

Патоморфологічний аналіз брунькування в колоректальних карциномах

I. С. Шпонька^{1,A,E}, О. В. Пославська^{1,*1,C,E}, І. К. Хархаліс^{2,B,C}, Т. В. Шинкаренко^{1,C,D}

¹Дніпровський державний медичний університет, Україна, ²Ужгородський національний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Захворюваність і смертність, спричинена колоректальним раком (КРР), залишається актуальною проблемою сучасної онкології. Інтенсивне брунькування вважають важливим фактором прогнозу гіршого клінічного перебігу КРР, що може впливати на ухвалення клінічних рішень щодо застосування розширених втручань при рТ1 та II стадії, згідно з висновком Міжнародної консенсусної конференції з брунькування пухлин 2016 року.

Мета роботи – оцінити прогностичну значущість брунькування залежно від клініко-морфологічних характеристик колоректальних карцином.

Матеріали та методи. Дослідили клініко-анатомічний матеріал 31 пацієнта з КРР (14 жінок і 17 чоловіків), що перебували на лікуванні в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова» ДОР в період з 2019 до 2021 року. Вік пацієнтів становив 27–84 роки, середній вік – $62,3 \pm 14,8$ року. Здійснили гістологічне дослідження зразків КРР з оцінюванням «гарячих ділянок» інвазивного фронту та імуногістохімічне дослідження з PАН СК АЕ 1/3, Ki-67, MUC2, caspase-3, β -catenin для розрахунку кількості кластерів пухлинних клітин.

Результати. У третині зразків визначили розбіжності не тільки за кількістю кластерів, але й за категорією брунькування в разі забарвлення рутинним та імуногістохімічним методами. Перитуморальне брунькування інвазивного фронту з категорією Bd3 завжди супроводжувалось інтратуморальним брунькуванням різних ступенів інтенсивності. Аналіз розподілу градацій брунькування колоректальних карцином за статтю, віком хворих, локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання, наявністю метастазів не показав статистично вірогідні відмінності ($p > 0,05$). Це може свідчити про незалежність цього фактора та прогнозу виживаності пацієнтів. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії маркерів Ki-67, caspase-3 і β -catenin не показала достовірної різниці в підгрупах ($p > 0,05$), але мала тенденцію до збільшення кількості бруньок із підвищенням індексу проліферації та зниженням активності проапоптотичного ензиму caspase-3.

Висновки. Якщо кількість бруньок, що визначена стандартизованим методом забарвлення Н & Е, викликає сумніви на межі категорій Bd1 і Bd2 або Bd2 і Bd3, можливе заниження ступеня брунькування порівняно з забарвленням імуногістохімічним методом, оскільки виключені хибно інтерпретовані морфологічні об'єкти як кластери пухлини. Найнадійніший імуногістохімічний маркер для контрастного визначення бруньок – коктейль із цитокератинів.

Ключові слова:
колоректальна карцинома, імуногістохімія, брунькування, цитокератини.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 2(58).
С. 135-140

***E-mail:**
alexandra.poslavskaya@
gmail.com

Pathomorphological analysis of budding in colorectal carcinomas

I. S. Shponka, O. V. Poslavska, I. K. Kharkhalis, T. V. Shynkarenko

Morbidity and mortality from colorectal cancer (CRC) remains a current problem of modern oncology. Intensive budding is an important prognostic factor for a worse clinical course of CRC and may influence clinical decision-making regarding the use of extended interventions in pT1 and stage II, according to the conclusion of the 2016 International Consensus Conference on Tumor Budding.

The aim of the work is to evaluate the prognostic significance of budding depending on the clinical and morphological characteristics of colorectal carcinomas.

Materials and methods. The article deals with clinical and anatomical material of 31 patients with CRC (14 women and 17 men) who were treated in the 2nd surgical department of the SE "Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital" in the period from 2019 to 2021. The age of the patients varied of 27–84 years old (average age – 62.3 ± 14.8 years old). A histological examination of CRC samples was carried out with an assessment of "hot areas" of the invasive front and an immunohistochemical examination with PАН СК АЕ 1/3, Ki-67, MUC2, caspase-3, β -catenin to calculate the number of tumor cell clusters.

Results. In one third of the number of samples, differences were determined not only in the number of clusters, but also in the budding category when stained by routine and immunohistochemical methods. Peritumoral budding of the invasive front with category Bd3 was always accompanied by intratumoral budding of varying degrees of intensity. The analysis of the distribution of gradations of budding of colorectal carcinomas by gender, age, location, histological degree of differentiation, and the presence of metastases did not show a statistically significant difference ($p > 0.05$), which may indicate the independence of this factor on the prognosis of patient survival. The intensity of budding of colorectal carcinomas depending on the expression of markers Ki-67, caspase-3 and β -catenin did not show a significant difference in subgroups ($p > 0.05$) but showed tendencies to increase the number of budding with an increase in the proliferation index and a decrease in the activity of the proapoptotic enzyme caspase-3.

Key words:
colorectal carcinoma, immunohistochemistry, budding, cytokeratin.

Pathologia, 2023. 20(2),
135-140

Conclusions. If the number of buds on the border of categories Bd1 and Bd2, or Bd2 and Bd3, determined by the standardized method of H & E staining is doubtful, the degree of budding may be underestimated in comparison with staining by the immunohistochemical method, due to the exclusion of falsely interpreted morphological objects as tumor clusters; the most reliable immunohistochemical marker for contrast separation of buds is a cocktail of cytokeratins.

Захворюваність і смертність, спричинена колоректальним раком (КРР), залишається актуальною проблемою сучасної онкології. Через широке використання скринінгу та розроблення ефективних методів лікування ранніх форм КРР та облігатних передракових станів, мала би простежуватись тенденція до зменшення захворюваності та смертності від КРР в останні роки, і про це повідомляли в деяких розвинених країнах: Австрії, Люксембурзі, Німеччині, Ізраїлі тощо. Однак темпи захворюваності та смертності від КРР у країнах, що розвиваються та раніше мали відносно низькі показники, помітно зросли, як-от у Румунії, Молдові, Еквадорі, Китаї тощо [1,2,3,4,5].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, КРР є третім за поширеністю раком у світі: у 2022 році зафіксовано 1,85 млн нових випадків і 850 тис. смертей. Прогноз зростання захворюваності на 2040 рік, встановлений на основі статистики, – до 3,2 млн [6,7,8].

У 2021 році КРР посідав провідні місця в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення в населення України віком понад 55 років: в чоловіків – 3 та 4 місця з локалізацією в ободовій і прямій кишках відповідно, в жінок – 4 та 5 місця відповідно. Зазначимо, що у структурі смертності від КРР для чоловіків розподіл виявився нижчим за показники захворюваності (4 та 5 місця для ободової та прямої кишки відповідно), а для жінок геть іншим – 2 місце в структурі смертності для пухлин ободової кишки в осіб віком 55–74 роки, 2 і 3 місця – в пацієнок віком понад 75 років з локалізацією в ободовій і прямій кишках відповідно. Причинами вважають якісні зміни в харчових продуктах, що останнім часом є рафінованими і не такими збалансованими, як натуральні, що містили клітковину, вітаміни, мікроелементи в достатніх кількостях [9].

Отже, прогнозують стабільне зростання захворюваності на злоякісні новоутворення ободової та прямої кишок і в чоловіків, і жінок, які проживають в Україні, з переважанням рівня смертності в жінок [9]. Чимало джерел фахової літератури свідчать, що виживаність хворих на КРР безпосередньо залежить від своєчасності виявлення злоякісної пухлини, і тому показник відносної п'ятирічної виживаності хворих із ранніми стадіями КРР у 8–10 разів кращий порівняно з занедбанними клінічними випадками [4,5,6].

Морфологічні дослідження показали: високий рівень пухлинних бруньок інвазивного фронту в колоректальній карциномі асоціюється з гіршим прогнозом, включаючи вищий ризик рецидиву захворювання та зниження загальної виживаності. Пухлинні бруньки – невеликі скупчення злоякісних клітин, що відокремлюються від основної пухлинної маси та проростають у навколишні тканини. Доведено, що при колоректальній карциномі наявність пухлинних бруньок – важливий прогностичний фактор, а отже є корисним під час прогнозування результатів лікування пацієнтів [10].

Крім того, брунькування пов'язане з підвищеною імовірністю метастазування в лімфатичні вузли, що також може погіршити прогноз [4]. Тому наявність і рівень пухлинних бруньок у КРР – важливий фактор для визначення тяжкості захворювання та ухвалення рішення щодо лікування. Це також може допомогти виявити пацієнтів, які потребують більш агресивного лікування або ретельнішого спостереження [11].

Мета роботи

Оцінити прогностичну значущість брунькування залежно від клініко-морфологічних характеристик колоректальних карцином.

Матеріали і методи дослідження

Дослідили клініко-анатомічний матеріал 31 пацієнта з КРР (14 жінок і 17 чоловіків), що одержали під час операцій (правобічна геміколектомія, резекція сигмоподібної кишки, операція Гартмана, резекція поперечно-ободової кишки, резекція клубової кишки). Усі хворі перебували на лікуванні в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова» ДОР в період з 2019 до 2021 року. Вік пацієнтів становив від 27 до 84 років, середній вік – $62,3 \pm 14,8$ року.

Дослідження схвалено комісією з біоетики ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (витяг з протоколу засідання № 7/16 від 30 вересня 2020 р.), здійснене відповідно до принципів біоетики, що викладені в Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)». Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

За гістологічною будовою всі спостереження – колоректальні карциноми. Визначили гістологічні підтипи: аденокарцинома (АК) неспецифікована NOS – 17 випадків, зубчаста АК – 5 випадків, мікропапілярна АК – 3 випадки, медулярна АК – 3 випадки, муциозна АК – 1 випадок, перстнеподібноклітинна АК – 1 випадок, АК типу like-adenoma – 1 випадок.

Правобічну локалізацію (у висхідній частині ободової кишки, печінковому куті, поперечно-ободовій кишці) визначили в 17 випадках, лівобічну (в селезінковому куті, ректо-сигмоїдному сполученні, сигмоподібній та прямій кишці) – в 14 випадках. Більшість пухлин локалізувались у сліпій та ободовій кишках.

Матеріал поділили на дві групи залежно від наявності метастазів: без метастазів – 26 КРК, з метастазами – 5 спостережень (4 випадки – у лімфатичних вузлах черевної порожнини, 1 – у печінці).

Гістологічний метод дослідження. Зразки пухлин КРР, фіксовані в формаліні й залиті парафіном, взято з архіву КЗ «Дніпровське обласне патолого-анатомічне бюро». Зрізи завтовшки 4 мкм зробили на

мікромомі Microm HM-340, забарвлені за стандартною методикою гематоксиліном та еозином [12].

Імуногістохімічний метод забарвлення. Крім звичайного гістологічного дослідження (забарвлення гематоксиліном та еозином), здійснили імуногістохімічний аналіз за протоколами ThermoScientific (TS) з первинними антитілами до кератину, Pan (клон AE1/AE3, RTU), Ki-67 (sp6, 1:250), MUC2 (sp1, RTU), caspase-3 (RB-1197, RTU), β -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU). Використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з детектуванням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США) [13].

Під час огляду пухлини зі збільшенням $\times 100$ обирали «гарячі ділянки» – частини зони інфільтрації з найбільшою кількістю кластерів пухлинних клітин (бруньки – «купки» від 1 до 4 клітин). Після обрахунку кількості кластерів виконували нормалізацію до $0,78 \text{ мм}^2$. Завершальний етап – визначення категорії брунькування (табл. 1).

За рекомендаціями N. Melling et al., для статистичного аналізу результати забарвлення маркером Ki-67 поділили на три групи (слабка, помірна, висока) за відсотком Ki-67-позитивних пухлинних клітин: низький Ki-67 – 0–10 %, помірний – 10–25 %, високий – 25 % і більше [14].

За рекомендацією Tahany M. Shams et al., імунореактивність маркера caspase-3 оцінювали так: (–) – негативна, без забарвлення або коричневе забарвлення цитоплазми менше ніж 25 % клітин пухлин; (+1) – слабка, коричневе забарвлення цитоплазми у 25–50 % пухлинних клітин; (+2) – помірна, забарвлення цитоплазми 50–75 % пухлинних клітин; (+3) – інтенсивна, забарвлення більш ніж 75 % пухлинних клітин [15]. Для наступного статистичного опрацювання градації (–) та (+1) об'єднали в «low», а градації (+2) і (+3) – у групу «high» [15].

За рекомендаціями Amani Kazem et al., оцінювання β -catenin ґрунтувалося на його розподілі всередині клітини: мембранна експресія (0–1), цитоплазма (0–2) та ядра (0–2). Показник розраховували шляхом додавання балів: сума ядерних балів (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = немає експресії), оцінка цитоплазми (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = немає експресії) та оцінка мембрани (0 = позитивна експресія на мембрані; +1 = негативна мембранна експресія). Отже, «типова експресія» характеризувалась загальним балом 0, показувала лише забарвлення клітинної мембрани, що подібне до такого нормальної слизової оболонки товстої кишки; «каберантна експресія» показувала бали від 1 до загальної оцінки 5 (5 – для пухлин із сильним ядерним забарвленням (+2), дифузним забарвленням цитоплазми (+2) і втраченою клітинною мембраною (+1)) [16].

Для цифрової морфометрії застосували камеру мікроскопа Zeiss Primo Star – AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору збережено в форматі *.jpg, опрацьовано на платформі Fiji з обрахунком кількості кластерів брунькування [17].

Статистичний аналіз здійснили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30); the R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцен-

Таблиця 1. Класифікація ступеня брунькування

Категорія	Нормалізована кількість кластерів	Рівень брунькування
Bd0	0	нульовий
Bd1	1–4	низький
Bd2	5–9	помірний
Bd3	10 і більше	високий

зією GNU General Public License. Достовірність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за допомогою точного тесту Фішера. Відмінність між підгрупами вважали вірогідною при $p < 0,05$ [18].

Результати

Перитуморальне та внутрішньопухлинне брунькування при KPP ретроспективно проаналізували на післяопераційному матеріалі 31 пацієнта з колоректальною аденокарциномою на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином, за рекомендаціями Міжнародної консенсусної конференції з брунькування пухлин (International Tumour Budding Consensus Conference, 2016 р.). У 10 (32,26 %) випадках KPP із 31 виявили цільний запальний інфільтрат, що на межі помірного й високого брунькування викликало сумніви щодо правильності інтерпретації морфологічних об'єктів на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином (рис. 1). Для уточнення стадії брунькування в зразках KPP здійснили імуногістохімічне (ІГХ) дослідження зі специфічними маркерами, що добре відокремлюють пухлинні клітини для наступного комп'ютерного опрацювання зображень: Pan СК 1/3, MUC-2 та β -catenin.

Встановили, що з-поміж цих трьох маркерів найбільшу перевагу мав коктейль з цитокератинів Pan СК 1/3, який показав чітку мембрано-цитоплазматичну реакцію всіх кластерів брунькування (рис. 2). MUC-2 часто давав гранулярний характер забарвлення (dot-like реакції) стромального компонента навколо кластерів, що в разі щільного скупчення клітин ускладнювало інтерпретацію кількості бруньок (рис. 3). Маркер β -catenin, що загалом чітко й інтенсивно забарвлював мембрани пухлинних клітин у залозах і солідних скупченнях KPP, показав тенденцію до зниження експресії в окремих клітинах при брунькуванні (рис. 4). Втрата міжклітинних зв'язків і виникнення активного інвазивного фронту зі зниженням експресії β -catenin роблять цей маркер недоцільним під час аналізу перитуморального брунькування.

Отже, завдяки подвійному контролю (обрахунок кластерів при забарвленні гематоксиліном та еозином (H & E), додаткова перевірка ІГХ-методом із маркером Pan СК 1/3) визначили: KPP із низькою інтенсивністю перитуморального брунькування (Bd0–1) зареєстровано в 7 (22,6 %) випадках, із середньою інтенсивністю (Bd2) – 14 (45,2 %), із високою (Bd3) – 10 (32,2 %).

Зазначимо, що в усіх зразках KPP (100 %) із високим рівнем брунькування (Bd3) та 6 (42,85 %) із 14 випадків із помірним (Bd2) виявили внутрішньопухлинне брунькування різної інтенсивності. Це було зазначено в протоколі дослідження, але не враховано під час статистичного аналізу зв'язків із клініко-морфологічними характеристиками KPP.

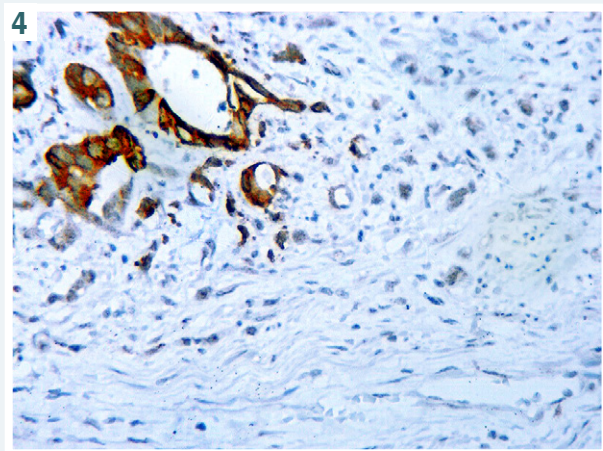
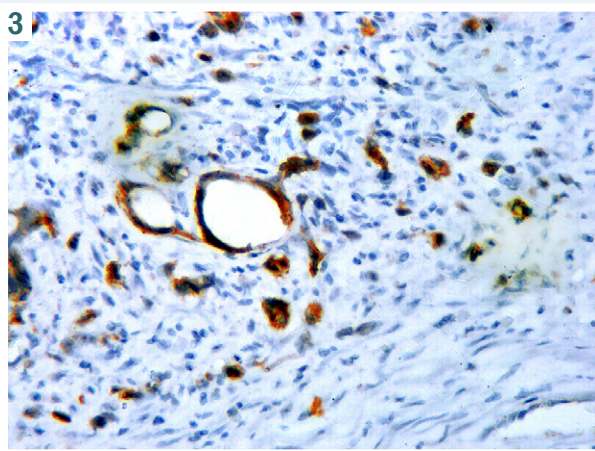
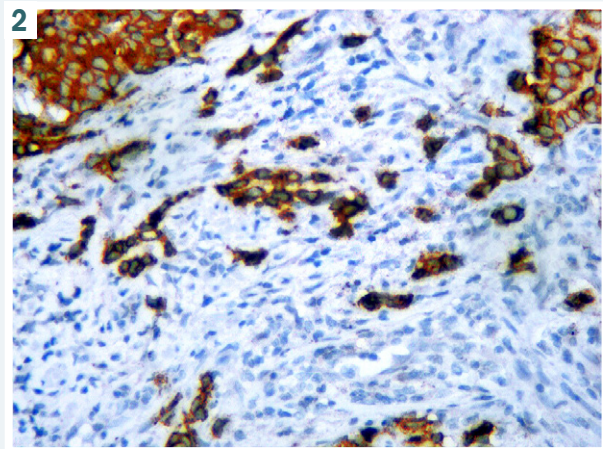
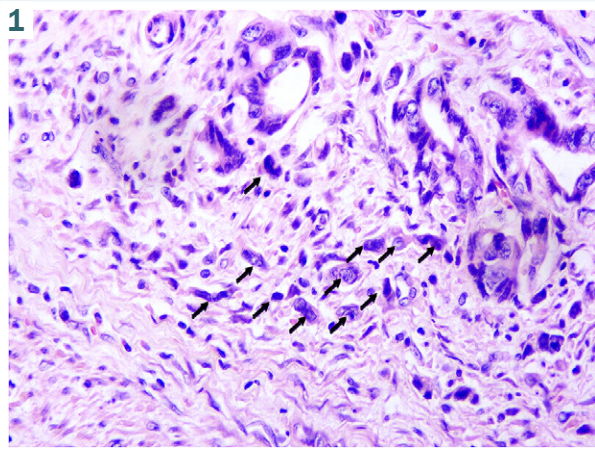


Рис. 1. Аденокарцинома NOS, забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 400$. Випадок брунькування на рівні Bd2–3(?) у «гарячій точці» інвазивного фронту серед запального інфільтрату стромі.

Рис. 2. Аденокарцинома NOS, мембранно-цитоплазматична реакція з маркером Pan CK 1/3, ІГХ-метод із додатковим забарвлення гематоксилином Майєра, $\times 400$. Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

Рис. 3. Аденокарцинома NOS, мембранно-цитоплазматична реакція, зокрема dot-like реакція з маркером MUC-2, ІГХ метод з додатковим забарвлення гематоксилином Маєра ($\times 400$). Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

Рис. 4. Аденокарцинома NOS, сильна мембранна реакція з маркером β -catenin у залозах, що поступово втрачається в кластерах брунькування, ІГХ-метод із додатковим забарвлення гематоксилином Маєра, $\times 400$. Випадок брунькування на рівні Bd3 у «гарячій точці» інвазивного фронту.

Структура за віком і статтю пацієнтів, залучених у дослідження, в цілому відповідала приблизним показникам захворюваності на КРР в Україні: зафіксовано переважання чоловіків в 1,2 раза в вибірці, в 1,3 раза – в Україні (2021–2022 рр.). Середній вік пацієнтів ($62,3 \pm 14,8$ року, середнє \pm SD) відповідав піку захворюваності на КРР (старше за 55 років, часто – діапазон 70–79 років), враховуючи меншу кількість осіб цієї вікової групи, особливо чоловіків. Однак інтенсивність брунькування не показала статистично достовірної залежності від статі та віку пацієнтів із КРР ($p = 0,564$ і $p = 0,111$ відповідно) (табл. 2).

Аналіз розподілу випадків КРР за локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання та наявністю метастазів також не виявив статистично вірогідні відмінності в групах із різним ступенем брунькування ($p = 0,722$, $p = 0,527$, $p = 0,472$ відповідно). Втім, виявили тенденції до значного переважання випадків КРР із

Bd2 і 3 (разом), порівняно з Bd0 і 1 (разом) у лівобічних КРР – 12 проти 2 (85,71 % проти 14,29 %), в низькодиференційованих КРР G3 – 4 проти 0 (табл. 2). Відомості щодо залежності клініко-морфологічних характеристик від стадії брунькування наведено в таблиці 2.

Проаналізували зв'язок експресії деяких маркерів зі стадією брунькування: проліферативну активність за маркером Ki-67, апоптотичну активність за маркером caspase-3, міжклітинну адгезію за маркером β -catenin. Тенденцію до переважання випадків КРР з Bd2 і 3 (разом) порівняно з Bd0 і 1 (разом) встановили в КРР із високою проліферативною активністю, де індекс проліферації становив понад 25 % – 11 проти 0 (100 %), в КРР із низькою експресією маркера caspase-3 – 13 проти 3 (81,25 % проти 18,75 %), але статистично достовірну різницю не встановили ($p > 0,05$). Відомості щодо розподілу наведено в таблиці 3.

Обговорення

На думку багатьох дослідників, брунькування пухлини – потенційно корисний прогностичний біомаркер колоректального раку та інших солідних типів карцином [4,5,6,7]. Пухлинні бруньки зазвичай визначають як ізольовані поодинокі ракові клітини або скупчення до чотирьох неопластичних клітин, розташованих у відділі інвазивного фронту пухлини [5].

Прогностичну цінність брунькування пухлини підтверджено. Так, у публікації Qiao Qu et al., які здійснили метааналіз 1503 пацієнтів із дев'яти ретроспективних когортних досліджень, показано: пацієнти з КРР і високим показником брунькування пухлини мали нижчу виживаність порівняно з випадками низького брунькування КРР ($p < 0,001$) [2]. У нашому дослідженні не виявили зв'язки стадійності брунькування та характеристик, що наведені в таблицях 2, 3. Це може свідчити про незалежність цього прогностичного фактора виживаності або про недоліки дослідження, як-от недостатня вибірка чи некоректність градації брунькування. Звісно, застосування індексів брунькування пухлини в клінічній практиці потребує стандартизованої системи оцінювання, яку треба адаптувати до конкретних типів пухлин і клінічних випадків.

Щодо КРР, то брунькування пухлин часто оцінюють за методом, що ухвалений на Міжнародній консенсусній конференції з брунькування пухлин (International Tumour Budding Consensus Conference) у 2016 році. Метод передбачає застосування напівкількісної шкали оцінювання брунькування: Vd0 – без бруньок; Vd1 – 1–4 бруньки; Vd2 – 5–9 бруньок; Vd3 – ≥ 10 бруньок [5].

За такою системою оцінювання визначили, що брунькування є незалежним предиктором метастатичного ураження лімфатичних вузлів для пацієнтів із КРР pT1 та зниження загальної виживаності пацієнтів із КРР II стадії. Загальна концепція брунькування – «чим більше пухлинних бруньок, тим гірший клінічний результат» [5,6,7].

У зв'язку з певною суб'єктивністю оцінювання брунькування на Міжнародній консенсусній конференції з брунькування пухлин визначено правила для стандартизації висновків щодо КРР:

1. брунькування пухлини розраховують за забарвленням H & E;
2. його оцінюють в одній «гарячій точці» (у полі розміром 0,785 мм²) на інвазивному фронті;
3. рекомендовано використовувати тріривневу систему разом з обрахунком бруньок, щоб полегшити стратифікацію ризику КРР;
4. не поєднувати поняття брунькування пухлини та стадію пухлини [6].

У контексті таких положень постає питання щодо доцільності контрастного відокремлення клітин бруньок від клітин запального інфільтрату або стромальної десмопластичної реакції завдяки імуногістохімічному забарвленню зразків КРР. Дійсно, під час нашого дослідження виникла проблема з визначення градації брунькування в щільному запальному інфільтраті, для чого використано такі імуногістохімічні маркери, як коктейль цитокератинів, ЕМА, β -catenin і муцин 2 типу.

Спільні погляди дослідників щодо застосування H & E та імуногістохімії для оцінювання брунькування

Таблиця 2. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від клініко-морфологічних характеристик, n = 31

Клініко-морфологічна характеристика КРР	n (%)	Категорія брунькування			p
		Vd0–1	Vd2	Vd3	
Чоловіки	17 (54,84)	5	7	5	0,722
Жінки	14 (45,16)	2	7	5	
Вік (роки)					
<50	7 (22,58)	2	3	2	0,397
50–75	18 (58,07)	4	10	4	
>75	6 (19,35)	1	1	4	
Правобічні	17 (54,84)	5	7	5	0,722
Лівобічні	14 (45,16)	2	7	5	
AK NOS	17 (54,84)	4	7	6	p*
Зубчаста АК	5 (16,13)	2	3	0	
Мікропапілярна АК	3 (9,68)	1	0	2	
Медулярна АК	3 (9,68)	0	2	1	
Муцинозна АК	1 (3,23)	0	1	0	
Перснеподібна АК	1 (3,23)	0	1	0	
AK типу adenoma-like	1 (3,23)	0	0	1	
G2	27 (87,10)	7	11	9	0,527
G3	4 (12,90)	0	3	1	
Без метастазів	26 (83,87)	5	13	8	0,472
3 метастазами	5 (16,13)	2	1	2	

p: вірогідність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за точним тестом Фішера; p*: статистичний аналіз даних не здійснили через відсутність зразків у деяких підгрупах.

Таблиця 3. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії імуногістохімічних маркерів, n = 31

Клініко-морфологічна характеристика КРР	n (%)	Категорія брунькування			p
		Vd0–1	Vd2	Vd3	
Ki-67					
<10 %	3 (9,68)	1	2	0	0,114
10–25 %	17 (54,84)	6	6	5	
>25 %	11 (35,48)	0	6	5	
Caspase 3 high	15 (48,39)	4	7	4	0,811
Caspase 3 low	16 (51,61)	3	7	6	
β -catenin high	20 (64,52)	5	10	5	0,620
β -catenin low	11 (35,48)	2	4	5	

p: вірогідність міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом визначали за точним тестом Фішера.

КРР, що видається логічною і збігається з результатами наших спостережень, підсумовано твердженнями:

1. брунькування КРР треба оцінювати за допомогою H & E, коли немає ознак, що обмежують його визначення, наприклад, перитуморальне запалення, нетипова стромальна реакція, фрагментація залоз, тощо;
2. імуногістохімічне забарвлення (як надійніший інструмент візуалізації) треба застосовувати у випадках КРР, коли оцінювання за допомогою рутинного забарвлення H & E обмежене;
3. на імуногістохімічно забарвлених слайдах випадків КРР об'єктивний обрахунок бруньок можна здійснити завдяки цифровому програмному забезпеченню, наприклад на платформі Fiji.

Висновки

1. Якщо кількість бруньок, що визначена стандартизованим методом забарвлення H & E, викликає

сумніви на межі категорій Vd1 і Vd2 або Vd2 і Vd3, можливе заниження ступеня брунькування порівняно з забарвленням імуногістохімічним методом, оскільки виключені хибно інтерпретовані морфологічні об'єкти як кластери пухлини. Найнадійніший імуногістохімічний маркер для контрастного визначення бруньок – коктейль із цитокератинів.

2. Перитуморальне брунькування інвазивного фронту з категорією Vd3 завжди супроводжувалось інтрамуральним брунькуванням різних ступенів інтенсивності.

3. Аналіз розподілу градацій брунькування колоректальних карцином за статтю, віком хворих, локалізацією, гістологічним ступенем диференціювання, наявністю метастазів не показав статистично достовірні відмінності ($p > 0,05$). Це може свідчити про незалежність цього фактора та прогнозу виживаності пацієнтів.

4. Інтенсивність брунькування колоректальних карцином залежно від експресії маркерів Ki-67, caspase-3 та β -catenin не показала вірогідної різниці в підгрупах ($p > 0,05$), але мала тенденцію до збільшення кількості бруньок із підвищенням індексу проліферації та зниженням активності проапоптотичного ензиму caspase-3.

Перспективи подальших досліджень. Продовження вивчення потребують відомості щодо впливу біологічних властивостей колоректальної аденокарциноми на прогноз перебігу неопластичного процесу та визначення оптимальної тактики ведення пацієнтів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 22.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 09.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 28.06.2023

Відомості про авторів:

Шпонька І. С., д-р мед. наук, професор, перший проректор Дніпровського державного медичного університету, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-7561-6489

Пославська О. В., д-р мед. наук, доцент, в. о. зав. каф. патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології, Дніпровський державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-3133-8413

Хархаліс І. К., асистент каф. шкірних та венеричних хвороб, Ужгородський національний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-9487-4785

Шинкаренко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології, Дніпровський державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0002-3428-7949

Information about authors:

Shponka I. S., MD, PhD, DSc, Professor, First Vice-Rector of Dnipro State Medical University, Ukraine.

Poslavskaya O. V., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Acting Head of the Department of Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Pathological Physiology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

Kharkhalis I. K., MD, Assistant of the Department of Skin and Venereal Diseases, Uzhhorod National University, Ukraine.

Shynkarenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Pathological Physiology, Dnipro State Medical University, Ukraine.

References

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Qu, Q., Wu, D., Li, Z., & Yin, H. (2023). Tumor budding and the prognosis of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*, 38(1), 141. <https://doi.org/10.1007/s00384-023-04423-8>
- Lugli, A., Zlobec, I., Berger, M. D., Kirsch, R., & Nagtegaal, I. D. (2021). Tumour budding in solid cancers. *Nature reviews. Clinical oncology*, 18(2), 101-115. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0422-y>
- Ulase, D., Heckl, S., Behrens, H. M., Krüger, S., & Röcken, C. (2020). Prognostic significance of tumour budding assessed in gastric carcinoma according to the criteria of the International Tumour Budding Consensus Conference. *Histopathology*, 76(3), 433-446. <https://doi.org/10.1111/his.13997>
- Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Fléjou, J. F., Hansen, T. P., Hartmann, A., Kakar, S., Langner, C., Nagtegaal, I., Puppa, G., Riddell, R., Ristimäki, A., Sheahan, K., Smyrk, T., Sugihara, K., Terris, B., ... Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumour Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology*, 30(9), 1299-1311. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.46>
- Baidoun, F., Elshiyk, K., Elkeraie, Y., Merjaneh, Z., Khoudari, G., Sarmini, M. T., Gad, M., Al-Husseini, M., & Saad, A. (2021). Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Current drug targets*, 22(9), 998-1009. <https://doi.org/10.2174/1389450121999201117115717>
- Chhikara, B. S., & Parang, K. (2023). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451.
- Mitrovic, B., Handley, K., Assarzagdegan, N., Chang, H. L., Dawson, H. A. E., Grin, A., Hutchins, G. G. A., Magill, L., Quirke, P., Riddell, R. H., Gray, R. G., Kirsch, R., & QUASAR Collaborative Group (2021). Prognostic and Predictive Value of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*, 20(3), 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2021.05.003>
- Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. Y., Horokh, Ye. L., Ryzhov, A. Yu., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2021). Rak v Ukraini, 2019-2020. Zakhvoriuvani, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*, 22. [in Ukrainian]. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/
- Marx, A. H., Mickler, C., Sauter, G., Simon, R., Terracciano, L. M., Izbicki, J. R., & Clauditz, T. S. (2020). High-grade intratumoral tumor budding is a predictor for lymphovascular invasion and adverse outcome in stage II colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*, 35(2), 259-268. <https://doi.org/10.1007/s00384-019-03478-w>
- Zlobec, I., & Lugli, A. (2018). Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation. *Nature reviews. Cancer*, 18(4), 203-204. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.1>
- Varenjuk I. M., & Dzerzhynskiy M. E. (2019). *Metody tsyto-histolohichnoi diahnozistyky* [Methods of cyto-histological diagnosis]. Kyiv: Interservis. [in Ukrainian].
- Nguyen, T. (2022). *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., Izbicki, J. R., & Marx, A. H. (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 69(3), 209-214. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>
- Shams, T. M., Atwa, M. M., & Shams, M. E. (2012). Negative correlation between caspase-3 and COX-2 expression in colon cancer. *Egyptian Journal of Pathology*, 32(1), 68-74. <https://doi.org/10.1097/01.xej.0000417555.65230.8d>
- Kazem, A., Sayed, K. E., & Kern, Y. E. (2014). Prognostic significance of COX-2 and β -catenin in colorectal carcinoma. *Alexandria journal of medicine*, 50(3), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2013.05.007>
- Poslavskaya, O. V. (2015). Metodolohiia vykorystannia prohramnoho zabezpechennia dia analizu tsyfrovoykh mikrofotohrafii na bazi kursu patomorfologii z metoiu pidvyshchennia profesiinoho rivnia studentiv i naukotsiv [The methodology of using software for the analysis of digital photomicrographs based on the course of pathomorphology in order to improve the professional level of students and scientists]. *Morphologia*, 9(3), 122-126. [in Ukrainian].
- Strakhova, O. P., & Androsov, O. I. (2021). *Statystychni metody opratsiuvannia rezul'tativ medyko-biologichnykh doslidzhen* [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv: Karavela. [in Ukrainian].