

Наумов Сергей Сергеевич

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

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научный руководитель

доктор медицинских наук, профессор

Вторушин Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент

Раскин Григорий Александрович

(Общество с ограниченной ответственностью «Лечебно-диагностический центр Международного института биологический систем имени Сергея Березина», заместитель главного врача по лабораторной медицине – врач-патологоанатом)

доктор медицинских наук

Сетдикова Галия Равиловна

(Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», отделение морфологической диагностики отдела онкологии, руководитель отделения)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского» (г. Москва)

Защита состоится «____» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, 4; тел. 8 (383) 222-68-35; <https://new.ngmu.ru/dissers/get-file/4717>).

Автореферат разослан «____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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, ежегодная заболеваемость РТК превышает 1,1 миллиона новых случаев, что составляет 11 % от всех впервые диагностированных злокачественных новообразований (Siegel R. L. et al., 2020). В Российской Федерации в 2023 году было зарегистрировано более 74 тысяч новых случаев РТК, что соответствует 10,6 % в структуре онкологической заболеваемости (Каприн А. Д. и др., 2024).

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) (Федянин М. Ю. и др., 2024).

Особую значимость в прогнозировании течения РТК имеет определение статуса MMR/MSI. Опухоли с дефицитом системы репарации (dMMR/MSI) составляют до 20 % всех случаев (Battaglin F. et al., 2018) и характеризуются более благоприятным прогнозом по сравнению с опухолями с профицитом системы репарации (pMMR/MSS) (Boland C. R. et al., 2010; Lin A. et al., 2020). Данное различие может быть обусловлено особенностями опухолевого микроокружения, в частности, более выраженной иммунной инфильтрацией, связанной с повышенной неоантигенной нагрузкой в dMMR/MSI опухолях (Lin A. et al., 2020).

Иммунное микроокружение РТК характеризуется сложной архитектоникой и включает как противоопухолевые, так и проопухолевые компоненты (Locu H. et al., 2018). Ключевыми элементами противоопухолевого иммунитета являются опухолинфильтрующие лимфоциты (TILs), представленные различными субпопуляциями CD3+Т-клеток, включая CD4+ и CD8+Т-лимфоциты (Renman D. et al., 2021). Количественная оценка CD3+ и CD8+ TILs легла в основу разработки прогностического индекса Immunoscore (Galon J. et al., 2020; Angell H. K. et al., 2018). Проопухолевый компонент микроокружения представлен преимущественно опухоль-ассоциированными макрофагами (TAM) M2 фенотипа (Huang X. et al., 2018), высокая плотность которых коррелирует с неблагоприятным прогнозом и резистентностью к терапии (Ma S. et al., 2022; Edin S. et al., 2012).

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 (Tavana S. et al., 2023; Esen F., et al., 2021). В настоящее время ингибиторы контрольных точек (анти-PD-1/PD-L1, анти-CTLA-4) успешно применяются в клинической практике (Garralda E. et al., 2022; Carlino M. S. et al., 2021; Derakhshani A. et al., 2021; Onoi K. et al., 2020; Lopez-Beltran A. et al., 2021), а LAG-3 рассматривается как перспективная терапевтическая мишень (Yan S. et al., 2024).

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 (Chen X. et al., 2024). 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 (Fabrizio D. A. et al., 2018; Chen J. et. al., 2014; Korehisa S. et. al., 2018; Makaremi S. et al., 2021). 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 (Garcia, G. G et.al., 2024).

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. 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 (Argilés G. et.al., 2020; Guinney J. et.al., 2015). 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 (He X. et.al., 2020; Yan S. et.al., 2024; Locy H. et.al., 2018).

В настоящее время особое внимание заслуживает исследование экспрессии молекул контрольных точек PD-L1, CTLA-4, LAG-3, что обусловлено их значением в развитии и прогрессии злокачественных новообразований (He X. et.al., 2020). 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 (Lin, A. et al., 2020; Argilés G. et.al., 2020).

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 персонализированному 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 периневральной 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 работы. 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.

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 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. 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 периневральной 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 результатов исследования. 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 проведенного 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.

Структура и объем 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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Распространенность процесса определялась согласно международной классификации по системе TNM (8 издание, 2017 г). В 6 случаях у пациентов была установлена I стадия заболевания (8 %), ПА стадия была выявлена у 4 (5 %) пациентов, в свою очередь, ПВ и ПС стадии были обнаружены в 3 (4 %) и 1 (1 %) наблюдениях. Наибольшее количество пациентов характеризовались наличием ПИА клинической стадии – 25 (31 %) случаев, у 16 (20 %) больных выявлена ПВ стадия, у 9 (11 %) пациентов – ПС стадия. В 16 (20 %) случаях были обнаружены признаки метастатического поражения печени, что соответствовало стадии IVA.

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.

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

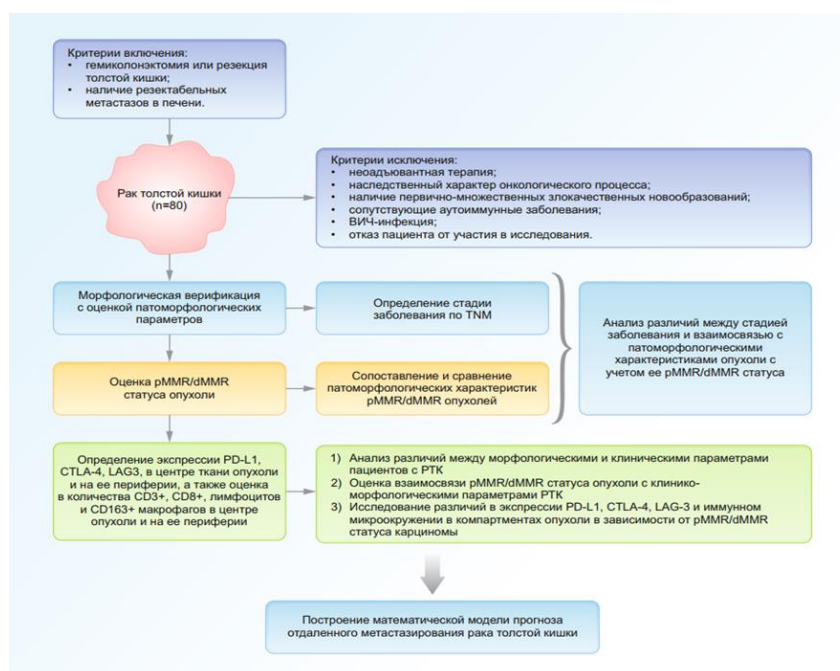


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Морфологические методы исследования. 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. Гистологический тип опухоли устанавливался согласно классификации ВОЗ 5-го пересмотра (WHO, 2020). Инфильтрацию иммунными клетками оценивали в опухоли и в строме новообразования при увеличении $\times 400$ в 10 полях зрения. Результаты количественной оценки переведены в балльную шкалу (1 балл – слабо выраженная инфильтрация, до 200 иммунных клеток; 2 балла – умеренно выраженная инфильтрация, от 200 до 400 клеток; 3 балла – резко выраженная, 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.

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.

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.

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, Акою) в течение 15 минут. На заключительном этапе с помощью системы мультиплексного анализа ткани Vectra 3.0.3 (PerkinElmer) были получены многоцветные изображения, в которых производилась количественная оценка исследуемых маркеров (Рисунок 2).

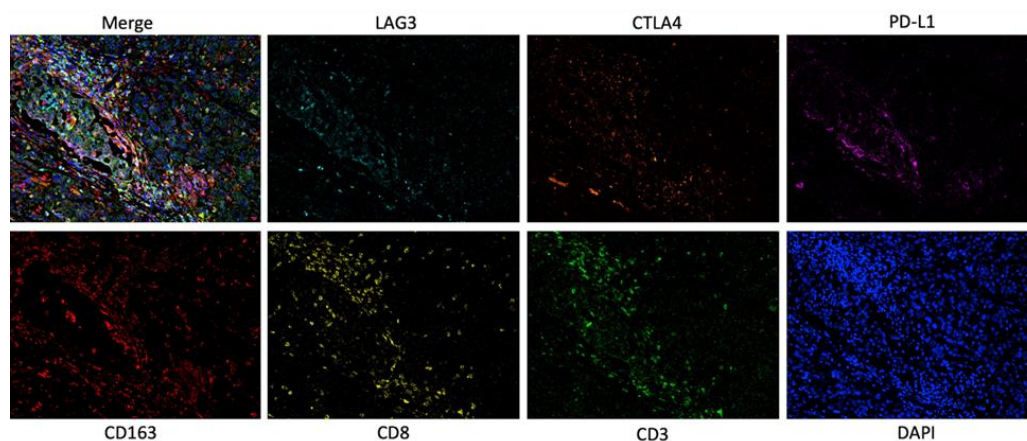


Рисунок 2. – TSA-модифицированное многоцветное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани колоректальной карциномы (центр) антителами против LAG3 (голубой цвет), CD8 (желтый цвет), CD163 (красный цвет), CD3 (зеленый цвет), PD-L1 (розовый цвет), CTLA4 (оранжевый цвет), DAPI (синий цвет). Увеличение $\times 630$

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.

Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией к статистической значимости при $p \leq 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взаимосвязь патоморфологических характеристик и клинических параметров при раке толстой кишки. 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.

На первом этапе исследования нами был проведен анализ сопряженности гистологического типа опухоли с рядом клинических и патоморфологических аспектов: полом пациентов, ее локализацией, глубиной инвазии, количеством пораженных лимфатических узлов, наличием отдалённых метастазов, а также лимфоваскулярной, периневральной инвазией, наличием «опухолевых почек» (tumor budding) в инвазивном фронте опухоли и степенью инфильтрации стромы опухоли иммунокомпетентными клетками. Отдельно также была проведена оценка взаимосвязи степени выраженности опухолевого почкования и ключевых клиничко-патоморфологических критериев. Существенных различий между гистологическим типом опухоли полом пациентов обнаружено не было ($\chi^2 = 5,79$; $p = 0,12$). Нами было достоверно установлено, 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 ($\chi^2 = 9,4$; $p = 0,02$). Анализ зависимости гистологического типа опухоли и непосредственной ее локализации в анатомических отделах толстой кишки выявил достоверное преобладание в сигмовидной кишке карцином неспецифического типа low-grade ($\chi^2 = 34,29$; $p = 0,03$). В ходе проведенного исследования было установлено, что глубина инвазии опухоли, наличие периневральной инвазии, степень выраженности феномена опухолевого почкования, а также развитие отдаленных метастазов не определяется гистологическим типом опухоли ($\chi^2 = 12,6$, $p = 0,17$; $\chi^2 = 9,2$, $p = 0,02$; $\chi^2 = 2,18$, $p = 0,53$; $\chi^2 = 13,9$, $p = 0,2$), в то время как полученные данные продемонстрировали достоверную взаимосвязь между гистотипом опухоли, степенью выраженности воспалительной инфильтрации, лимфоваскулярной инвазии и развитием регионарных метастазов ($\chi^2 = 12,14$, $p = 0,048$; $\chi^2 = 9,2$, $p = 0,02$; $\chi^2 = 25,87$, $p = 0,039$) (Рисунки 3, 4 и 5).

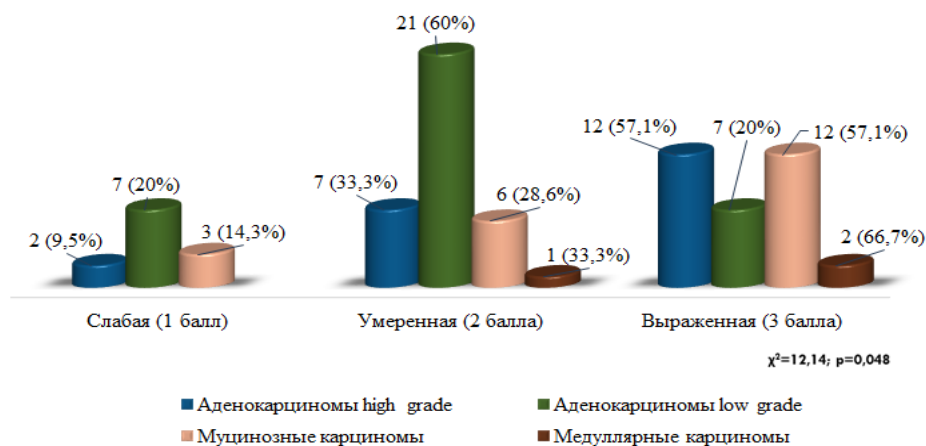


Рисунок 3 – Степень выраженности воспалительной инфильтрации в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

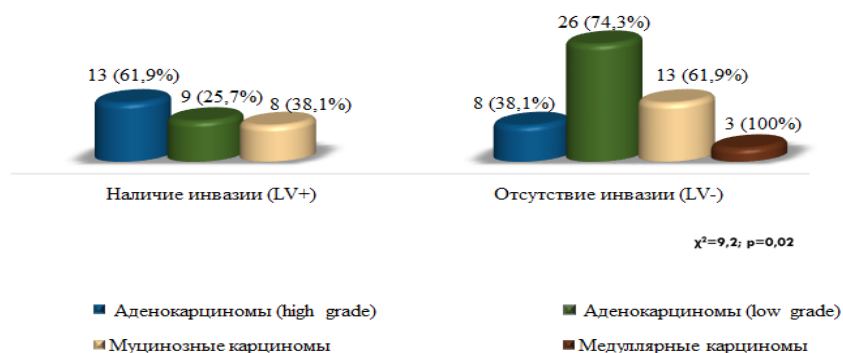


Рисунок 4 – Частота выявления лимфоваскулярной инвазии в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

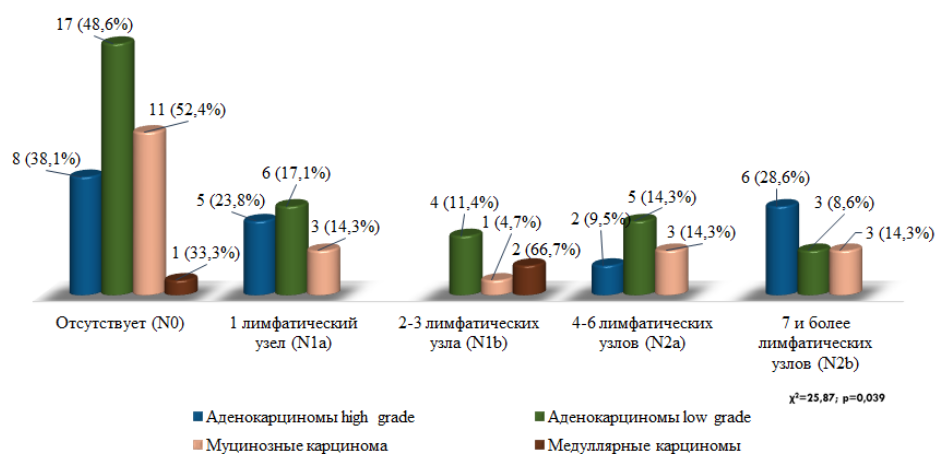


Рисунок 5 – Частота метастатического поражения лимфатических узлов в зависимости от гистологического типа опухоли у больных раком толстой кишки

Исследование взаимосвязи опухолевого почкования позволило установить достоверную сопряженность с более высокой частотой периневральной ($\chi^2 = 8,07$; $p = 0,044$), и лимфоваскулярной инвазии ($\chi^2 = 13,06$; $p = 0,0044$) опухоли и выявить сопряженность с повышенной частотой регионарного метастазирования ($\chi^2 = 25,43$; $p = 0,000013$). 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 ($\chi^2 = 43,9$; $p = 0,00011$)

Нами также было выявлено, что развитие гематогенных метастазов непосредственно ассоциировано со степенью выраженности опухолевого почкования ($\chi^2 = 26,34$; $p = 0,000008$) (Рисунок 6).

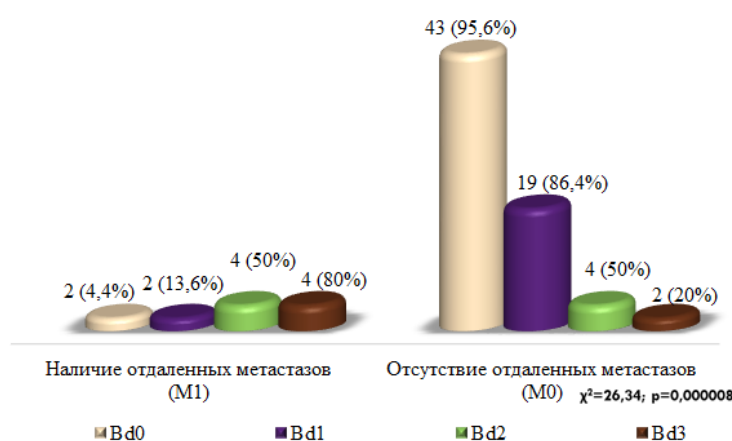


Рисунок 6 – Частота отдаленных метастазов в зависимости от степени феномена опухолевого почкования в первичной опухоли у больных с раком толстой кишки

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.

Оценка взаимосвязи pMMR/dMMR статуса опухоли с клиничко-морфологическими параметрами рака толстой кишки. Нами был проведен сравнительный анализ основных клинических и морфологических характеристик карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса опухоли. Стоит отметить, что на данном этапе исследования не было выявлено статистически значимых различий между MMR статусом опухоли и основными клиничко-морфологическими характеристиками колоректального рака. В частности, нами не было обнаружено достоверной связи между полом пациентов и преобладанием карцином с определенным MMR статусом ($\chi^2 = 1,20$, $p = 0,27$). Аналогично, анализ стороны локализации

опухоли не продемонстрировал значимой связи с молекулярным профилем новообразования ($\chi^2 = 0,81$, $p = 0,36$). 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 ($\chi^2 = 3,4$, $p = 0,32$). 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 ($\chi^2 = 4,6$, $p = 0,19$). В группе pMMR карцином чаще встречалась лимфоваскулярная инвазия, но различия не достигли уровня статистической значимости ($\chi^2 = 2,4$, $p = 0,11$). Перинеуральная инвазия встречалась с сопоставимой частотой в обеих группах и не было обнаружено статистически значимых различий в зависимости от молекулярного статуса опухоли ($\chi^2 = 0,02$, $p = 0,8$). 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 ($\chi^2 = 0,47$, $p = 0,49$). 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 ($\chi^2 = 2,61$; $p = 0,1$).

Мультиплексный иммуногистохимический анализ клеток опухолевого микроокружения и экспрессии молекул иммунных контрольных точек при раке толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса. На данном этапе исследования была проведена одномоментная количественная оценка компонентов противоопухолевого (CD3+ и CD8+ лимфоциты) и проопухолевого (CD163+ макрофаги) микроокружения в строме и на инвазивном крае опухолевой ткани, а также проанализирована экспрессия белков контрольных иммунных точек: PD-L1, CTLA-4 и LAG-3 в аналогичных компартментах опухоли. 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 % случаев 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).

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 ($p = 0,252$; $p = 0,669$). Нами была обнаружена сильная прямая корреляционная связь в группе dMMR карцином между количеством инфильтрирующих центр опухоли CD3+ и CD8+ лимфоцитов ($r = 0,64$; $p = 0,0073$). Аналогичного рода зависимость была отмечена и в группе карцином с профицитом белков репарации неспаренных нуклеотидов, однако степень прямой корреляции была слабее ($r = 0,45$; $p = 0,007$). Количественная оценка плотности иммунного инфильтрата показала достоверное статистическое преобладание обеих популяций лимфоцитов в инвазивном крае опухоли среди карцином с дефицитом белков мистматч репарации ($p = 0,0065$; $p = 0,0414$) (Рисунки 7 и 8).

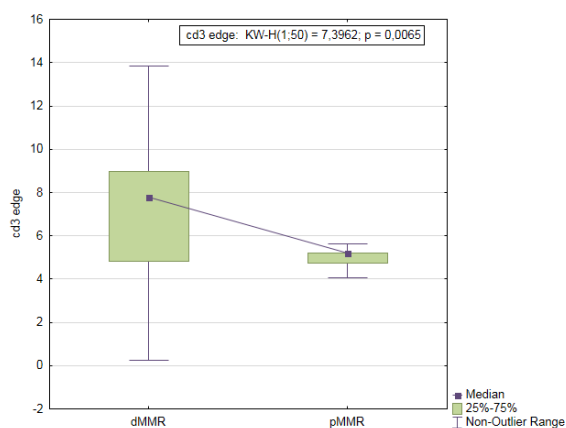


Рисунок 7 – Количество CD3+ опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

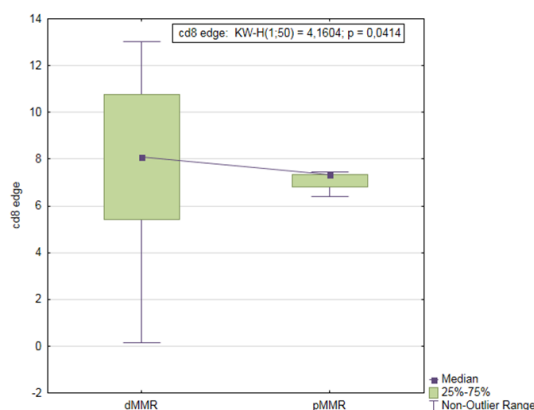


Рисунок 8 – Количество CD8+ опухоль инфильтрирующих лимфоцитов в инвазивном фронте опухоли в зависимости от pMMR/dMMR статуса карциномы толстой кишки

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.

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.

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 9, 10 и 11).

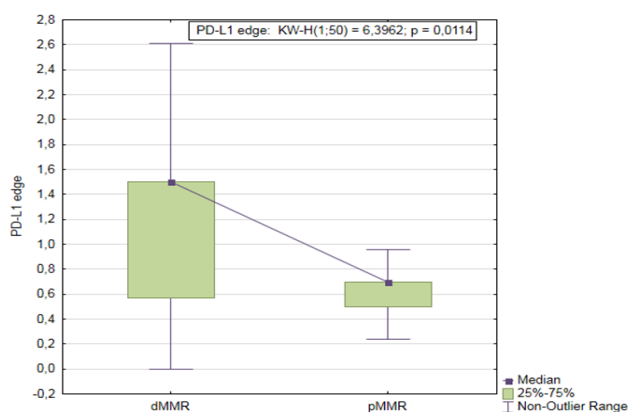


Рисунок 9 – Экспрессия PD-L1 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

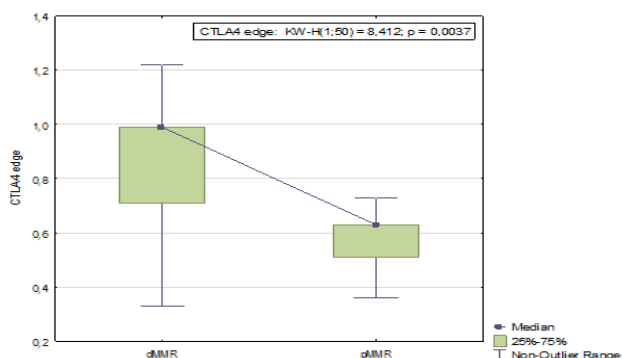


Рисунок 10 – Экспрессия CTLA4 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

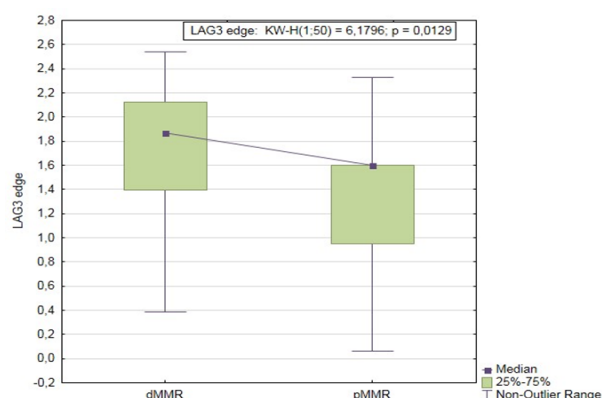


Рисунок 11 – Экспрессия LAG-3 в клетках опухолевого микроокружения в инвазивном крае карцином толстой кишки в зависимости от pMMR/dMMR статуса

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование позволило провести иммунофенотипирование опухоль-ассоциированных лимфоцитов и макрофагов, в ходе которого изучалось их количество в ткани опухоли. Использование корреляционного анализа для изучения взаимосвязей регионарного метастазирования и иммунного микроокружения опухоли, а также его фенотипа и экспрессии иммунных контрольных точек позволило 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 гиперэкспрессией PD-L1 в центре опухоли.

Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у больных люминальным подтипом рака молочной железы. На основе результатов проведенного исследования с использованием метода нелинейной логистической регрессии были

разработаны две математические модели для прогнозирования вероятности риска развития гематогенных метастазов для пациентов с колоректальным раком без предварительного предоперационного лечения. В качестве независимых признаков в первую математическую модель вошли такие показатели, как: количество пораженных лимфатических узлов; степень выраженности феномена опухолевого почкования; наличие интрамуральной сосудистой инвазии и экстрамуральной сосудистой инвазии.

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.

Степень достоверности модели подтверждена ($p = 0,002$). Чувствительность – 80,0 %, специфичность – 85,0 %.

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. В качестве независимых признаков в данную модель вошли следующие показатели: количество макрофагов с фенотипом CD163+PD-L1+; количество макрофагов с фенотипом CD163+PD-L1–.

Степень достоверности модели подтверждена ($p = 0,010$). Чувствительность – 70,0 %, специфичность – 70,0 %.

Пояснения формулы и переменных представлены в рубрике практических рекомендаций.

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 периневральной ($\chi^2 = 8,07$; $p = 0,044$), 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль оценки PD-L1 в аспекте молекулярно-генетической классификации колоректального рака. современное состояние проблемы / С. В. Вторушин, **С. С. Наумов**, И. В. Степанов [и др.] // **Сибирский онкологический журнал**. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 115–122.

2. Клинико-патологические особенности рака толстой кишки в зависимости от dMMR статуса опухоли / **С. С. Наумов**, Н. В. Крахмаль, М. Н. Тарасов [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 57–64.

3. Экспрессия иммунных контрольных точек PD-L1, CTLA4, LAG3 в микроокружении аденокарциномы толстой кишки в зависимости от MMR-статуса / **С. С. Наумов**, Н. В. Крахмаль, Л. А. Таширева, С. В. Вторушин // **Архив патологии**. – 2024. – Т. 86, № 2. – С. 6–13.

4. Evaluation of immune-checkpoint molecules in dMMR/pMMR colorectal cancer by multiplex immunohistochemistry / **S. S. Naumov**, L. A. Tashireva, N. V. Krakhmal, S. V. Vtorushin. – DOI 10.1007/s12094-024-03691-2. – Text : electronic // **Clinical & translational oncology**. – 2024. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-024-03691-2>.

5. Клинико-морфологические особенности рака толстой кишки в зависимости от молекулярных параметров первичной опухоли/ Л. Е. Синянский, С. В. Вторушин, С. Г. Афанасьев, **С. С. Наумов** // Злокачественные опухоли : материалы XXIV Российского онкологического конгресса, г. Москва, 2020. – Т. 10, № 3S1. – С. 118–119.

6. Синянский, Л. Е. Сопряженность клинико-морфологических особенностей рака толстой кишки с молекулярными параметрами и MMR-статусом первичной опухоли / Л. Е. Синянский, **С. С. Наумов** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» : материалы V Междунар. морфол. науч.-практ. конкурс-конф. студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения и 50-летию научно-педагогической деятельности Заслуженного деятеля науки РФ, академика РАН, профессора В. А. Шкурупия / сост. А. П. Надеев. – Новосибирск, 2020. – С. 212–215.

7. **Наумов, С. С.** Оценка взаимосвязи молекулярных подтипов колоректальной карциномы с особенностями клинического течения и прогноза / **С. С. Наумов**, Л. Е. Синянский, Н. В. Крахмаль // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» : материалы VI Междунар. Морфол. науч.-практ. конкурс-конф. студентов и молодых ученых, посвященной 125-летию со дня рождения профессора Ф. А. Новоселова. – Новосибирск, 2021. – С. 162–164.

8. Взаимосвязь dMMR/pMMR подтипов карциномы толстого кишечника с клинико-морфологическими особенностями/ **С. С. Наумов**, М. Н. Тарасов, М. И. Тараненко, С. В. Вторушин // Ради Жизни – FOR LIFE! : материалы VI Международного форума онкологии и радиотерапии. – Москва, 2023. – С. 152–153.

9. Мультиплексный анализ CTLA4, PD-L1, LAG3 и параметров опухолевого микроокружения в зависимости от статуса MMR при раке толстой кишки / **С. С. Наумов**, Л. А. Таширева, А. В. Лукин [и др.] // Злокачественные опухоли : сб. материалов XXIV Российского онкологического конгресса, г. Москва, 2023. – Т. 13, № 3S1 – С. 149–150.

10. **Наумов, С. С.** Особенности экспрессии CTLA-4, PD-L1, LAG3 при мультиплексном иммуногистохимическом анализе в зависимости от dMMR/pMMR статуса карцином толстой кишки / **С. С. Наумов** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы VIII Междунар. морфол. науч.-практ. конкурс-конф. студентов и молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. В. Донских / сост. А. П. Надеев. – Новосибирск, 2023. – С. 98–99.

11. Комплексная оценка экспрессии иммунных контрольных точек и опухолевого микроокружения при dMMR/pMMR карциномах толстого кишечника / **С. С. Наумов**, Н. В. Крахмаль, Л. А. Таширева, С. В. Вторушин // Путь в науку : материалы XII науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Москва, 2023. – С. 98–99.

12. **Naumov, S. S.** Multiplex immunohistochemistry analysis of CTLA4, PD-L1, LAG3 and tumour microenvironment components in relation to MMR status in colorectal carcinoma / **S. S. Naumov**, N. V. Krakhmal, S. V. Vtorushin / Virchows Archiv – European Journal of Pathology. – 2024. – Vol. 485. – P. 168–169.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Bd	–	опухолевое почкование
CTLA-4	–	цитотоксический лимфоцит ассоциированный протеин 4
dMMR	–	дефицит белков ошибочно спаренных нуклеотидов
LAG3	–	Lymphocyte-activation gene 3 – ген активации лимфоцитов-3
MMR	–	mismatch repair – система репарации неспаренных оснований ДНК
MSI	–	microsatellite instability – микросателлитная нестабильность
MSS	–	microsatellite stability – микросателлитная стабильность
PD-L1	–	программируемый лиганд гибели-1
pMMR	–	отсутствие недостатка белков ошибочно спаренных нуклеотидов
TAM	–	tumor associated macrophages – опухоль ассоциированные макрофаги
TILs	–	tumor infiltrated lymphocytes – опухоль инфильтрирующие лимфоциты
TSA	–	усиление сигнала тирамидом
PTK	–	рак толстой кишки