 Роль белка PD-L1 в опухолевом микроокружении и прогнозе рака толстой кишки

Трансмембранный протеин CD274, наиболее известный как лиганд программируемой гибели (англ. PD-L1-Programmed death-ligand 1), представляет собой белок контрольной иммунной точки, который экспрессируется как на опухолевых клетках, так и на различных типах клеток иммунного микроокружения, являясь главной иммунорегуляторной молекулой, которая при взаимодействии с рецептором программируемой гибели (англ. PD-1 – Programmed cell death 1) приводит к его активации [96, 162, 163]. Молекула PD-1 (CD279) представляет собой рецептор, который экспрессируется на активированных Т- и В-лимфоцитах, а также на моноцитах и дендритных клетках [40, 82, 162]. В то же время установлено, что белок PD-L1 синтезируется различными типами клеток,

включая покоящиеся Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги, а также паренхиматозные клетки, среди которых сосудистые эндотелиальные клетки и клетки островков поджелудочной железы [96, 162]. Связывание рецептора PD-1 с лигандом PD-L1 приводит к активации пути PD-1/PD-L1 и передачи ингибирующих сигналов Т-клеткам во время иммунного ответа путем подавления активности киназы 2 (англ. CK2 – casein kinase 2). Данный механизм предотвращает фосфорилирование регуляторного домена гена *PTEN*, что снижает активность фосфоинозитид-3-киназы (англ. PI3K – phosphoinositide 3-kinases), ингибируя циклин-зависимую киназу (англ. CDK – cyclin dependent kinase), тем самым непосредственно участвуя в регуляции активации рецепторов на поверхности Т-клеток, что в норме направлено на сдерживание гиперактивации иммунных клеток, в особенности на ингибирование цитотоксического иммунного ответа, что предотвращает развитие аутоиммунных заболеваний [17, 136, 194, 211].

В настоящее время установлено, что одним из механизмов опухолевой прогрессии является продукция непосредственно самими опухолевыми клетками лиганда PD-L1 и PD-1-рецептора [163]. В настоящее время в зависимости от субстрата выделяют следующие механизмы экспрессии PD-1/PD-L1 на опухолевых клетках: врожденная иммунная устойчивость и адаптивный иммунитет [163]. К первому механизму относится повышение PD-L1 экспрессии в результате конститутивной онкогенной сигнализации опухолевых клеток, тоже самое наблюдается в случае ALK транслокации и EGFR-мутации при раке легких [6, 163]. При адаптивной иммунной устойчивости экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках индуцируется в ответ на локальное воспаление, вызванное, например, интерферонами, секретируемыми активированными противоопухолевыми иммунными клетками, включая цитотоксические Т-лимфоциты и Th1-клетки. Это, в свою очередь, способствует усиленной экспрессии PD-1 на Т-лимфоцитах [152, 199]. Повышенная продукция PD-L1 опухолевыми клетками инициирует механизм инактивации Т-лимфоцитов, который реализуется через связывание PD-L1 с PD-1 и последующее

взаимодействие с фосфатазой SHP250. В результате происходит ингибирование киназ, участвующих в активации Т-клеток, что приводит к их апоптозу. Некоторые исследователи предполагают существование дополнительных сигнальных путей, которые опухолевые клетки могут использовать для подавления Т-лимфоцитов, однако на данный момент убедительных доказательств этому в научной литературе не представлено [163].

Описанный каскад реакций, вне зависимости от механизма активации, опосредует иммунную толерантность микроокружения опухоли, ингибируя противоопухолевый иммунный ответ. Также на примере плоскоклеточного рака головы и шеи было показано, что увеличение экспрессии PD-L1 в ткани опухоли нарастает по мере прогрессирования заболевания, о чем свидетельствует его большая экспрессия на поздней стадии по сравнению с ранней стадией заболевания и предопухолевыми процессами, где экспрессия определяется значительно реже [172, 193].

Считается, что экспрессия PD-L1 рецептора в опухолевой ткани является неблагоприятным прогностическим фактором для солидных опухолей, однако разработка анти PD-1/PD-L1 терапии с использованием моноклональных антител, направленных на таргетное ингибирование рецептор программируемой гибели или его лигандов, получили широкое распространение в клинической практике для лечения ряда злокачественных заболеваний ввиду их высокой эффективности [114, 168]. К таргетным ингибиторам PD-1 рецептора относят: ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб и цемиплимаб, а ингибиторами PD-L1 лиганда являются атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб [117]. Перечисленные лекарственные средства могут быть использованы в качестве монотерапии или в составе конъюгатов для лечения ряда злокачественных новообразований, которые сопровождаются повышенной продукцией PD-1/PD-L1. К данным нозологиям относят меланому, лимфому Ходжкина, немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточный почечноклеточный рак, уротелиальную карциному, тройной негативный рак молочной железы, эндометриодную карциному, рак желудка, колоректальный рак [17, 23, 71, 77, 171, 172, 174, 176, 177, 197]. При этом с целью

назначения ингибиторов контрольных точек, помимо клинических показаний, для ряда опухолей необходимо также проводить оценку PD-L1 экспрессии в ткани опухоли [83].

Выделяют две основные системы оценки уровня экспрессии PD-L1. Первая – Tumor Proportion Score (TPS) – представляет собой методику, основанную на определении доли жизнеспособных опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, что проявляется полным или частичным мембранным окрашиванием различной интенсивности, относительно общего числа опухолевых клеток. Вторая – Combined Positive Score (CPS) – рассчитывается как отношение количества PD-L1-экспрессирующих клеток, включая опухолевые клетки, лимфоциты и макрофаги, к общему количеству опухолевых клеток с последующим умножением на 100 [184, 198]. Данные методики широко применяются в клинической практике для количественной оценки уровня экспрессии PD-L1 с целью определения пороговых значений, необходимых для принятия решения о назначении иммунотерапии пациентам с определёнными типами злокачественных новообразований. В частности, использование иммунотерапевтических подходов рекомендовано при немелкоклеточном раке лёгкого, аденокарциноме желудка и гастроэзофагеального перехода ($CPS \geq 1$), раке шейки матки ($CPS \geq 1$), уротелиальной карциноме ($CPS \geq 10$), плоскоклеточном раке головы и шеи ($CPS \geq 1$), плоскоклеточном раке пищевода ($CPS \geq 10$), а также трижды негативном раке молочной железы (TNBC) ($CPS \geq 10$) [75, 134, 187].

Однако данные способы оценки экспрессии PD-L1 в настоящее время еще не прошли клинические исследования у пациентов с колоректальной карциномой. Следовательно, единственным критерием для назначения ингибиторов контрольных точек является наличие микросателлитной нестабильности и/или наличие дефицита белков мисматч репарации в опухоли с MSI/dMMR статусом. Существующие данные показывают, что опухоли данной группы характеризуется более высокой экспрессией PD-L1, такие опухоли также именуются как «горячие» [146, 167]. Причиной тому, что опухоли с dMMR статусом характеризуются повышенной экспрессией PD-L1, являются несколько факторов: во-первых,

количество связанных с мутацией неоантигенов в опухолях с дефицитом белков mismatch репарации может стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, что сопровождается повышенной экспрессией PD-1 рецепторов в иммунном микроокружении опухоли и непосредственно в самой ткани опухоли. Другая причина заключается в том, что более высокая мутационная нагрузка в опухолях с dMMR статусом коррелирует с более высокой распространенностью инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), которые могут способствовать усилению противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа [78, 184]. Установлено также, что карциномы с dMMR статусом характеризуются повышенной экспрессией PD-L1 в опухолевых и иммунных стромальных клетках по сравнению с карциномами pMMR [78, 184]. Четвертая причина заключается в том, что различные сигнальные пути между опухолями dMMR и pMMR могут приводить к различиям в секреции факторов, активирующих путь PD-1 в микроокружении опухоли. Изменения в сигнальном пути TGF- β могут быть еще одной причиной ответов на терапию анти-PD-1. Сигнализация TGF- β играет роль в иммунной модуляции, а ген, кодирующий рецептор TGF- β типа II, часто мутирует в раке толстой кишки с dMMR статусом [184].

В отличие от «горячих» (MSI/dMMR) карцином, «холодные» опухоли (MSS/pMMR) резистентны к анти-PD-L1/PD-1 терапии. В настоящее время изучаются комбинированные стратегии лечения данной группы пациентов, включающие назначение блокады иммунных контрольных точек в сочетании с химиотерапией, радиотерапией или ингибиторами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) / рецептора VEGF (VEGFR). Возможно также назначение ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы (MEK), а также ингибиторов сигнального трансдуктора и активации транскрипции 3 (STAT3) [165].

Важно отметить, что, несмотря на установленную значимую взаимосвязь между MSS/MSI и pMMR/dMMR статусом опухоли с экспрессией PD-L1, было выявлено, что иммуногистохимическая экспрессия PD-L1 и MMR статус, а также инфильтрирующие опухоль лимфоциты являются независимыми друг от друга прогностическими предикторами у пациентов с колоректальным раком [78]. В

связи с этим возникает необходимость дальнейшего изучения экспрессии рецептора программируемой гибели и его лиганда в колоректальной карциноме и ее иммунном микроокружении с учетом MMR статуса опухоли.

1.5.2 Значение экспрессии CTLA-4 при раке толстой кишки

Цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4, или CD152) представляет собой ингибирующий рецептор, принадлежащий к подсемейству иммуноглобулинов CD28, экспрессирующийся в форме ковалентного гомодимера на поверхности Т-клеток и состоящий из цитоплазматического хвоста, трансмембранной части и внеклеточного домена. В отличие от регуляторных Т-клеток, которые конститутивно экспрессируют CTLA-4, в обычных наивных CD4⁺ и CD8⁺ клетках CTLA-4 изначально изолируется во внутриклеточных везикулах и далее перемещается на поверхность мембраны только после активации клеток [238]. CD28 и CTLA-4 отвечают за различные аспекты иммунной регуляции Т-клеток, оказывая разнонаправленное действие на их функцию: CD28 играет стимулирующую роль, тогда как CTLA-4 – ингибирующую. Оба рецептора имеют общую пару лигандов (CD80 и CD86), экспрессируемых на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). Важно отметить, что молекула CTLA-4 обладает более высокой аффинностью к лигандам CD80 и CD86 по сравнению с CD28, при этом наиболее прочное взаимодействие наблюдается между CTLA-4 и CD80, тогда как комплекс CD28-CD86 характеризуется наименьшей авидностью [62, 202]. Данный механизм лежит в основе концепции, согласно которой CTLA-4 конкурирует с CD28 за связывание с лигандами, выступая антагонистом CD28-опосредованной костимуляции, обеспечивающей второй сигнал активации Т-лимфоцитов [242]. Кроме того, связывание CTLA-4 с CD80 и CD86 способствует дальнейшему поглощению и распаду этих лигандов посредством процесса трансэндоцитоза [238]. Однако точные механизмы, лежащие в основе его ингибирующей функции, полностью не изучены [241].

Таким образом, функции CTLA-4 выступают в качестве механизма иммунной регуляции, одновременно снижая способность АПК стимулировать Т-клетки через CD28. Систему CD28/CTLA-4 возможно представить в виде реостата, который позволяет сообща регулировать процессы активации или ингибирования Т-клеток. В регуляторных Т-клетках CTLA-4 необходим для осуществления механизмов иммуносупрессивной активности [241].

Более ранние исследования *in vivo* позволили доказать, что дефицит CTLA-4 в Т-регуляторных лимфоцитах непосредственно ухудшает выполняемую ими функцию подавления собственного иммунитета [24].

В настоящее время CTLA-4 широко признан как одна из ключевых молекул иммунных контрольных точек и приобрел значительную популярность в качестве терапевтической мишени в лечении аутоиммунных и онкологических заболеваний [62, 243]. Было показано, что применение антител для связывания CTLA-4 характеризуется амбивалентностью: с одной стороны, активация CTLA-4 ограничивает развитие иммунных реакций на собственные ткани, что находит отражение в лечении аутоиммунных заболеваний; с другой – инактивация CTLA-4 стимулирует противоопухолевый механизм. Таким образом, синтетический CTLA-4 вводят в форме слитого белка с целью ингибирования патологического иммунного ответа в контексте аутоиммунитета. При этом антитела, нацеленные на CTLA-4 (анти-CTLA-4), используются в качестве противораковой терапии. Блокировка эндогенного CTLA-4 ослабляет его подавляющее действие на иммунную систему, тем самым вызывая более сильный ответ Трег против злокачественных клеток [238]. Первоначальные модели рака на мышах продемонстрировали, что лечение антителами против CTLA-4 приводит к регрессии опухоли и относительной устойчивости к рецидиву заболевания. Однако менее иммуногенные виды рака не реагировали на терапию анти-CTLA-4, что привело к наблюдаемому недостаточному клиническому эффекту [180, 202]. Первым и единственным одобренным препаратом на основе антител к CTLA-4 является Ипилимумаб, рекомбинантное моноклональное антитело. Резистентность большинства типов рака к терапии, нацеленной на CTLA-4,

привела к тому, что данный препарат одобрен в клинике только для лечения меланомы и почечно-клеточного рака [159, 204]. В крупном клиническом исследовании с участием 906 пациентов с резецированной меланомой III и IV стадий при применении ипилимумаба как препарата адъювантной терапии распространенной меланомы безрецидивная выживаемость в течение 1 года составила 60,5 % [10]. Важно, что двойственная функция CTLA-4 обуславливает высокую частоту встречаемости побочных эффектов в виде инициации и/или прогрессирования аутоиммунных заболеваний у лиц, получающих анти-CTLA-4 терапию [108]. Механизм обусловлен тем, что снижение функции CTLA-4 в результате его блокады увеличивает доступность лигандов (CD80 и CD86) для CD28, тем самым позволяя активировать потенциально аутореактивные Treg и в целом изменять их гомеостаз [202].

Распространенность нежелательных явлений, связанных с иммунной системой (irAE), на практике достигает 60–65 %. Наиболее частыми мишенями выступают кожа, желудочно-кишечный тракт и органы эндокринной системы [203]. Следствием наблюдаемого побочного воздействия является вынужденная отмена приема ипилимумаба почти у половины всех пациентов (42,6 %) [10]. Таким образом, воздействие на CTLA-4 сопровождается двумя взаимосвязанными проблемами: субоптимальной эффективностью и повышенной токсичностью [137]. Однако, несмотря на все указанные негативные аспекты лечения, онкологические больные, получающие ипилимумаб, демонстрируют очень длительную отдаленную выживаемость, если они прожили первые три года и более и прием препарата удалось пролонгировать [179].

В настоящее время интерес к анти-CTLA-4 терапии в лечении рака сохраняется, поскольку были получены данные, что ипилимумаб улучшает терапевтический ответ на антитела против PD-1, о чем свидетельствуют улучшение показателей общей выживаемости и частота ответа на применяемую терапию [58, 161]. Было выяснено, что назначение двойной блокады иммунных контрольных точек в сочетании ипилимумаба и ниволумаба (анти-PD-1) значительно повышает эффективность их применения у пациентов с

метастатической меланомой [81]. Настоящее время комбинация ипилимумаб плюс ниволумаб была также одобрена для лечения распространенного почечно-клеточного рака и метастатического колоректального рака (мКРР) с абберрациями MMR/MSI-H [201]. Однако выявление группы пациентов, получающих большую пользу от совместного применения анти-PD-1 и анти-CTLA-4 по сравнению с монотерапией анти-PD-1, остается актуальным на сегодняшний день.

Использование ингибиторов ИКТ в терапии мКРР в настоящее время по-прежнему сопряжено с рядом неразрешенных вопросов. Несмотря на высокую частоту ответа и долгосрочную пользу от терапии ингибиторами ИКТ, у 30–50 % пациентов с мКРР MSI/dMMR наблюдается раннее или вторичное прогрессирование заболевания. При этом подтвержденных прогностических биомаркеров резистентности к анти-PD-1 ± анти-CTLA4 у пациентов с мКРР MSI/dMMR не существует. Кроме того, на сегодняшний день нет данных об использовании ингибиторов ИКТ в качестве адъювантной терапии при резецированном КРР MSI/dMMR [35]. С другой стороны, постепенно накапливаются данные об эффективности неоадъювантных ингибиторов ИКТ: по меньшей мере у двух третей пациентов в различных исследованиях наблюдался полный патологический ответ (ППО) на применяемое лечение. В частности, в исследовании NICHE среди 21 пациента с КРР MSI/dMMR, получавшего одну дозу ипилимумаба и две дозы ниволумаба за 4 недели до операции, частота основного патологического ответа (≥ 10 % жизнеспособной остаточной опухоли) составила 95 %, тогда как частота ППО – 60 % [158].

Исходя из актуальных вопросов недостаточной эффективности и безопасности применения анти-CTLA-4 в спектре различных видов злокачественных новообразований, группа авторов высказала предположения о возможной траектории модификации привычного использования данной терапии. Благодаря накоплению данных установлено, что полное блокирование CTLA-4 не является ни необходимым, ни достаточным для иммунотерапии рака. Как следствие, безопасность применения анти-CTLA-4 терапии без потери клинической эффективности возможно повысить за счет дополнительно

сохранения, а не ингибирования функции CTLA-4. Важным аспектом является то, что сохранение CTLA-4 также позволяет более эффективно истощать Treg в микроокружении опухоли и, таким образом, улучшать качество лечения [137].

В заключение стоит отметить, что анти-CTLA-4 терапия представляет обоснованный интерес в контексте иммунотерапии колоректального рака, в особенности для пациентов с MSS/pMMR карциномами и метастатическим раком толстого кишечника. Однако их широкое использование в клинической практике ограничивает ряд причин, в том числе, отсутствие внедренного в практику валидированного протокола оценки уровня данного протеина в опухоли.

1.5.3 Регуляторная роль LAG-3 при злокачественных опухолях и раке толстой кишки

LAG-3 – белок активации гена лимфоцитов-3 (также именуемый как CD223 или белок FDC) – относится к суперсемейству иммуноглобулинов (IgSF) [225]. Впервые упоминания о данном протеине были опубликованы Фредериком Трибелем в 1990 году, именно он с коллегами выявили в ходе экспериментального исследования экспрессию данного протеина, а также обнаружили одноименный ген – *LAG-3*, расположенный на 12 хромосоме [132]. По своей структуре LAG-3 является трансмембранным гликопротеином типа I массой ~55 кДа, включающий четыре внеклеточных иммуноглобулиновых (Ig)-подобных домена (D1–D4), соединительный пептид и внутриклеточную область, которая передает ингибирующие сигналы CD4⁺ Т-клеткам при связывании с МНС класса II и другими лигандами [127, 130]. В основе передачи ингибирующих сигналов CD4⁺ лимфоцитам лежит активация белка LAG-3, что в последующем приводит к образованию кластеров и их ко-локализации на поверхности Т-клеток, что фактически ведет к ингибированию иммунного ответа. Установлено, что помимо МНС класса II, его канонического лиганда, к другим предполагаемым партнерам по связыванию LAG-3 относятся галектин-3 (Gal-3), лектин С-типа эндотелиальных клеток синусоидального типа печени и лимфатических узлов

(LSECtin), α -синуклеин, фибриногеноподобный белок 1 (FGL1), а также комплекс TCR–CD3 [80, 125, 153].

На сегодняшний день установлено, что молекула LAG-3 экспрессируется на CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, Т-регуляторных клетках, естественных Т-киллерах, NK-клетках и плазмацитоидных дендритных клетках. При этом наиболее активную продукцию LAG-3 обеспечивают активированные субпопуляции Т-клеток [125]. Кроме того, экспрессия LAG-3 усиливается в ответ на активацию Т-клеток под действием цитокинов IL-2 и IL-12 [237].

Ключевая функция LAG-3 заключается в передаче ингибирующих сигналов, регулирующих гомеостаз иммунных клеток, включая контроль их пролиферации и активации, секреции цитокинов, а также цитолитической активности [139]. Соответственно, LAG-3, наряду с PD-1/PD-L1 и CTLA-4, несет иммунорегуляторную функцию. Установлено, что нарушение синтеза LAG-3 протеина приводит к иммуноопосредованному поражению тканей, что наблюдается при аутоиммунных заболеваниях [91, 122]. Изучение механизмов и функции протеина LAG-3 позволило установить, что постоянная антигенная стимуляция вследствие наличия злокачественных новообразований вызывает гиперпродукцию данной молекулы, приводя к истощению субпопуляций Т-клеток с последующим ингибированием их функции, что способствует прогрессии опухоли [139].

Изучение экспрессии протеина LAG-3 позволило выявить ее при ряде злокачественных новообразований, таких как немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы [21, 48, 126, 129, 133, 140, 144, 151]. На сегодняшний день доказано, что наличие экспрессии LAG-3 в опухолевом микроокружении является неблагоприятным прогнозом течения, однако проведенный ряд исследований также позволили установить, что именно на ранних стадиях факт наличия этого протеина в микроокружении может являться благоприятным прогностическим фактором течения заболевания для экстранодальной NK/Т-клеточной лимфомы

назального типа, немелкоклеточного рака легких, трижды негативного рака молочной железы [188]. Однако подтверждение данных результатов требует дальнейших исследований экспрессии данного маркера и оценки его положительного прогностического значения именно на ранних стадиях заболевания, поскольку наиболее вероятно, что изолированная оценка данного маркера не может являться достоверной для прогноза заболевания.

Важное значение с точки зрения подхода к лечению и определения прогноза заболевания несет совокупная оценка экспрессии молекулы LAG-3 с другими иммунными контрольными точками, в частности, CTLA-4, рецептора PD-1 и его лиганда. Так, анализ результатов исследований показал, что наличие экспрессии LAG-3 в ткани опухоли при карциноме молочной железы характеризуется благоприятным прогнозом, однако было также выявлено, что ко-экспрессия данного маркера с PD-L1 при трижды негативном раке молочной железы сопряжена с неблагоприятным течением заболевания, в особенности у пациенток с наличием отдаленных метастазов [206].

Считается, что ко-экспрессия LAG-3 и PD-L1 на иммунных клетках обладает синергетическим эффектом в отношении уклонения опухоли от иммунного надзора [109, 123]. При этом следует отметить, что ко-экспрессия LAG-3 и PD-L1 не является характерной для всех карцином молочной железы. Наиболее часто данное сочетание выявляется у пациентов с тройным негативным раком молочной железы. Однако уровень ко-экспрессии варьирует в зависимости от молекулярного подтипа опухоли: наиболее высокая степень совместной экспрессии, по-видимому, наблюдается у опухолей, экспрессирующих рецепторы эстрогена и прогестерона [123]. Проведенный анализ ко-экспрессии PD-1, CTLA-4, LAG-3 при немелкоклеточном раке легкого установил повышенную экспрессию внутриопухолевых Tregs, что, вероятно, является характерным признаком истощения опухоль инфильтрирующих Т-лимфоцитов и может быть предиктором снижения безрецидивной выживаемости, но в то же время являться потенциальным признаком для назначения ингибитора анти-LAG-3 при утрате эффекта от лечения другими ингибиторами контрольных точек [86, 109, 115, 217].

Следовательно, комплексная оценка иммунных контрольных точек в совокупности с LAG-3 несет большое значение для понимания течения заболевания, а также выбора терапии.

Существующие в литературе данные по анализу экспрессии LAG-3 при раке толстой кишки крайне ограничены и носят противоречивый характер. Так, первоначально опубликованное исследование Чен с соавторами, в котором оценивалась экспрессия данного маркера у пациентов с колоректальной карциномой I–IV стадии в опухоли инфильтрирующих лимфоцитах, показало, что экспрессия LAG3 + сопряжена с более низкой выживаемостью. Особого внимания также заслуживает тот факт, что авторам исследования удалось определить, что опухоли I и II клинической стадии характеризовались более низким процентом экспрессии LAG3 +, чем опухоли III и IV стадии заболевания [39]. Стоит отметить, что Tavara S. в своем исследовании продемонстрировали схожие результаты по уровню экспрессии LAG3 + в зависимости от стадии заболевания, однако связи с общей выживаемостью и уровнем экспрессии установлено не было [48]. Исследование Lee с соавторами, проведенное позднее, позволило установить, что в изолированной группе пациентов с наличием MSI карцином III клинической стадии определялась связь с благоприятным течением заболевания и безрецидивной выживаемостью [32]. При этом Rhyner Agocs с соавторами в ходе своего исследования установили, что при карциномах толстой кишки II клинической стадии положительная экспрессия LAG3+ в опухоли инфильтрирующих лимфоцитах ассоциировалась с безрецидивной выживаемостью [128]. Стоит отметить, что данная взаимосвязь наблюдалась среди пациентов как с dMMR карциномами, так и pMMR опухолями. Данные результаты очень важны, поскольку на сегодняшний день установлено, что не только опухоли с MSI/dMMR статусом, но и MSS/pMMR статусом могут обладать выраженным иммунным микроокружением, что потенциально позволяет рассматривать возможность оценки LAG3+ экспрессии как дополнительный предиктивный фактор прогноза течения заболевания [118].

Такие противоречивые результаты можно объяснить с точки зрения

нескольких позиций. Когорта пациентов первого описанного исследования включала 108 пациентов с раком толстой и прямой кишки I–IV стадии, тогда как описанные другие когорты включали II и III стадии заболевания. Учитывая факт того, что 2/3 пациентов, включенных в когорту первого исследования, имели рак толстой кишки на стадии III и IV, неудивительно, что высокая экспрессия LAG-3+ по сравнению с низкой экспрессией в смешанной когорте стадии I–IV была связана с более низкой выживаемостью. Однако, также неизученным остается вопрос, повышается ли уровень экспрессии LAG-3 подобно молекуле PD-L1 в зависимости от степени прогрессирования заболевания. Другим фактором является отсутствие единой системы оценки уровня экспрессии LAG-3 на опухоль инфильтрирующих лимфоцитах. Так, одни авторы используют понятия «высокий» и «низкий» уровни экспрессии, в то же время другие авторы предпочитают определять лишь ее наличие или отсутствие. Стоит отметить, что в проведенных исследованиях их авторами использовались различные антитела, что также могло повлиять на интерпретацию полученных данных.

На данный момент дальнейшему исследованию данного маркера при раке толстой кишки придается особое значение. В том числе, в настоящее время проводятся клинические исследования по внедрению анти-LAG-3 моноклонального антитела – Фавезелимаба – в сочетании с анти PD-1 моноклональным антителом – Пембролизумабом – для терапии колоректального рака [124]. Следовательно, необходимо проведение дальнейших исследований с целью изучения влияния LAG-3 на прогрессирование заболевания, определение потенциальных синергетических механизмов и ко-экспрессии LAG-3 с другими молекулами контрольных точек, а также разработка единого протокола оценки экспрессии LAG-3 при колоректальном раке.

1.6 Заключение

Проведенный анализ литературы демонстрирует, что, несмотря на значительный прогресс в понимании морфологических и

молекулярно-генетических характеристик колоректального рака, ведущих к стандартизации патоморфологической оценки и персонализации лечения, ключевым направлением современных исследований становится изучение иммунного микроокружения опухоли. Это обусловлено как выявлением новых молекул иммунных контрольных точек, продуцируемых опухолью и ее микроокружением, так и разработкой эффективных таргетных препаратов. Особую значимость исследование иммунного микроокружения при колоректальном раке приобретает в контексте его выраженной иммунной гетерогенности, связанной с MMR-статусом.

Систематизация имеющихся научных данных выявила существенные пробелы в комплексной оценке про- и противоопухолевых компонентов микроокружения, их взаимосвязи с экспрессией молекул контрольных точек и их ко-экспрессии в зависимости от MMR-статуса. Примечательно, что морфологические характеристики опухоли редко учитываются при анализе экспрессии ингибиторов контрольных точек. Существующие диагностические критерии и показания к назначению иммунотерапии основываются преимущественно на определении MMR-статуса, не включая комплексную оценку популяционного состава иммунного микроокружения и экспрессии молекул контрольных точек.

Таким образом, интегративное исследование патоморфологических характеристик колоректального рака в сочетании с всесторонним анализом иммунного микроокружения и оценкой экспрессии прогностически значимых молекул иммунных контрольных точек представляется необходимым для углубления понимания гетерогенности иммунного ландшафта данного заболевания. Результаты такого исследования будут способствовать более точному прогнозированию течения заболевания и оптимизации персонализированных терапевтических подходов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническая характеристика пациентов

В данное исследование была включена группа из 80 пациентов с верифицированным диагнозом рак толстой кишки в стадиях T1-4bN0-2bM0-1, получавших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2019 по 2023 год. Исследование проводилось в строгом соответствии с этическими стандартами и нормативно-правовыми требованиями, регламентирующими проведение клинических исследований. От всех участников исследования или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ и ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 9291 от 28.11.2022) соответствовал принципам надлежащей клинической практики (GCP) и положениям Хельсинкской декларации.

Демографическая характеристика исследуемой когорты включала 48 пациентов мужского пола (средний возраст $(63,3 \pm 12,9)$ года) и 32 пациента женского пола (средний возраст $(63,6 \pm 13,5)$ года). Средний возраст в общей когорте составил $(64,4 \pm 12,8)$ года.

На догоспитальном этапе всем пациентам был проведён комплекс диагностических мероприятий, включающий сбор анамнеза и физикальное обследование, а также инструментальные, лабораторные и эндоскопические методы исследования. В рамках инструментальной диагностики выполнялись компьютерная томография органов брюшной полости, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, рентгенография органов грудной клетки и электрокардиография. Лабораторные исследования включали общий и биохимический анализы крови, оценку параметров системы гемостаза и общий анализ мочи. Для морфологической верификации диагноза всем пациентам проводилось эндоскопическое исследование толстой кишки с биопсией

новообразования.

При формировании исследуемой когорты нами были определены следующие критерии включения: выполнение радикального оперативного вмешательства в объеме гемиколонэктомии или резекции толстой кишки; наличие резектабельного метастатического поражения печени с возможностью одномоментного хирургического лечения.

Критериями исключения являлись: предшествующее проведение неоадьювантной терапии; наследственный характер онкологического процесса; наличие первично-множественных злокачественных новообразований; сопутствующие аутоиммунные заболевания; ВИЧ-инфекция; отказ пациента от участия в исследовании.

Дизайн исследования представлен на Рисунке 2.

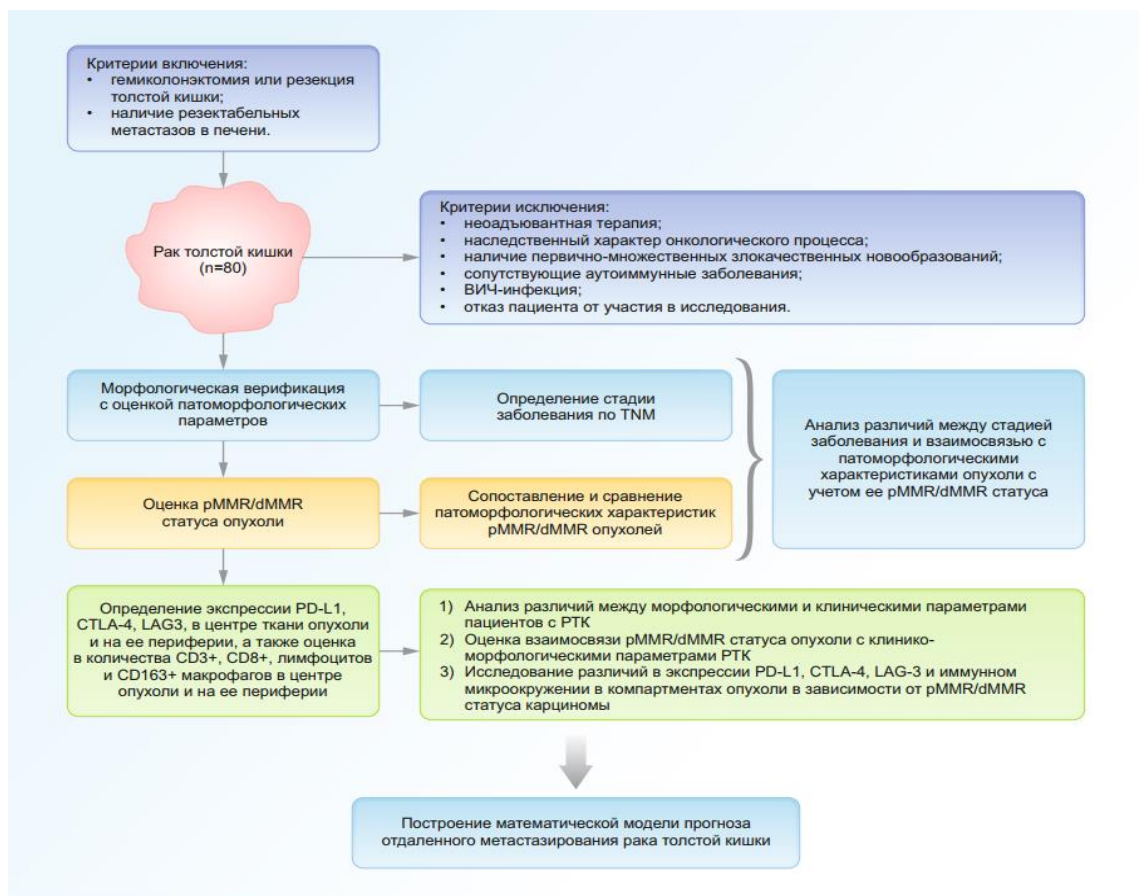


Рисунок 2 – Дизайн исследования

В данном исследовании группы пациентов с раком толстой кишки формировались искусственно в зависимости от статуса дефицита системы мисматч-репарации (dMMR). В общей популяции частота микросателлитно нестабильных опухолей составляет около 15 %, однако для достижения статистически обоснованного сравнения были сформированы две группы пациентов, равные по численности: одна группа с dMMR-статусом опухоли и вторая – с микросателлитно стабильными опухолями (pMMR). Такой подход позволил провести детальный анализ влияния MMR-статуса на клинико-морфологические характеристики опухолей.

Стадирование заболевания осуществлялось в соответствии с критериями классификационной системы TNM (8-я редакция, утвержденная в 2016 году и рекомендованная к клиническому применению с 2017 года) на основании интегративного анализа результатов патогистологического исследования операционного материала и комплексной оценки данных, полученных в ходе клинико-инструментального обследования пациентов.

В 6 случаях у пациентов была установлена I стадия заболевания (8 %), IIА стадия была выявлена у 4 (5 %) пациентов, в свою очередь, IIВ и IIС стадии были обнаружены в 3 (4 %) и 1 (1 %) наблюдениях. Наибольшее количество пациентов характеризовались наличием IIIА клинической стадии – 25 (31 %) случаев, у 16 (20 %) больных выявлена IIIВ стадия, у 9 (11 %) пациентов – IIС стадия. В 16 (20 %) случаях были обнаружены признаки метастатического поражения печени, что соответствовало стадии IVA (Рисунок 3).

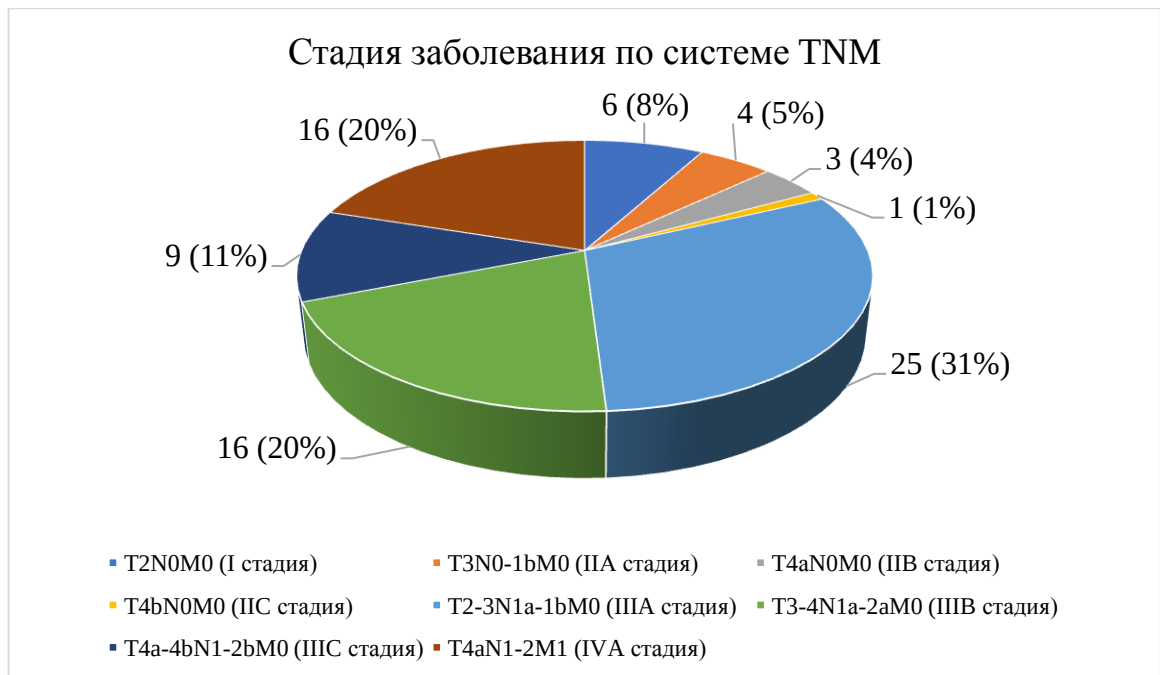


Рисунок 3 – Диаграмма распределения больных раком толстой кишки в зависимости от стадии заболевания

Анатомическая локализация первичной опухоли в исследуемой когорте пациентов имела следующее топографическое распределение неопластического процесса. Наиболее часто опухоль локализовалась в сигмовидной кишке – у 26 пациентов, что составило 32 % от общего числа наблюдений. Второй по частоте локализацией являлась восходящая ободочная кишка – 15 случаев (19 %). В слепой кишке и печеночном изгибе ободочной кишки опухоль определялась с одинаковой частотой – по 9 случаев (11 %) для каждой локализации. Селезеночный изгиб и нисходящая ободочная кишка были поражены у 6 пациентов (7 %) в каждом случае. В поперечно-ободочной кишке опухоль локализовалась у 5 пациентов (6 %). Наименее частой локализацией являлся ректосигмоидный переход – 4 случая (5 %).

2.2 Патоморфологические методы исследования.

2.2.1 Гистологическое исследование

В рамках морфологического исследования производилась комплексная оценка операционного материала, полученного после хирургического лечения. Первичная обработка материала включала фиксацию в 10 % нейтральном забуференном формалине на протяжении 24 часов. Процесс гистологической проводки осуществлялся в автоматическом режиме с использованием гистологического процессора закрытого типа ASP6025 (Leica) с последующей парафиновой проводкой образцов. Изготовление гистологических срезов толщиной 4-5 мкм производилось на ротационном микротоме RM 2125 RTS (Leica). Окрашивание микропрепаратов осуществлялось с применением стандартной методики гематоксилин-эозин в автоматизированной системе Varistain™ Gemini (Thermo Fisher). Микроскопическое исследование проводилось с использованием биологического микроскопа Eclipse Ni (Nikon). Для получения цифровых изображений гистологических и иммуногистохимических препаратов применялся сканер Pannoramic MIDI II (3D Histec).

В ходе патоморфологического исследования производилась детальная оценка следующих морфологических параметров: степень локальной распространенности опухолевого процесса (pT); линейные размеры первичного новообразования; степень гистологической дифференцировки (grade); интенсивность лимфоидной инфильтрации стромы (определяемая в 10 репрезентативных полях зрения при увеличении $\times 400$); наличие лимфоваскулярной и периневральной инвазии; статус регионарных лимфатических узлов (pN) с количественной оценкой исследованных лимфоузлов; наличие и выраженность феномена почкования опухоли (tumor budding) в зоне инвазивного края; состояние проксимального и дистального краев резекции.

Диагноз рака толстой кишки устанавливался в соответствии с актуальной

редакцией «Международной гистологической классификации опухолей желудочно-кишечного тракта», утверждённой ВОЗ в 2019 году. Определение степени дифференцировки новообразования основывалось на количественной оценке железистого компонента в структуре опухоли. Высокодифференцированные карциномы (Low-grade) характеризовались наличием железистых структур в 50–100 % объема опухоли, тогда как низкодифференцированные формы (High-grade) демонстрировали менее 49 % железистого компонента.

При установке муцинозного варианта аденокарциномы ключевым диагностическим критерием являлось наличие внеклеточного муцина, занимающего не менее 50 % площади опухоли. Диагностика медуллярной карциномы базировалась на комплексе морфологических характеристик, включающих синцитиальный паттерн роста, наличие неопластических клеток с везикулярными ядрами и отчетливыми ядрышками, выраженную лимфоидную инфильтрацию стромы при отсутствии экспрессии нейроэндокринных маркеров.

В рамках комплексной морфологической оценки особое внимание уделялось количественному анализу иммунного инфильтрата в строме опухоли. Исследование проводилось при стандартизированном увеличении микроскопа $\times 400$ с оценкой 10 репрезентативных полей зрения. При количественном анализе учитывалась совокупность иммунокомпетентных клеток, локализованных как в строме опухоли, так и в интраэпителиальном компартменте, при этом перитуморальная зона исключалась из зоны анализа.

Для стандартизации полученных результатов была разработана полуколичественная шкала оценки, включающая три градации:

- слабая степень инфильтрации (1 балл) – до 200 иммунных клеток;
- умеренная степень инфильтрации (2 балла) – от 200 до 400 клеток;
- выраженная степень инфильтрации (3 балла) – более 400 клеток.

Отдельным параметром морфологической оценки исследуемых образцов являлся феномен опухолевого почкования (tumor budding). Количественный анализ осуществлялся путем подсчета опухолевых почек в зонах наибольшей

плотности (hot spot) инвазивного края новообразования. Оценка производилась на стандартизированной площади 0,785 мм², что соответствует полю зрения при увеличении $\times 20$ с окуляром, имеющим диаметр поля зрения 20 мм.

На основании количественных показателей была применена градационная система, предусматривающая три степени выраженности почкования: Bd1 подтип (Low grade) – наличие 0–4 опухолевых почек; Bd2 подтип (Intermediate grade) – присутствие 5–9 опухолевых почек; Bd3 подтип (High grade) – обнаружение 10 и более опухолевых почек.

2.2.2 Иммуногистохимическое исследование

Оценка экспрессии исследуемых белков тканью опухоли проводилось иммуногистохимическим методом в два этапа. Окраска образцов опухолевой ткани была выполнена с помощью автоматизированной системы для иммуногистохимического окрашивания и *in situ* гибридизации Bond RX (Leica Biosystem) («Leica», USA).

На первом этапе проводилась оценка pMMR/dMMR статуса образцов ткани рака толстой кишки на парафиновых срезах опухолевой ткани (операционный материал) с применением метода иммуногистохимии. Окрашивание выполняли с использованием антител MLH1 (клон ES05, RTU, Dako An Agilent Technologies Company); MSH2 (клон FE1, RTU, Dako An Agilent Technologies Company), MSH6 (клон EP49, RTU, Dako An Agilent Technologies Company); PMS2 (клон EP51, RTU, Dako An Agilent Technologies Company). В случаях, когда наблюдалась полная утрата ядерной экспрессии одного или нескольких белков системы репарации неспаренных оснований при наличии адекватного внутреннего положительного контроля, опухоль классифицировалась как dMMR. При отсутствии достоверного внутреннего положительного контроля или при выявлении неспецифического окрашивания результаты ИГХ исследования признавались недействительными и исключались из последующего анализа. Результаты иммуногистохимического окрашивания белков системы репарации

неспаренных нуклеотидов представлены на Рисунках 4, 5, 6, 7 и 8.

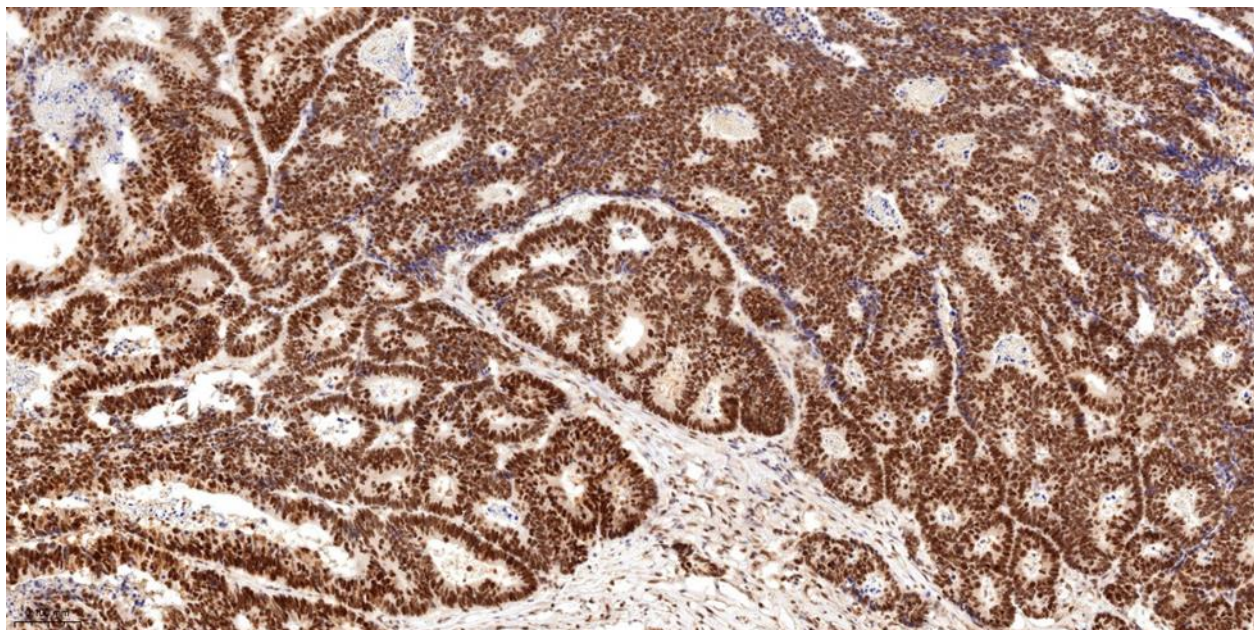


Рисунок 4 – Диффузное ядерное позитивное окрашивание опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки при иммуногистохимическом исследовании с антителами к белку MLH1. Позитивный внутренний контроль в ядрах стромальных клеток. Увеличение $\times 100$

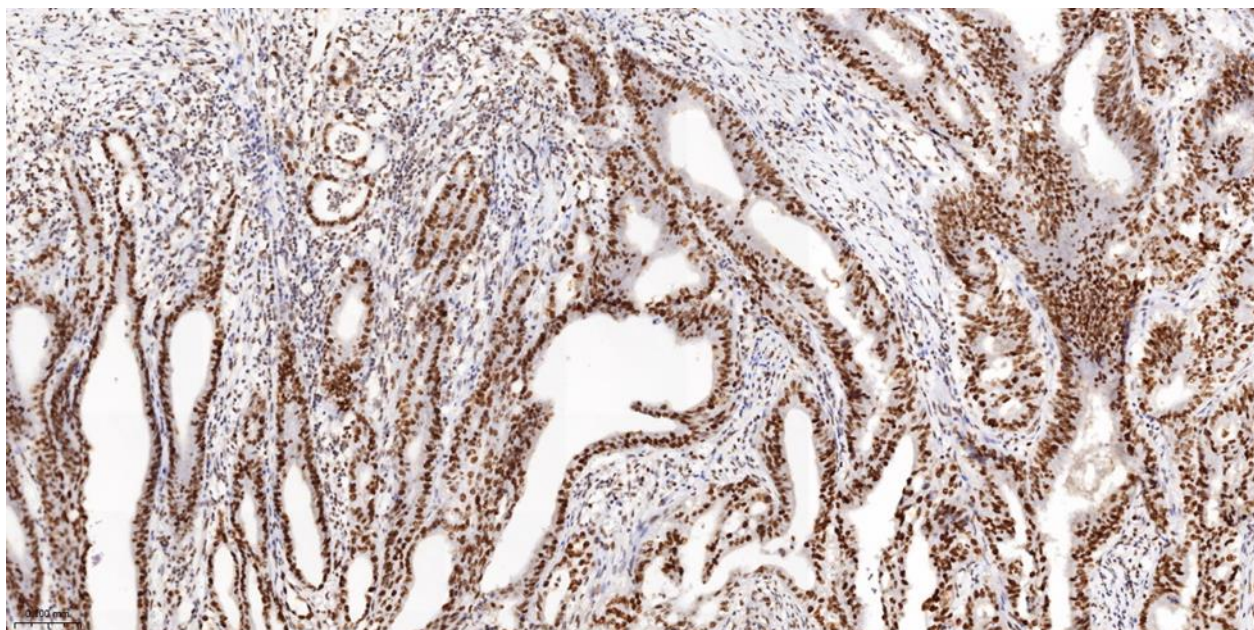


Рисунок 5 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку PMS2 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Позитивный внутренний контроль в клетках стромы и воспалительного инфильтрата. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$

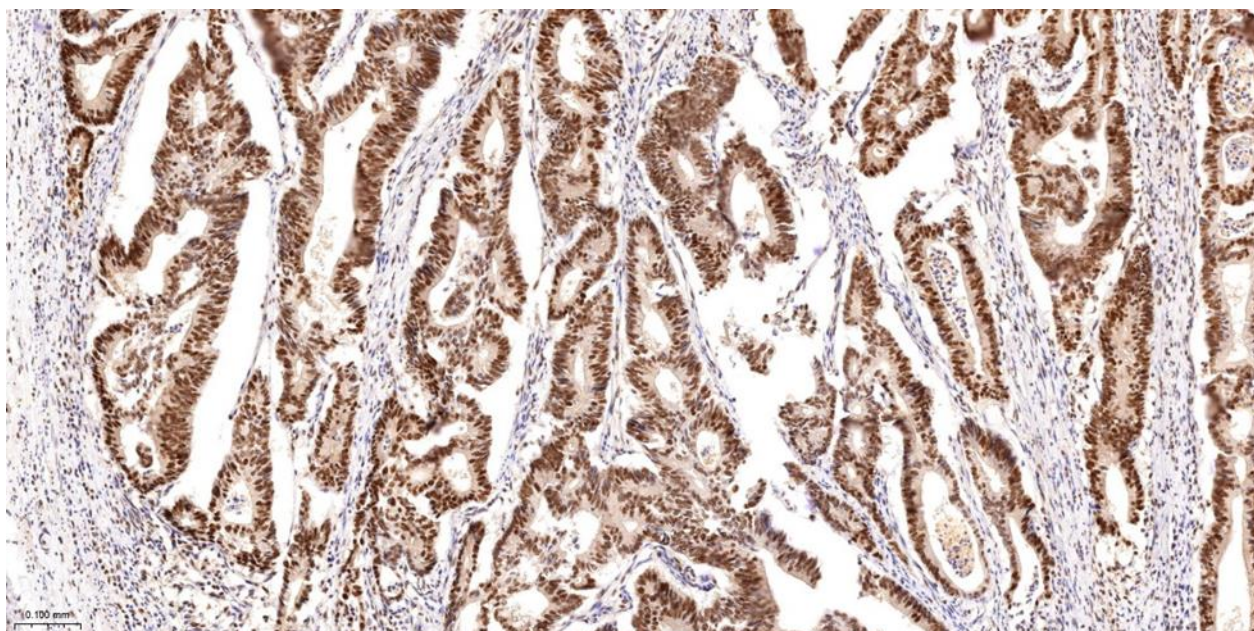


Рисунок 6 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку MSH2 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Воспалительный инфильтрат и стромальные клетки демонстрируют позитивное окрашивание. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$

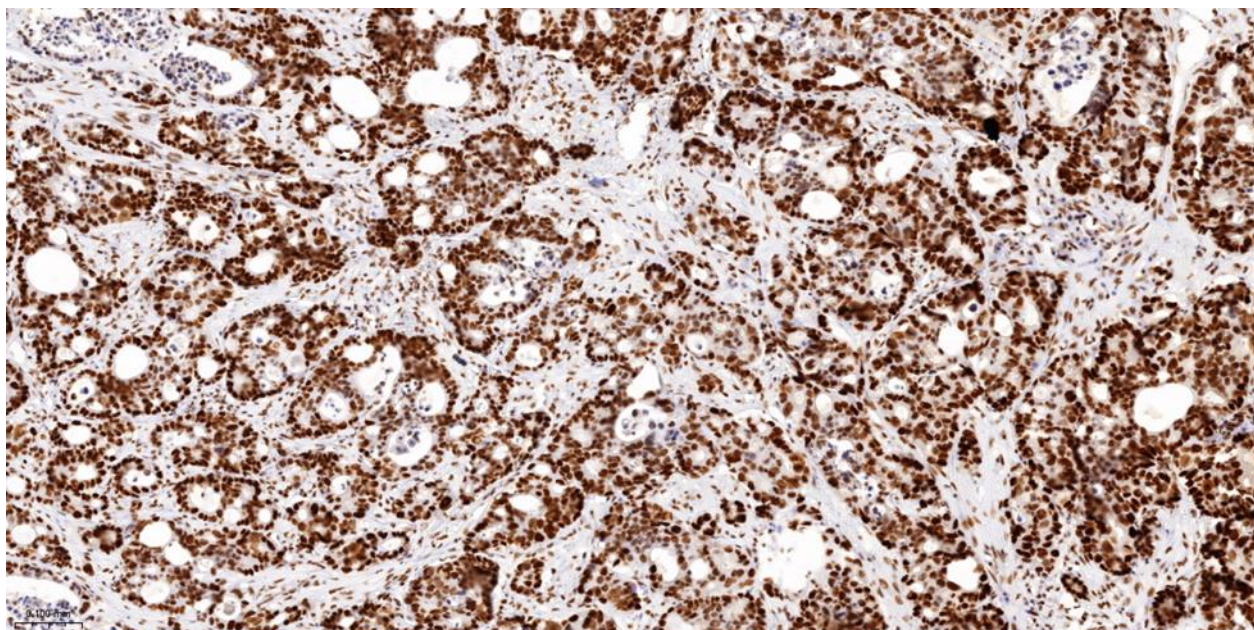


Рисунок 7 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку MSH6 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$

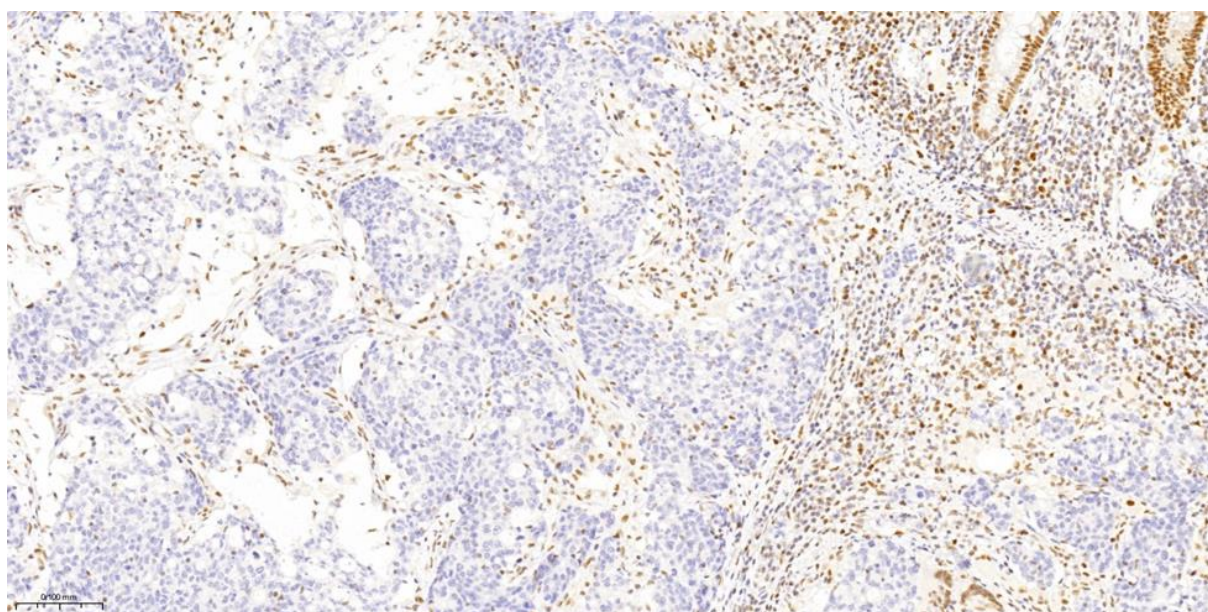


Рисунок 8 – Отсутствие экспрессии белка MLH1 в опухолевых клетках аденокарциномы толстой кишки. Положительное окрашивание воспалительного инфильтрата и слизистой кишки за пределами опухоли (верхний правый угол снимка) служит внутренним позитивным контролем. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$

На втором этапе было проведено TSA (англ. Tyramide signal amplification - амплификация сигнала тирамидом) модифицированное иммунофлуоресцентное исследование коэкспрессии белков в ткани опухоли.

Метод основан на реакции антиген-антитело, которая выявляется в ткани с помощью флуоресцентных меток. Возможность оценки в ткани одновременно шести антигенов достигается за счет модификации реакции посредством использования флуоресцентных меток, конъюгированных с тирамидом, что обеспечивает их ковалентное связывание с тканью, а также последовательным высокотемпературным удалением предыдущих комплексов антиген-антитело из ткани.

Исследование являлось многоэтапным и включало в себя создание библиотек флуоресцентных красителей и библиотеки аутофлуоресценции, подбор условий для одноцветного иммунофлуоресцентного исследования, подбор условий для мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования.

Создание библиотек флуоресцентных красителей и библиотеки аутофлуоресценции.

Для этого использовался образец анализируемого в исследовании типа ткани – рак толстой кишки – и проводилось окрашивание каждым из флуоресцентных красителей отдельно, исключая окрашивание ядер. Для получения библиотеки аутофлуоресценции использовалась нативная ткань без какого-либо окрашивания. Далее в программном обеспечении для анализа изображений inForm 2.2.1 (PerkinElmer) производилась экстракция профиля флуоресценции каждого из флуоресцентных красителей и неокрашенной ткани.

Оптимизация одноцветного иммунофлуоресцентного исследования

В рамках методологической части исследования была разработана и оптимизирована процедура иммуногистохимического окрашивания образцов. Процесс включал в себя комплексную оптимизацию нескольких ключевых параметров для каждого исследуемого антитела: селекцию оптимального буферного раствора для демаскировки антигена, определение рабочей

концентрации первичных антител, а также установление оптимальных временных и температурных режимов инкубации как первичных, так и вторичных антител.

Стандартизированный протокол ИГХ-исследования состоял из следующих последовательных этапов. Предварительная подготовка образцов осуществлялась путем трехкратной инкубации в ксилоле (по 10 минут), с последующей регидратацией в серии этанолов убывающей концентрации (двукратно в 70 % этаноле по 5 минут, затем однократно в 96 % этаноле в течение 5 минут) и финальной отмывкой в дистиллированной воде (10 минут). Демаскировка антигенов проводилась в автоматизированном модуле PTLINK 20 (Dako, Дания) с использованием ЭДТА-содержащего буфера при температуре 97 °C в течение 20 минут. После демаскировки срезы промывались фосфатно-солевым буфером (5 минут). Блокирование неспецифического связывания осуществлялось последовательной обработкой срезов раствором для блокировки эндогенной пероксидазной активности (10 минут), промывкой в дистиллированной воде (5 минут) и инкубацией с белковым блокирующим раствором (10 минут).

Иммуное мечение производилось с использованием следующих первичных антител: Anti-LAG3 (клон, 663Hu01 Cloud Clone Corporation разведение 1 : 500), anti-CD8 (клон SP57, RTU, Ventana), anti-CD163 (клон 10D6, RTU, Diagnostic Biosystems), anti-CD3 (клон 2GV6, RTU, Ventana), anti-PD-L1 (клон SP142, RTU, Ventana) и anti-CTLA4 (клон 230Hu01 Cloud Clone Corporation, разведение 1 : 500). Время инкубации составляло 25 минут.

Визуализация осуществлялась с помощью универсальной полимерной системы EnVision FLEX + (Dako) при температуре 25 °C в течение 20 минут с последующей инкубацией с раствором Opal (разведение 1 : 150, Акоуа) в течение 15 минут.

Оптимизация мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования

Для проведения мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования был разработан модифицированный протокол, включающий множественные циклы демаскировки и иммунного мечения. Особое внимание уделялось оценке стабильности экспрессии белков при повторных циклах демаскировки,

оптимизации последовательности нанесения первичных антител и подбору специфических флуоресцентных меток. Условия инкубации первичных антител и флуоресцентных красителей представлены в Таблице 1.

Окрашивание срезов ткани также проводилось с помощью автоматического иммуностейнера Bond RXm (Leica, США). Финальным этапом являлось заключение препаратов в светозащитную среду ProLong Mount with DAPI (Thermo, США), содержащую ядерный краситель.

Таблица 1 – Условия инкубации первичных антител и флуоресцентных красителей при проведении мультиплексного иммуногистохимического исследования

Цикл	Антитело	Разведение антитела	Opal	Разведение Opal
1	LAG3	1 : 1 000	520	1 : 150
2	CD8	1 : 20	570	1 : 300
3	CD163	1 : 150	650	1 : 150
4	CD3	1 : 10	540	1 : 150
5	PD-L1	1 : 10	690	1 : 150
6	CTLA4	1 : 1 000	620	1 : 150

С использованием системы мультиплексного анализа тканей Vectra 3.0.3 (PerkinElmer) были получены многоцветные изображения, которые впоследствии обработаны с учётом спектральных библиотек, созданных для каждого флуоресцентного красителя. Дополнительно была выполнена коррекция путём вычитания аутофлуоресценции в программном обеспечении для расширенного анализа изображений inForm 2.2.1 (PerkinElmer). Обучение программного обеспечения inForm, включая создание эталонной сегментации, проводилось на 10 наиболее репрезентативных изображениях. В рамках анализа выполнены сегментация тканей и клеток, фенотипирование клеточных популяций, а также количественная оценка клеток, экспрессирующих искомые маркеры, в центральной зоне опухоли и на её инвазивном крае. Исследуемые срезы сканировали при увеличении $\times 4$, мультиспектральные изображения изучаемых

областей получали при увеличении $\times 10$, в каждом препарате исследовали 10 областей. Результаты мультиплексного окрашивания опухолевой ткани представлены на Рисунках 9 и 10.

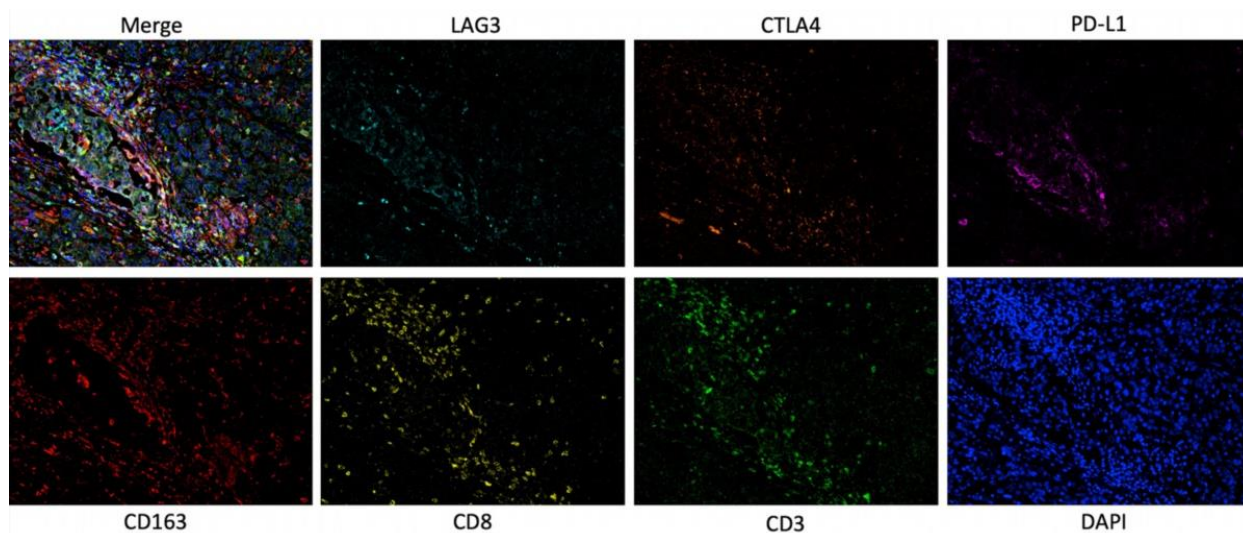


Рисунок 9 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против LAG3 (голубой цвет), CD8 (желтый цвет), CD163 (красный цвет), CD3 (зеленый цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет), DAPI (синий цвет).

Увеличение $\times 630$

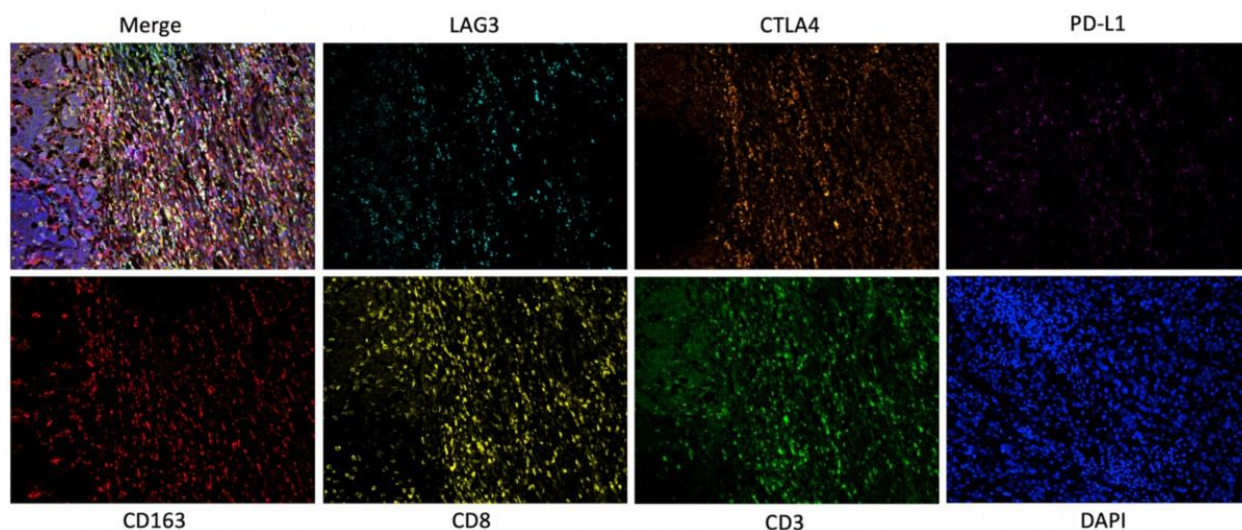


Рисунок 10 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный фронт) антителами против LAG3 (голубой цвет), CD8 (желтый цвет), CD163 (красный цвет), CD3 (зеленый цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет), DAPI (синий цвет). Увеличение $\times 630$

Описанный методологический подход обеспечил высокую специфичность и воспроизводимость результатов иммуногистохимического исследования, что позволило получить достоверные данные об экспрессии исследуемых маркеров.

2.3 Статистическая обработка результатов

Анализ полученных данных выполнен с использованием статистического пакета SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, США). Описание количественных показателей представлено с указанием медианы и межквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля), а качественные переменные характеризованы в виде абсолютных и относительных частот n (%). Для межгруппового сравнения количественных показателей в независимых выборках применялся критерий Краскела-Уоллиса, а для внутригруппового сравнения двух независимых выборок использовались непараметрический U-критерий Манна – Уитни и χ^2 -критерий Пирсона.

Построение прогностической модели вероятности определённого исхода осуществлялось методом логистической регрессии, при этом коэффициент R^2 Найджелкерка использовался в качестве меры определённости, отражающей долю объяснённой дисперсии. Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании исхода применялся анализ ROC-кривых, а пороговое (cut-off) значение количественного параметра определялось по максимальному индексу Юдена. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Взаимосвязь патоморфологических характеристик и клинических параметров при раке толстой кишки

В настоящее время установлено, что течение рака толстой кишки может быть связано с рядом клинических и патоморфологических аспектов была проведена оценка его взаимосвязей со следующими параметрами: пол пациентов, гистологический тип опухоли, ее локализация, глубина поражения, количество пораженных лимфатических узлов, наличие отдалённых метастазов, а также лимфоваскулярная, периневральная инвазия, наличие «опухолевых почек» (tumor budding) в инвазивном фронте опухоли и степень инфильтрации стромы опухоли иммунокомпетентными клетками.

В настоящем исследовании все опухоли были разделены на четыре группы в зависимости от их гистотипа и степени дифференцировки: группа низкодифференцированных аденокарцином (high grade), была представлена 21 случаем, количество высокодифференцированных аденокарцином (low-grade) составило 35 случаев, муцинозный рак был представлен 21 образцом опухолевой ткани, в 3 наблюдениях, включенных в исследование, была установлена медуллярная карцинома.

Результаты морфологического исследования образцов опухолевой ткани с различными гистологическими субтипами рака толстой кишки представлены на микрофотографиях (Рисунки 11, 12, 13 и 14).

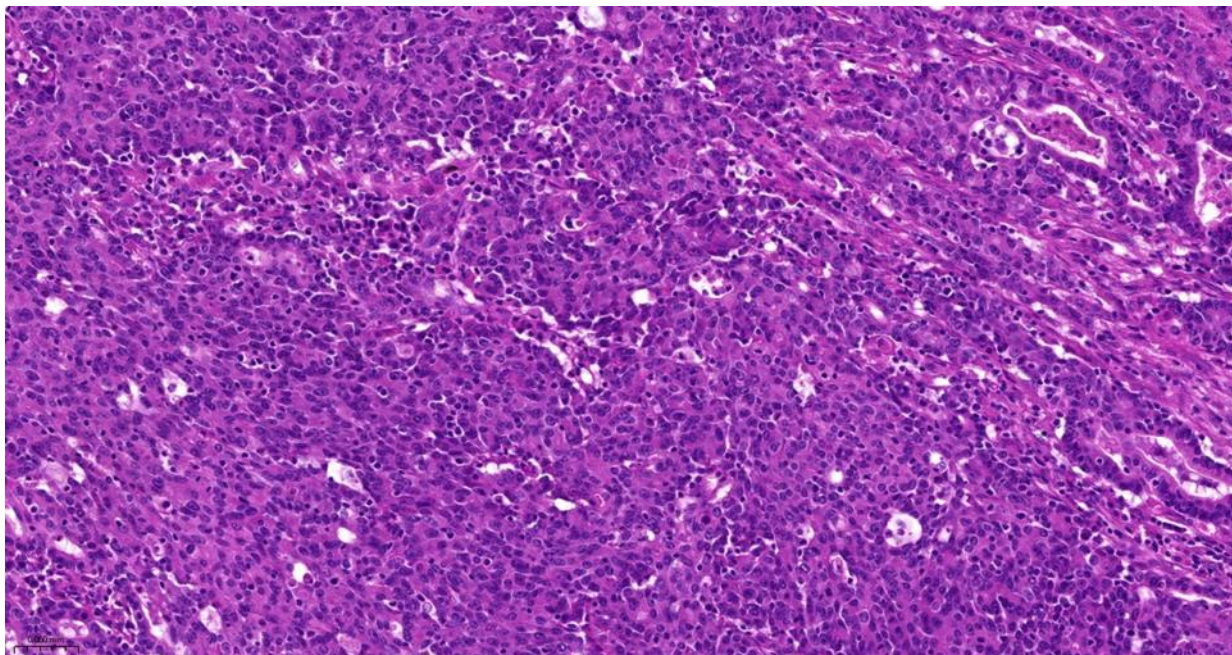


Рисунок 11 – Аденокарцинома толстой кишки низкой степени дифференцировки (high-grade). Структура опухоли представлена солидным ростом с минимальными признаками железистой дифференцировки. В строме отмечается выраженная воспалительная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

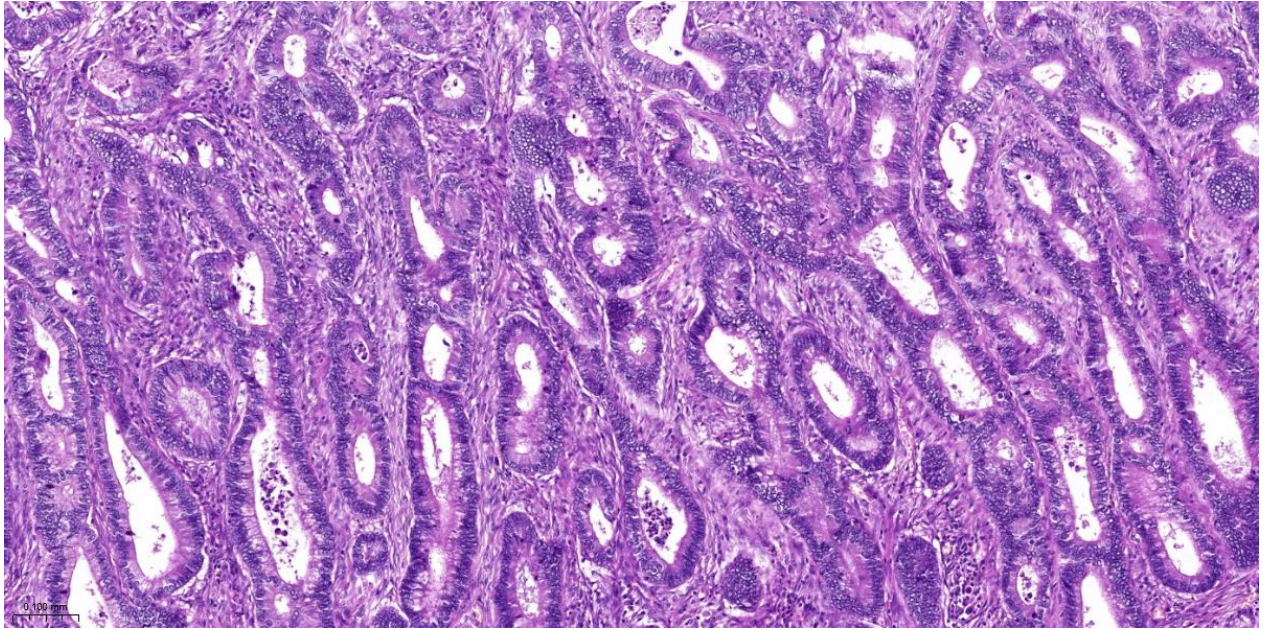


Рисунок 12 – Аденокарцинома толстой кишки высокой степени дифференцировки (low-grade), опухоль представлена железистыми структурами (тубулярный паттерн). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

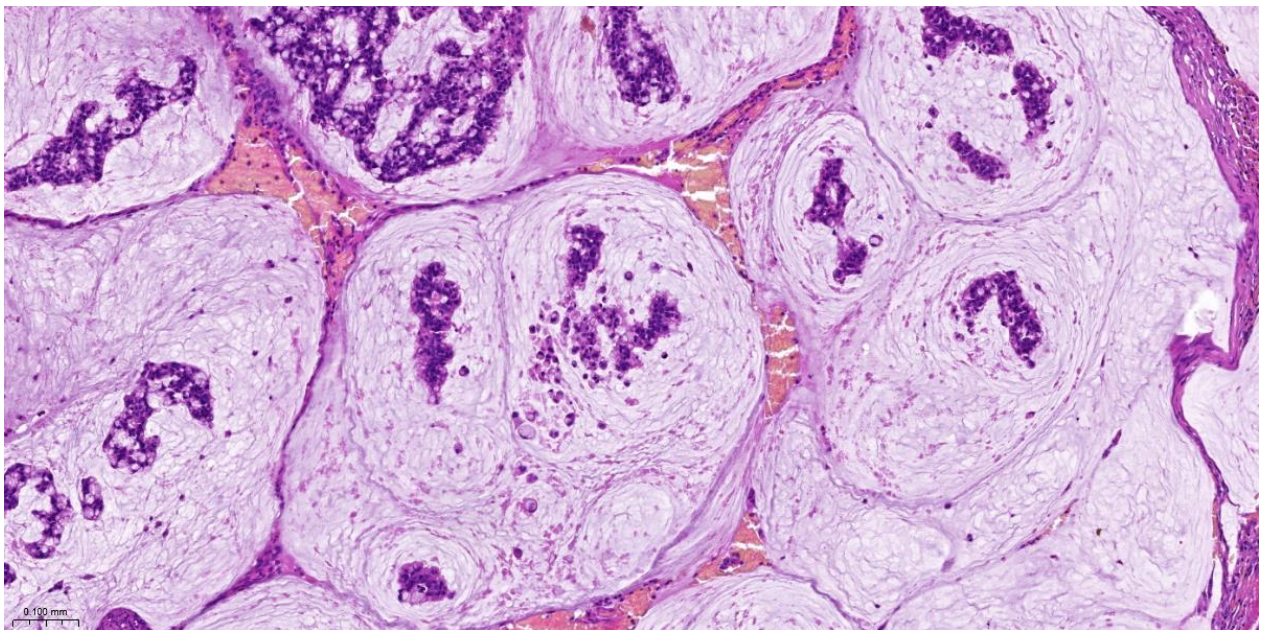


Рисунок 13 – Муцинозная аденокарцинома толстой кишки. «Озера» внеклеточного муцина с наличием в них опухолевых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

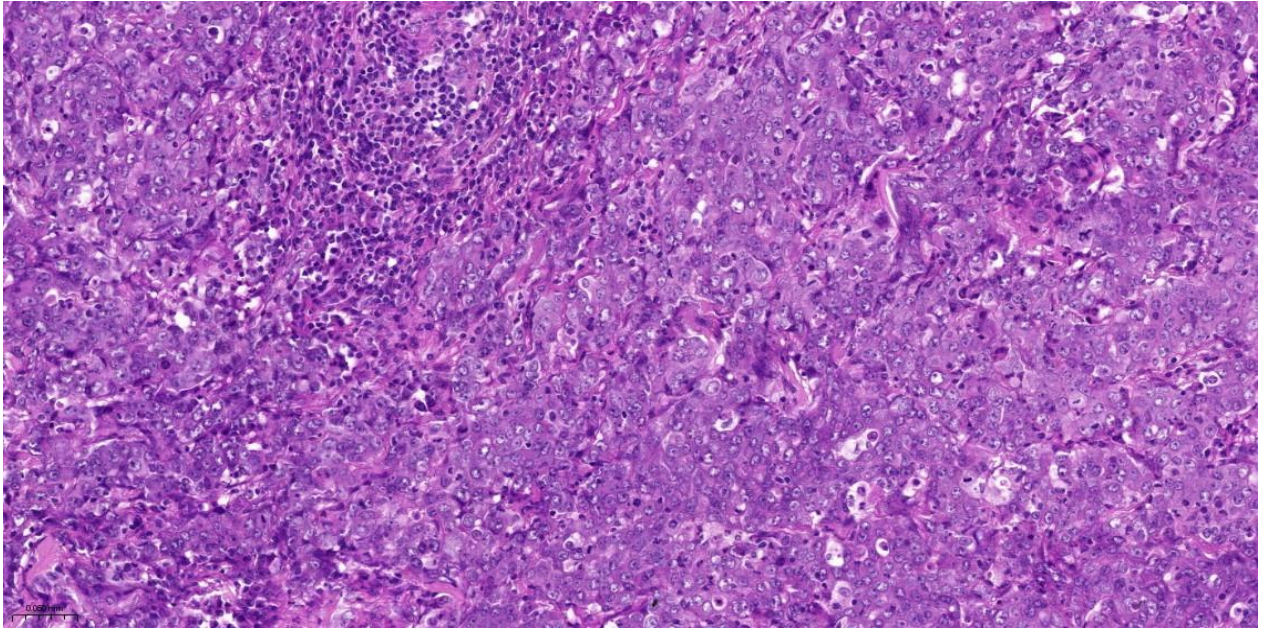


Рисунок 14 – Медуллярная аденокарцинома толстой кишки. Синцитиальный паттерн роста с наличием выраженной лимфодной инфильтрации стромы опухоли. Ядра клеток резко полиморфные, определяются многочисленные фигуры митозов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Особый интерес изучения сопряженности гистологического типа и степени дифференцировки опухоли с клинико-морфологическими параметрами обусловлен тем, что данные морфологические характеристики отражают степень анаплазии клеток карциномы, в основе чего лежат биохимические процессы клеточной адгезии, межклеточной и стромальной интеграции опухолевых клеток, что, в свою очередь, обуславливает биологическое поведение опухоли, определяя непосредственное клиническое значение.

Сравнительный анализ распределения морфологического типа рака толстой кишки со степенью дифференцировки опухоли в зависимости от пола пациентов показал ряд отличий. Так, все случаи медуллярного рака были выявлены у пациентов женского пола, в то время как муцинозные опухоли и аденокарциномы high grade чаще наблюдались у больных мужского пола (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от пола и гистологического типа опухоли

Пол пациента	Гистологический тип опухоли* (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Мужской	13 (62,0 %)	20 (57,1 %)	15 (71,4 %)	—
Женский	8 (38,1 %)	15 (42,9 %)	6 (28,6 %)	3 (100 %) $\chi^2 = 5,714$
$\chi^2 = 5,79; p = 0,12$				
Примечание: *HG – аденокарцинома high grade; LG – аденокарцинома low grade; MUC – муцинозная карцинома; MED – медуллярная карцинома.				

На сегодняшний день широко показано отличие в клиническом течении РТК в зависимости от стороны поражения опухолью толстой кишки. Проведенный анализ распределения правосторонней и левосторонней локализации опухоли в зависимости от гистологического типа позволил установить, что в группе с правосторонним расположением новообразование чаще было представлено аденокарциномой неспецифического типа high-grade и медуллярным раком. При этом для аденокарциномы неспецифического типа с дифференцировкой low-grade была более характерна левосторонняя локализация опухоли (Таблица 3).

Таблица 3 – Зависимость локализации опухоли от гистологического типа у больных раком толстой кишки

Сторона локализации опухоли	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Правый гемиколон	13 (61,9 %)	11 (31,4 %) $p_{1-2} = 0,026$; $\chi^2 = 4,978$	12 (57,1 %)	3 (100 %) $p_{2-4} = 0,018$; $\chi^2 = 5,584$
Левый гемиколон	8 (38,1 %)	24 (68,6 %)	9 (42,9 %)	0
$\chi^2 = 9,4$; $p = 0,02$				

В дальнейшем был проведен анализ зависимости гистологического типа опухоли и непосредственной ее локализации в анатомических отделах толстой кишки. Было показано, что имеется достоверное преобладание в сигмовидной кишке карцином неспецифического low-grade. В остальных подгруппах существенных различий не обнаружено (Таблица 4).

Таблица 4 – Частота распределения больных раком толстой кишки в зависимости от гистологического типа и анатомической локализации первичной опухоли

Сторона локализации опухоли в толстой кишке	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Слепая кишка	3 (14,3 %)	1 (2,9 %)	5 (23,8 %)	—
Восходящая кишка	4 (19,0 %)	5 (14,3 %)	4 (19,0 %)	2 (66,7 %)
Печеночный изгиб	4 (19,0 %)	2 (5,7 %)	2 (9,5 %)	1 (33,3 %)
Поперечно-ободочная кишка	3 (14,3 %)	—	2 (9,5 %)	—
Селезеночный изгиб	—	6 (17,1 %)	—	—
Нисходящая ободочная кишка	—	3 (8,6 %)	3 (14,3 %)	—

Сторона локализации опухоли в толстой кишке	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Сигмовидная кишка	7 (33,3 %)	15 (42,9 %)	4 (19,0 %)	—
Ректосигмоидный отдел	—	3 (8,6 %) $p_{1-2} = 0,016$; $\chi^2 = 17,26$	1 (4,8 %) $p_{2-3} = 0,029$; $\chi^2 = 9,18$	—
$\chi^2 = 34,29$; $p = 0,03$				

Глубина инвазии опухолью в стенку кишки является важным фактором, определяющим распространенность опухолевого процесса, на основе которого оценивается критерий Т при стадировании заболевания. Примеры различной глубины инвазии продемонстрированы на микрофотографиях (Рисунок 15 и 16).

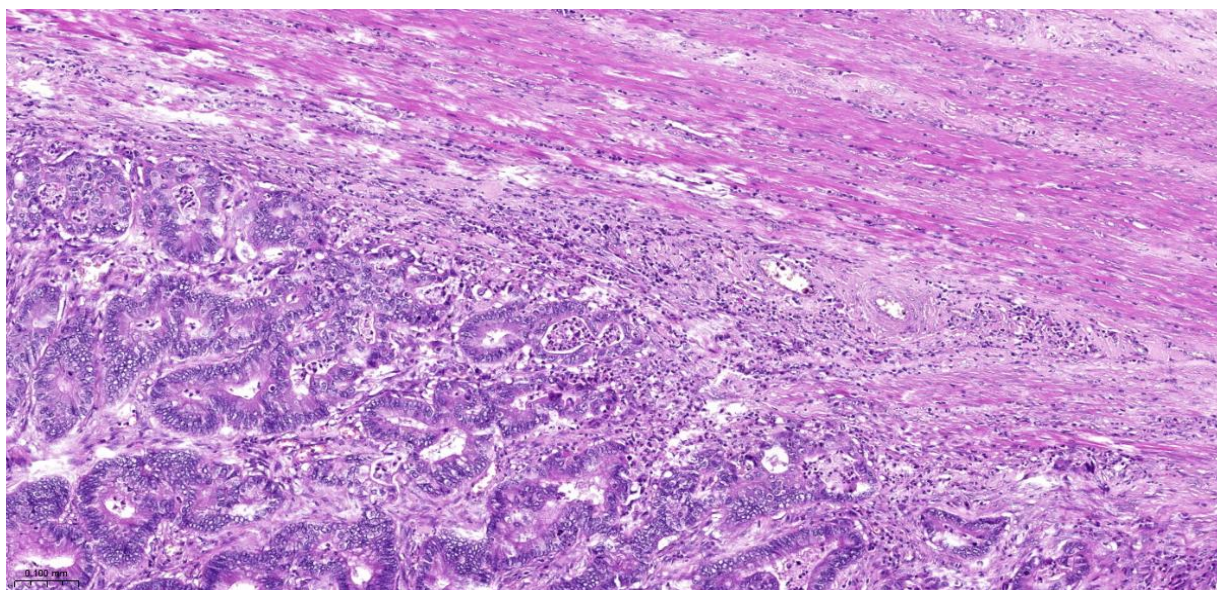


Рисунок 15 – Инвазия аденокарциномы толстой кишки высокой степени дифференцировки (low-grade) в мышечную оболочку стенки кишки. Опухолевые комплексы прорастают за пределы подслизистой основы, инфильтрируя мышечный слой, что соответствует стадии pT3. Морфологически отмечается десмопластическая реакция стромы. Вокруг опухолевых структур наблюдается умеренно выраженная воспалительная инфильтрация, преимущественно за счёт лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

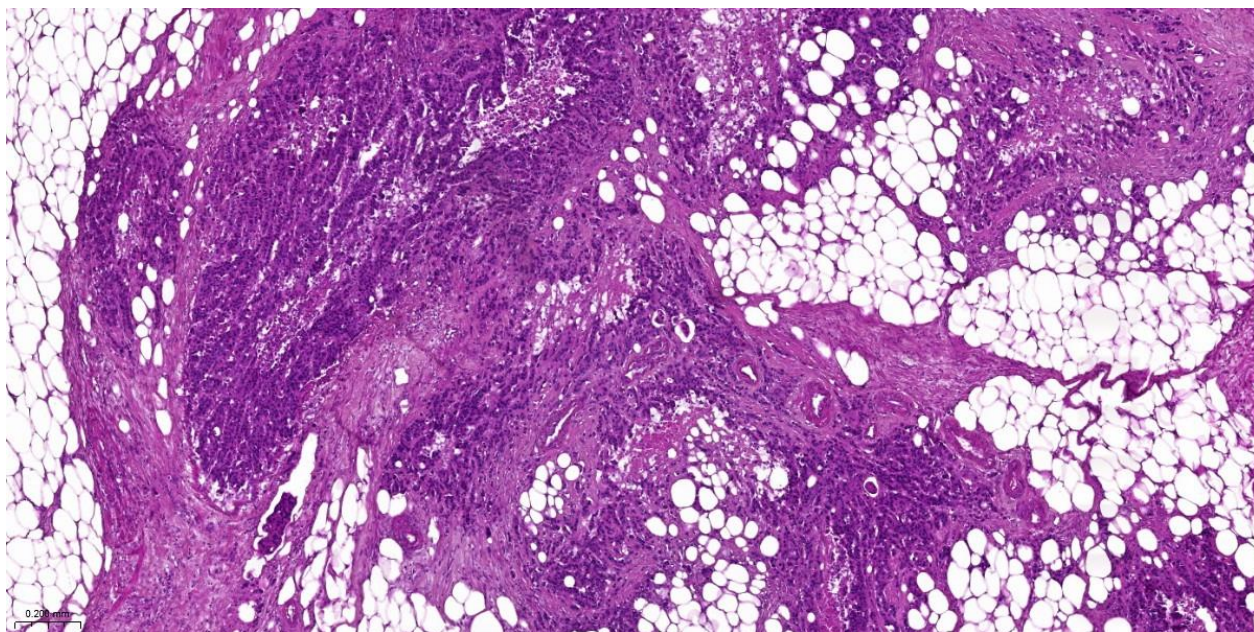


Рисунок 16 – Инвазия аденокарциномы толстой кишки низкой степени дифференцировки (high-grade) в жировую клетчатку брыжейки. Опухолевые комплексы распространяются за пределы серозной оболочки, инфильтрируя жировую ткань брыжейки, что соответствует стадии pT4a. Морфологически отмечается гнездное и солидное расположение опухолевых клеток среди жировых долек, сопровождающееся выраженной десмопластической реакцией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$

Глубина инвазии опухоли в стенку кишки варьировала в зависимости от её гистологического типа. В большинстве случаев опухоли прорастали через все слои кишки и распространялись на прилежащие ткани (pT4). Данный тип инвазии наиболее часто наблюдался среди аденокарцином высокой степени злокачественности (80,9 %), муцинозных карцином (76,2 %) и медуллярных карцином (100 %). В то же время опухоли, ограниченные мышечным слоем (pT3), чаще встречались среди аденокарцином высокой степени дифференцировки (31,4 %), что может указывать на их менее агрессивное поведение. Поверхностная инвазия, ограниченная слизистым и подслизистым слоями (pT1–pT2), была выявлена только у опухолей низкой степени злокачественности (17,2 %) и муцинозных карцином (4,8 %), тогда как среди аденокарцином высокой степени

злокачественности и медуллярных карцином такие случаи не зарегистрированы. Однако статистическая значимость связи между гистологическим типом опухоли и глубиной её инвазии в нашем исследовании не была установлена (Таблица 5).

Таблица 5 – Глубина инвазии опухоли в стенку кишки в зависимости от гистологического типа карциномы

Глубина инвазии опухоли	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Слизистый слой(pT1)	—	—	—	—
Подслизистый слой (pT2)	—	6 (17,2 %)	1 (4,8 %)	—
Мышечный слой (pT3)	4 (19,1 %)	11 (31,4 %)	4 (19,0 %)	—
Все слои стенки кишки и в прилежащие ткани (pT4a и pT4b)	17 (80,9 %)	18 (51,4 %)	16 (76,2 %)	3 (100 %)
$\chi^2 = 12,6; p = 0,17$				

Во многих исследованиях было показано, что степень инфильтрации иммунными клетками при злокачественных новообразованиях рассматривается как важная составляющая опухолевого микроокружения, отражающая степень иммунного ответа на опухолевые антигены и имеющая как прогностическое, так и в ряде случаев предиктивное значение в отношении ответа на проводимое лечение. В связи с чем, представляло особый интерес провести оценку степени выраженности воспалительной инфильтрации в зависимости от морфологического типа РТК.

Было обнаружено, что в группе аденокарцином неспецифического типа high grade и в опухолях с муцинозным гистологическим типом преобладали случаи с выраженной воспалительной инфильтрацией по сравнению с высокодифференцированными аденокарциномами (Таблица 6).

Таблица 6 – Степень выраженности воспалительной инфильтрации в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Степень выраженности воспалительной инфильтрации	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Слабая (1 балл)	2 (9,5 %)	7 (20 %)	3 (14,3 %)	—
Умеренная (2 балла)	7 (33,3 %)	21 (60 %)	6 (28,6 %)	1 (33,3 %)
Выраженная (3 балла)	12 (57,1 %)	7 (20 %) $p_{1-2} = 0,017$; $\chi^2 = 8,1$	12 (57,1 %) $p_{2-3} = 0,016$; $\chi^2 = 8,266$	2 (66,7 %)
$\chi^2 = 12,14$; $p = 0,048$				

Исследование лимфоваскулярной инвазии является неотъемлемой частью патоморфологического протокола оценки, так как выявление в просвете лимфатических или кровеносных сосудов опухолевых клеток существенно сопряжено с риском развития лимфогенных и гематогенных метастазов. Морфологические проявления данного признака продемонстрированы на микрофотографиях (Рисунок 17 и 18).

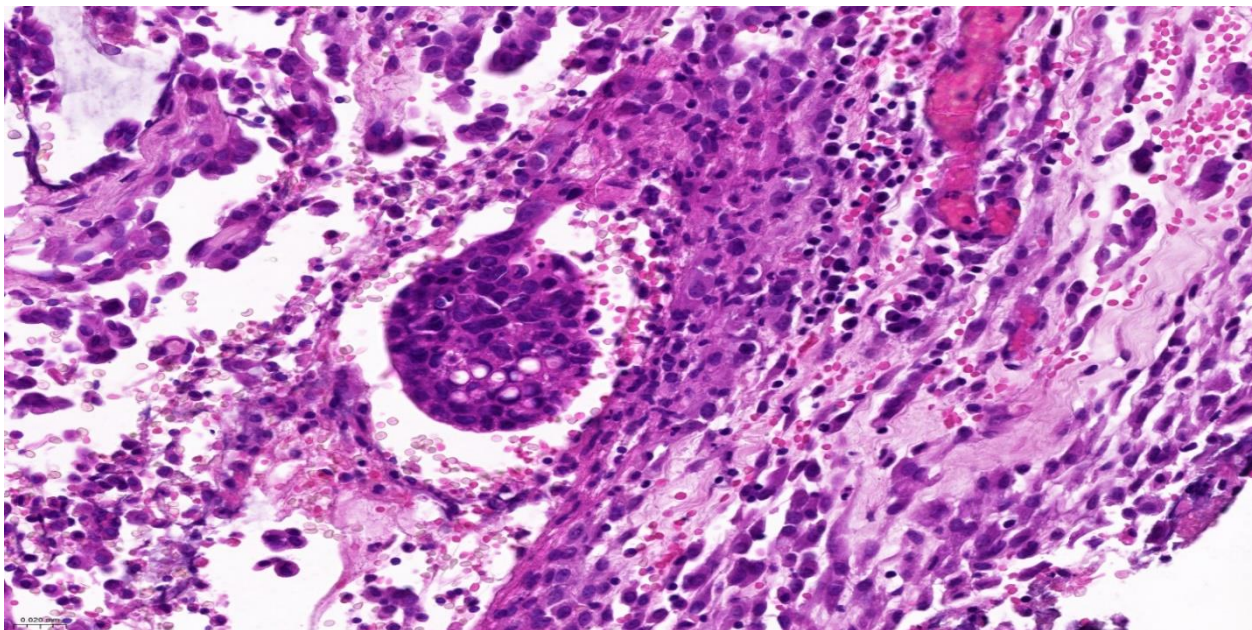


Рисунок 17 – Опухолевый эмбол аденокарциномы high-grade толстой кишки в просвете кровеносного сосуда. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 400$

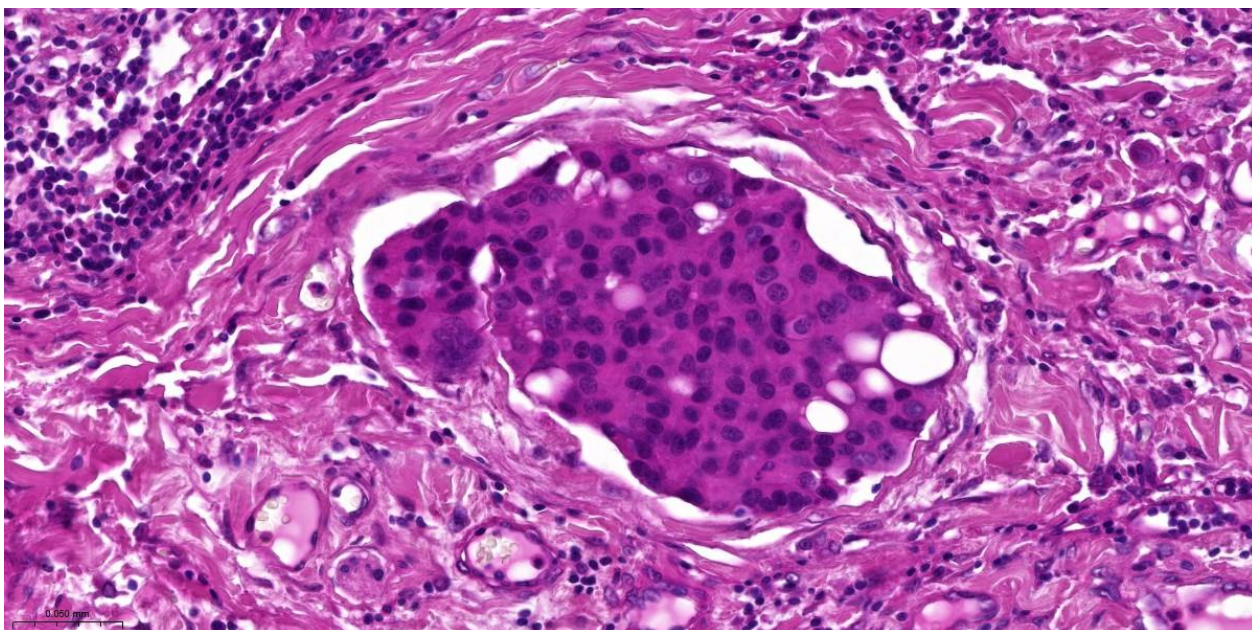


Рисунок 18 – Опухолевый эмбол аденокарциномы high-grade толстой кишки в просвете лимфатического сосуда. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 630$

Проведенная оценка данного параметра в зависимости от гистологического типа опухоли позволила установить достоверно большую частоту лимфоваскулярной инвазии среди high grade аденокарцином неспецифического типа в сравнении с low grade карциномами и медуллярными аденокарциномами. Стоит также отметить, что среди медуллярных аденокарцином, включенных в исследование, признаков лимфоваскулярной инвазии обнаружено не было (Таблица 7).

Таблица 7 – Частота выявления лимфоваскулярной инвазии в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Лимфоваскулярная инвазия	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Наличие инвазии (LVI+)	13 (61,9 %)	9 (25,7 %)	8 (38,1 %)	—
Отсутствие инвазии (LVI–)	8 (38,1 %)	26 (74,3 %) $p_{1-2} = 0,007$; $\chi^2 = 7,207$	13 (61,9 %)	3 (100 %) $p_{1-4} = 0,044$; $\chi^2 = 4,052$
$\chi^2 = 9,2$; $p = 0,02$				

Дополнительным критерием оценки течения заболевания при патоморфологическом исследовании является определение периневральной инвазии [138]. Патоморфологические проявления периневральной инвазии продемонстрированы на Рисунке 19.

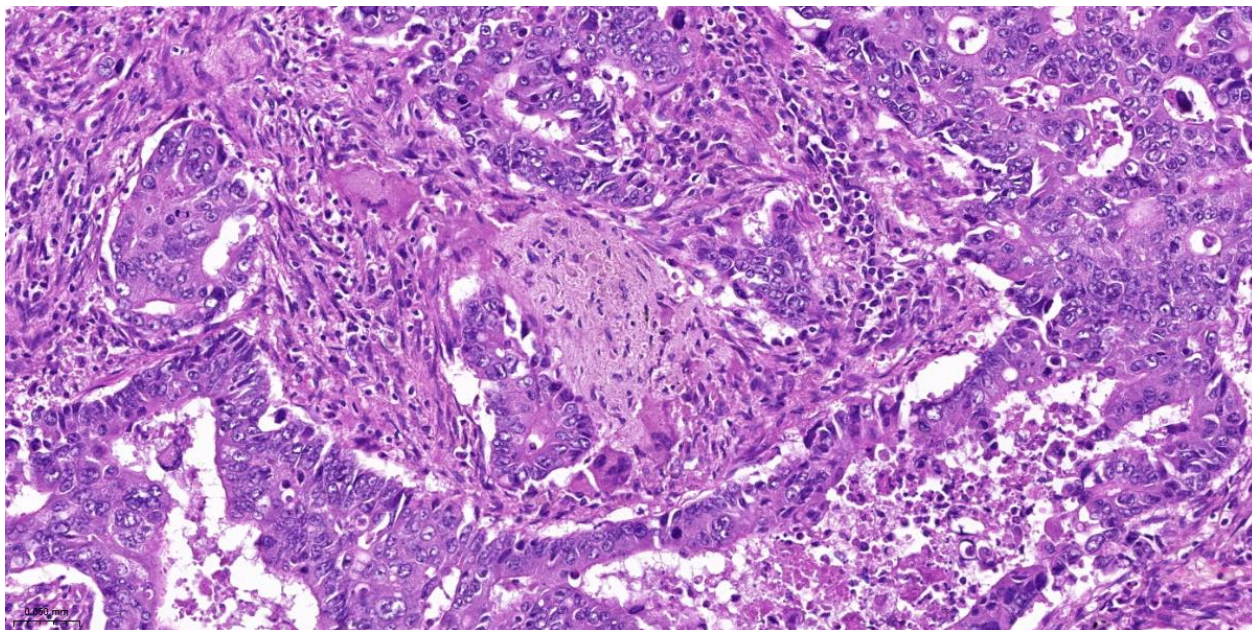


Рисунок 19 – Периневральная инвазия в мышечной оболочке стенки толстой кишки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

В исследуемых группах было установлено, что данный признак наблюдался при разных гистологических подтипах новообразования, но в нашей когорте не был обнаружен при медуллярной карциноме. Однако статически значимые различия были выявлены между аденокарциномой неспецифического типа high grade и муцинозной аденокарциномой, так как муцинозные опухоли характеризовались тенденцией к меньшей частоте периневральной инвазии в отличие от низкодифференцированных карцином (Таблица 8).

Таблица 8 – Частота выявления периневральной инвазии в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Периневральная инвазия	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Наличие периневральной инвазии (PNI+)	10 (47,6 %)	10 (28,6 %)	4 (19,0 %)	—
Отсутствие периневральной инвазии (PNI–)	11 (52,4 %)	25 (71,4 %)	17 (81,0 %) $p_{1-3} = 0,05$; $\chi^2 = 3,857$	3 (100 %)
$\chi^2 = 5,6$; $p = 0,13$				

Оценка связи феномена опухолевого почкования с гистологическим типом исследуемых групп не позволила установить значимых различий (Таблица 9).

Таблица 9 – Распределение степеней феномена опухолевого почкования в зависимости от гистологического типа опухоли

Степень феномена опухолевого почкования	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Отсутствует	9 (42,9 %)	20 (57,1 %)	13 (61,9 %)	3 (100 %)
Слабая (bd1)	4 (19,0 %)	11 (31,4 %)	7 (33,3 %)	—
Умеренная (bd2)	4 (19,0 %)	3 (8,6 %)	1 (4,8 %)	—
Выраженная (bd3)	4 (19,0 %)	1 (2,9 %)	—	—
Достоверность различий	$\chi^2 = 13,9$; $p = 0,2$			

В последующем были также оценены регионарные лимфатические узлы на предмет наличия метастазов и проведен анализ частоты их возникновения в зависимости от морфологического типа опухоли. Различные варианты

метастатического поражения аденокарциномой толстой кишки регионарных лимфатических узлов представлены на Рисунках 20 и 21.

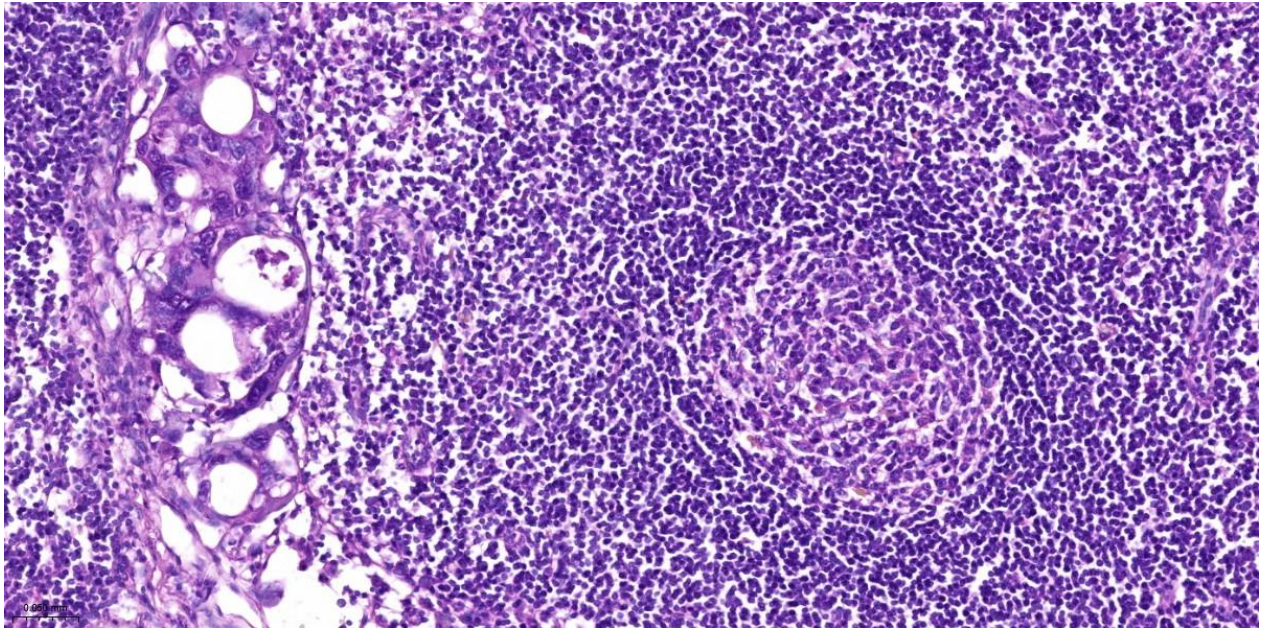


Рисунок 20 – Метастаз аденокарциномы толстой кишки в краевой синус регионарного лимфатического узла. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

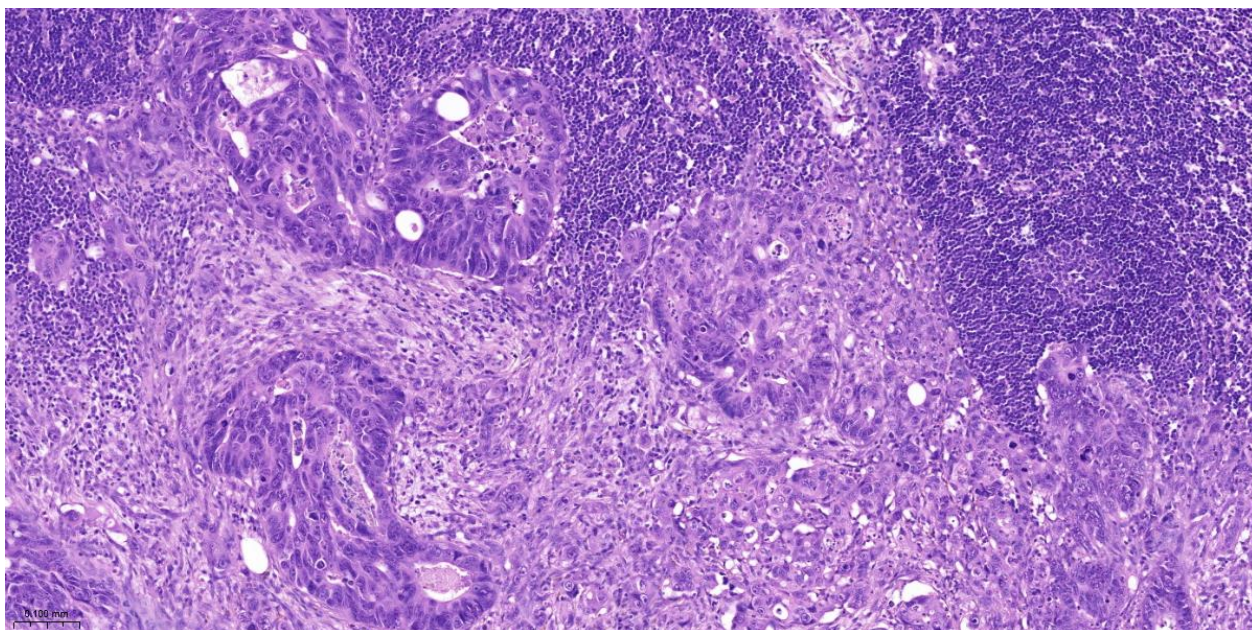


Рисунок 21 – Метастаз аденокарциномы толстой кишки в регионарный лимфатический узел. Субтотальное замещение ткани лимфатического узла опухолью. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

Исследование количества пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов в зависимости от гистологического подтипа опухоли выявило различия между группами низкодифференцированных и высокодифференцированных карцином неспецифического типа. Группа low-grade карцином характеризовалась отсутствием метастатического поражения лимфатических узлов, в то время как карциномы с морфологией high-grade характеризовались поражением более 7 регионарных лимфоузлов. Стоит отметить, что в отличие от низкодифференцированных аденокарцином толстого кишечника неспецифического типа при медуллярном раке метастатическое поражение лимфатических узлов либо не было выявлено или было ограничено стадий N1b, что было статистически подтверждено (Таблица 10).

Таблица 10 – Частота метастатического поражения лимфатических узлов в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Количество пораженных лимфатических узлов	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Отсутствует (N ₀)	8 (38,1 %)	17 (48,6 %) p ₁₋₂ = 0,048; $\chi^2 = 11,192$	11 (52,4 %)	1 (33,3 %) p ₁₋₄ = 0,007; $\chi^2 = 15,873$
1 лимфатический узел (N _{1a})	5 (23,8 %)	6 (17,1 %)	3 (14,3 %)	—
2-3 лимфатических узла (N _{1b})	—	4 (11,4 %)	1 (4,7 %)	2 (66,7 %)
4-6 лимфатических узлов (N _{2a})	2 (9,5 %)	5 (14,3 %)	3 (14,3 %)	—
7 и более лимфатических узлов (N _{2b})	6 (28,6 %)	3 (8,6 %)	3 (14,3 %)	—
$\chi^2 = 25,87$; p = 0,039				

При этом взаимосвязи между гистологическим типом опухоли и фактом отдаленного метастазирования в ходе проведенного статистического анализа нами установлено не было (Таблица 11).

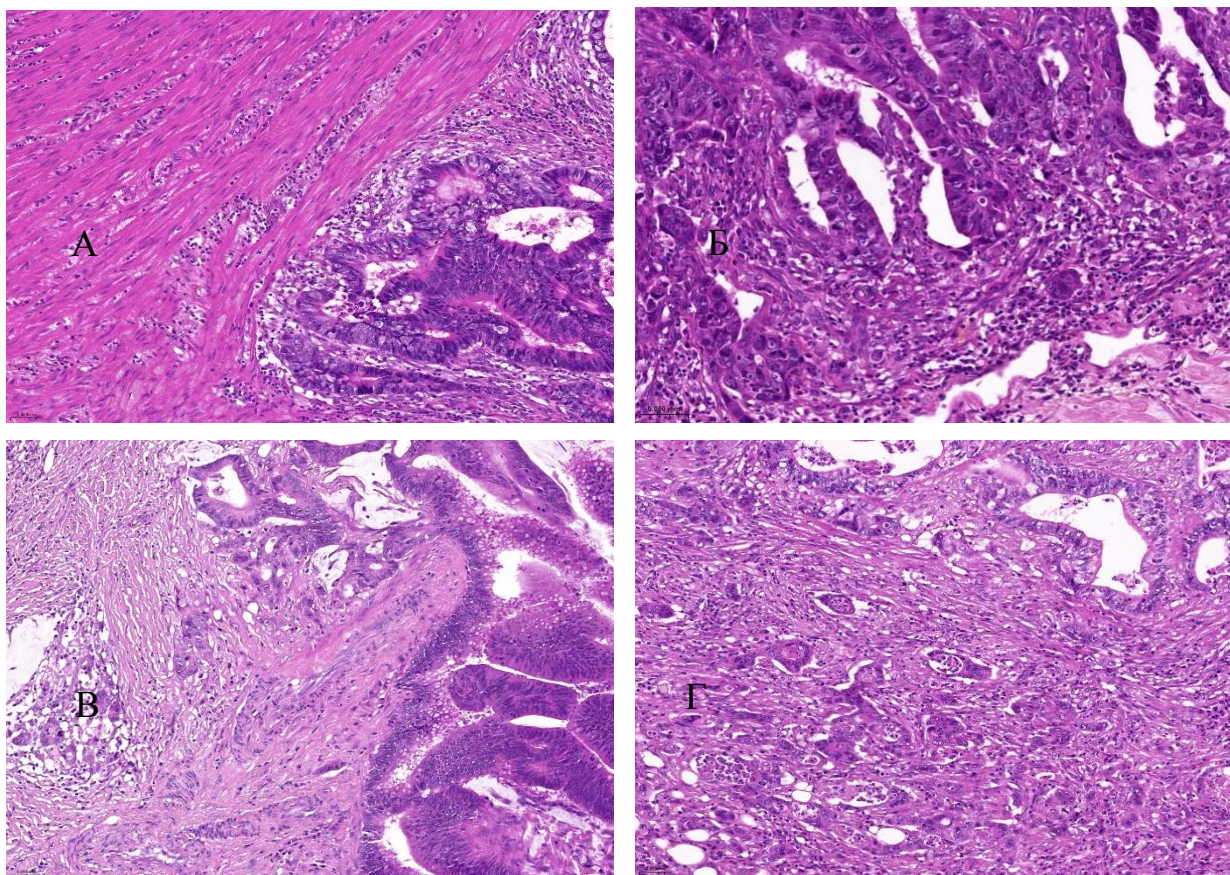
Таблица 11 – Частота отдаленных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Наличие отдаленных метастазов	Гистологический тип опухоли (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	HG n = 21	LG n = 35	MUC n = 21	MED n = 3
Да (M ₁)	4 (19,0 %)	4 (11,4 %)	5 (23,8 %)	0
Нет (M ₀)	17 (81,0 %)	31 (88,6 %)	16 (76,2 %)	3 (100 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 2,18$; p = 0,53			

В ходе исследования проведена полуколичественная оценка феномена опухолевого почкования (Tumor budding), являющегося важным морфологическим критерием прогноза рака толстой кишки. Данный параметр

характеризует степень анаплазии опухолевых клеток, их инвазивный и метастатический потенциал и рассматривается в совокупности с традиционными морфологическими характеристиками, такими как степень дифференцировки опухоли и её морфологический подтип. Анализ полученных данных показал, что выраженность опухолевого почкования варьирует среди исследуемых случаев, что подтверждает его гетерогенность в пределах одной опухоли.

Для количественной оценки опухолевого почкования использовалась стандартизированная градационная система, предусматривающая три степени выраженности данного показателя: Bd1 (низкая степень, ≤ 4 почки), Bd2 (умеренная степень, 5–9 почек) и Bd3 (высокая степень, ≥ 10 почек). Проведённое исследование позволило выявить различную степень опухолевого почкования в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли, что подтверждается данными, представленными на Рисунке 22, демонстрирующем различные уровни выраженности данного признака.



Примечание: А – отсутствие феномена опухолевого почкования (bd0); Б – феномен опухолевого почкования 1 степени (bd1); В – феномен опухолевого почкования 2 степени (bd2); Г – феномен опухолевого почкования 3 степени (bd3). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

Рисунок 22 – Феномен опухолевого почкования при карциноме толстой кишки

В данном исследовании была установлена достоверная взаимосвязь между наличием лимфоваскулярной инвазии и степенью выраженности феномена опухолевого почкования. Карциномы с отсутствием в инвазивном крае опухолевого почкования обладали достоверно меньшей способностью к сосудистой инвазии по сравнению с опухолями bd1, bd2, bd3 степени (Таблица 12).

Таблица 12 – Частота лимфоваскулярной инвазии в зависимости от степени опухолевого почкования в опухоли у больных раком толстой кишки

Лимфоваскулярная инвазия	Степень опухолевого почкования (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	Bd0 n = 45	Bd1 n = 21	Bd2 n = 8	Bd3 n = 6
Наличие инвазии (LVI+)	8 (17,8 %)	12 (54,5 %) $p_{1-2} = 0,002$; $\chi^2 = 9,53$;	7 (87,5 %) $p_{1-3} = 0,001$; $\chi^2 = 16,27$	6 (100 %) $p_{1-4} = 0,001$; $\chi^2 = 17,91$
Отсутствие инвазии (LVI–)	37 (82,2 %)	10 (45,5 %)	1 (12,5 %)	—
$\chi^2 = 13,06$; $p = 0,0044$				

При исследовании зависимости периневральной инвазии от степени выраженности феномена опухолевого почкования были также установлены различия, которые продемонстрировали, что карциномы с отсутствием в инвазивном крае феномена опухолевого почкования характеризовались достоверно меньшей частотой периневральной инвазии, чем опухоли с наличием данного феномена в разной степени выраженности (Таблица 13).

Таблица 13 – Частота выявления периневральной инвазии в зависимости от степени опухолевого почкования у больных раком толстой кишки

Периневральная инвазия	Степень опухолевого почкования (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	Bd0 n = 45	Bd1 n = 21	Bd2 n = 8	Bd3 n = 6
Наличие периневральной инвазии (PNI+)	3 (6,7 %)	11 (50 %)	7 (87,5 %) $p_{1-3} = 0,001$; $\chi^2 = 28,99$	4 (66,7 %) $p_{1-4} = 0,001$; $\chi^2 = 16,09$
Отсутствие периневральной инвазии (PNI–)	42 (93,3 %)	11 (50 %) $p_{1-2} = 0,001$; $\chi^2 = 16,78$	1 (12,5 %)	2 (33,3 %)
$\chi^2 = 8,07$; $p = 0,044$				

Исследование зависимости степени выраженности опухолевого почкования с фактом лимфогенного метастазирования в регионарные лимфатические узлы позволило обнаружить сопряженность исследуемых параметров. Было показано, что опухоли с отсутствием данного морфологического феномена в инвазивном крае значительно реже характеризуются метастатическим поражением лимфатических узлов (Таблица 14).

Таблица 14 – Частота поражения лимфатических узлов в зависимости от степени опухолевого почкования

Состояние регионарных лимфатических узлов	Степень опухолевого почкования (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	Bd0 n = 45	Bd1 n = 21	Bd2 n = 8	Bd3 n = 6
Наличие поражения лимфатических узлов	15 (24,4 %)	15 (81,8 %) $p_{1-2} = 0,001$; $\chi^2 = 19,81$	8 (100 %) $p_{1-3} = 0,001$; $\chi^2 = 16,86$	6 (100 %) $p_{1-4} = 0,01$; $\chi^2 = 6,61$
Отсутствие поражения лимфатических узлов	30 (75,6 %)	6 (18,2 %)	—	—
$\chi^2 = 25,43$; $p = 0,000013$				

Кроме того, в случаях наличия регионарных метастазов количество пораженных лимфатических узлов было статистически меньше среди опухолей, в инвазивном крае которых не обнаруживались опухолевые почки, чем среди карцином, имеющих первую, вторую и третью степень почкования (Таблица 15).

Таблица 15 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от количества метастатических регионарных лимфатических узлов и феномена опухолевого почкования

Количество пораженных лимфатических узлов	Степень опухолевого почкования (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	Bd0 n = 45	Bd1 n = 21	Bd2 n = 8	Bd3 n = 6
Отсутствует (N0)	30 (66,7 %)	6 (28,6 %)	—	—
1 лимфатический узел (N1a)	5 (11,1 %)	4 (19 %)	—	—
2-3 лимфатических узла (N1b)	6 (13,3 %)	4 (19 %)	2 (25 %)	1 (20 %)
4-6 лимфатических узлов (N2a)	—	3 (14,4 %)	2 (25 %)	1 (20 %)
7 и более лимфатических узлов (N2b)	4 (8,9 %)	4 (19 %)	4 (60 %)	4 (60 %)
Достоверность различий	—	$p_{1-2} = 0,001$; $\chi^2 = 20,43$	$p_{1-3} = 0,001$; $\chi^2 = 31,15$	$p_{1-4} = 0,001$; $\chi^2 = 32,22$
$\chi^2 = 43,9$; $p = 0,00011$				

В ходе изучения взаимосвязи между фактом отдаленного метастазирования и наличием феномена опухолевого почкования было установлено достоверное различие между карциномами с отсутствием опухолевых почек и опухолями, имеющими разную степень выраженности данного феномена. Стоит также отметить, что в группе больных, опухоли которых имели степень Bd1, отмечена более низкая частота отдаленных метастазов, чем в группах с Bd2 и Bd3 (Таблица 16).

Таблица 16 – Частота отдаленных метастазов в зависимости от степени феномена опухолевого почкования в первичной опухоли у больных с раком толстой кишки

Наличие отдаленных метастазов	Степень опухолевого почкования (а. ч. %)			
	1	2	3	4
	Bd0 n = 45	Bd1 n = 21	Bd2 n = 8	Bd3 n = 6
Да (M ₁)	2 (4,4 %)	2 (13,6 %)	4 (50 %)	4 (80 %) p ₂₋₄ = 0,002; $\chi^2 = 9,34$
Нет (M ₀)	43 (95,6 %) p ₁₋₃ = 0,001; $\chi^2 = 14,04$;	19 (86,4 %)	4 (50 %) p ₂₋₃ = 0,037; $\chi^2 = 4,33$;	2 (20 %) p ₁₋₄ = 0,001; $\chi^2 = 24,32$
$\chi^2 = 26,34$; p = 0,000008				

Проведенный комплексный анализ взаимосвязи патоморфологических характеристик карцином толстой кишки с рядом клинических параметров пациентов с данной нозологической единицей позволил установить ряд достоверных различий, часть из которых могут определять течение заболевания.

Так, было установлено, что аденокарциномы NOS high-grade обладают большей способностью к инвазии за пределы стенки кишки с вовлечением в процесс опухолевого роста прилежащих органов. В исследованной нами когорте больных РТК опухоли с морфологией high-grade, также как и муцинозные аденокарциномы, характеризовались высокой степенью воспалительной

инфильтрации в сравнении с low-grade карциномами, что было подтверждено статистически. Несмотря на выраженную инфильтрацию иммунными клетками стромы низкодифференцированных карцином, опухоли данного типа характеризовались большей способностью к лимфоваскулярной инвазии в отличие от других исследуемых типов опухолей. Стоит отметить, что факт наличия периневральной и лимфоваскулярной инвазии не был выявлен среди медуллярных карцином. Характер более агрессивного течения низкодифференцированных опухолей был подтвержден большим количеством пораженных лимфатических узлов в сравнении с высокодифференцированными и медуллярными опухолями. При этом зависимости между морфологическим подтипом опухоли и степенью ее дифференцировки с частотой отдаленного метастазирования не было обнаружено.

Оценка стороны локализации злокачественного новообразования показала, что расположение опухоли в правых отделах толстой кишки было характерно для карциномы неспецифического типа с high-grade дифференцировкой, так же, как и для медуллярной аденокарциномы. При этом для аденокарциномы неспецифического типа с дифференцировкой low-grade была более характерна левосторонняя локализация.

Исследование феномена опухолевого почкования в инвазивном крае опухоли показало, что данный патоморфологический параметр не связан с гистологическим типом опухоли и степенью ее дифференцировки. Однако феномен опухолевого почкования вне зависимости от его степени был связан с наличием таких неблагоприятных патоморфологических признаков, как периневральная и лимфоваскулярная инвазия, что, в свою очередь, было сопряжено с количеством пораженных лимфатических узлов.

При этом было установлено, что наличие гематогенных метастазов у больных раком толстой кишки было ассоциировано со степенью выраженности опухолевого почкования в инвазивном крае новообразования.

3.2 Оценка взаимосвязи pMMR/dMMR статуса опухоли с клинико-морфологическими параметрами рака толстой кишки

В настоящее время согласно клиническим рекомендациям Российского общества клинической онкологии (англ. RUSSCO – Russian society of clinical oncology) и других ведущих мировых онкологических сообществ наряду с оценкой морфологических характеристик карцином толстой кишки критерии исследования патоморфологического протокола были дополнены определением pMMR/dMMR статуса и/или MSS/MSI статуса опухоли. Результаты оценки данного параметра позволяют наиболее точно определить характер течения заболевания и назначить высокоэффективную персонализированную терапию пациентам с раком толстой кишки.

Несмотря на наличие pMMR/dMMR статуса в клинических рекомендациях и рутинную его оценку в практическом здравоохранении остается актуальным изучение морфологических паттернов карцином с указанным молекулярным профилем поскольку имеющиеся данные на сегодняшний день часто имеют противоречивый характер. Так, Liang с соавторами показали, что карциномы толстой кишки с dMMR статусом в отличие от pMMR карцином обладают низкой степенью дифференцировки, имеют экспансивный характер роста и высокую степень иммунной инфильтрации стромы опухоли. При сравнении наличия лимфоваскулярной инвазии и метастатического поражения регионарных лимфатических узлов среди pMMR/dMMR карцином авторами исследования различий установлено не было [16]. Другие исследования показали, что в отличие от pMMR карцином dMMR опухоли характеризовались преимущественно местноограниченным характером роста и наличием high-grade дифференцировки, а также было установлено, что степень иммунной инфильтрации стромы опухоли и характер иммунного инфильтрата между pMMR и dMMR карциномами не имели различия [47].

Нами был проведен сравнительный анализ основных клинических и морфологических характеристик карцином толстой кишки в зависимости от

pMMR/dMMR статуса опухоли.

Исследование взаимосвязи между полом пациентов и статусом опухоли не позволили установить различий в преобладании карцином с профицитом белков мистматч репарации или, наоборот, с их дефицитом в зависимости от женского или мужского пола исследованных больных (Таблица 17).

Таблица 17 – Частота распределения pMMR и dMMR карцином в зависимости от пола у больных раком толстой кишки

Пол пациента	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Мужской	21 (53,8 %)	27 (65,9 %)
Женский	18 (46,2 %)	14 (34,1 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 1,20$; p = 0,27	

Оценка молекулярного статуса опухоли в зависимости от стороны ее локализации не установили статистически значимых различий между стороной поражения и наличием/отсутствием экспрессии белков репарации неспаренных нуклеотидов (Таблица 18).

Таблица 18 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от локализации опухоли

Сторона поражения	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Правый гемиколон	17 (43,6 %)	22 (53,7 %)
Левый гемиколон	22 (56,4 %)	19 (46,3 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 0,81$; p = 0,36	

Анализ частоты встречаемости опухолей с pMMR или dMMR статусом в зависимости от гистологического подтипа опухоли выявил, что для всех

исследованных медуллярных аденокарцином было характерно наличие dMMR статуса, однако при по парных групповых сравнениях статистических значимых различий между данным гистологическим типом и другими морфологическими группами, включенными в исследование статистических различий обнаружено, не было, что наиболее вероятно объяснимо малым числом наблюдений.

Исследование MMR статуса среди муцинозных карцином показало преобладание опухолей с pMMR статусом в данной группе, однако межгрупповое сравнение не продемонстрировало статистически значимых различий с другими гистологическими подтипами опухоли и MMR статусом карцином. При оценке MMR статуса среди низкодифференцированных карцином определяющих различий не было выявлено, более того High grade карциномы с dMMR статусом составили 26,8 % от общего числа исследованных опухолей, а с pMMR статусом 25,6 % (Таблица 19).

Таблица 19 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Гистологический тип опухоли	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа MMR n = 39	группа dMMR n = 41
HG	10 (25,6 %)	11 (26,8 %)
LG	17 (43,6 %)	18 (43,9 %)
MUC	12 (30,8 %)	9 (22,0 %)
MED	—	3 (7,3 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 3,4$; p = 0,32	

Оценка глубины инвазии опухоли в зависимости от MMR статуса рака толстой кишки также продемонстрировала отсутствие какой-либо связи между глубиной инвазии опухоли и ее молекулярным статусом при попарном межгрупповом сравнении (Таблица 20).

Таблица 20 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от глубины прорастания опухоли стенки кишки

Глубина инвазии опухоли	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	гГруппа dMMR n = 41
Слизистый слой (pT1)	0	0
Подслизистый слой (pT2)	1 (2,6 %)	6 (14,6 %)
Мышечный слой (pT3)	10 (25,6 %)	6 (14,6 %)
Все слои стенки кишки (pT4a)	25 (64,1 %)	25 (61,0 %)
Инвазия в прилежащие органы (pT4b)	3 (7,7 %)	4 (9,8 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 4,6$; p = 0,19	

В рамках исследования проведена оценка степени воспалительной инфильтрации опухолевой ткани у пациентов с микросателлитно стабильными (pMMR) и микросателлитно нестабильными (dMMR) карциномами толстой кишки. В Таблице 21 представлены данные о распределении выраженности воспалительного ответа в двух группах пациентов. Статистический анализ не выявил достоверных различий между группами, что указывает на отсутствие значимого влияния MMR-статуса опухоли на степень выраженности воспалительного ответа в микроокружении карциномы толстой кишки. Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на известную роль dMMR-опухолей в формировании выраженного иммунного ответа, в данном исследовании степень воспалительной инфильтрации не продемонстрировала значимых различий между pMMR и dMMR группами. Это может свидетельствовать о многофакторности регуляции иммунного микроокружения опухоли и необходимости дальнейших исследований, направленных на уточнение механизмов взаимодействия опухолевых клеток с компонентами иммунной системы.

Таблица 21 – Степень выраженности воспалительного инфильтрата в зависимости от pMMR и dMMR статуса рака толстой кишки

Степень выраженности воспалительной инфильтрации	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Слабая (1 балл)	5 (12,8 %)	7 (17,1 %)
Умеренная (2 балла)	19 (48,7 %)	16 (39,0 %)
Выраженная (3 балла)	15 (38,5 %)	18 (43,9 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 0,66$; p = 0,8	

Исследование опухолевого почкования с учетом оценки молекулярного статуса показало, что данный морфологический параметр встречается несколько чаще в карциномах с профицитом белков репарации неспаренных нуклеотидов в сравнении с опухолями с dMMR статусом, при этом достоверных статистических различий при попарном межгрупповом сравнении не установлено (Таблица 22).

Таблица 22 – Степень выраженности опухолевого почкования в зависимости от pMMR и dMMR статуса рака толстой кишки

Степень опухолевого почкования	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Отсутствует	20 (51,3 %)	25 (61,0 %)
Слабая (bd1)	10 (25,6 %)	12 (29,3 %)
Умеренная (bd2)	5 (12,8 %)	3 (7,3 %)
Выраженная (bd3)	4 (10,3 %)	1 (2,4 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 2,98$; p = 0,39	

Оценка признаков взаимосвязи между молекулярным статусом опухоли и такими морфологическими характеристиками неблагоприятного течения рака толстого кишечника как: лимфоваскулярная инвазия и периневральная инвазия, показало отсутствие различий в исследуемых группах по данным признакам. Стоит отметить, что количественно среди карцином с профицитом белков

репарации неспаренных нуклеотидов количество случаев лимфоваскулярной инвазии было выявлено больше, чем среди dMMR карцином (Таблица 23). Частота различий при оценке факта периневральной инвазии и MMR статуса карциномы не было установлено (Таблица 24).

Таблица 23 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от наличия лимфоваскулярной инвазии в опухоли у больных раком толстой кишки

Лимфоваскулярная инвазия	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Наличие инвазии (LVI+)	18 (46,2 %)	12 (29,3 %)
Отсутствие инвазии (LVI–)	21 (53,8 %)	29 (70,7 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 2,4$; p = 0,11	

Таблица 24 – Частота периневральной инвазии в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли у больных раком толстой кишки

Наличие периневральной инвазии	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Наличие периневральной инвазии (PNI+)	12 (30,8 %)	12 (29,3 %)
Отсутствие периневральной инвазии (PNI–)	27 (69,2 %)	29 (70,7 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 0,02$; p = 0,8	

При исследовании метастатического поражения регионарных лимфатических узлов было установлено, что опухоли с dMMR статусом характеризуются несколько меньшим числом метастатических узлов, но статистических различий между pMMR и dMMR карциномами обнаружено не было. В тоже время опухоли с дефицитом белков мистматч репарации чаще характеризовались отсутствием метастатического поражения лимфатических узлов, что находит отражение в количественном преобладании, но при

проведении межгруппового сравнения статистических различий обнаружено не было (Таблицы 25 и 26).

Таблица 25 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли и состояния регионарных лимфатических узлов

Состояние регионарных лимфатических узлов	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Наличие метастатического поражение (N+)	22 (56,4 %)	20 (48,8 %)
Отсутствие метастатического поражения (N0)	17 (43,6 %)	21 (51,2 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 0,47$; p = 0,49	

Таблица 26 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли и количества пораженных регионарных лимфатических узлов

Количество лимфатических узлов, пораженных метастазами	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Отсутствует (стадия N0)	16 (41,0 %)	20 (48,8 %)
1 лимфатический узел (стадия N1a)	3 (7,7 %)	6 (14,6 %)
2–3 лимфатических узла (стадия N1b)	7 (17,9 %)	6 (14,6 %)
4–6 лимфатических узлов (стадия N2a)	7 (17,9 %)	3 (7,3 %)
7 и более лимфатических узлов (стадия N2b)	6 (15,4 %)	6 (14,6 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 6,9$; p = 0,22	

Оценка факта отсутствия или наличия отдаленных метастазов у пациентов с раком толстой кишки показала, что среди случаев опухолей с dMMR статусом отмечалась тенденция к меньшей частоте возникновения отдаленных метастазов, однако различия были статистически не значимы (Таблица 27).

Таблица 27 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR и dMMR статуса опухоли и наличия отдаленных метастазов

Отдаленные метастазы	Статус опухоли (а. ч. %)	
	группа pMMR n = 39	группа dMMR n = 41
Наличие отдаленных метастазов(M ₁)	9 (23,1 %)	4 (9,8 %)
Отсутствие отдаленных метастазов (M ₀)	30 (76,9 %)	37 (90,2 %)
Достоверность различий	$\chi^2 = 2,61; p = 0,1$	

Таким образом, проведенное исследование не выявило статистически значимых различий между MMR статусом опухоли и основными клинико-морфологическими характеристиками колоректального рака. В частности, нами не было обнаружено достоверной корреляции между полом пациентов и преобладанием карцином с определенным MMR статусом. Аналогично, анализ стороны локализации опухоли не продемонстрировал значимой связи с молекулярным профилем новообразования. Тем не менее, следует подчеркнуть, что при оценке гистологических подтипов было отмечено, что все медуллярные аденокарциномы характеризовались dMMR статусом, однако малое количество наблюдений не позволило установить статистическую значимость данного наблюдения. Среди муцинозных карцином наблюдалось некоторое преобладание опухолей с pMMR статусом, но межгрупповое сравнение также не выявило достоверных различий. Распределение высоко- и низкодифференцированных карцином было сопоставимым между группами с различным MMR статусом.

Глубина инвазии опухоли в стенку кишки, степень выраженности воспалительной инфильтрации и феномен опухолевого почкования также не продемонстрировали статистически значимой связи с MMR статусом. В группе pMMR карцином чаще встречалась лимфоваскулярная инвазия, но различия не достигли уровня статистической значимости. Периневральная инвазия встречалась с сопоставимой частотой в обеих группах.

Анализ частоты метастатического поражения регионарных лимфатических узлов показал определенные тенденции: опухоли с dMMR статусом

характеризовались несколько меньшим числом пораженных лимфатических узлов и более редким возникновением отдаленных метастазов по сравнению с pMMR карциномами. Однако, эти различия также не достигли уровня статистической значимости при межгрупповом сравнении. Полученные результаты частично расходятся с данными некоторых исследований, описанных в литературе, что может быть обусловлено особенностями выборки и методологическими различиями.

3.3 Мультиплексный иммуногистохимический анализ клеток опухолевого микроокружения и экспрессии молекул иммунных контрольных точек при раке толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

В настоящее время исследование иммунного ландшафта карцином толстой кишки представляет особый интерес, поскольку ряд его компонентов несет в себе важную прогностическую ценность. Существующие данные свидетельствуют о том, что в наибольшей степени противоопухолевый компонент иммунного ландшафта рака толстой кишки представлен опухоль инфильтрирующими лимфоцитами (TILs), которые являются различными субпопуляциями CD3+ Т-клеток, в том числе CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами и преобладание их в микроокружении опухоли связано с благоприятным течением заболевания. В свою очередь выведенный индекс, в основе которого лежит соотношение CD3+ к CD8+ лимфоцитам в центре и инвазивном крае опухоли, хоть и не внедрен в патоморфологический протокол оценки, но может расцениваться как потенциальный предиктор течения рака толстой кишки [88].

Ряд исследований также показали, что наличие в иммунном компоненте опухоли макрофагов типа M2 (CD163+) было связано с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [219]. Наряду с опухоль-ассоциированными макрофагами и лимфоцитами прогностическое значение также несет оценка молекул иммунных контрольных точек в опухолевом микроокружении. К

ингибирующим иммунным контрольным точкам относят ряд молекул, в том числе CTLA-4, LAG-3, а также лиганд программируемой клеточной гибели – PD-L1. Было показано, что конститутивная экспрессия данных молекул часто связана с истощением Т-клеток (CD3+, CD4+, CD8+), что сопряжено с антигенной стимуляцией при злокачественных новообразованиях [48, 76].

С учетом имеющихся данных о том, что иммунное микроокружение опухоли может быть обусловлено непосредственно MMR статусом опухоли, особый интерес представляет комплексная оценка иммунокомпетентных клеток в различных компартментах опухоли (в центре опухоли и в ее инвазивном крае), а также белков иммунных контрольных точек в зависимости от pMMR и dMMR статуса опухоли.

На первом этапе данного исследования после качественной оценки экспрессии белков системы репарации неспаренных нуклеотидов были сформированы две группы пациентов в зависимости от иммуногистохимически верифицированного pMMR/dMMR статуса новообразования. Стоит отметить, что для проведения полноценного мультиплексного иммуногистохимического анализа ключевым параметром включения гистологического материала в данный этап исследования явилось сохранение площади опухолевой ткани в анализируемом материале более 80 %, что достигалось за счет исключения из исследования препаратов с наличием артефактов и площадью некрозов в ткани опухоли более 20 %. В связи с этим количество исследуемых случаев составило 50 тканевых образцов опухоли. В первую группу вошли 32 % случая опухолей (n = 16/50) с дефицитом белков мистматч репарации (dMMR статус). Вторую группу составили опухоли с профицитом белков мистматч репарации (pMMR статус), в нее было включено 68 % случаев (n = 34/50).

На втором этапе проводимого исследования была выполнена количественная оценка CD3+, CD8+ лимфоцитов, а также CD163+ макрофагов в центре опухоли и ее инвазивном крае, одномоментно была изучена экспрессия белков иммунных контрольных точек.

Результаты многоцветного иммуногистохимического окрашивания клеток

иммунного микроокружения и экспрессии исследуемых иммунных контрольных точек с учетом компартмента опухоли (центр и инвазивный край) продемонстрированы на микрофотографиях (Рисунки 23, 24, 25 и 26).

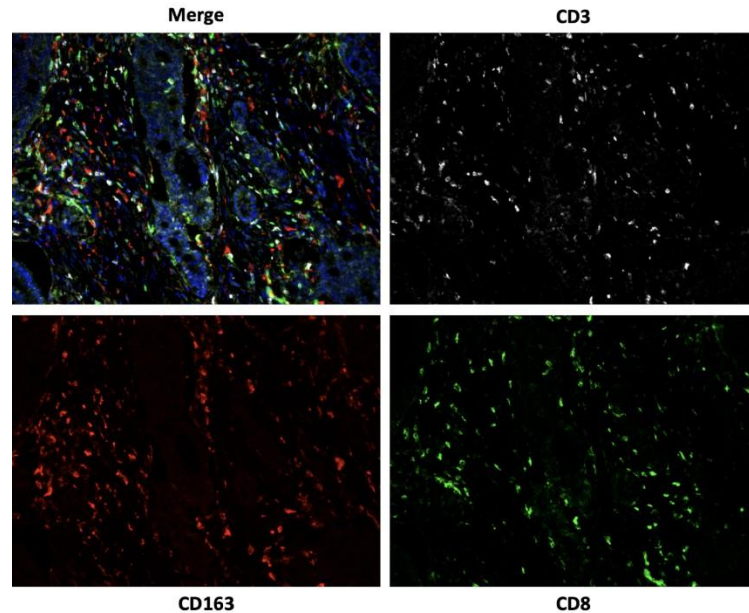


Рисунок 23 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против CD3 (белый цвет), CD163 (красный цвет), CD8 (зеленый цвет). Увеличение $\times 630$

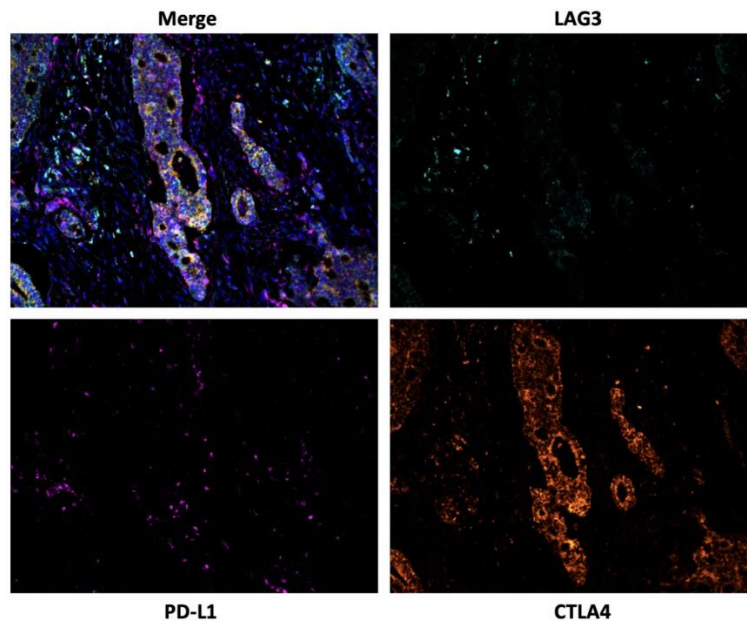


Рисунок 24 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против LAG3 (голубой цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет).

Увеличение $\times 630$

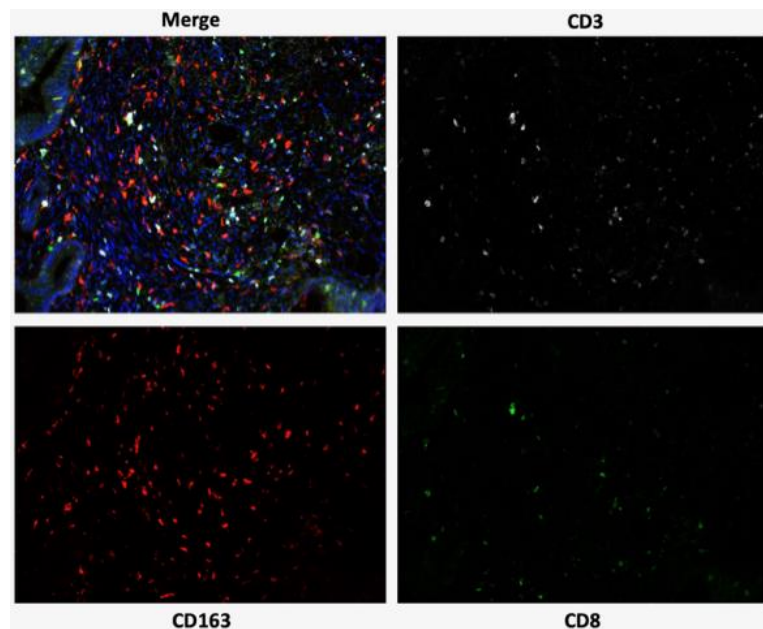


Рисунок 25 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный край) антителами против CD3 (белый цвет), CD163 (красный цвет), CD8 (зеленый цвет).

Увеличение $\times 630$.

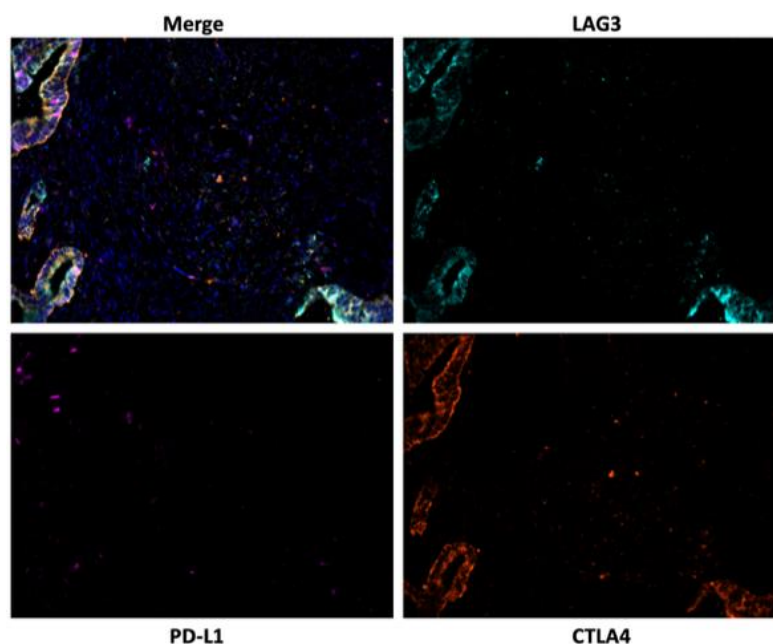


Рисунок 26 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный край) антителами против LAG3 (голубой цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет).

Увеличение $\times 630$

При оценке количества CD3⁺ и CD8⁺ TILs в центре опухоли в сравниваемых группах было обнаружено незначительное преобладание обеих популяций лимфоцитов среди pMMR карцином. Однако полученные данные не имели статистических различий ($p = 0,252$; $p = 0,669$).

При проведении корреляционного анализа в группе dMMR карцином была установлена сильная корреляционная связь между количеством инфильтрирующих центр опухоли CD3⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (Рисунок 27).

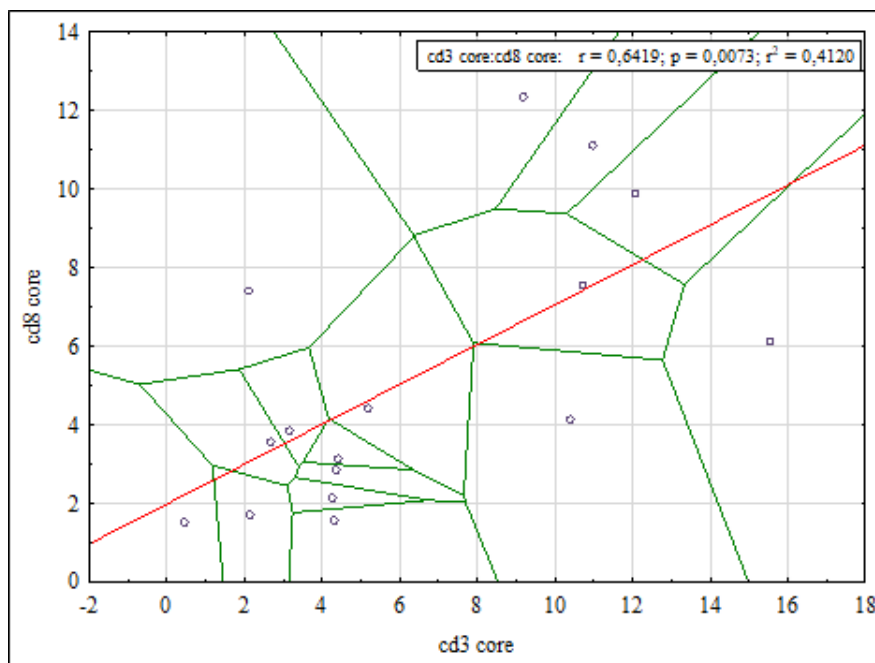


Рисунок 27 – Сильная прямая корреляционная связь между инфильтрацией CD3+ и CD8+ лимфоцитов центра опухоли с dMMR статусом

Аналогичного рода зависимость была отмечена и в группе карцином с профицитом белков репарации неспаренных нуклеотидов, однако степень прямой корреляции была слабее ($r = 0,45$; $p = 0,007$).

В то же время количественная оценка плотности иммунного инфильтрата показала достоверное статистическое преобладание обеих популяций лимфоцитов в инвазивном крае опухоли среди карцином с дефицитом белков мистматч репарации (Рисунки 28 и 29).

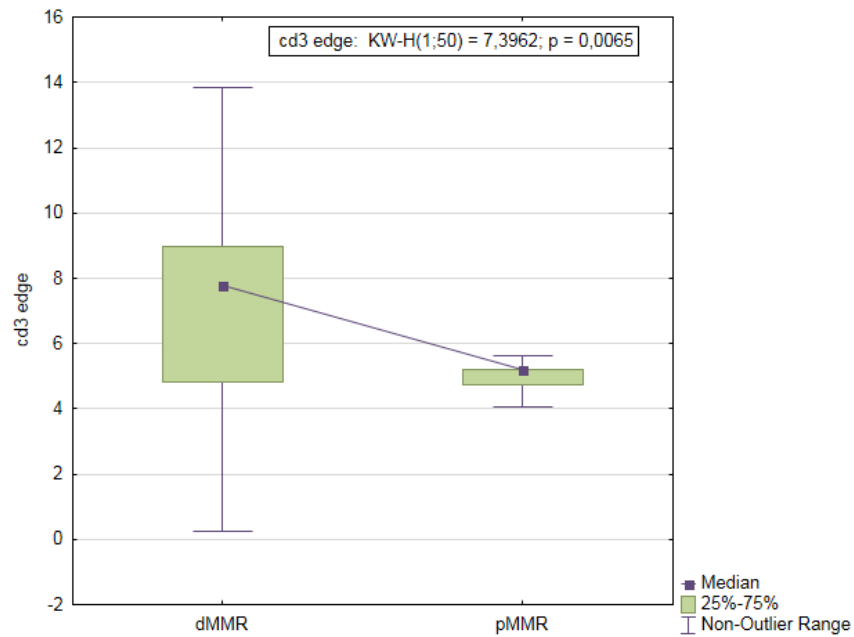


Рисунок 28 – Количество CD3 + опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

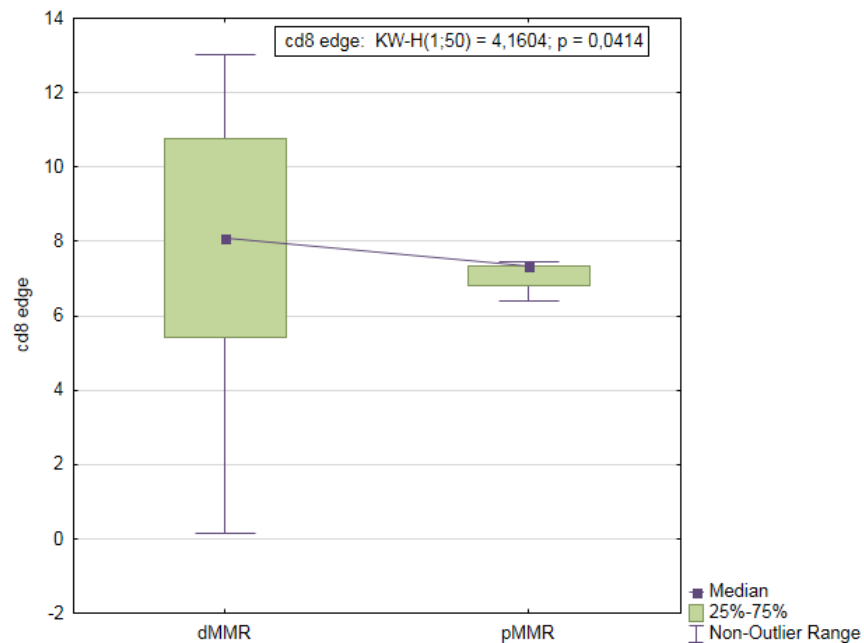


Рисунок 29 – Количество CD8 + опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

В дальнейшем проведенный корреляционный анализ позволил установить, что карциномы толстой кишки с наличием dMMR статуса характеризуются сильной прямой корреляцией между количеством CD8+ и CD3+ лимфоцитов в инвазивном крае опухоли (Рисунок 30). При этом корреляционный анализ количественной инфильтрации между CD8+ и CD3+ лимфоцитами позволил установить умеренную прямую корреляционную связь среди pMMR опухолей ($r = 0,53$; $p = 0,004$).

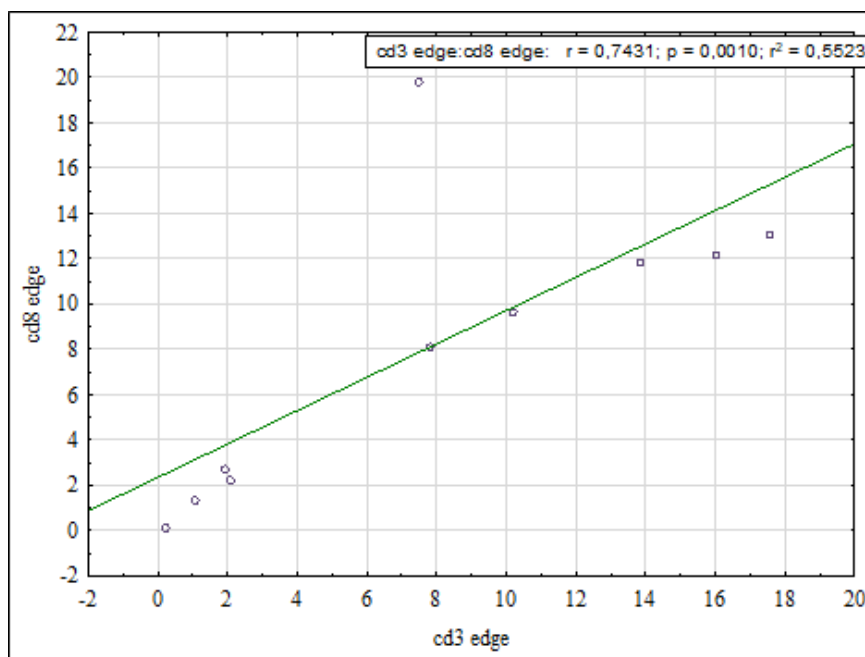


Рисунок 30 – Сильная прямая корреляционная связь между инфильтрацией инвазивного края опухоли CD8+ и CD3+ лимфоцитами в dMMR карциноме

Проведенный анализ соотношения CD3+/CD8+ опухоль инфильтрирующих лимфоцитов среди dMMR и pMMR опухолей позволил установить достоверное преобладание данного показателя среди карцином с дефицитом белков мистматч репарации (Рисунок 31).

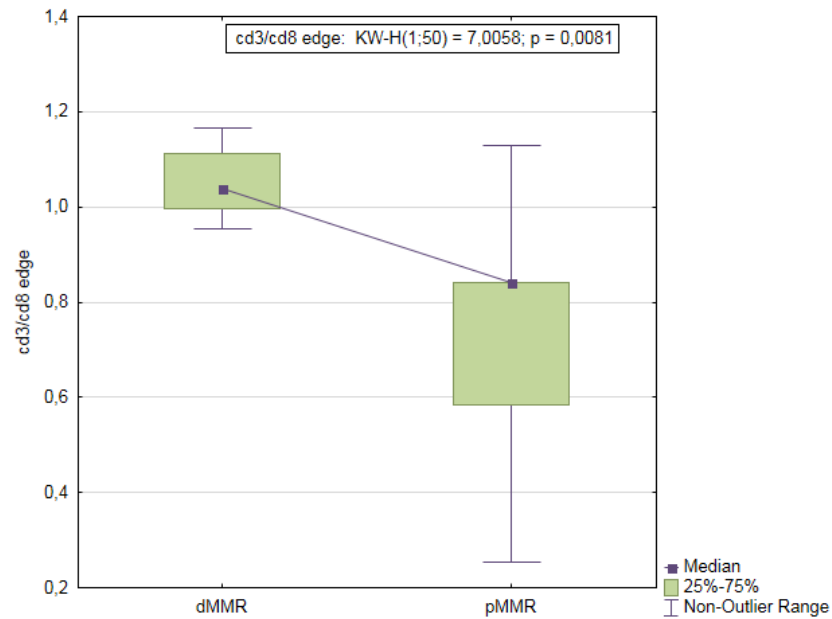


Рисунок 31 – Соотношение CD3+/CD8+ лимфоцитов в инвазивном крае опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

В ходе проведенной оценки количества CD163+ макрофагов среди обеих исследуемых групп было установлено достоверно значимо преобладающее количество CD163+ макрофагов как в центре опухоли ($p = 0,007$), так и на инвазивном крае ($p = 0,018$) среди карцином с dMMR статусом (Рисунки 32 и 33).

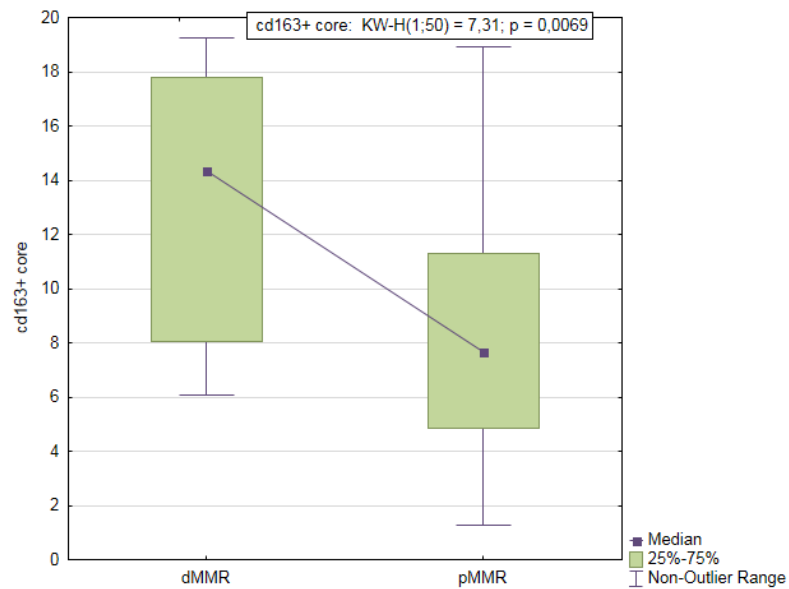


Рисунок 32 – Количество CD163+ опухоль инфильтрирующих макрофагов в центре опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

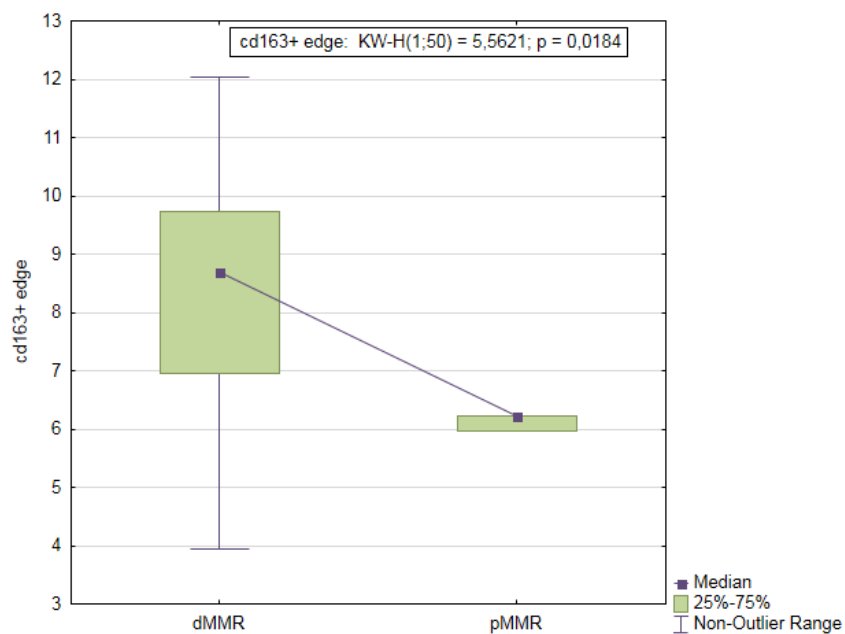


Рисунок 33 – Количество CD163+ опухоль инфильтрирующих макрофагов в инвазивном крае опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

На втором этапе данного исследования был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии молекул иммунных контрольных точек в инвазивном крае и центре опухоли с учетом MMR статуса, а также была изучена взаимосвязь экспрессии данных молекул с количеством CD3+ и CD8+ опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в аналогичных компартментах карцином.

Сравнительная оценка иммунных контрольных точек в центре опухоли показала некоторое преобладание экспрессии PD-L1, CTLA-4, LAG-3 среди опухолей с pMMR статусом по сравнению с группой с dMMR. Тем не менее, статистический анализ не выявил достоверных различий в экспрессии PD-L1 ($p = 0,472$), CTLA-4 ($p = 0,077$) и LAG-3 ($p = 0,048$) между исследуемыми группами.

Проведенный корреляционный анализ экспрессии иммунных контрольных точек в обеих группах исследования также не позволил установить сильных корреляционных зависимостей между количеством CD 3+ и CD8+ лимфоцитов в центре опухоли и экспрессией иммунных контрольных точек (Таблицы 28 и 29). При этом умеренные прямые корреляционные связи отмечались между количеством CD3+ лимфоцитов в центре опухоли и экспрессией CTLA-4 ($r = 0,51$, $p = 0,03$) и LAG-3 ($r = 0,67$; $p = 0,003$) среди dMMR карцином. В группе pMMR карцином была выявлена заметная корреляционная связь между количеством CD8+ в центре опухоли и экспрессией LAG-3.

Таблица 28 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в центре опухоли среди карцином с dMMR статусом

Опухоль инфильтрирующие лимфоциты в центре опухоли	Экспрессия иммунных контрольных точек		
	PD-L1 core	CTLA-4 core	LAG-3 core
CD3+	$r = 0,02$; $p = 0,92$	$r = 0,51$; $p = 0,03$	$r = 0,67$; $p = 0,003$
CD8+	$r = 0,14$; $p = 0,59$	$r = 0,15$; $p = 0,58$	$r = 0,48$; $p = 0,05$

Таблица 29 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в центре опухоли среди карцином с pMMR статусом

Опухоль инфильтрирующие лимфоциты в центре опухоли	Экспрессия иммунных контрольных точек		
	PD-L1 core	CTLA-4 core	LAG-3 core
CD3+	$r = 0,29$; $p = 0,09$	$r = 0,14$; $p = 0,39$	$r = 0,38$; $p = 0,02$
CD8+	$r = 0,49$; $p = 0,002$	$r = 0,37$; $p = 0,02$	$r = 0,59$; $p = 0,000$

Последующее исследование экспрессии иммунных контрольных точек в инвазивном крае опухоли выявило количественное преобладание всех исследуемых молекул в опухолевом микроокружении среди dMMR карцином. При этом полученные результаты количественной оценки экспрессии изучаемых маркеров являлись статистически достоверными: PD-L1 ($p = 0,011$), CTLA-4 ($p = 0,004$), LAG-3 ($p = 0,013$) (Рисунки 34, 35 и 36).

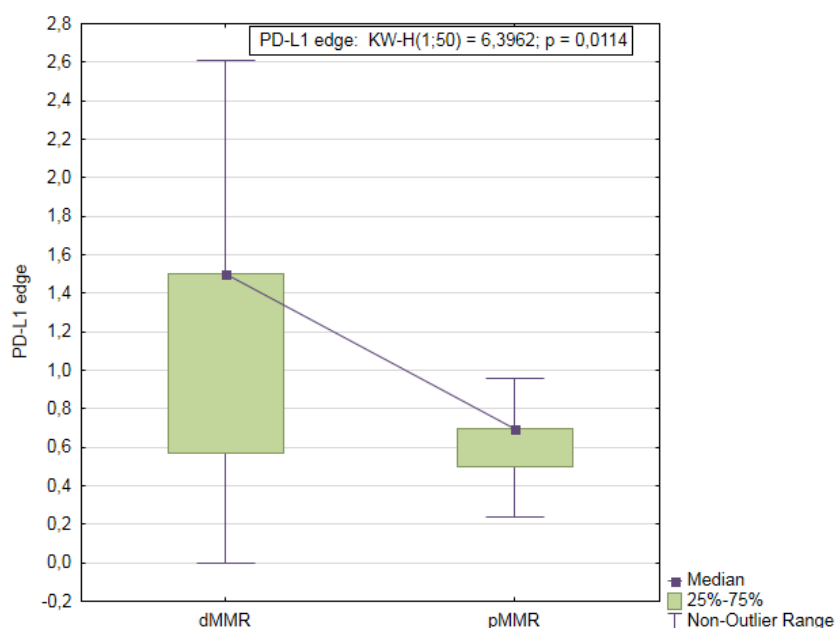


Рисунок 34 – Экспрессия PD-L1 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

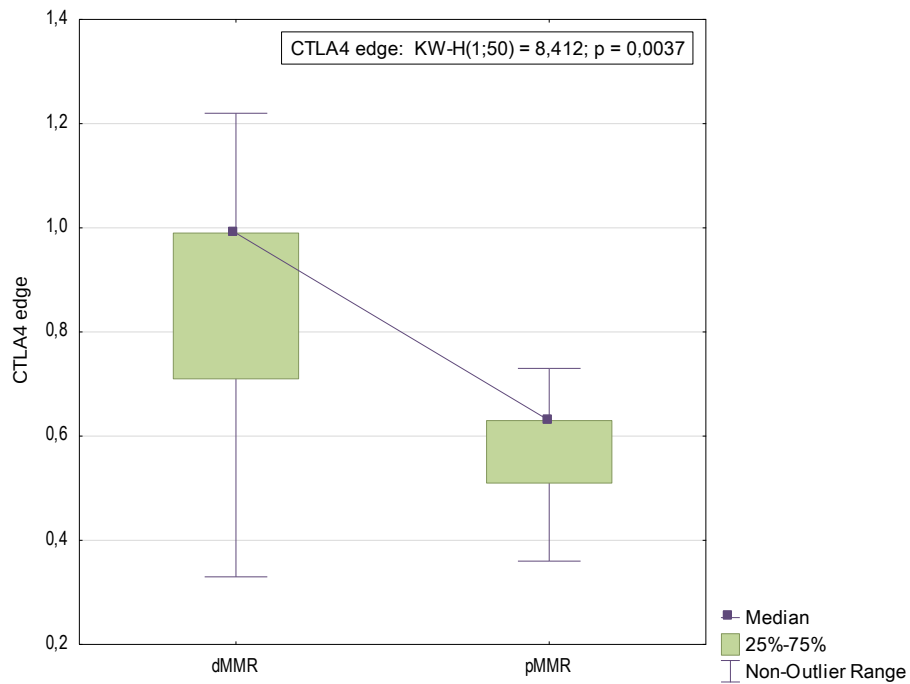


Рисунок 35 – Экспрессия CTLA4 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

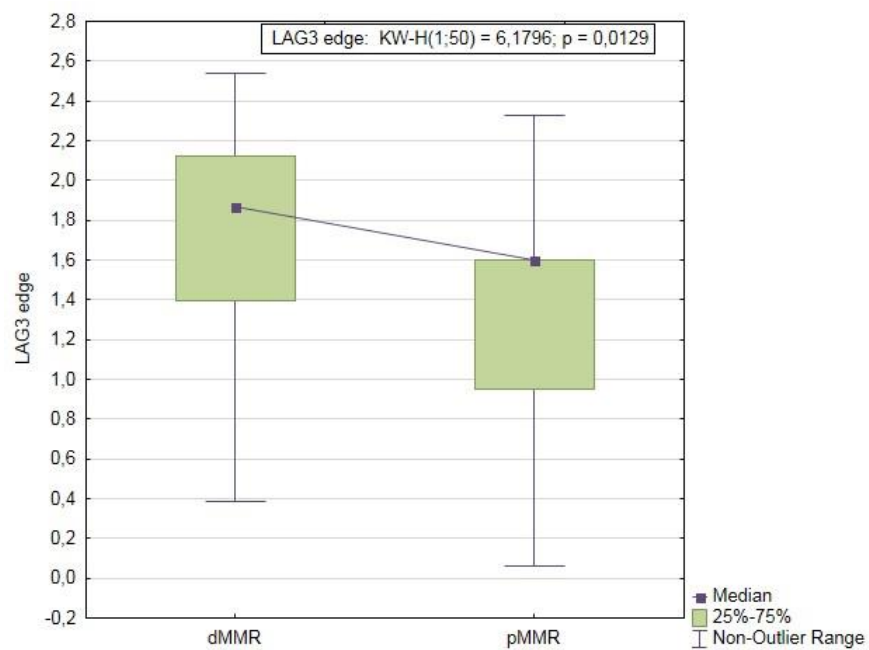


Рисунок 36 – Экспрессия LAG-3 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

Проведенный корреляционный анализ в двух группах исследования между экспрессией иммунных контрольных точек и количеством CD3+ CD8+ лимфоцитов в инвазивном крае позволил установить сильную прямую связь между количеством CD8+ лимфоцитов и экспрессией PD-L1 в инвазивном крае опухоли (Рисунок 37).

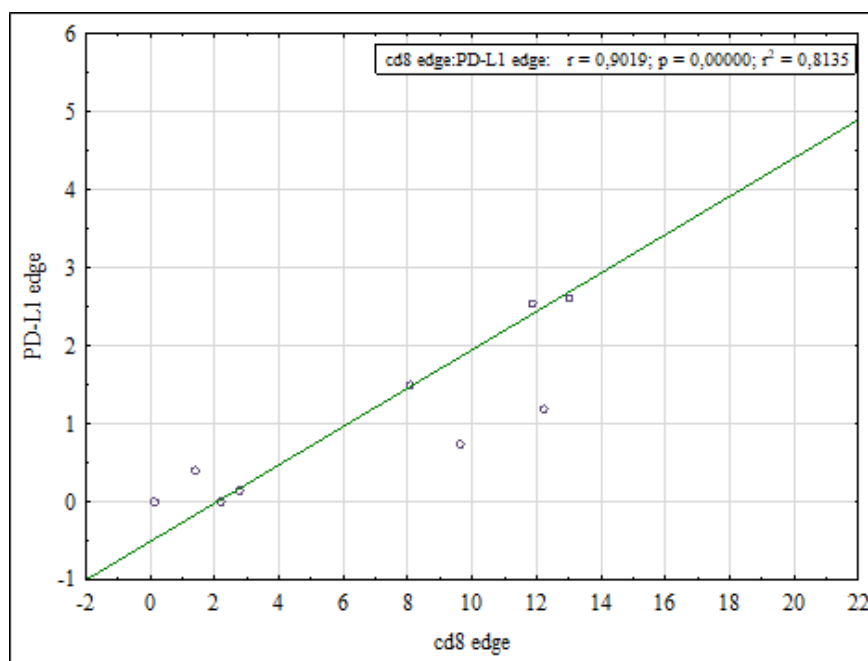


Рисунок 37 – Выраженная прямая корреляция между экспрессией PD-L1 и CD8+ лимфоцитами в инвазивном крае при раке толстой кишки с dMMR статусом

Полученные другие корреляционные значения в ходе выполненного анализа не позволили установить столь выраженные взаимосвязи между количеством инфильтрирующих инвазивный край опухоли лимфоцитов и экспрессией иммунных контрольных точек среди карцином как с dMMR, так и с pMMR статусом (Таблицы 30 и 31).

Таблица 30 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в инвазивном крае опухоли в группе карцином с dMMR статусом

Опухоль инфильтрирующие лимфоциты в инвазивном крае опухоли	Экспрессия иммунных контрольных точек		
	PD-L1	CTLA-4	LAG-3
CD3+	$r = 0,54; p = 0,029$	$r = 0,43; p = 0,08$	$r = 0,48; p = 0,057$
CD8+	$r = 0,76; p = 0,0006$	$r = 0,33; p = 0,19$	$r = 0,23; p = 0,38$

Таблица 31 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в инвазивном крае опухоли в группе карцином с pMMR статусом

Опухоль инфильтрирующие лимфоциты в инвазивном крае опухоли	Экспрессия иммунных контрольных точек		
	PD-L1 край	CTLA-4 край	LAG-3 край
CD3+	$r = 0,11; p = 0,506$	$r = 0,01; p = 0,91$	$r = 0,49; p = 0,003$
CD8+	$r = 0,18; p = 0,29$	$r = -0,25; p = 0,14$	$r = 0,26; p = 0,12$

При этом полученная слабая отрицательная корреляция между количеством CD8+ лимфоцитов и экспрессией CTLA-4 в инвазивном крае опухоли не имела достоверного статистического различия ($r = -0,25; p = 0,14$).

На заключительном – третьем этапе мультиплексного иммуногистохимического исследования было проведено иммунофенотипирование опухоль-ассоциированных лимфоцитов и макрофагов, в ходе которого изучалось их количество в ткани опухоли. Схожие данные были ранее изложены в исследованиях, посвященных оценке иммунного ландшафта при лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме [110, 166]. Madonna G. с соавторами провели анализ опухолевого микроокружения путем иммунофенотипирования TILS (CD3+PD-L1+; CD3+PD-L1–; CD8+PD-L1+; CD8+PD-L1–) и TAM (CD163+PD-L1+; CD163+PD-L1–) у пациентов с распространенной меланомой, получавших монотерапию ипилимумабом [170].

Анализ вышеперечисленных источников позволил предположить перспективность аналогичного исследования иммунофенотипов опухолевого микроокружения колоректальной карциномы.

В результате проведенного анализа в исследуемых группах нами не выявлено существенных различий в количестве лимфоцитов с иммунофенотипом: CD3+PD-L1+; CD3+PD-L1– CD3+CTLA4–; CD3+LAG3– и CD8+PD-L1+; CD8+PD-L1– CD8+CTLA4–; CD8+LAG3– (Таблица 32).

Таблица 32 – Количественная оценка CD3+ и CD8+ лимфоцитов с экспрессией иммунных контрольных точек в зависимости от MMR статуса опухоли

Иммунофенотип опухоль инфильтрирующих лимфоцитов	Статус опухоли, Me (Q1 ÷ Q3)		Достоверность различий
	группа 1	группа 2	
	dMMR n = 16	pMMR n = 34	p
CD3+PDL1+	0,24 (0,01 ÷ 0,4)	0,37 (0 ÷ 0,92)	0,501
CD3+PDL1–	4,26 (2,23 ÷ 9,69)	5,32 (3,71 ÷ 11,70)	0,232
CD3+CTLA4+	0 (0 ÷ 0)	0 (0 ÷ 0,16)	0,088
CD3+CTLA4–	4,39 (2,78 ÷ 10,29)	6,34 (3,67 ÷ 12,18)	0,253
CD3+LAG3+	0 (0 ÷ 0,07)	0 (0 ÷ 0,18)	0,400
CD3+LAG3–	4,39 (2,78 ÷ 10,29)	6,38 (3,82 ÷ 12,25)	0,220
CD8+PDL1+	0,16 (0 ÷ 0,73)	0,22 (0 ÷ 0,76)	0,642
CD8+PDL1–	3,69 (1,82 ÷ 7,25)	4,29 (2,39 ÷ 7,19)	0,693
CD8+CTLA4+	0 (0 ÷ 0)	0 (0 ÷ 0,09)	0,269
CD8+CTLA4–	3,99 (2,31 ÷ 7,53)	4,68 (2,56 ÷ 7,78)	0,739
CD8+LAG3+	0 (0 ÷ 0)	0 (0 ÷ 0,19)	0,061
CD8+LAG3–	3,99 (2,31 ÷ 7,45)	5,01 (2,21 ÷ 7,72)	0,693

Обращало на себя внимание то, что в пределах опухолевого окружения вне зависимости от pMMR/dMMR статуса не было обнаружено TILs со следующими фенотипами: CD3+CTLA4+; CD3+LAG3+ и CD8+CTLA4+; CD8+LAG3+. При этом оценка TAM с иммунофенотипом CD163+PD-L1+ показала незначительное преобладание в опухолевом микроокружении dMMR карцином данного

фенотипа, тем не менее, статистического различия с опухолями, имеющими pMMR статус, обнаружено не было ($p = 0,129$). В то время как при оценке TAM с CD163+PD-L1– было установлено статистически значимое количественное преобладание их экспрессии среди карцином с dMMR статусом в опухоли ($p = 0,025$).

В дальнейшем проведенный корреляционный анализ взаимосвязей регионарного метастазирования и иммунного микроокружения опухоли, а также его фенотипа и экспрессии иммунных контрольных точек позволил установить ряд достоверных значений. Так, было показано, что наличие CD8+PD-L1+ лимфоцитов в строме опухоли обратно коррелирует с количеством пораженных лимфатических узлов: то есть, при увеличении экспрессии лимфоцитов данного типа снижалась частота случаев регионарного метастазирования ($r = -0,29$; $p = 0,039$). Аналогичная зависимость демонстрировалась и для CD8+ клеток с фенотипом LAG3+ ($r = -0,29$; $p = 0,042$). Нами было также установлено, что экспрессия PD-L1 непосредственно в центре опухолевой ткани была связана с меньшим числом пораженных регионарных лимфатических узлов ($r = -0,38$; $p = 0,006$).

Полученные результаты демонстрируют различие в популяции компонентов иммунного микроокружения в строме и инвазивном крае опухоли в зависимости от MMR статуса карциномы. С учетом полученных данных можно заключить, что, по всей вероятности, степень инфильтрации иммунными клетками именно инвазивного края карцином толстой кишки, а не всей площади опухоли, может определять характер течения заболевания. Стоит также отметить, что наличие в опухоли популяции лимфоцитов с фенотипами CD8+PD-L1 и CD8+LAG3+ имеет благоприятный прогноз в отношении развития регионарных метастазов, что также характерно для опухолей с гиперэксперссией PD-L1 в центре опухоли.

3.4 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у больных раком толстой кишки

Проблема метастазирования остаётся ключевой в современной онкологии, так как именно этот процесс определяет неблагоприятный исход заболевания в большинстве случаев. Разработка методов, позволяющих прогнозировать риск метастазирования, имеет важное значение для оптимизации лечения и повышения выживаемости пациентов. Существующие подходы к оценке риска развития метастазов базируются преимущественно на клинико-патологических характеристиках опухоли. Однако их прогностическая ценность остаётся ограниченной из-за гетерогенности биологических свойств РТК. Это подчёркивает необходимость внедрения новых прогностических моделей, основанных на интеграции традиционных факторов с современными молекулярно-биологическими и иммунологическими параметрами.

На основании результатов проведенного исследования с использованием метода нелинейной логистической регрессии нами были построены две математические модели, которые позволяют оценивать риск развития отдаленных метастазов у пациентов с раком толстой кишки.

Одним из ключевых этапов данного анализа является отбор предикторов, который влияет на точность и стабильность модели. В связи с этим в работе применялся комбинированный подход к выбору переменных для включения в регрессионное уравнение.

На первом этапе проводился однофакторный анализ, в ходе которого оценивалась связь отдельных предикторов с прогнозируемым исходом. Для количественных переменных использовался непараметрический U-критерий Манна – Уитни, а для категориальных – χ^2 -критерий Пирсона. В предикторную модель включались только те переменные, которые продемонстрировали статистическую значимость ($p < 0,05$) в однофакторном анализе.

На втором этапе анализировались взаимосвязи между потенциальными предикторами для исключения мультиколлинеарности. Для этого был построен

корреляционный матрикс, а также проведена оценка фактора инфляции дисперсии (VIF). Переменные с $VIF > 5$ исключались из модели для предотвращения дублирования информации и повышения устойчивости регрессионного анализа.

На третьем этапе анализа применялся метод пошагового регрессионного анализа, который позволял отбирать наиболее значимые предикторы с учётом критерия максимального правдоподобия. В первой модели использовался метод форсированного ввода, при котором все отобранные предикторы вводились одновременно. Во второй модели использовался пошаговый метод исключения, что позволило оставить только статистически значимые переменные.

Дополнительно нами учитывалось правило «10 событий на одну переменную», согласно которому количество включаемых в модель предикторов ограничивалось числом наблюдений с прогнозируемым событием (в данном случае – наличием отдалённых метастазов). Это обеспечивало стабильность регрессионного анализа и снижало риск переобучения модели.

Первая прогностическая модель основана на ключевых патоморфологических критериях, которые были проанализированы на первом этапе исследования.

В качестве независимых предикторов в математическую модель вошли следующие параметры: количество пораженных лимфатических узлов, феномен опухолевого почкования, интрамуральная сосудистая инвазия, экстрамуральная сосудистая инвазия (Таблица 33).

Расчет вероятности риска отдаленных метастазов у больных раком толстой кишки выполнялся по следующей формуле:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100 \%$$

$$z = -1,073 + 0,018 \times X_1 + 0,645 \times X_2 - 1,931 \times X_3 - 0,749 \times X_4$$

где P – вероятность отдалённых метастазов;

X_1 – количество пораженных л/у;

X_2 – почкование ($bd_{\text{нет}}-1$; bd_1-2 ; bd_2-3 ; bd_3-4);

X_3 – наличие сосудистой инвазии (интрамуральная) (1 – нет; 2 – да);

X_4 – наличие сосудистой инвазии (экстрамуральная) (1 – нет; 2 – да).

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p = 0,002$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель объясняет 59,6 % наблюдаемой дисперсии отдаленного метастаза (нет – 1; да – 2).

Таблица 33 – Характеристики связи предикторов модели с вероятностью выявления отдаленного метастаза (нет – 1; да – 2)

Предикторы	Статистические параметры			
	COR; 95 % ДИ	p	AOR; 95 % ДИ	p
Количество пораженных л/у	1,269; 1,029–1,565	0,026*	1,019; 0,763–1,361	0,901
Почкование ($bd_{\text{нет}} - 1$; $bd_1 - 2$; $bd_2 - 3$; $bd_3 - 4$)	4,151; 1,629–10,580	0,003*	1,906; 0,508–7,149	0,339
Наличие сосудистой инвазии (интрамуральная) (1 – нет; 2 – да)	0,028; 0,003–0,288	0,003*	0,145; 0,004–4,889	0,282
Наличие сосудистой инвазии (экстрамуральная) (1 – нет; 2 – да)	0,037; 0,004–0,370	0,005*	0,473; 0,012–18,709	0,690

Оценка отношения шансов с 95 % доверительным интервалом (ДИ) для изучаемых предикторов развития отдаленных метастазов представлена на графике (Рисунок 38).

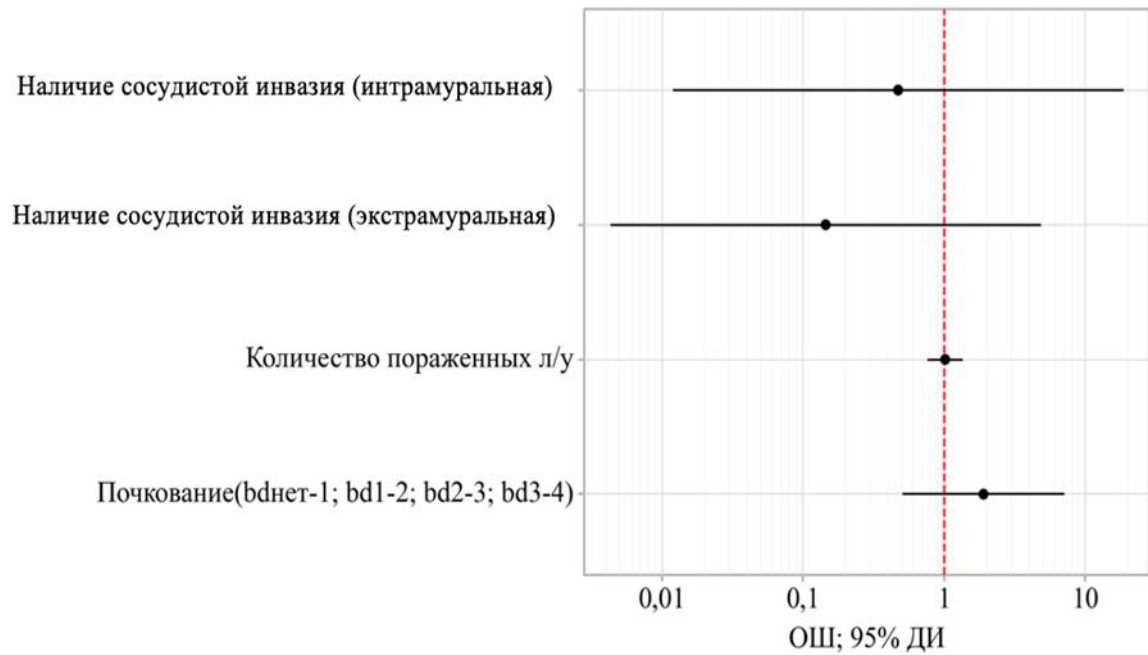


Рисунок 38 – Оценка отношения шансов с 95 % ДИ для изучаемых предикторов отдаленного метастазирования у больных раком толстой кишки (нет – 1; да – 2)

При оценке зависимости вероятности от значения логистической функции Р с помощью ROC-анализа была получена следующая кривая (Рисунок 39).

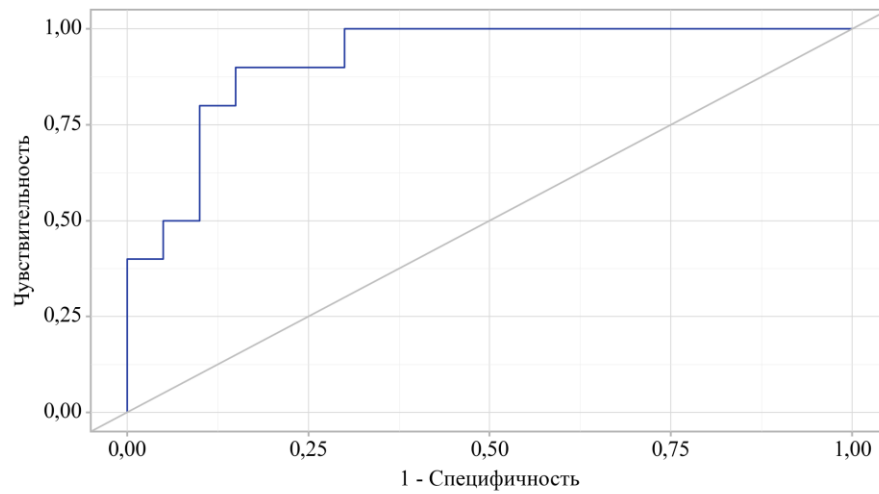


Рисунок 39 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности отдаленных метастазов (нет – 1; да – 2) от значения логистической функции Р

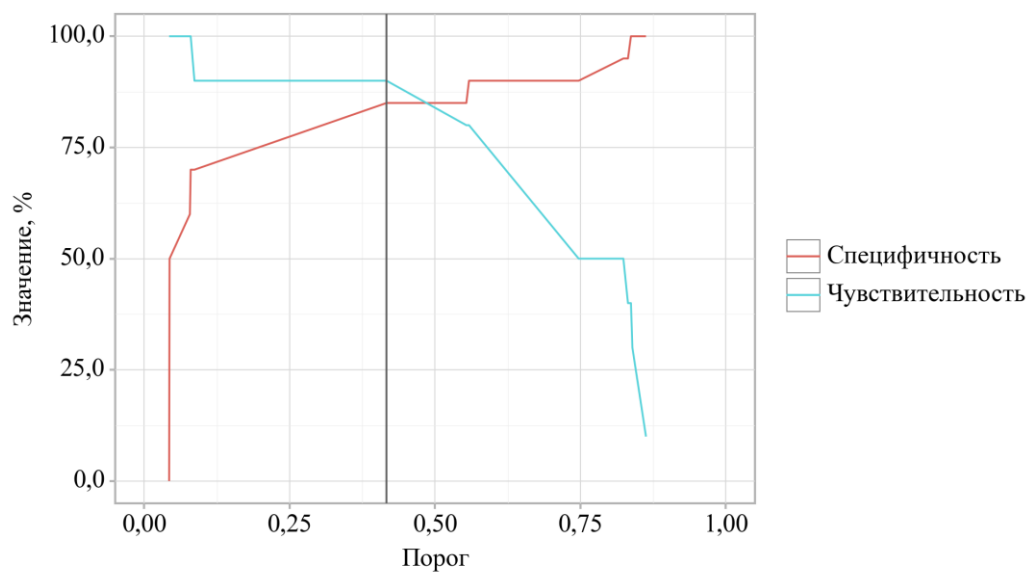


Рисунок 40 – Анализ чувствительности и специфичности модели в зависимости от пороговых значений логистической функции Р

Таблица 34 – Пороговые значения логистической функции Р

Пороговое значение	Чувствительность (Se), %	Специфичность (Sp), %	PPV	NPV
0,824	50,0	95,0	90,9	65,5
0,747	50,0	90,0	83,3	64,3
0,558	80,0	90,0	88,9	81,8
0,554	80,0	85,0	84,2	81,0
0,417	90,0	85,0	85,7	89,5
0,086	90,0	70,0	75,0	87,5
0,080	100,0	70,0	76,9	100,0
0,078	100,0	60,0	71,4	100,0
0,044	100,0	50,0	66,7	100,0

Результаты ROC-анализа демонстрируют площадь под кривой (AUC) $0,920 \pm 0,063$ с 95 % доверительным интервалом от 0,797 до 1,000. Статистическая значимость разработанной модели подтверждена ($p < 0,001$). При определении оптимального порогового значения с использованием критерия максимизации индекса Юдена установлено, что вероятность Р логистической функции в точке cut-off составляет 0,417. Прогнозирование наличия метастатического процесса осуществляется при достижении значением логистической функции Р данного порогового уровня или его превышении. Диагностические характеристики модели характеризуются чувствительностью 80,0 % и специфичностью 85,0 %, и отражены в графическом (Рисунок 40) и табличном (Таблица 34) представлении данных.

Вторая прогностическая модель позволяет проводить оценку риска развития отдаленных метастазов у пациентов с раком толстой кишки на основании количественной оценки клеток CD163+PDL1+, CD163+PDL1– в ткани карциномы.

Была разработана прогностическая модель для определения вероятности развития отдалённых метастазов (нет – 1; да – 2) в зависимости от CD163+PDL1+,

CD163+PDL1– методом бинарной логистической регрессии. Число наблюдений составило 30. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100 \%$$

$$z = -2,175 - 8,321 \times X_1 + 0,274 \times X_2,$$

где P – вероятность развития отдаленных метастазов;

X_1 – количество макрофагов CD163+PD-L1+;

X_2 – количество макрофагов CD163+PD-L1–.

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p = 0,010$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель объясняет 36,5 % наблюдаемой дисперсии отдаленного метастаза (нет – 1; да – 2). При увеличении CD163+PDL1+ на 1 шансы показателя 2 уменьшались в 4 108,445 раза. При увеличении CD163+PDL1– на 1 шансы показателя 2 увеличивались в 1,315 раза (Таблица 35, Рисунок 41).

Таблица 35 – Характеристики связи предикторов модели с вероятностью развития отдаленных метастазов (нет – 1; да – 2)

Предикторы	Статистические параметры			
	COR; 95 % ДИ	p	AOR; 95 % ДИ	p
CD163+PDL1+	0,084; 0,000–21,136	0,380	0,000; 0,000–0,709	0,041
CD163+PDL1–	1,143; 0,986–1,326	0,076	1,315; 1,060–1,631	0,013

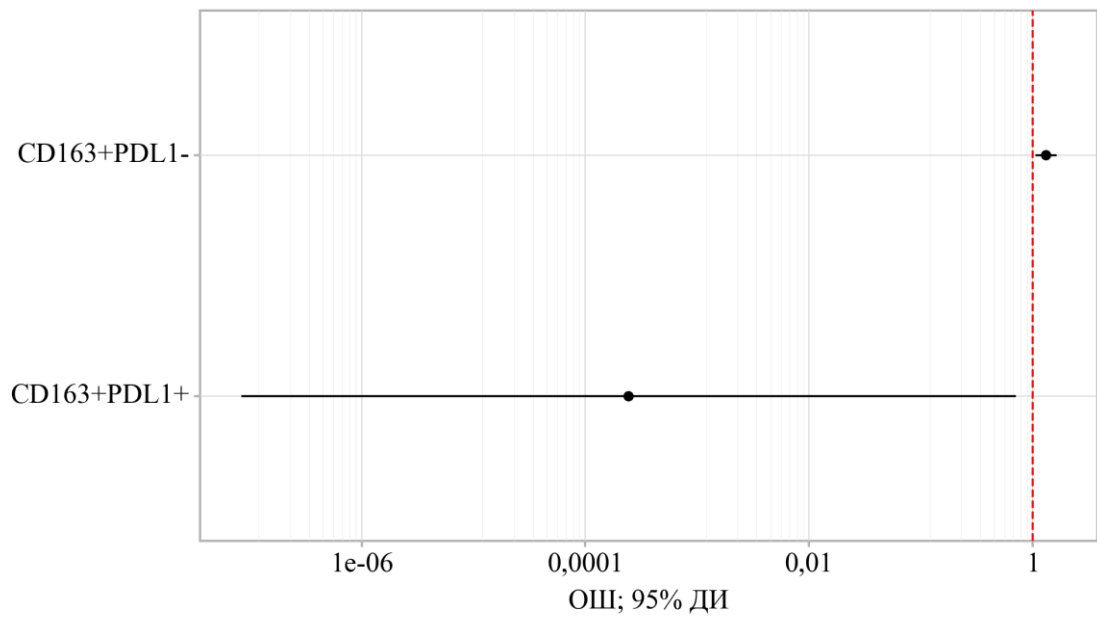


Рисунок 41 – Оценка отношения шансов с 95 % доверительным интервалом для изучаемых предикторов отдаленного метастазирования (нет – 1; да – 2)

При оценке зависимости вероятности показателя 2 от значения логистической функции Р с помощью ROC-анализа была получена следующая кривая (Рисунок 42).

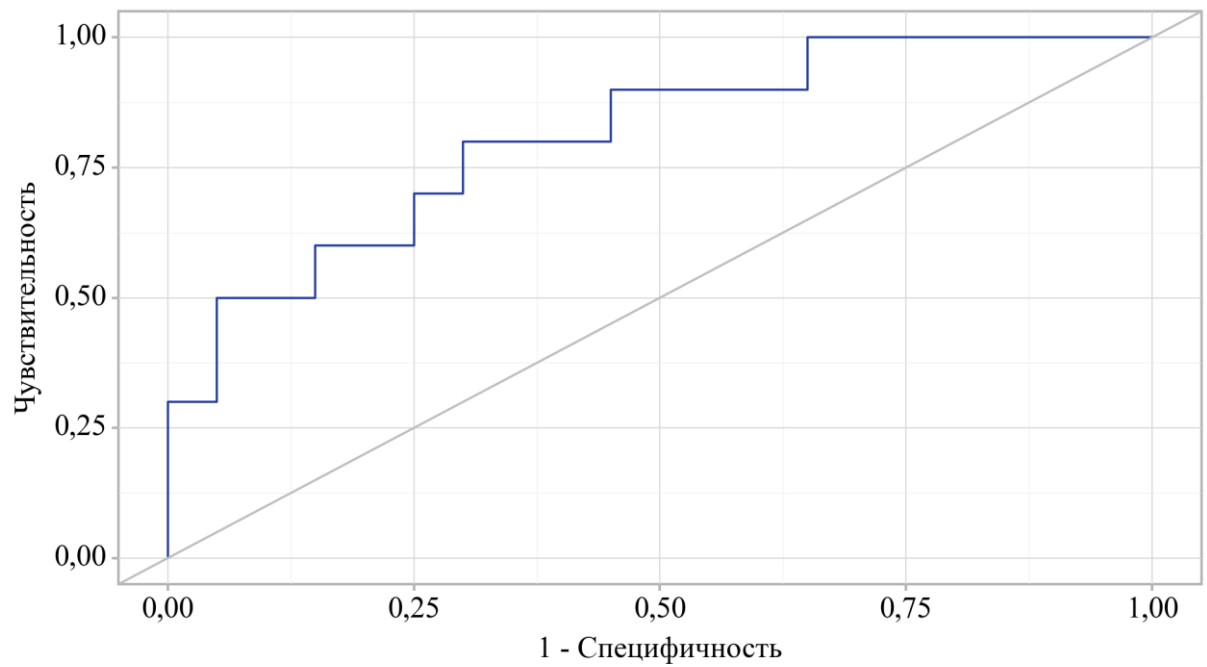


Рисунок 42 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности отдаленного метастазирования (нет – 1; да – 2) от значения логистической функции P

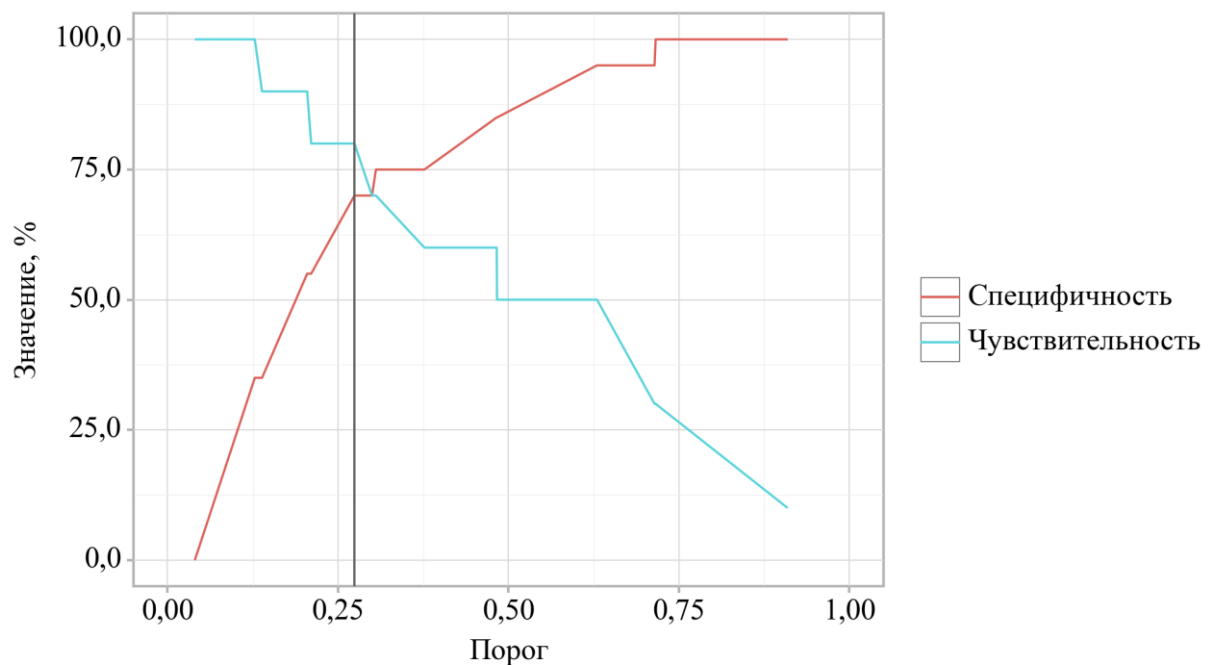


Рисунок 43 – Анализ чувствительности и специфичности модели в зависимости от пороговых значений логистической функции P

Таблица 36 – Пороговые значения логистической функции Р

Пороговое значение	Чувствительность (Se), %	Специфичность (Sp), %	PPV	NPV
0,630	50,0	95,0	90,9	65,5
0,483	50,0	85,0	76,9	63,0
0,483	60,0	85,0	80,0	68,0
0,377	60,0	75,0	70,6	65,2
0,306	70,0	75,0	73,7	71,4
0,300	70,0	70,0	70,0	70,0
0,274	80,0	70,0	72,7	77,8
0,211	80,0	55,0	64,0	73,3
0,205	90,0	55,0	66,7	84,6

Результаты ROC-анализа свидетельствуют о том, что площадь под кривой (AUC) составила $0,810 \pm 0,092$ с 95 % доверительным интервалом от 0,630 до 0,990. Разработанная модель продемонстрировала статистическую значимость ($p = 0,006$). При оптимизации диагностических характеристик с применением индекса Юдена определено пороговое значение вероятности Р логистической функции в точке cut-off, равное 0,274. Прогнозирование развития отдаленных метастазов осуществляется при достижении или превышении логистической функцией Р указанного порогового значения. Диагностическая эффективность модели характеризуется чувствительностью 70,0 % и специфичностью 70,0 %, что графически представлено на Рисунке 43 и в табличной форме отражено в Таблице 36.

Таким образом, результаты проведённого исследования позволили разработать и оценить две прогностические модели, направленные на оценку вероятности развития отдалённых метастазов у больных РТК. Первая модель, основанная на ключевых патоморфологических параметрах, таких как количество поражённых лимфатических узлов, феномен опухолевого почкования, интрамуральная и экстрамуральная сосудистая инвазия, продемонстрировала высокую прогностическую значимость ($AUC = 0,920$, $p < 0,001$). Вторая модель

включала количественную оценку CD163+PDL1+ и CD163+PDL1– макрофагов, что позволило учесть особенности иммунного микроокружения опухоли (AUC = 0,810, $p = 0,006$).

Полученные данные подтверждают важность комплексного подхода, включающего традиционные морфологические параметры и данные об иммунологическом профиле опухоли, для более точного прогнозирования риска метастазирования. Эти результаты могут стать основой для дальнейшей разработки индивидуализированных программ лечения, что может способствовать повышению эффективности онкологической помощи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак толстой кишки является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований как в мире, так и в Российской Федерации, занимая лидирующие позиции по уровню смертности от онкологических заболеваний [1, 90]. Согласно данным исследований, только 6 % всех диагностируемых карцином толстой кишки локализуются *in situ*, что позволяет выполнять эндоскопическую резекцию. В остальных случаях РТК представлен более распространенными формами, что обуславливает необходимость планового хирургического вмешательства в объеме резекции пораженного участка кишки или гемиколонэктомии с лимфодиссекцией. При наличии показаний проводится одномоментное удаление метастазов с последующей морфологической оценкой операционного материала [2, 49].

Гистологическая верификация имеет первостепенное значение в процессе диагностики и детерминации последующих терапевтических мероприятий. Актуальные морфологические параметры оценки операционного материала предоставляют объективную основу для формирования рациональной лечебной стратегии. Результаты современных исследований свидетельствуют о том, что прогноз и характер течения колоректальной карциномы детерминируются не исключительно гистологическими параметрами новообразования, но также определяются комплексом его молекулярно-генетических характеристик.

Для оптимизации персонализированного подхода к лечению в протокол патоморфологического исследования рекомендуется включать результаты молекулярно-генетических методов, таких как определение статуса белков репарации ошибок спаривания (dMMR) или микросателлитной нестабильности (MSI). Эти исследования выполняются с использованием иммуногистохимического анализа и полимеразной цепной реакции. Однако применение молекулярно-генетических методов ограничено их высокой стоимостью и сложностями интерпретации, обусловленными внутриопухолевой генетической гетерогенностью [141]. Кроме того, результаты молекулярных

исследований не отражают статус иммунного микроокружения опухоли, которому в последние годы уделяется повышенное внимание в связи с успешным применением ингибиторов контрольных точек для лечения различных злокачественных новообразований, включая РТК [17, 169, 202, 238].

Опубликованные данные подчеркивают гетерогенность опухолевого иммунного микроокружения РТК, что позволяет рассматривать его как важный прогностический фактор. Для более глубокого понимания роли иммунного микроокружения в прогрессировании РТК необходим комплексный анализ патоморфологических характеристик новообразования с учетом её MMR-статуса и изучением про- и противоопухолевых компонентов в различных компартментах ткани опухоли.

Настоящее исследование включает изучение иммунного микроокружения РТК с использованием мультиплексного иммуногистохимического анализа. Предварительно выполнялась оценка pMMR/dMMR-статуса опухолей в сочетании с основными клиничко-патоморфологическими характеристиками.

На первом этапе проведена морфологическая оценка операционного материала с учетом таких данных, как пол, возраст пациентов, сторона и отдел локализации опухоли, наличие отдаленных метастазов, размер и гистологический тип опухоли, степень злокачественности, критерии pT и pN, состояние краев резекции, лимфатических узлов, а также сосудистая и периневральная инвазия. Особое внимание уделялось инфильтративному фронту опухоли, включая феномен опухолевого почкования (tumor budding). Карциномы были разделены на четыре группы по гистологическому типу для изучения связи этого параметра с клиничко-патоморфологическими характеристиками. Выявлено, что аденокарциномы с морфологией high-grade характеризуются большей глубиной инвазии и частым вовлечением прилежащих органов. Эти опухоли также демонстрировали склонность к лимфоваскулярной и периневральной инвазии, а также к поражению регионарных лимфатических узлов, что указывало на более прогрессивную N-стадию.

Анализ также показал различия в локализации и клиническом течении

опухолей. Правосторонняя локализация была характерна для низкодифференцированных карцином и медуллярных аденокарцином, в то время как высокодифференцированные опухоли преимущественно локализовались в левых отделах толстой кишки.

Комплексный анализ клинико-патологических характеристик колоректального рака с учетом морфологических параметров новообразования выявил отсутствие корреляции между гистологическим типом опухоли и наличием отдаленных метастазов. Данное наблюдение представляет особый интерес, поскольку ряд исследований демонстрирует, что низкодифференцированные новообразования, являясь морфологическим проявлением эпителиально-мезенхимальной трансформации, характеризуются повышенным потенциалом к отдаленному метастазированию [12, 13].

Углубленное исследование феномена «опухолевого почкования», рассматриваемого как независимый предиктор неблагоприятного прогноза и косвенный индикатор эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой ткани, подтвердило ассоциацию данного морфологического признака с агрессивным течением заболевания. Это обусловлено повышенным инвазивным и миграционным потенциалом опухолевых клеток [12, 13, 232]. Для количественной оценки феномена опухолевого почкования исследуемый материал был категоризирован на четыре дискретные группы соответственно выраженности данного морфологического признака. Проведенный анализ установил, что наличие «опухолевого почкования», независимо от степени его выраженности, достоверно коррелирует с частотой обнаружения лимфоваскулярной и периневральной инвазией в операционном материале, а также с количеством метастатически пораженных лимфатических узлов. При этом статистически значимой связи с гистологическим типом и степенью дифференцировки новообразования не выявлено. Результаты статистического анализа также продемонстрировали значимую корреляцию между степенью выраженности «опухолевого почкования» и частотой гематогенного метастазирования. В частности, новообразования с отсутствием данного

феномена или его минимальной выраженностью (первая степень) характеризовались достоверно более низкой частотой гематогенного метастазирования по сравнению с опухолями, демонстрирующими вторую и третью степени опухолевого почкования.

На втором этапе исследования было выявлено, что клинимоρφологические характеристики опухолей с дефицитом (dMMR) и профицитом белков mismatch-репарации (pMMR) имеют существенное перекрытие. Сравнительный анализ не обнаружил статистически значимых различий в морфологических параметрах, локализации опухолей, а также в наличии перинеуральной и лимфоваскулярной инвазии между двумя группами. Хотя в группе pMMR было зарегистрировано больше случаев отдалённого метастазирования, различия не достигли статистической значимости, что согласуется с литературными данными, подтверждающими наличие метастатического потенциала у опухолей обоих типов [28].

Данные о плотности воспалительного инфильтрата между dMMR и pMMR карциномами также не выявили различий, несмотря на предположения о менее агрессивном течении dMMR опухолей за счёт высокой плотности иммунного инфильтрата [244]. При этом полученные нами результаты находят подтверждения в работе Fabrizio D., в которой было показано, что опухоли с pMMR статусом в части клинических случаев, так же, как и dMMR карциномы, характеризуются выраженной иммуногенностью, что обусловлено высокой мутационной нагрузкой, сопоставимой с таковой у карцином с дефицитом белков mismatch репарации [28, 22]. Тем не менее, даже при сопоставимой плотности инфильтрата наблюдались различия в составе иммунного микроокружения. Например, опухоли с dMMR статусом часто характеризуются низкой инфильтрацией цитотоксических лимфоцитов и увеличенным содержанием иммуносупрессивных клеток, что объясняет их высокую чувствительность к ингибиторам контрольных точек [73, 208].

Таким образом, анализ данных позволил заключить, что различия между опухолями с pMMR и dMMR статусом заключаются не столько в плотности

иммунного инфильтрата, сколько в соотношении его компонентов, что по данным исследований существенно влияет на поведение опухоли и прогноз заболевания [207].

Поскольку гетерогенность клеточных популяций иммунного микроокружения проявляется как функциональной, так и фенотипической пластичностью, изучение их состава и локализации в различных компартментах опухоли имеет ключевое значение для понимания биологии рака толстой кишки [235]. Однако современные исследования не предоставляют чёткого понимания, какие именно компартменты (центр, инвазивный край или оба) демонстрируют различия в иммунном окружении в зависимости от MMR статуса, а также не оценивают степень экспрессии иммунных контрольных точек, что особенно актуально с учётом их растущего клинического применения [106].

На третьем этапе нашего исследования был проведён мультиплексный иммуногистохимический анализ параметров иммунного микроокружения и экспрессии иммунных контрольных точек в различных компартментах опухолевой ткани. Полученные данные показали, что экспрессия TILs, CD3+ и CD8+ в центре опухоли не различалась в зависимости от MMR статуса, в то время как их соотношение было значительно выше в инвазивном крае dMMR карцином. Эти результаты свидетельствуют о возможной роли инвазивного края опухоли в снижении метастатического потенциала и благоприятном прогнозе для пациентов с dMMR статусом [186]. Таким образом, оценка параметров иммунного микроокружения без учёта инвазивного края может быть менее информативной, что подчёркивает важность изучения этой зоны как ключевого прогностического маркера [233].

Анализ экспрессии белков иммунных контрольных точек представляет особый научный интерес, поскольку, согласно проведенному литературному обзору, комплексное исследование данных молекул совместно с клетками иммунного микроокружения в контексте MMR статуса опухоли ранее не осуществлялось. Примечательно, что экспрессия иммунных контрольных точек PD-L1, CTLA-4 и LAG-3 в центральной части опухоли не продемонстрировала

статистически значимых различий в зависимости от MMR статуса карциномы. Однако исследование экспрессии указанных маркеров на инвазивном фронте новообразования выявило их достоверное преобладание в группе dMMR карцином, что коррелирует с распределением TILs.

Установлено, что экспрессия PD1/PD-L1 может инициироваться малыми внеклеточными везикулами (sEV) опухолевого микроокружения, что впоследствии стимулирует поляризацию макрофагов M2 и повышает экспрессию PD-L1 посредством сигнальных путей PTEN/AKT и SCOS1/STAT1, способствуя прогрессированию колоректального рака [56]. В настоящее время разработаны sEV-miRNA препараты, специфически ингибирующие PD-L1 в опухоль-ассоциированных макрофагах (TAM), что открывает перспективы их применения в анти-PD-L1 терапии при колоректальном раке [56].

Следует отметить, что отсутствие экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани не всегда свидетельствует о его полной утрате, поскольку помимо конститутивной экспрессии, уровень PD-L1 может варьировать, особенно в условиях множественных стрессовых воздействий иммунной системы. Следовательно, оценка экспрессии PD-L1 в микроокружении опухоли, в частности в инвазивном крае, приобретает существенное значение и открывает новые возможности для потенциального внедрения дополнительных критериев назначения PD-L1-ингибиторов [170].

В контексте внедрения в клиническую практику check-point ингибиторов нового поколения и инновационных методов блокады контрольных точек, включая двойную блокаду, особое внимание уделяется молекуле CTLA-4 как потенциальной мишени в терапии колоректального рака. Результаты второй фазы исследования NICHE-2, включающего пациентов с местнораспространенным раком толстой кишки с dMMR статусом, продемонстрировали, что неоадьювантная иммунотерапия с применением блокаторов PD1 рецептора и CTLA4 индуцировала терапевтический ответ у 98 % пациентов в течение 4 недель лечения, причем у 95 % пациентов наблюдался значительный патологический ответ (MPR), а у 68 % – полный патологический ответ (pCR) [34].

Существующие результаты монотерапии метастатической меланомы анти-CTLA-4 препаратами, в частности ипилиумабом, демонстрируют выраженный противоопухолевый ответ у пациентов [170]. Данный эффект обусловлен воздействием ингибиторов CTLA-4 на опухолевое микроокружение, приводящим к снижению уровня Т-регуляторных лимфоцитов с одновременной поляризацией ТММ с М2 на М1, активацией реакций антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности с последующим привлечением клеток CD8, что в итоге индуцирует противоопухолевый ответ [170].

LAG-3 остается наименее изученной контрольной точкой, однако исследование пациентов с метастатическими MSS карциномами толстой кишки, резистентными к предшествующей иммунотерапии, продемонстрировало, что двойная блокада иммунных контрольных точек (анти-LAG-3 и блокатор PD1 рецептора) обеспечивает медианную выживаемость 8,3 месяцев у 95 % пациентов [5]. Исследование Tavana S. по оценке LAG-3 в инвазивном крае колоректальных карцином выявило корреляцию с Т стадией заболевания [48]. Наше исследование также свидетельствует о более высоких уровнях экспрессии LAG-3 в инвазивном крае dMMR карцином.

Таким образом, полученные нами результаты, демонстрирующие преобладание в инвазивном крае колоректальных карцином с dMMR статусом повышенной экспрессии белков иммунных контрольных точек – PD-L1, LAG-3, CTLA-4 – являются крайне актуальными и могут потенциально привести к пониманию новых механизмов опухолевой прогрессии и расширить показания для назначения ингибиторов контрольных точек.

Отдельного рассмотрения заслуживают результаты количественного анализа CD163+ макрофагов (типа М2) в центральной части и инвазивном крае колоректальной карциномы. Согласно имеющимся данным, преобладание этих клеток в опухолевом микроокружении коррелирует с более агрессивным течением заболевания [106, 107]. В ходе настоящего исследования установлена статистически значимо более высокая плотность CD163+ макрофагов как в центре опухоли, так и в её инвазивном крае у карцином с dMMR статусом в сравнении с

pMMR группой ($p = 0,007$; $p = 0,018$ соответственно).

Полученные данные представляют определенный научный интерес ввиду наблюдаемого парадокса: dMMR статус ассоциирован с благоприятным клиническим прогнозом, тогда как высокая плотность CD163+ клеток традиционно рассматривается как предиктор неблагоприятного течения заболевания [178, 219]. Примечательно, что наши результаты частично согласуются с исследованием Korehisa S., демонстрирующим преобладание как CD8+ лимфоцитов, так и CD163+ макрофагов в центре опухоли и её инвазивном крае при dMMR карциномах в сравнении с pMMR новообразованиями [43].

Существенным является установленное в настоящем исследовании статистически значимое преобладание макрофагов с фенотипом CD163+PD-L1– в строме dMMR карцином ($p = 0,025$), что контрастирует с данными Korehisa S., где доминировал иммунофенотип CD163+PD-L1+. В современной литературе функциональная роль PD-L1 на TAM остается недостаточно изученной, однако имеются данные об участии CD163+ TAM в супрессии иммунного ответа в опухолевом микроокружении посредством оси PD-L1/PD-1 [14].

На основании полученных результатов можно предположить, что новообразования с иммунофенотипом CD163+PD-L1– характеризуются более благоприятным прогнозом вследствие неинактивированной оси PD-L1/PD-1. Данное предположение косвенно подтверждается наблюдениями Korehisa S., согласно которым опухоли с dMMR статусом и фенотипом CD163+PD-L1+ демонстрировали более агрессивные морфологические характеристики и выраженную лимфоваскулярную инвазию, что не наблюдалось в исследованной нами группе карцином с CD163+PD-L1– фенотипом.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует гетерогенность иммунного ландшафта колоректального рака в зависимости от MMR статуса. Установлено, что при отсутствии различий в плотности иммунного инфильтрата между pMMR и dMMR карциномами на светооптическом уровне, новообразования с дефицитом системы репарации неспаренных оснований характеризуются повышенной экспрессией PD-L1, CTLA-4, LAG-3, а также более

высокой плотностью CD3+, CD8+ лимфоцитов и CD163+ макрофагов. При отсутствии статистически значимых различий между MMR статусом опухоли и основными клинико-патологическими параметрами, представляется вероятным, что именно особенности иммунного ландшафта могут детерминировать прогноз заболевания и эффективность терапии ингибиторами контрольных точек.

ВЫВОДЫ

1. Степень выраженности воспалительной инфильтрации в опухоли у больных раком толстой кишки зависит от гистологического типа опухоли ($\chi^2 = 12,14$; $p = 0,048$) – наиболее выражена в муцинозных карциномах и аденокарциномах high grade по сравнению с low grade опухолями, но не сопряжена со статусом pMMR/dMMR ($p = 0,8$). Лимфоваскулярная инвазия ($\chi^2 = 9,2$; $p = 0,02$) и регионарное метастазирование ($\chi^2 = 25,87$; $p = 0,039$) чаще встречаются в опухолях с низкой степенью дифференцировки (high grade) и более характерны для муцинозных карцином по сравнению с аденокарциномами low grade.

2. Феномен опухолевого почкования связан с более высокой частотой обнаружения перинеуральной ($\chi^2 = 8,07$; $p = 0,044$), лимфоваскулярной инвазии ($\chi^2 = 13,06$; $p = 0,0044$) опухоли и сопряжен с повышенной частотой регионарного метастазирования ($\chi^2 = 25,43$; $p = 0,000013$), но не зависит от статуса pMMR/dMMR ($\chi^2 = 2,98$; $p = 0,39$). Развитие гематогенных метастазов ассоциировано со степенью выраженности феномена опухолевого почкования в аденокарциномах толстой кишки ($\chi^2 = 26,34$; $p = 0,000008$). Частота развития лимфогенных и гематогенных метастазов не связана с pMMR/dMMR статусом рака толстой кишки ($\chi^2 = 0,47$; $p = 0,49$ и $\chi^2 = 2,61$; $p = 0,1$ соответственно).

3. Экспрессия иммунных контрольных точек PD-L1, CTLA-4, LAG-3 в клетках микроокружения выше в аденокарциномах толстой кишки с dMMR статусом и наиболее выражена в инвазивном фронте опухоли ($p = 0,011$; $p = 0,004$; $p = 0,013$ соответственно). В dMMR опухолях наиболее сильные корреляции определяются между экспрессией иммунных контрольных точек и плотностью CD3+, в карциномах с pMMR-статусом – с плотностью CD8+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении.

4. Соотношение CD3+/CD8+ лимфоцитов в инвазивном крае опухоли выше в карциномах толстой кишки с дефицитом белков репарации неспаренных нуклеотидов по сравнению с группой аденокарцином с pMMR-статусом

($p = 0,0081$). Количество CD163+ макрофагов преобладает в центре и на инвазивном крае карцином с dMMR статусом ($p = 0,007$; $p = 0,018$).

5. Количественная плотность CD8+PD-L1+ и CD8+LAG3+ лимфоцитов в строме опухоли обратно коррелирует с числом метастатических лимфатических узлов при раке толстой кишки ($r = -0,29$; $p = 0,039$; $r = -0,29$; $p = 0,042$, соответственно). Экспрессия PD-L1 в иммунных клетках центра опухоли связана с меньшим числом пораженных регионарных лимфатических узлов ($r = -0,38$; $p = 0,006$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении стандартной гистологической оценки опухоли включать в патоморфологическое заключение информацию о наличии феномена опухолевого почкования, сосудистой инвазии (интрамуральной и экстрамуральной) и количестве пораженных лимфатических узлов для расчета риска отдаленного метастазирования. Расчет вероятности риска отдаленных метастазов у больных раком толстой кишки проводить по следующей формуле:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100 \%$$

$$z = -1,073 + 0,018 \times X_1 + 0,645 \times X_2 - 1,931 \times X_3 - 0,749 \times X_4$$

где P – вероятность отдалённых метастазов;

X_1 – количество пораженных л/у;

X_2 – почкование ($bd_{\text{нет}} - 1$; $bd_1 - 2$; $bd_2 - 3$; $bd_3 - 4$);

X_3 – наличие сосудистой инвазии (интрамуральная) (1 – нет; 2 – да);

X_4 – наличие сосудистой инвазии (экстрамуральная) (1 – нет; 2 – да).

Прогноз считается неблагоприятным при значении $P \geq 41,7 \%$ (оптимальная cut-off точка).

2. При иммуногистохимическом исследовании параметров опухолевого микроокружения учитывать количество CD163+PD-L1+ и CD163+PD-L1– макрофагов и для оценки риска метастазирования у пациентов с раком толстой кишки использовать формулу:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) \times 100 \%$$

$$z = -2,175 - 8,321 \times X_1 + 0,274 \times X_2$$

где P – вероятность развития отдаленных метастазов;

X_1 – количество макрофагов CD163+PD-L1+;

X_2 – количество макрофагов CD163+PD-L1–.

Прогноз считается неблагоприятным при значении $P \geq 27,4 \%$ (оптимальная cut-off точка).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
KPP	колоректальный рак
PTK	рак толстой кишки
CMS	consensus of molecular subtypes – консенсус молекулярных подтипов
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 – цитотоксический лимфоцит ассоциированный протеин 4
dMMR	deficient mismatch repair – дефицит белков ошибочно спаренных нуклеотидов
EMT	Epithelial mesenchymal transition – эпителиально-мезенхимальный переход
ICP	immune checkpoint – иммунные контрольные точки
ILC2s	type 2 innate lymphoid cells – врожденные лимфоидные клетки группы 2
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3 – ген активации лимфоцитов-3
MDSCs	myeloid-derived suppressor cells – миелоидные клетки-супрессоры
MHC II	major histocompatibility complex II – главный комплекс гистосовместимости II
MSI	microsatellite instability – микросателлитная нестабильность
MSS	microsatellite stability – микросателлитная стабильность
NOS	not otherwise specified – без дополнительного уточнения
PD-1	Programmed cell death 1 – программируемая клеточная гибель-1
PD-L1	Programmed death-ligand 1 – программируемый лиганд гибели-1
pMMR	proficient mismatch repair – отсутствие недостатка белков ошибочно спаренных нуклеотидов
RUSSCO	Russian society of clinical oncology – Российское общества клинической онкологии
TAM	tumor associated macrophages – опухоль ассоциированные макрофаги
TILs	tumor infiltrated lymphocytes – опухоль инфильтрирующие

лимфоциты

TIM-3	cell immunoglobulin and mucin domain 3 – Домен Т-клеточного иммуноглобулина-муцина 3
Tregs	regulatory T cells – Т регуляторные клетки
TSA	Tyramide signal amplification – амплификация сигнала тирамидом

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 262 с.
2. Рак ободочной кишки, ректосигмоидного соединения и прямой кишки : Практические рекомендации RUSSCO, часть 1.1. / М. Ю. Федянин, О. А. Гладков, С. С. Гордеев [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2024. – Т. 14, № 3s2. – С. 263–322.
3. Олейникова, Н. А. Новое в классификации злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки. (ВОЗ, 2019, 5-е издание) / Н. А. Олейникова, П. Г. Мальков, Н. В. Данилова // Архив патологии. – 2020. – Т. 82, № 3. – С. 38–46.
4. A Comprehensive Comparison of Early-Onset and Average-Onset Colorectal Cancers / A. Cercek, W. K. Chatila, R. Yaeger [et al.] // J Natl Cancer Inst. – 2021. – Vol. 113, № 12. – P. 1683-1692.
5. A first-in-human study of the anti-LAG-3 antibody favezelimab plus pembrolizumab in previously treated, advanced microsatellite stable colorectal cancer / E. Garralda, A. Sukari, N. J. Lakhani [et al.] // ESMO open. – 2022. – Vol. 7, № 6. – P. 100639.
6. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors / E. A. Akbay, S. Koyama, J. Carretero [et al.] // Cancer Discov. – 2013. – Vol. 3, № 12. – P. 1355–1363.
7. Adaptive NK Cells Resist Regulatory T-cell Suppression Driven by IL37 / D. Sarhan, K. L. Hippen, A. Lemire [et al.] // Cancer Immunol Res. – 2018. – Vol. 6, № 7. – P. 766–775.
8. Adenoma-like adenocarcinoma: clinicopathologic characterization of a newly recognized subtype of colorectal carcinoma / I. A. González, P. S. Bauer, J. Liu, D. Chatterjee // Hum Pathol. – 2021. – Vol. 107. – P. 9–19.

9. Adenosquamous carcinoma of the sigmoid colon: A case report and review of literature / A. Shafaghi, K. Askari, M. T. Ashoobi, F. Mansour-Ghanaei // *Int J Clin Exp Med.* – 2013. – Vol. 6, № 5. – P. 390–392.
10. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma / J. Weber, M. Mandala, M. Del Vecchio [et al.] ; CheckMate 238 Collaborators // *N Engl J Med.* – 2017. – Vol. 377, № 19. – P. 1824–1835.
11. Advanced Mucinous Colorectal Cancer: Epidemiology, Prognosis and Efficacy of Chemotherapeutic Treatment / C. Ott, M. Gerken, D. Hirsch [et al.] // *Digestion.* – 2018. – Vol. 98, № 3. – P. 143–152.
12. Al-Maghrabi, J. Vimentin immunoexpression is associated with higher tumor grade, metastasis, and shorter survival in colorectal cancer / J. Al-Maghrabi // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2020. – Vol. 13, № 3. – P. 493–500.
13. Amri, R. Effect of High-Grade Disease on Outcomes of Surgically Treated Colon Cancer / R. Amri, L. G. Bordeianou, D. L. Berger // *Ann Surg Oncol.* – 2016. – Vol. 23, № 4. – P. 1157–1163.
14. An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma / H. Horlad, C. Ma, H. Yano [et al.] // *Cancer Sci.* – 2016. – Vol. 107, № 11. – P. 1696–1704.
15. An Update on the Epidemiology, Molecular Characterization, Diagnosis, and Screening Strategies for Early-Onset Colorectal Cancer / A. N. Burnett-Hartman, J. K. Lee, J. Demb, S. Gupta // *Gastroenterology.* – 2021. – Vol. 160, № 4. – P. 1041–1049.
16. Analysis of the Clinicopathological Characteristics of Stage I-III Colorectal Cancer Patients Deficient in Mismatch Repair Proteins / Y. Liang, X. Cai, X. Zheng, H. Yin // *Onco Targets Ther.* – 2021. – Vol. 14. – P. 2203–2212.
17. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer: Clinical implications and future considerations / X. Chen, L. J. Chen, X. F. Peng [et al.] // *Transl Oncol.* – 2024. – Vol. 40.
18. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors. A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International

Immunooncology Biomarkers Working Group. Part 1. Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research / S. Hendry, R. Salgado, T. Gevaert [et al.] // *Adv Anat Pathol.* – 2017. – Vol. 24, № 5. – P. 235–251.

19. Association of Primary Tumor Site With Mortality in Patients Receiving Bevacizumab and Cetuximab for Metastatic Colorectal Cancer / M. A. Aljehani, J. W. Morgan, L. A. Guthrie [et al.] // *JAMA Surg.* – 2018. – Vol. 153, № 1. – P. 60–67.

20. Atlas of Hematopathology. Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches / F. Naeim, P. N. Rao, S. X. Song, R. T. Phan. – 2nd ed. – Academic Press, 2018. – 984 p.

21. ATM-AMPK α mediated LAG-3 expression suppresses T cell function in prostate cancer / X. Zhang, H. Chen, J. Han [et al.] // *Cell Immunol.* – 2023. – Vol. 393–394. – P. 104773.

22. Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition / D. A. Fabrizio, T. J. George Jr, R. F. Dunne [et al.] // *J Gastrointest Oncol.* – 2018. – Vol. 9, № 4. – P. 610–617.

23. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up / T. Powles, J. Bellmunt, E. Comperat [et al.] ; ESMO Guidelines Committee // *Ann Oncol.* – 2022. – Vol. 33, № 3. – P. 244–258.

24. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function *in vivo* / S. Read, R. Greenwald, A. Izcue [et al.] // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 7. – P. 4376–4383.

25. Blockade of surface-bound TGF- β on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment / S. Budhu, D. A. Schaer, Y. Li [et al.] // *Sci Signal.* – 2017. – Vol. 10, № 494. – P. eaak9702.

26. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group / B. Lauby-Secretan, C. Scoccianti, D. Loomis [et al.] ; International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group // *N Engl J Med.* – 2016. – Vol. 375, № 8. – P. 794–798.

27. Boland, C. R. Microsatellite instability in colorectal cancer / C. R. Boland, A. Goel // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138, № 6. – P. 2073–2087.
28. Buchler, T. Microsatellite Instability and Metastatic Colorectal Cancer - A Clinical Perspective / T. Buchler // *Front Oncol*. – 2022. – Vol. 12. – P. 888181.
29. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat / V. Bouvard, D. Loomis, K. Z. Guyton [et al.] ; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group // *Lancet Oncol*. – 2015. – Vol. 16, № 16. – P. 1599–1600.
30. Carlino, M. S. Immune checkpoint inhibitors in melanoma / M. S. Carlino, J. Larkin, G. V. Long // *Lancet*. – 2021. – Vol. 398, № 10304. – P. 1002–1014.
31. CD163 as a Potential Biomarker in Colorectal Cancer for Tumor Microenvironment and Cancer Prognosis: A Swedish Study from Tissue Microarrays to Big Data Analyses / S. Ma, Y. Zhao, X. Liu [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, № 24.
32. CD274, LAG3, and IDO1 expressions in tumor-infiltrating immune cells as prognostic biomarker for patients with MSI-high colon cancer / S. J. Lee, S. Y. Jun, I. H. Lee [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol*. – 2018. – Vol. 144, № 6. – P. 1005–1014.
33. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation / M. Boieri, A. Malishkevich, R. Guennoun [et al.] // *J Exp Med*. – 2022. – Vol. 219, № 7. – P. e20201963.
34. Cercek, A. Neoadjuvant Treatment of Mismatch Repair-Deficient Colon Cancer - Clinically Meaningful? / A. Cercek // *N Engl J Med*. – 2024. – Vol. № 390, № 21. – P. 2024–2025.
35. Cervantes, B. Deficient mismatch repair/microsatellite unstable colorectal cancer: therapeutic advances and questions / B. Cervantes, T. André, R. Cohen // *Ther Adv Med Oncol*. – 2024. – Vol. 16. – P. 17588359231170473.
36. Change in weight and waist circumference and risk of colorectal cancer: results from the Melbourne Collaborative Cohort Study / A. Karahalios, J. A. Simpson, L. Baglietto [et al.] // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – P. 157.
37. Characteristics of primary signet ring cell carcinoma of colon and rectum: a case control study / M. T. Weng, K. H. Chao, C. C. Tung [et al.] // *BMC Gastroenterol*.

– 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 173.

38. Checkpoint Markers and Tumor Microenvironment: What Do We Know? / R. Ephraim, S. Fraser, K. Nurgali, V. Apostolopoulos // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 15. – P. 3788.

39. Chen, J. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer / J. Chen, Z. Chen // *Med Oncol*. – 2014. – Vol. 31, № 8. – P. 82.

40. Chen, M. Cancer cell-intrinsic PD-1: Its role in malignant progression and immunotherapy / M. Chen, L. Bie, J. Ying // *Biomed Pharmacother*. – 2023. – Vol. 167. – P. 115514.

41. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types / R. J. Hause, C. C. Pritchard, J. Shendure, S. J. Salipante // *Nat Med*. – 2016. – Vol. 22, № 11. – P. 1342–1350.

42. Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer / A. N. Willauer, Y. Liu, A. A. L. Pereira [et al.] // *Cancer*. – 2019. – Vol. 125, № 12. – P. 2002–2010.

43. Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability / S. Korehisa, E. Oki, M. Iimori [et al.] // *Int J Cancer*. – 2018. – Vol. 142, № 4. – P. 822–832.

44. Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / S. Ten Hoorn, T. R. de Back, D. W. Sommeijer, L. Vermeulen // *J Natl Cancer Inst*. – 2022. – Vol. 114, № 4. – P. 503–516.

45. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma / J. García-Solano, M. Pérez-Guillermo, P. Conesa-Zamora [et al.] // *Hum. Pathol*. – 2010. – Vol. 41, № 10. – P. 1359–1368.

46. Clinicopathological and molecular characteristics of colorectal adenosquamous carcinoma in an Asian population / F. Ye, M. Chen, X. Zheng [et al.] //

BMC Gastroenterol. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 36.

47. Clinicopathological characteristics of high microsatellite instability/mismatch repair-deficient colorectal cancer: A narrative review / W. J. Mei, M. Mi, J. Qian [et al.] // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – P. 1019582.

48. Clinicopathological significance and prognostic role of LAG3 + tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer; relationship with sidedness / S. Tavana, Z. Mokhtari, M. H. Sanei [et al.] // Cancer Cell Int. – 2023. – Vol. 23, № 1. – P. 23.

49. Colon Cancer Disparities in Stage at Presentation and Time to Surgery for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders: A Study with Disaggregated Ethnic Groups / B. Jain, S. S. Bajaj, T. A. Patel [et al.] // Ann Surg Oncol. – 2023. – Vol. 30, № 9. – P. 5495–5505.

50. Colon Cancer. [Updated 2023 Jun 3] // StatPearls. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2023 Jan-. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>. – Текст : электронный.

51. Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy / L. Guo, C. Wang, X. Qiu [et al.] // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1052.

52. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Diseases: Epidemiology and Prevention: A Review / E. Marabotto, S. Kayali, S. Buccilli [et al.] // Cancers (Basel). – 2022. – Vol. 14, № 17. – P. 4254.

53. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society / A. M. D. Wolf, E. T. H. Fontham, T. R. Church [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2018. – Vol. 68, № 4. – P. 250–281.

54. Colorectal cancer statistics, 2023 / R. L. Siegel, N. S. Wagle, A. Cercek [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2023. – Vol. 73, № 3. – P. 233–254.

55. Colorectal cancer with invasive micropapillary components (IMPCs) shows high lymph node metastasis and a poor prognosis. A retrospective clinical study / Z. Guo, Z. Yang, D. Li [et al.] // Medicine (Baltimore). – 2020. – Vol. 99, № 21. – P. e20238.

56. Colorectal Cancer-Derived Small Extracellular Vesicles Promote Tumor

Immune Evasion by Upregulating PD-L1 Expression in Tumor-Associated Macrophages / Y. Yin, B. Liu, Y. Cao [et al.] // *Adv Sci (Weinh)*. – 2022. – Vol. 9, № 9. – P. 2102620.

57. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects / M. Fleming, S. Ravula, S. F. Tatishchev, H. L. Wang // *J Gastrointest Oncol*. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 153–173.

58. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain / H. A. Tawbi, P. A. Forsyth, A. Algazi [et al.] // *N Engl J Med*. – 2018. – Vol. 379, № 8. – P. 722–730.

59. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers / M. E. Salem, B. A. Weinberg, J. Xiu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 49. – P. 8635–86368.

60. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial / S. Stintzing, P. Wirapati, H.-J. Lenz [et al.] // *Ann Oncol*. – 2019. – Vol. 30, № 11. – P. 1796–1803.

61. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer in clinical practice: A translational approach / G. Valenzuela, J. Canepa, C. Simonetti [et al.] // *World J Clin Oncol*. – 2021. – Vol. 12, № 11. – P. 1000–1008.

62. Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases / M. M. Hossen, Y. Ma, Z. Yin [et al.] // *Front Immunol*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1198365.

63. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy / H. Raskov, A. Orhan, J.P. Christensen, I. Gögenur // *Br J Cancer*. – 2021. – Vol. 124, № 2. – P. 359–367.

64. Density of CD3⁺ and CD8⁺ Cells in the Microenvironment of Colorectal Cancer according to Prediagnostic Physical Activity / D. Renman, B. Gylling, L. Vidman [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2317–2326.

65. Diagnosing colorectal medullary carcinoma: interobserver variability and

clinicopathological implications / L. H. Lee, R. K. Yantiss, E. Sadot [et al.] // *Hum Pathol.* – 2017. – Vol. 62. – P. 74–82.

66. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature / B. Baran, N. Mert Ozupek, N. Yerli Tetik [et al.] // *Gastroenterology Res.* – 2018. – Vol. 11, № 4. – P. 264–273.

67. Digestive system tumors / WHO Classification of tumors editorial board. – 5th ed. – WHO, 2019. – 635 p. – ISBN 978-9283244998.

68. Distinct Populations of Immune-Suppressive Macrophages Differentiate from Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer / T. Kwak, F. Wang, H. Deng [et al.] // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 33, № 13. – P. 108571.

69. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma / H. Li, A. M. van der Leun, I. Yofe [et al.] // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, № 4. – P. 775–789. – Erratum in: *Cell.* – 2020. – Vol. 181, № 3. – P. 747.

70. Early onset sporadic colorectal cancer: Worrisome trends and oncogenic features / G. M. Cavestro, A. Mannucci, R. A. Zupardo [et al.] // *Dig Liver Dis.* – 2018. – Vol. 50, № 6. – P. 521–532.

71. Early Response to First-Line Anti-PD-1 Treatment in Hodgkin Lymphoma: A PET-Based Analysis from the Prospective, Randomized Phase II NIVAH Trial / C. A. Voltin, J. Mettler, L. van Heek [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2021. – Vol. 27, № 2. – P. 402–407.

72. Early-Onset Colorectal Cancer: Current Insights / F. Ullah, A. B. Pillai, N. Omar [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2023. – Vol. 15, № 12. – P. 3202.

73. Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients With Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study / E. X. Chen, D. J. Jonker, J. M. Loree [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2020. – Vol. 6, № 6. – P. 831–838.

74. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity / K. Sakuishi, P. Jayaraman, S. M. Behar [et al.] // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol. 32, № 8. – P. 345–349.

75. Equivalence of laboratory-developed test and PD-L1 IHC 22C3 pharmDx across all combined positive score indications / G. Vainer, L. Huang, K. Emancipator, S. Nuti // PLoS One. – 2023. – Vol. 18, № 6. – P. e0285764.
76. Esen, F. PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions / F. Esen, G. Deniz, E. C. Aktas // Immunol Lett. – 2021. – Vol. 240. – P. 15–23.
77. ESMO consensus conference recommendations on the management of metastatic melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee / U. Keilholz, P. A. Ascierto, R. Dummer [et al.] // Ann Oncol. – 2020. – Vol. 31, № 11. – P. 1435–1448.
78. Evaluation of PD-L1 Expression in Colorectal Carcinomas by Comparing Scoring Methods and Their Significance in Relation to Clinicopathologic Parameters / M. Frančina, M. Mikuš, M. Mamić [et al.] // Diagnostics (Basel). – 2024. – Vol. 14, № 10. – P. 1007.
79. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers / L. Chang, M. Chang, H. M. Chang, F. Chang // J Gastrointest Cancer. – 2017. – Vol. 48, № 4. – P. 305–313.
80. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3 / J. Wang, M. F. Sanmamed, I. Datar [et al.] // Cell. – 2019. – Vol. 176, № 1-2. – P. 334–347.
81. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma / J. Larkin, V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez [et al.] // N Engl J Med. – 2019. – Vol. 381, № 16. – P. 1535–1546.
82. Francisco, L. M. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity / L. M. Francisco, P. T. Sage, A. H. Sharpe // Immunol Rev. – 2010. – Vol. 236, № 1. – P. 219–242.
83. French Endocrine Society Guidance on endocrine side effects of immunotherapy / F. Castinetti, F. Albarel, F. Archambeaud [et al.] // Endocr Relat Cancer. – 2019. – Vol. 26, № 2. – P. G1–G18.
84. Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated

adenocarcinoma / K. Stefanius, L. Ylitalo, A. Tuomisto [et al.] // *Histopathology*. – 2011. – Vol. 58, № 5. – P. 679–692.

85. From Oncogenic Signaling Pathways to Single-Cell Sequencing of Immune Cells: Changing the Landscape of Cancer Immunotherapy / A. Derakhshani, Z. Rostami, H. Safarpour [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 8. – P. 2278.

86. Functionally distinct LAG-3 and PD-1 subsets on activated and chronically stimulated CD8 T cells / J. F. Grosso, M. V. Goldberg, D. Getnet [et al.] // *J Immunol*. – 2009. – Vol. 182, № 11. – P. 6659–6669.

87. Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells / D. I. Gabrilovich // *Cancer Immunol Res*. – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 3–8.

88. Galon, J. Immunoscore and its introduction in clinical practice / J. Galon, A. Lanzi // *Q J Nucl Med Mol Imaging*. – 2020. – Vol. 64, № 2. – P. 152–161.

89. Garcia, G. G. The tumor microenvironment in therapy resistance / G. G. Garcia, C. J. Schmidt, C. Hajal // *Front Lab Chip Technol*. – 2024. – Vol. 3. – P. 1420233.

90. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J Clin*. – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249.

91. Goldberg, M. V. LAG-3 in Cancer Immunotherapy / M. V. Goldberg, C. G. Drake // *Cancer Immunology and Immunotherapy* / ed. G. Dranoff. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2011. – *Curr Top Microbiol Immunol*. ; Vol. 344. – P. 269–278.

92. Gonzalez, H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // *Genes Dev*. – 2018. – Vol. 32, № 19-20. – P. 1267–1284.

93. Gordy, C. Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing / C. Gordy, Y. W. He // *Cell Mol Immunol*. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 5–6.

94. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance / X. Cao, S. F. Cai, T. A. Fehniger [et al.] // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 635–646.

95. Granzyme B-expressing treg cells are enriched in colorectal cancer and present the potential to eliminate autologous T conventional cells / B. Sun, M. Liu, M. Cui, T. Li // *Immunol Lett.* – 2020. – Vol. 217. – P. 7–14.
96. Greenwald, R. J. The B7 family revisited / R. J. Greenwald, G. J. Freeman, A. H. Sharpe // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 515–548.
97. Group 2 Innate Lymphoid Cells: A Double-Edged Sword in Cancer? / E. Maggi, I. Veneziani, I. Moretta [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 11. –
98. He, X. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy / X. He, C. Xu // *Cell Res.* – 2020. – Vol. 30, № 8. – P. 660–669.
99. Hereditary and familial colon cancer / K. W. Jasperson, T. M. Tuohy, D. W. Neklason, R. W. Burt // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138, № 6. – P. 2044–2058.
100. High intratumoral CD8⁺ T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy / Y. Yang, K. Attwood, W. Bshara [et al.] // *Prostate.* – 2021. – Vol. 81, № 1. – P. 20–28.
101. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared / D. Y. Vogel, J. E. Glim, A. W. Stavenhagen [et al.] // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219, № 9. – P. 695–703.
102. ILC2-driven innate immune checkpoint mechanism antagonizes NK cell antitumoral function in the lung / M. J. Schuijs, S. Peng, A. C. Richard [et al.] // *Nat Immunol.* – 2020. – Vol. 21, № 9. – P. 998–1009.
103. ILC2-modulated T cell-to-MDSC balance is associated with bladder cancer recurrence / M. F. Chevalier, S. Trabacchi, J. Racle [et al.] // *J Clin Invest.* – 2017. – Vol. 127, № 8. – P. 2916–2929.
104. Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review / K. Onoi, Y. Chihara, J. Uchino [et al.] // *J Clin Med.* – 2020. – Vol. 9, № 5.
105. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer / A. Lopez-Beltran, A. Cimadamore, A. Blanca [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 131.
106. Immune Checkpoint Inhibitors in Colorectal Cancer: Challenges and

Future Prospects / S. Makaremi, Z. Asadzadeh, N. Hemmat [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, № 9. – P. 1075.

107. Immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: limitation and challenges / S. Yan, W. Wang, Z. Feng [et al.] // *Front Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1403533.

108. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations / N. Verma, S. O. Burns, L. S. K. Walker, D. M. Sansom // *Clin Exp Immunol.* – 2017. – Vol. 190, № 1. – P. 1–7.

109. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape [et al.] / S. R. Woo, M. E. Turnis, M. V. Goldberg // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 4. – P. 917–927.

110. Immune landscape in Burkitt lymphoma reveals M2-macrophage polarization and correlation between PD-L1 expression and non-canonical EBV latency program / M. Granai, L. Mundo, A. U. Akarca [et al.] // *Infect Agent Cancer.* – 2020. – Vol. 15. – Erratum in: *Infect Agent Cancer.* – 2020. – Vol. 39. – P. 28.

111. Immunomodulation of the Tumor Microenvironment: Turn Foe Into Friend / H. Locy, S. de Mey, W. de Mey [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2909.

112. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment / B. Lv, Y. Wang, D. Ma [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 844142.

113. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance) / H.J. Lenz, F.S. Ou, A.P. Venook [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2019. – Vol. 37, № 22. – P. 1876–1885.

114. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation / M. Wu, Q. Huang, Y. Xie [et al.] // *J Hematol Oncol.* – 2022. – Vol. 15, № 1. – P. 24.

115. Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients / T. Wei, J. Zhang, Y. Qin [et al.] // *Am J Cancer Res.* – 2015. – Vol. 5, № 7. – P. 2190–2201.

116. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal

cancers in the United States, 1975-2010 / C. E. Bailey, C. Y. Hu, Y. N. You [et al.] // JAMA Surg. – 2015. – Vol. 150, № 1. – P. 17–22.

117. Inhibitors of immune checkpoints-PD-1, PD-L1, CTLA-4-new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners / M. Z. Wojtukiewicz, M. M. Rek, K. Karpowicz [et al.] // Cancer Metastasis Rev. – 2021. – Vol. 40, № 3. – P. 949–982.

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

119. Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation / A. B. Molofsky, F. Van Gool, H. E. Liang [et al.] // Immunity. – 2015. – Vol. 43, № 1. – P. 161–174.

120. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? / D. M. Davis, J. E. Marcet, J. C. Frattini [et al.] // J Am Coll Surg. – 2011. – Vol. 213, № 3. – P. 352–361.

121. Kim, J. H. Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy / J. H. Kim, B. S. Kim, S. K. Lee // Immune Netw. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. e4.

122. LAG3 (CD223) and autoimmunity: Emerging evidence / S. Hu, X. Liu, T. Li [et al.] // J Autoimmun. – 2020. – Vol. 112. – P. 102504.

123. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target / L. P. Andrews, A. E. Marciscano, C. G. Drake, D. A. Vignali // Immunol Rev. – 2017. – Vol. 276, № 1. – P. 80–96.

124. LAG-3 : recent developpments in combinational therapies in cancer / A. Chavanton, F. Mialhe, J. Abrey [et al.] // Cancer Sci. – 2024. – Vol. 115, № 8. – P. 2494–2505.

125. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation / C. Guy, D. M. Mitrea, P. C. Chou [et al.] // Nat Immunol. – 2022. – Vol. 23, № 5. – P. 757–767.

126. LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor

response in head and neck squamous cell carcinoma / W. W. Deng, L. Mao, G. T. Yu [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5, № 11. – P. e1239005.

127. LAG3 ectodomain structure reveals functional interfaces for ligand and antibody recognition / Q. Ming, D. P. Celas, C. Wu [et al.] // *Nat Immunol*. – 2022. – Vol. 23, № 7. – P. 1031–1041.

128. LAG-3 Expression Predicts Outcome in Stage II Colon Cancer / G. Rhyner Agocs, N. Assarzagdegan, R. Kirsch [et al.] // *J Pers Med*. – 2021. – Vol. 11, № 8. – P. 749.

129. LAG3 in gastric cancer: it's complicated / D. Ulase, H. M. Behrens, S. Krüger [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol*. – 2023. – Vol. 149, № 12. – P. 10797–10811.

130. LAG-3 inhibits the activation of CD4⁺ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII / T. Maruhashi, I. M. Okazaki, D. Sugiura [et al.] // *Nat Immunol*. – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 1415–1426.

131. LAG3 landscape in solid tumors and its association with immunotherapy outcomes in non-small cell lung cancer / R. J. Seager, M. Senosain, E. Van Roey [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2023. – Vol. 41. – P. e21113–e21113.

132. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4 / F. Triebel, S. Jitsukawa, E. Baixeras [et al.] // *J Exp Med*. – 1990. – Vol. 171, № 5. – P. 1393–1405.

133. LAG-3-Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are Associated with Reduced Disease-Free Survival in Pancreatic Cancer / L. Seifert, I. Plesca, L. Müller [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 6. – P. 1297.

134. Lea, D. Programmed death ligand-1 (PD-L1) clone 22C3 expression in resected colorectal cancer as companion diagnostics for immune checkpoint inhibitor therapy: A comparison study and inter-rater agreement evaluation across proposed cut-offs and predictive (TPS, CPS and IC) scores / D. Lea, C. Zaharia, K. Søreide // *Cancer Treat Res Commun*. – 2024. – Vol. 38. – P. 100788.

135. Lin, A. Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in

Colorectal Cancer / A. Lin, J. Zhang, P. Luo // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 2039.

136. Liu, R. PD-1-mediated inhibition of T cell activation: Mechanisms and strategies for cancer combination immunotherapy / R. Liu, H. F. Li, S. Li // *Cell Insight.* – 2024. – Vol. 3, № 2. – P. 100146.

137. Liu, Y. Preserving the CTLA-4 Checkpoint for Safer and More Effective Cancer Immunotherapy / Y. Liu, P. Zheng // *Trends Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 41, № 1. – P. 4–12.

138. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / G. Argilés, J. Tabernero, R. Labianca [et al.] ; ESMO Guidelines Committee // *Ann Oncol.* – 2020. – Vol. 31, № 10. – P. 1291–1305.

139. Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor / E. Ruffo, R. C. Wu, T. C. Bruno [et al.] // *Semin Immunol.* – 2019. – Vol. 42. – P. 101305.

140. Lymphocyte-activation gene 3 in non-small-cell lung carcinomas: correlations with clinicopathologic features and prognostic significance / D. J. Shepherd, E. S. Tabb, K. Kunitoki [et al.] // *Mod Pathol.* – 2022. – Vol. 35, № 5. – P. 615–624.

141. Markman, J. L. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer / J. L. Markman, S. L. Shiao // *J Gastrointest Oncol.* – 2015. – Vol. 6, № 2. – P. 208–223.

142. Mattner, J. Friend or Foe? The Ambiguous Role of Innate Lymphoid Cells in Cancer Development / J. Mattner, S. Wirtz // *Trends Immunol.* – 2017. – Vol. 38, № 1. – P. 29–38.

143. Medullary carcinoma of the colon: A comprehensive analysis of the National Cancer Database / I. S. Jabbal, A. Nagarajan, C. Rivera [et al.] // *Surg Oncol.* – 2022. – Vol. 45. – P. 101856.

144. Mesenchymal ovarian cancer cells promote CD8⁺ T cell exhaustion through the LGALS3-LAG3 axis / E. Yakubovich, D. P. Cook, G. M. Rodriguez, B. C. Vanderhyden // *NPJ Syst Biol Appl.* – 2023. – Vol. 9, № 1. – P. 61.

145. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype / N. Hugen, C. J. H. van de Velde, J. H. W. de Wilt, I. D. Nagtegaal // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25, № 3. – P. 651–657.

146. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy / E. Alspach, D. M. Lussier, A. P. Miceli [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 574, № 7780. – P. 696–701.

147. Micropapillary component in colorectal carcinoma is associated with lymph node metastasis in T1 and T2 Stages and decreased survival time in TNM stages I and II / F. Xu, J. Xu, Z. Lou [et al.] // *Am J Surg Pathol.* – 2009. – Vol. 33, № 9. – P. 1287–1292.

148. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives / F. Battaglin, M. Naseem, H. J. Lenz, M. E. Salem // *Clin Adv Hematol Oncol.* – 2018. – Vol. 16, № 11. – P. 735–745.

149. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know / K. Li, H. Luo, L. Huang [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2020. – Vol. 20. – P. 16.

150. Microsatellite instable vs stable colon carcinomas: analysis of tumour heterogeneity, inflammation and angiogenesis / L. De Smedt, J. Lemahieu, S. Palmans [et al.] // *Br J Cancer*. – 2015. – Vol. 113, № 3. – P. 500–509.

151. Molecular and Clinical Characterization of LAG3 in Breast Cancer Through 2994 Samples / Q. Liu, Y. Qi, J. Zhai [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 599207.

152. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity / M. S. Rooney, S. A. Shukla, C. J. Wu // *Cell*. – 2015. – Vol. 160, № 1-2. – P. 48–61.

153. Molecular Pathways and Mechanisms of LAG3 in Cancer Therapy / L. P. Andrews, A. R. Cillo, L. Karapetyan [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2022. – Vol. 28, № 23. – P. 5030–5039.

154. Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes / A. Remo, M. Fassan, A. Vanoli [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 1036.

155. Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options / C. Luo, S. Cen, G. Ding, W. Wu // *Cancer Commun (Lond)*. – 2019. – Vol. 39, № 1. – P. 13.
156. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies / K. C. G. Berg, P. W. Eide, I. A. Eilertsen [et al.] // *Mol Cancer*. – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 116.
157. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic targets to overcome tumor immune evasion / J. Lu, Y. Luo, D. Rao [et al.] // *Exp Hematol Oncol*. – 2024. – Vol. 13, № 1. – P. 39.
158. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers / M. Chalabi, L. F. Fanchi, K. K. Dijkstra [et al.] // *Nat Med*. – 2020. – Vol. 26, № 4. – P. 566–576.
159. New oncologic emergencies: What is there to know about immunotherapy and its potential side effects? / A. Barquín-García, J. Molina-Cerrillo, P. Garrido [et al.] // *Eur J Intern Med*. – 2019. – Vol. 66. – P. 1–8.
160. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study / M. J. Overman, R. McDermott, J.L. Leach [et al.] // *Lancet Oncol*. – 2017. – Vol. 18, № 9. – P. 1182–1191.
161. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden / M. D. Hellmann, T. E. Ciuleanu, A. Pluzanski [et al.] // *N Engl J Med*. – 2018. – Vol. 378, № 22. – P. 2093–2104.
162. Okazaki, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance / T. Okazaki, T. Honjo // *Trends Immunol*. – 2006. – Vol. 27, № 4. – P. 195–201.
163. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / D. M. Pardoll // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 252–264.
164. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, A. H. Sharpe // *Annu Rev Immunol*. – 2008. – Vol. 26. – P. 677–704.
165. PD-1 and PD-L1 inhibitors in cold colorectal cancer: challenges and

strategies / K. X. Lin, A. C. Istl, D. Quan [et al.] // *Cancer Immunol Immunother.* – 2023. – Vol. 72, № 12. – P. 3875–3893.

166. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: a study from the International DLBCL Consortium Program / L. Li, R. Sun, Y. Miao [et al.] // *Mod Pathol.* – 2019. – Vol. 32, № 6. – P. 741–754.

167. PD-1/PD-L1-dependent immune response in colorectal cancer / Z. Payandeh, S. Khalili, M. H. Somi [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2020. – Vol. 235, № 7-8. – P. 5461–5475.

168. PD-L1 as a prognostic biomarker in surgically resectable non-small cell lung cancer: a meta-analysis / S. Tuminello, D. Sikavi, R. Veluswamy [et al.] // *Transl Lung Cancer Res.* – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 1343–1360.

169. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes / X. Wang, F. Teng, L. Kong, J. Yu // *Onco Targets Ther.* – 2016. – Vol. 9. – P. 5023–5039.

170. PD-L1 expression with immune-infiltrate evaluation and outcome prediction in melanoma patients treated with ipilimumab / G. Madonna, C. Ballesteros-Merino, Z. Feng [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2018. – Vol. 7, № 12. – P. e1405206.

171. PD-L1 Immunohistochemistry in Gastric Cancer: Comparison of Combined Positive Score and Tumor Area Positivity Across 28-8, 22C3, and SP263 Assays / S. J. Klempner, E. S. Cowden, S. L. Cytryn [et al.] // *JCO Precis Oncol.* – 2024. – Vol. 8. – P. e2400230.

172. PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and β -catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer / W. Yu, Y. Hua, H. Qiu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, № 7. – P. 506.

173. Pembrolizumab KEYNOTE-001: an adaptive study leading to accelerated approval for two indications and a companion diagnostic / S.P. Kang, K. Gergich, G. M. Lubiniecki [et al.] // *Ann Oncol.* – 2017. – Vol. 28, № 6. – P. 1388–1398.

174. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast

Cancer / J. Cortes, H. S. Rugo, D. W. Cescon [et al.] ; KEYNOTE-355 Investigators // N Engl J Med. – 2022. – Vol. 387, № 3. – P. 217–226.

175. Personal habits and indoor combustions. Review of Human Carcinogens / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. – Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2012. – 575 p.

176. Petru, E. Endometrial cancer: news from ASCO / E. Petru // *memo*. – 2022. – Vol. 15, № 4. – P. 275–277.

177. Pivot, X. Pembrolizumab in the Treatment of Breast Cancer / X. Pivot // N Engl J Med. – 2022. – Vol. 387, № 3. – P. 273–274.

178. Polarizing Macrophages In Vitro / X. Huang, Y. Li, M. Fu, H. B. Xin // Macrophages. Methods and Protocols / ed. G. Rousselet. – Humana New York, 2018. – (Methods Mol Biol ; Vol. 1784). – P. 119–126.

179. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma / D. Schadendorf, F. S. Hodi, C. Robert [et al.] // J Clin Oncol. – 2015. – Vol. 33, № 17. – P. 1889–1894.

180. Postow, M. A. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade / M. A. Postow, R. Sidlow, M. D. Hellmann // N Engl J Med. – 2018. – Vol. 378, № 2. – P. 158–168.

181. Presentation, treatment, and prognosis of colorectal adenosquamous carcinoma: A contemporary analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database / A. H. Khan, X. Gao, P. Goffredo [et al.] // Am J Surg. – 2022. – Vol. 223, № 5. – P. 957–962.

182. Principles of Molecular Utility for CMS Classification in Colorectal Cancer Management / L. Rejali, R. Seifollahi Asl, F. Sanjabi [et al.] // Cancers (Basel). – 2023. – Vol. 15, № 10. – P. 2746.

183. Profiling the heterogeneity of colorectal cancer consensus molecular subtypes using spatial transcriptomics / A. Valdeolivas, B. Amberg, N. Giroud [et al.] // NPJ Precis Oncol. – 2024. – Vol. 8, № 1. – P. 10.

184. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double

immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer / K. Yamashita, M. Iwatsuki, K. Harada [et al.] // *Gastric Cancer*. – 2020. – Vol. 23, № 1. – P. 95–104.

185. Prognostic significance of CD8⁺ T-cells density in stage III colorectal cancer depends on SDF-1 expression / A. Lalos, A. Tülek, N. Tosti [et al.] // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 775.

186. Prognostic significance of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and CD66b⁺ tumor-associated neutrophils in the invasive margins of stages I-III colorectal cancer / C. Yin, Y. Okugawa, A. Yamamoto [et al.] // *Oncol Lett*. – 2022. – Vol. 24, № 1. – P. 212.

187. Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer / G. Lin, X. Fan, W. Zhu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 48. – P. 83986–83994.

188. Prognostic Value of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Cancer: A Meta-Analysis / R. R. Saleh, P. Peinado, J. Fuentes-Antrás [et al.] // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1040.

189. Pyo, J.-S. Medullary carcinoma in the colorectum. A systematic review and meta-analysis / J.-S. Pyo, J.H. Sohn, G. Kang // *Hum Pathol*. – 2016. – Vol. 53. – P. 91–96.

190. Quiescence of Memory CD8(+) T Cells Is Mediated by Regulatory T Cells through Inhibitory Receptor CTLA-4 / V. Kalia, L.A. Penny, Y. Yuzefpolskiy [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 42, № 6. – P. 1116–1129.

191. Rawla, P. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors / P. Rawla, T. Sunkara, A. Barsouk // *Prz Gastroenterol*. – 2019. – Vol. 14, № 2. – P. 89–103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.

192. Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance / X. Wei, J. Zhang, Q. Gu [et al.] // *Cell Rep*. – 2017. – Vol. 21, № 7. – P. 1853–1869.

193. Refining PD-1/PD-L1 assessment for biomarker-guided immunotherapy: A review / M. Zdrenka, A. Kowalewski, N. Ahmadi [et al.] // *Biomol Biomed*. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 14–29.

194. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment / M. Yi, M. Niu, L. Xu [et al.] // *J Hematol Oncol.* – 2021. – Vol. 14, № 1. – P. 10.
195. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects / C. Li, P. Jiang, S. Wei [et al.] // *Mol Cancer.* – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 116.
196. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer / E. Picard, C. P. Verschoor, G. W. Ma, G. Pawelec // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 369.
197. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up / T. Powles, L. Albiges, A. Bex [et al.] ; ESMO Guidelines Committee // *Ann Oncol.* – 2024. – Vol. 35, № 8. – P. 692–706.
198. Reproducibility in PD-L1 Immunohistochemistry Quantification through the Tumor Proportion Score and the Combined Positive Score: Could Dual Immunostaining Help Pathologists? / A. Mercier, V. Conan-Charlet, I. Quintin-Roué [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2023. – Vol. 15, № 10. – P. 2768.
199. Ribas, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack / A. Ribas // *Cancer Discov.* – Vol. 5, № 9. – P. 915–919.
200. Richman, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review) / S. Richman // *Int J Oncol.* – 2015. – Vol. 47, № 4. – P. 1189–1202.
201. Rotte, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer / A. Rotte // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol. 38, № 1. – P. 255.
202. Rowshanravan, B. CTLA-4: a moving target in immunotherapy / B. Rowshanravan, N. Halliday, D. M. Sansom // *Blood.* – 2018. – Vol. 131, № 1. – P. 58–67.
203. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination / C. Boutros, A. Tarhini, E. Routier [et al.] // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 13, № 8. – P. 473–486.
204. Sanmamed, M. F. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization / M. F. Sanmamed, L. Chen // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, № 3. – P. 677.

205. Shu, Y. Targeting tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy / Y. Shu, P. Cheng // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. – 2020. – Vol. 1874, № 2. – P. 188434.
206. Sobottka, B. Differential PD-1/LAG-3 expression and immune phenotypes in metastatic sites of breast cancer / B. Sobottka, H. Moch, Z. Varga // *Breast Cancer Res*. – 2021. – Vol. 23, № 1. – P. 4.
207. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer / J. L. Carstens, P. Correa de Sampaio, D. Yang [et al.] // *Nat Commun*. – 2017. – Vol. 8. – P. 15095.
208. Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer / K. Pelka, M. Hofree, J. H. Chen [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184, № 18. – P. 4734–4752.e20.
209. Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics study / S. Kirzin, L. Marisa, R. Guimbaud [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e103159.
210. Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor / Q. Fu, T. M. Fu, A. C. Cruz [et al.] // *Mol Cell*. – 2016. – Vol. 61, № 4. – P. 602–613.
211. Sun, C. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint / C. Sun, R. Mezzadra, T. N. Schumacher // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48, № 3. – P. 434–452.
212. Sun, Y.-P. Prognostic value of CD8⁺ tumor-infiltrating T cells in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis / Y.-P. Sun, Y. L. Ke, X. Li // *Oncol Lett*. – 2022. – Vol. 25, № 1. – P. 39.
213. Survival in Young-Onset Metastatic Colorectal Cancer: Findings From Cancer and Leukemia Group B (Alliance)/SWOG 80405 / M. Lipsyc-Sharf, S. Zhang, E. S. Ou [et al.] // *J Natl Cancer Inst*. – 2022. – Vol. 114, № 3. – P. 427–435.
214. Tay, R. E. Revisiting the role of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy- new insights into old paradigms / R. E. Tay, E. K. Richardson, H. C. Toh // *Cancer Gene Ther*. – 2021. – Vol. 28, № 1-2. – P. 5–17.
215. TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage

activation / D. Gong, W. Shi, S.-J. Yi [et al.] // BMC Immunol. – 2012. – Vol. 13. – P. 31.

216. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype / I. Mellman, D. S. Chen, T. Powles, S. J. Turley // Immunity. – 2023. – Vol. 56, № 10. – P. 2188–2205.

217. The co-expression characteristics of LAG3 and PD-1 on the T cells of patients with breast cancer reveal a new therapeutic strategy / H. Du, Z. Yi, L. Wang [et al.] // Int Immunopharmacol. – 2020. – Vol. 78. – P. 106113.

218. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer / J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang [et al.] // Nat Med. – 2015. – Vol. 21, № 11. – P. 1350–1356.

219. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer / S. Edin, M. L. Wikberg, A. M. Dahlin [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e47045.

220. The Immune Landscape of Cancer / V. Thorsson, D.L. Gibbs, S. D. Brown [et al.] // Immunity. – 2018. – Vol. 48, № 4. – P. 812–830. – Erratum in: Immunity. 2019. Vol. 51, № 2. – P. 411–412.

221. The Immune Landscape of Colorectal Cancer / A. Mezheyeuski, P. Micke, A. Martín-Bernabé [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13, № 21. – P. 5545.

222. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond / H. K. Angell, D. Bruni, J. C. Barrett [et al.] // Clin Cancer Res. – 2020. – Vol. 26, № 2. – P. 332–339.

223. The Molecular Associations of Signet-Ring Cell Carcinoma in Colorectum: Meta-Analysis and System Review / X. Liu, L. Huang, M. Liu, Z. Wang // Medicina (Kaunas). – 2022. – Vol. 58, № 7. – P. 836.

224. The molecular background of mucinous carcinoma beyond MUC2 / N. Hugen, M. Simons, A. Halilović [et al.] // J Pathol Clin Res. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 3–17.

225. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application / J. L. Huo, Y. T. Wang, W. J. Fu [et al.] // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – P. 956090.

226. The Ratio of CD86+/CD163+ Macrophages Predicts Postoperative

Recurrence in Stage II-III Colorectal Cancer / G. Xu, L. Jiang, C. Ye [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 724429.

227. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells / T. Hoyler, C. S. Klose, A. Souabni [et al.] // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37, № 4. – P. 634–648.

228. Thota, R. Clinicopathological features and survival outcomes of primary signet ring cell and mucinous adenocarcinoma of colon: retrospective analysis of VACCR database / R. Thota, X. Fang, S. Subbiah // *J Gastrointest Oncol.* – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 18–24.

229. Tormoen, G. W. Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy / G. W. Tormoen, M. R. Crittenden, M. J. Gough // *Adv Radiat Oncol.* – 2018. – Vol. 3, № 4. – P. 520–526.

230. Treatment patterns and survival differ between early-onset and late-onset colorectal cancer patients: the patient outcomes to advance learning network / A. N. Burnett-Hartman, J. D. Powers, J. Chubak [et al.] // *Cancer Causes Control.* – 2019. – Vol. 30, № 7. – P. 747–755.

231. Treg Cells Promote the SREBP1-Dependent Metabolic Fitness of Tumor-Promoting Macrophages via Repression of CD8⁺ T Cell-Derived Interferon- γ / C. Liu, M. Chikina, R. Deshpande [et al.] // *Immunity.* – 2019. – Vol. 51, № 2. – P. 381–397.

232. Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: a post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR) / D. Basile, C. Broudin, J. F. Emile [et al.] ; for PRODIGE investigators, GERCOR, Fédération Française de Cancerologie Digestive, and UNICANCER // *Ann Oncol.* – 2022. – Vol. 33, № 6. – P. 628–637.

233. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to checkpoint blockers in solid tumors: A systematic review / D. Presti, F. G. Dall'Olio, B. Besse [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2022. – Vol. 177. – P. 103773.

234. Tumor Infiltration Levels of CD3, Foxp3 (+) Lymphocytes and CD68 Macrophages at Diagnosis Predict 5-Year Disease-Specific Survival in Patients with Oropharynx Squamous Cell Carcinoma / B. Ljokjel, H. Haave, S. Lybak [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2022. – P. 14, № 6. – P. 1508.

235. Tumor Microenvironment Characterization in Gastric Cancer Identifies Prognostic and Immunotherapeutically Relevant Gene Signatures / D. Zeng, M. Li, R. Zhou [et al.] // *Cancer Immunol Res.* – 2019. – Vol. 7, № 5. – P. 737–750.

236. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma / J. García-Solano, P. Conesa-Zamora, J. Trujillo-Santos [et al.] // *Histopathology.* – 2011. – Vol. 59, № 6. – P. 1046–1056.

237. Understanding LAG-3 Signaling / L. Chocarro, E. Blanco, M. Zuazo [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 10. – P. 5282.

238. Van Coillie, S. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4 / S. Van Coillie, B. Wiernicki, J. Xu // *Regulation of Cancer Immune Checkpoints. Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy* ; ed. J. Xu. – Singapore : Springer, 2020. – (Adv Exp Med Biol. ; Vol. 1248). – P. 7–32.

239. Variability of CD3 membrane expression and T cell activation capacity / F. Z. El Hentati, F. Gruy, C. Iobagiu, C. Lambert // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2010. – Vol. 78, № 2. – P. 105–114.

240. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells coming of age / F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich // *Nat Immunol.* – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 108–119.

241. Walker, L. S. K. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis / L. S. K. Walker // *Immunol Lett.* – 2017. – Vol. 184. – P. 43–50.

242. Walker, L. S. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses / L. S. Walker, D. M. Sansom // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 11, № 12. – P. 852–863.

243. Wei, S. C. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy / S. C. Wei, C. R. Duffy, J. P. Allison // *Cancer Discov.* – 2018. – Vol. 8, № 9. – P. 1069–1086.

244. Yang, G. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours / G. Yang, R.Y. Zheng, Z.S. Jin // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2019. – Vol. 145, № 12. – P. 2891–2899.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Схема проопухолевого и опухоль супрессивного компонентов иммунного микроокружения при раке толстой кишки. С. 37
2. Рисунок 2 – Дизайн исследования. С. 54
3. Рисунок 3 – Диаграмма распределения больных раком толстой кишки в зависимости от стадии заболевания. С. 56
4. Рисунок 4 – Диффузное ядерное позитивное окрашивание опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки при иммуногистохимическом исследовании с антителами к белку MLH1. Позитивный внутренний контроль в ядрах стромальных клеток. Увеличение $\times 100$ С. 60
5. Рисунок 5 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку PMS2 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Позитивный внутренний контроль в клетках стромы и воспалительного инфильтрата. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$ С. 61
6. Рисунок 6 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку MSH2 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Воспалительный инфильтрат и стромальные клетки демонстрируют позитивное окрашивание. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$ С. 61
7. Рисунок 7 – Диффузное позитивное ядерное окрашивание с антителом к белку MSH6 в клетках аденокарциномы толстой кишки. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение $\times 100$. С. 62
8. Рисунок 8 – Отсутствие экспрессии белка MLH1 в опухолевых клетках аденокарциномы толстой кишки. Положительное окрашивание воспалительного инфильтрата и слизистой кишки за пределами опухоли (верхний правый угол снимка) служит внутренним позитивным контролем. Иммуногистохимическое

- исследование. Увеличение $\times 100$ С. 62
9. Рисунок 9 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против LAG3 (голубой цвет), CD8 (желтый цвет), CD163 (красный цвет), CD3 (зеленый цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет), DAPI (синий цвет). Увеличение $\times 630$ С. 66
10. Рисунок 10 – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный фронт) антителами против LAG3 (голубой цвет), CD8 (желтый цвет), CD163 (красный цвет), CD3 (зеленый цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет), DAPI (синий цвет). Увеличение $\times 630$ С. 67
11. Рисунок 11 – Аденокарцинома толстой кишки низкой степени дифференцировки (high-grade). Структура опухоли представлена солидным ростом с минимальными признаками железистой дифференцировки. В строме отмечается выраженная воспалительная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 70
12. Рисунок 12 – Аденокарцинома толстой кишки высокой степени дифференцировки (low-grade), опухоль представлена железистыми структурами (тубулярный паттерн). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 71
13. Рисунок 13 – Муцинозная аденокарцинома толстой кишки. «Озера» внеклеточного муцина с наличием в них опухолевых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 71
14. Рисунок 14 – Медуллярная аденокарцинома толстой кишки. Синцитиальный паттерн роста с наличием выраженной лимфодной инфильтрации стромы опухоли. Ядра клеток резко полиморфные, определяются многочисленные фигуры митозов.

- Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 72
15. Рисунок 15 – Инвазия аденокарциномы толстой кишки высокой степени дифференцировки (low-grade) в мышечную оболочку стенки кишки. Опухолевые комплексы прорастают за пределы подслизистой основы, инфильтрируя мышечный слой, что соответствует стадии pT3. Морфологически отмечается десмопластическая реакция стромы. Вокруг опухолевых структур наблюдается умеренно выраженная воспалительная инфильтрация, преимущественно за счёт лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 75
16. Рисунок 16 – Инвазия аденокарциномы толстой кишки низкой степени дифференцировки (high-grade) в жировую клетчатку брыжейки. Опухолевые комплексы распространяются за пределы серозной оболочки, инфильтрируя жировую ткань брыжейки, что соответствует стадии pT4a. Морфологически отмечается гнездное и солидное расположение опухолевых клеток среди жировых долек, сопровождающееся выраженной десмопластической реакцией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$. . С. 76
17. Рисунок 17 – Опухолевый эмбол аденокарциномы high-grade толстой кишки в просвете кровеносного сосуда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 79
18. Рисунок 18 – Опухолевый эмбол аденокарциномы high-grade толстой кишки в просвете лимфатического сосуда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 630$ С. 79
19. Рисунок 19 – Периневральная инвазия в мышечной оболочке стенки толстой кишки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 81
20. Рисунок 20 – Метастаз аденокарциномы толстой кишки в краевой синус регионарного лимфатического узла. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 83

21. Рисунок 21 – Метастаз аденокарциномы толстой кишки в регионарный лимфатический узел. Субтотальное замещение ткани лимфатического узла опухолью. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 84
22. Рисунок 22 – Феномен опухолевого почкования при карциноме толстой кишки. С. 87
23. Рисунок 23 – TSA-модифицированное многоцветное иммуофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против CD3 (белый цвет), CD163 (красный цвет), CD8 (зеленый цвет). Увеличение $\times 630$ С. 103
24. Рисунок 24 – TSA-модифицированное многоцветное иммуофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против LAG3 (голубой цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет). Увеличение $\times 630$. . . С. 104
25. Рисунок 25 – TSA-модифицированное многоцветное иммуофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный край) антителами против CD3 (белый цвет), CD163 (красный цвет), CD8 (зеленый цвет). Увеличение $\times 630$ С. 104
26. Рисунок 26 – TSA-модифицированное многоцветное иммуофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (инвазивный край) антителами против LAG3 (голубой цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет). Увеличение $\times 630$ С. 105
27. Рисунок 27 – Сильная прямая корреляционная связь между инфильтрацией CD3+ и CD8+ лимфоцитов центра опухоли с dMMR статусом. С. 106
28. Рисунок 28 – Количество CD3 + опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки. С. 107

29. Рисунок 29 – Количество CD8+ опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки. С. 107
30. Рисунок 30 – Сильная прямая корреляционная связь между инфильтрацией инвазивного края опухоли CD8+ и CD3+ лимфоцитами в dMMR карциноме. С. 108
31. Рисунок 31 – Соотношение CD3+/CD8+ лимфоцитов в инвазивном крае опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки. С. 109
32. Рисунок 32 – Количество CD163+ опухоль инфильтрирующих макрофагов в центре опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки. С. 110
33. Рисунок 33 – Количество CD163+ опухоль инфильтрирующих макрофагов в инвазивном крае опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки. С. 110
34. Рисунок 34 – Экспрессия PD-L1 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса. С. 112
35. Рисунок 35 – Экспрессия CTLA4 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса. С. 113
36. Рисунок 36 – Экспрессия LAG-3 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса. С. 113
37. Рисунок 37 – Выраженная прямая корреляция между экспрессией PD-L1 и CD8+ лимфоцитами в инвазивном крае при раке толстой кишки с dMMR статусом. С. 114
38. Рисунок 38 – Оценка отношения шансов с 95 % ДИ для изучаемых предикторов отдаленного метастазирования у больных раком толстой кишки (нет – 1; да – 2). С. 121

39. Рисунок 39 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности отдаленных метастазов (нет – 1; да – 2) от значения логистической функции Р. С. 122
40. Рисунок 40 – Анализ чувствительности и специфичности модели в зависимости от пороговых значений логистической функции Р. С. 122
41. Рисунок 41 – Оценка отношения шансов с 95 % доверительным интервалом для изучаемых предикторов отдаленного метастазирования (нет – 1; да – 2). С. 125
42. Рисунок 42 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности отдаленного метастазирования (нет – 1; да – 2) от значения логистической функции Р. С. 126
43. Рисунок 43 – Анализ чувствительности и специфичности модели в зависимости от пороговых значений логистической функции Р. С. 126
44. Таблица 1 – Условия инкубации первичных антител и флуоресцентных красителей при проведении мультиплексного иммуногистохимического исследования. С. 65
45. Таблица 2 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от пола и гистологического типа опухоли. С. 73
46. Таблица 3 – Зависимость локализации опухоли от гистологического типа у больных раком толстой кишки. С. 74
47. Таблица 4 – Частота распределения больных раком толстой кишки в зависимости от гистологического типа и анатомической локализации первичной опухоли. С. 74
48. Таблица 5 – Глубина инвазии опухоли в стенку кишки в зависимости от гистологического типа карциномы. С. 77
49. Таблица 6 – Степень выраженности воспалительной инфильтрации в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки. С. 78
50. Таблица 7 – Частота выявления лимфоваскулярной инвазии в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком

	толстой кишки.	C. 80
51.	Таблица 8 – Частота выявления периневральной инвазии в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки.	C. 82
52.	Таблица 9 – Распределение степеней феномена опухолевого почкования в зависимости от гистологического типа опухоли.	C. 82
53.	Таблица 10 – Частота метастатического поражения лимфатических узлов в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки.	C. 85
54.	Таблица 11 – Частота отдаленных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки. ...	C. 85
55.	Таблица 12 – Частота лимфоваскулярной инвазии в зависимости от степени опухолевого почкования в опухоли у больных раком толстой кишки.	C. 88
56.	Таблица 13 – Частота выявления периневральной инвазии в зависимости от степени опухолевого почкования у больных раком толстой кишки.	C. 89
57.	Таблица 14 – Частота поражения лимфатических узлов в зависимости от степени опухолевого почкования.	C. 90
58.	Таблица 15 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от количества метастатических регионарных лимфатических узлов и феномена опухолевого почкования.	C. 90
59.	Таблица 16 – Частота отдаленных метастазов в зависимости от степени феномена опухолевого почкования в первичной опухоли у больных с раком толстой кишки.	C. 91
60.	Таблица 17 – Частота распределения pMMR и dMMR карцином в зависимости от пола у больных раком толстой кишки.	C. 94
61.	Таблица 18 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от локализации опухоли.	C. 94
62.	Таблица 19 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом	

	в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки.	C. 95
63.	Таблица 20 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от глубины прорастания опухолью стенки кишки. ...	C. 96
64.	Таблица 21 – Степень выраженности воспалительного инфильтрата в зависимости от pMMR и dMMR статуса рака толстой кишки.	C. 97
65.	Таблица 22 – Степень выраженности опухолевого почкования в зависимости от pMMR и dMMR статуса рака толстой кишки.	C. 97
66.	Таблица 23 – Распределение карцином с pMMR и dMMR статусом в зависимости от наличия лимфоваскулярной инвазии в опухоли у больных раком толстой кишки.	C. 98
67.	Таблица 24 – Частота периневральной инвазии в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли у больных раком толстой кишки. ...	C. 98
68.	Таблица 25 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли и состояния регионарных лимфатических узлов.	C. 99
69.	Таблица 26 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли и количества пораженных регионарных лимфатических узлов.	C. 99
70.	Таблица 27 – Распределение больных раком толстой кишки в зависимости от pMMR и dMMR статуса опухоли и наличия отдаленных метастазов.	C. 100
71.	Таблица 28 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в центре опухоли среди карцином с dMMR статусом.	C. 111
72.	Таблица 29 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в центре опухоли среди карцином с pMMR статусом.	C. 112
73.	Таблица 30 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными	

	точками в инвазивном крае опухоли в группе карцином с dMMR статусом.	C. 115
74.	Таблица 31 – Коэффициенты корреляций между опухоль инфильтрирующими клетками и иммунными контрольными точками в инвазивном крае опухоли в группе карцином с pMMR статусом.	C. 115
75.	Таблица 32 – Количественная оценка CD3+ и CD8+ лимфоцитов с экспрессией иммунных контрольных точек в зависимости от MMR статуса опухоли.	C. 116
76.	Таблица 33 – Характеристики связи предикторов модели с вероятностью выявления отдаленного метастаза (нет – 1; да – 2). ...	C. 120
77.	Таблица 34 – Пороговые значения логистической функции Р.	C. 123
78.	Таблица 35 – Характеристики связи предикторов модели с вероятностью развития отдаленных метастазов (нет – 1; да – 2). ...	C. 124
79.	Таблица 36 – Пороговые значения логистической функции Р.	C. 127