

УНИВЕРЗИТЕТ „СВЕТИ КИРИЛ И МЕТОДИЈ“

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ

УНИВЕРЗИТЕТСКА КЛИНИКА ЗА ДИГЕСТИВНА ХИРУРГИЈА



**Влијанието на тумор-асоцирачките лимфоцити во прогресијата на  
колоректалниот карцином**

Докторска дисертација

Ас. д-р Ѓорѓи Трајковски

Ментор:

Проф. д-р Владо Јаневски

Скопје, 2019

## Содржина

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| Благодарност.....             | 2   |
| Извадок.....                  | 3   |
| Вовед.....                    | 11  |
| Мотив.....                    | 17  |
| Предмет.....                  | 17  |
| Хипотези.....                 | 18  |
| Цели на докторскиот труд..... | 18  |
| Пациенти и методи.....        | 18  |
| Статистичка анализа.....      | 25  |
| Резултати.....                | 26  |
| Дискусија.....                | 115 |
| Заклучок.....                 | 130 |
| Литература.....               | 133 |

## **Благодарност**

На почетокот би сакал да ја искажам мојата благодарност до менторот, проф. д-р Владо Јаневски, за континуираната поддршка во изработката на оваа научноистражувачка студија. Неговите совети и насоки ми помогнаа во пишувањето на докторската дисертација и сопствениот развој како истражувач, но и како хирург.

Мојата голема благодарност до проф. д-р Весна Јаневска од Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје за нејзината несебична помош, насоки, совети и придонес за ова научно истражување да биде тоа што е.

Благодарност до проф. д-р Бети Зафирова-Ивановска за помошта околу статистичката обработка на податоците и нивно прикажување во графикони и табели.

Благодарност до проф. д-р Лилјана Спасевска и проф. д-р Гордана Петрушевска од Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје за нивните совети и поддршка при изработката на оваа научноистражувачка студија.

Благодарност до колегите од Универзитетската клиника за дигестивна хирургија за нивната помош и учество при изведувањето на хируршките интервенции врз пациентите заболени од колоректален карцином.

Воедно би сакал да се заблагодарам на мојата сопруга и моето семејство за нивната поддршка во текот на целиот процес на изведување и пишување на оваа докторска дисертација и воопшто во животот.

## Извадок

**Вовед:** Колоректалниот карцином (КРК) претставува еден од најчестите малигни тумори во западниот свет. Тој претставува една од водечките три неоплазми кај човекот заедно со бронхогениот карцином и карциномот на градата и како причина за смрт се наоѓа на второ место по ракот на белите дробови кај мажите и ракот на дојката кај жените. Во поново време се потенцира улогата на имуниот систем во контролата на туморската прогресија. Сè повеќе студии укажуваат на фактот дека имуниот систем може да ја превенира туморската прогресија во повеќе видови хумани малигни неоплазми, какви што се: малигниот меланом, карциномот на дојка, хепатоцелуларниот карцином, колоректалниот карцином и други.

**Цел** на оваа студија беше да се одреди влијанието на имунолошките клетки - „тумор-асоцирачки лимфоцити” (ТАЛ) во прогресијата на колоректалниот карцином, преку одредување на нивната густина во инвазивниот фронт на КРК и корелација со веќе прифатените прогностички параметри од ТНМ класификацијата на КРК.

**Пациенти и методи:** Во студијата беа вклучени 103 пациенти со КРК оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје, чиј оперативен материјал беше обработен на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. За целите на оваа студија беа анализирани и корелирани демографските и клинички параметри (пол, возраст, локализација на неоплазмата, присуство на далечни метастази) со наодите добиени од морфолошката анализа од Институтот за патологија (градус на неоплазмата, стадиум, Т статус, нодален статус, лимфатична инвазија) и густината на тумор-асоцирачките лимфоцити имунохистохемиски обоени со антителата против CD4, CD8, CD20 и CD68. Густината на ТАЛ беше одредена семиквантитативно, а на ист начин беше одредена и густината на секој поединечен тип на лимфоцити во воспалителниот инфилтрат. Инфилтратот беше одреден во 4 степени како: - (отсутен), + (ниска густина), ++ (умерено изразен), +++ (силно изразен, густ инфилтрат). Беа одреден и бројот на терцијарни лимфоидни фоликули во

инвазивниот фронт на неоплазмата и корелиран со испитуваните параметри. Беше направена корелација на испитуваните типови на лимфоцити и ТЛС меѓусебно.

**Резултати:** Според пол, испитаниците од ова острожување ја сочинуваа 68 (66,02%) машки пациенти и 35 (33,98%) пациенти од женски пол. Пациентите беа на просечна возраст од  $64,57 \pm 11,5$  години; најмладиот пациент имаше 30 години, а најстариот беше на возраст од 97 години. Анализата на локализацијата на неоплазмата на дебелото црево покажа дека во оваа група на пациенти со КРК, ректумот и сигмата беа најчести локализации на неоплазмата (30,09%, односно 28,16%). Во однос на локалната раширеност на примарниот тумор, односно Т статусот, пациентите најчесто имаа неоплазма со Т3 статус (Т стадиум) – 60 (58,25%).

Регионалните лимфни јазли беа зафатени кај 47 (45,63%) пациенти, а далечни метастази имаа 4 (3,88%) пациенти. Лимфатична инвазија беше регистрирана кај 49 (47,57%) пациенти. Во однос на степенот на диференцираност, најголем дел од пациентите имаа тумор со умерен степен на диференцираност - 83 (80,58%). Кај најголем број пациенти, карциномот на дебело црево беше дијагностициран во II и III стадиум - 42 (40,78%) и 44 (42,72%), соодветно.

Густината на ТАЛ сигнификантно се разликуваше во зависност од локалниот раст на туморот ( $p=0,0018$ ), зафатеноста на регионалните лимфни јазли ( $p<0,0001$ ), лимфатичната инвазија ( $p=0,00005$ ) и стадиумот на болеста ( $p<0,0001$ ).

Во инфилтратот од ТАЛ, густината на CD4+, CD8+, CD20+ и CD68+ лимфоцитите сигнификантно се разликуваше во зависност од густината на ТАЛ ( $p=0,003$ ).

Корелација помеѓу густината на ТАЛ и густината на различни типови лимфоцити покажа дека густината на ТАЛ сигнификантно корелираше со густината на CD4+ лимфоцити ( $p=0,0004$ ), со CD8+ лимфоцитите ( $p=0,00007$ ) и CD20+ лимфоцитите ( $p=0,000004$ ) и ТЛС ( $p<0,0001$ ).

Густината на CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцитите и ТЛС сигнификантно зависеше од локалниот раст на болеста, односно од Т статусот на туморот.

Густината на CD8+, CD20+ и ТЛС лимфоцитите беше сигнификантно помала кај пациентите со метастази во регионалните лимфни јазли ( $p=0,024$ ,  $p<0,001$ ) и кај пациенти со повисок стадиум на болеста ( $p=0,0055$ ,  $p= p<0,0001$ ).

Густината на CD20+ лимфоцитите и ТЛС беше сигнификантно помала и кај пациентите со лимфатична инвазија ( $p=0,001$ ,  $p=0,000001$ ).

Густината на ТЛС беше сигнификантно помала и кај пациентите со повисок градус на туморот ( $p=0,028$ ).

Не беше најдена статистички значајна разлика во густината на CD68+ макрофагите во однос на испитуваните параметри.

Густината на ТАЛ негативно, индиректно корелираше со локалниот раст на туморот ( $R=-0,352$ ) и со стадиумот на болеста ( $R=-0,566$ ). Сигнификантна корелација беше потврдена во поврзаноста помеѓу CD4+ и CD8+ лимфоцити ( $p=0,000055$ ), и поврзаноста помеѓу CD4+ и густината на ТАЛ ( $p=0,00041$ ).

Густината на CD8+ лимфоцитите позитивно, директно сигнификантно корелираше со количината на CD68+ лимфоцити ( $R=0,38$ ;  $p=0,000074$ ), со бројот на терцијарни фоликули ( $R=0,545$ ;  $p<0,0001$ ), и со густината на ТАЛ ( $R=0,381$ ;  $p=0,000073$ ). Густината на CD8+ лимфоцити негативно, индиректно корелираше со Т статусот на туморот ( $R=-0,271$ ;  $p=0,0056$ ), и со стадиумот на болеста ( $R=-0,324$ ;  $p=0,00084$ ).

Густината на CD20+ лимфоцитите позитивно, сигнификантно корелираше со густината на CD8+ лимфоцити ( $R=0,367$ ;  $p=0,00013$ ), со бројот на терцијарни лимфоидни структури ( $R=0,574$ ;  $p<0,0001$ ), и со густината на ТАЛ ( $R=0,436$ ;  $p=0,000004$ ). Негативна, односно индиректна статистички сигнификантна корелација се потврди помеѓу густината на CD20+ лимфоцитите со локалниот раст на туморот ( $R= -0,407$ ;  $p=0,00002$ ), со стадиумот на болеста ( $R= -0,564$ ;  $p<0,0001$ ) и со степенот на диференцираност на туморот ( $R= -0,22$ ;  $p=0,025$ ).

Бројот на ТЛС негативно, индиректно корелираше со Т статусот на туморот ( $R = -0,576$ ), со стадиумот на болеста ( $R = -0,635$ ), и со степенот на диференцираност на туморот ( $R = -0,243$ ).

**Заклучок:** Густината на тумор-асоцирачките лимфоцити може да ја предвиди прогресијата на заболувањето кај пациентите со колоректален карцином и може да се користи како прогностички маркер кај пациентите со КРК.

Густината на тумор-асоцирачките лимфоцити има влијание врз контролата на туморската прогресија.

**Клучни зборови:** колоректален карцином, инфламација, ТАЛ, CD4, CD8, CD20, CD68, терцијарни лимфоидни структури

## Abstract

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors in the Western world. It is one of the three leading neoplasms in both men and women along with bronchogenic carcinoma and breast carcinoma, and it is the second most common cause of death after lung cancer in men and breast cancer in women. Recently, the role of the immune system in the control of tumor progression has been emphasized. Many studies point out the fact that immune system can prevent tumor progression in several types of human malignant neoplasms such as malignant melanoma, breast cancer, hepatocellular carcinoma, colorectal cancer and others.

The **aim** of this study was to determine the role of immunological cells “tumor-associated lymphocytes” (TAL) in progression of colorectal carcinoma by determining their density in the invasive front of CRC and by correlating it with the already accepted prognostic parameters of the TNM classification of CRC.

**Patients and methods:** The study included 103 patients with CRC, who underwent surgery at the University Clinic of Digestive Surgery and whose operative material was analyzed at the Institute of Pathology, Faculty of Medicine in Skopje. For the aims of the study demographic and clinical parameters (sex, age, neoplasm localization, presence of distant metastasis) were analyzed and correlated with the findings obtained from the morphological analysis at the Institute of Pathology (grade of the neoplasm, disease stage, T status, lymph node status, lymphatic invasion) and the density of tumor-associated lymphocytes immunohistochemically stained with antibodies against CD4, CD8, CD20 и CD68. The density of TAL was determined semiquantitatively as well as the density of each separate type of lymphocytes in the inflammatory infiltrate. The infiltrate was quantified in 4 grades: - (absent), + (low density/scanty), ++ (moderately present/moderate), +++(abundant, thick infiltrate). The number of tertiary lymphoid follicles in the invasive front of the neoplasm was also determined and it was correlated with the examined parameters. Correlation between the examined types of lymphocytes and TLS was also made.



**Results:**The study comprised 68 (66.02%) male patients and 35 (33.98%) female patients. Their mean age was  $64.57 \pm 11.5$  years; the youngest patient was 30 years old and the oldest 97 years. The analysis of the localization of the neoplasm in the colon showed that in this group of CRC patients rectum and sigma were the most common sites of the neoplasm (30.09% and 28.16%, respectively). Regarding the local spreading of the primary tumor, that is, T status, the most frequently found neoplasm was of T3 status, found in 60 (58.25%) patients.

Regional lymph nodes were affected in 47 (45.63%) patients, and 4 (3.88%) patients had distant metastasis. Lymphatic invasion was registered in 49 (47.57%) patients. With regard to the grade of differentiation, the largest number of patients had tumor of a moderate grade of differentiation - 83 (80.58%). In the largest number of patients, colon carcinoma was in the II and III stage - 42 (40.78%) and 44 (42.72%), respectively.

The density of TAL was significantly different depending on the local tumor growth ( $p=0.0018$ ), the involvement of the regional lymph nodes ( $p<0.0001$ ), lymphatic invasion ( $p=0.00005$ ) and stage of the disease ( $p<0.0001$ ).

In the TAL infiltrate, the density of CD4+, CD8+, CD20+ and CD68+ lymphocytes was significantly different depending on the density of TAL ( $p=0.003$ ).

The correlation between density of TAL and density of different types of lymphocytes showed that density of TAL was in a significant correlation with density of CD4+ lymphocytes ( $p=0.0004$ ), with CD8+ lymphocytes ( $p=0.00007$ ), with CD20+ lymphocytes ( $p=0.000004$ ) and TLS ( $p<0.0001$ ).

The density of CD4+, CD8+ and CD20+ lymphocytes and TLS significantly depended on the local growth of the disease, that is, on tumor T status.

The density of CD8+, CD20+ and TLS lymphocytes was significantly lower in patients with metastasis in regional lymph nodes ( $p=0.024$ ,  $p<0.001$ ) and in patients with higher disease stage ( $p=0.0055$ ,  $p= p<0.0001$ ).

The density of CD20+ and TLS was also significantly lower in patients with lymphatic invasion ( $p=0.001$ ,  $p=0.000001$ ).

The density of TLS was significantly lower in patients with higher tumor grade ( $p=0.028$ ).

No statistically significant difference in the density of CD68+ macrophages and examined parameters was found.

The density of TAL was in a negative, indirect correlation with the local tumor growth ( $R= -0.352$ ) and stage of the disease ( $R= -0.566$ ). A significant correlation was confirmed between CD4+ and CD8+ lymphocytes ( $p=0.000055$ ), and between CD4+ and the density of TAL ( $p=0.00041$ ).

The density of CD8+ lymphocytes was in a positive, direct significant correlation with the quantity of CD68+ lymphocytes ( $R=0.38$ ;  $p=0.000074$ ), with the number of tertiary follicles ( $R=0.545$ ;  $p<0.0001$ ), and with the density of TAL ( $R=0.381$ ;  $p=0.000073$ ). The density of CD8+ lymphocytes was in a negative, indirect correlation with the T status of the tumor ( $R= -0.271$ ;  $p=0.0056$ ), and with the disease stage ( $R= -0.324$ ;  $p=0.00084$ ).

The density of CD20+ lymphocytes was in a significant negative correlation with the density of CD8+ lymphocytes ( $R=0.367$ ;  $p=0.00013$ ), with the number of tertiary lymphoid structures ( $R=0.574$ ;  $p<0.0001$ ), and with the density of TAL ( $R=0.436$ ;  $p=0.000004$ ). A negative, indirect statistically significant correlation was confirmed between the density of CD20+ lymphocytes and the local tumor growth ( $R= -0.407$ ;  $p=0.00002$ ), with the stage of the disease ( $R= -0.564$ ;  $p<0.0001$ ) and with the grade of tumor differentiation ( $R= -0.22$ ;  $p=0.025$ ).

The number of TLS was in a negative, indirect correlation with the T status of the tumor ( $R= -0.576$ ), with the stage of the disease ( $R= -0.635$ ), and with the grade of tumor differentiation ( $R= -0.243$ ).

**Conclusion:** The density of tumor-associated lymphocytes can predict disease progression in patients with colorectal carcinoma and can be used as a prognostic marker in CRC patients.

The density of tumor-associated lymphocytes has an influence on the control of tumor progression.

**Keywords:** colorectal carcinoma, inflammation, TAL, CD4, CD8, CD20, CD68, tertiary lymphoid structures

## ВОВЕД

### 1.1 Епидемиологија

Колоректалниот карцином (КРК) претставува еден од најчестите малигни тумори во западниот свет и според GLOBOCAN претставува една од водечките три неоплазми кај човекот со 1.650.000 нови случаи и 835.000 смртни исходи во 2015 година (1). КРК заедно со бронхогениот карцином и карциномот на дојката се наоѓа на второ место како причина за смрт по ракот на белите дробови кај мажите и ракот на дојката кај жените (1,2). Инциденцијата на КРК во светот покажува географски варијации, со највисоко проценета стапка во Океанија, Австралија, Нов Зеланд, Европа и Северна Америка и најниска во Западна Африка. За разлика од претходниот период, кога инциденцијата на КРК била пониска во високоразвиените земји и повисока во неразвиените земји и земјите во развој (2,3), во последните децении сè повеќе случаи се јавуваат и во поразвиените региони на светот, како што се Шпанија, Источна Европа и Источна Азија (4,5). Инциденцијата и морталитетот во Северна Америка се во благ, но постојан пад, со околу 50.000 смртни случаи годишно (6).

Во Република Македонија во 2012 година инциденцијата изнесувала 366 случаи, со 239 смртни случаи, а според Светската здравствена организација (СЗО) во 2017 година смртта од ракот на дебелото црево достигнала бројка од 476 пациенти, односно 2,53% од вкупниот број умрени. Според тоа, Република Македонија е класифицирана како земја со умерено висока инциденција и смртност, а КРК претставува трет по честота тумор, кај двата пола и втора причина за смрт во земјата (7,8).

Се смета дека географските разлики во инциденцијата на КРК се должат на разликите во диететскиот режим и изложеноста на надворешни фактори, здружени со одредена генетска чувствителност. Зголемениот ризик од појава на КРК е здружен со нискиот социоекономски статус, одреден тип на животен стил, физичка неактивност, пушење и обезност. Недостатокот на соодветен скрининг за

КРК придонесува за повисока инциденција на КРК во регионите со низок социоекономски статус (9,10).

## **1.2 Фактори на ризик**

Факторите на ризик за појава на КРК се генетски или се фактори од околината. Поголемиот број колоректални карциноми се спорадични, но наследната осетливост драстично го зголемува ризикот (11).

Возраста е најголем ризик-фактор за спорадичниот КРК. КРК ретко се јавува на возраст под 40 години; инциденцијата нагло и значајно се зголемува помеѓу 40-тата и 50-тата година, а потоа продолжува да расте во секоја следна декада. Сепак, во последно време се јавуваат податоци кои укажуваат на тоа дека КРК сè почесто се јавува и кај помлади од 50 години, што се смета дека се должи на наследните синдроми (12,13).

Хередитарните синдроми, специфични генетски нарушувања, од кои повеќето се автозомно доминантни, се здружени со многу висок ризик за појава на КРК. Фамилијарната аденоматозна полипоза (FAP), и Lynch синдромот (хередитарен неполипозен колоничен канцер (HNPCC)) се најчестите фамилијарни синдроми на КРК.

FAP, Гарднеровиот, Туркот синдромот и ослабената фамилијарна аденоматозна полипоза (AFAP) опфаќаат околу 1% од КРК.

КРК се јавува кај околу 90% од нетретираните пациенти со FAP на возраст од 45 години. FAP настанува поради герминативна мутација (аденоматозна полипоза на колонот) на APC генот, лоциран на хромозомот 5 и се манифестира со бројни аденоматозни полипи на дебелото црево кои стануваат симптоматски околу 16-тата година на пациентите (14).

MAP (MUTYH-associated polyposis) претставува автозомно рецесивен синдром, кој настанува заради герминативна мутација на двата алела на mutY homolog генот. MAP се манифестира со појава на аденоматозни полипи во дебелото црево и е здружен со појава на КРК (11).

Lynch синдромот или HNPCC претставува автозомно доминантен синдром, кој опфаќа фамилии со дефицит на еден од гените за поправка на ДНК (MMR гени), како што се hMLH1, hMSH6, hPMS2. Пациентите со Lynch синдром имаат герминативна мутација на еден алел на некој од гените за поправка на ДНА и дополнителна соматска мутација за инактивација на вториот алел. КРК кај пациентите со Lynch синдром се јавуваат на десниот колон на околу 48-годишна возраст. Кај пациентите со Lynch синдром вообичаено се јавуваат синхрони колонични или екстраколонични неоплазми, како што се рак на желудникот, рак на тенко црево, на овариум, дојка, простата, бубрег, уретер, мозок и други. Lynch синдромот е здружен со околу 3% од сите КРК (11,15,16).

Зголемен ризик за појава на КРК имаат и пациентите со претходна фамилијарна или лична историја на спорадичен КРК и пациентите со наод на аденоматозни полипи > 1 cm и полипи со хистолошки вилозна и тубуловилозна градба. Ризикот за појава на КРК е зголемен и кај пациентите коишто имаат аденоми со висок степен на дисплазија (17,18).

Инфламаторните цревни болести, исто така, претставуваат фактор на ризик за појава на КРК. Улцеративниот колитис е здружен со појава на КРК, при што појавата на КРК е во позитивна релација со должината и активноста на болеста. Ризикот за појава на КРК кај пациентите со улцеративен колитис се јавува 8-10 години од поставувањето на дијагнозата. Проценетата инциденција на КРК кај пациентите со улцеративен колитис изнесува 0,5% годишно за пациенти со болест која трае 10-20 години. Кај улцеративен панколитис се смета дека ризикот е зголемен за 5-15 пати, додека ризикот кај пациентите со улцеративен проктитис и проктосигмоидитис не е значително поголем во однос на општата популација. Кај пациентите со улцеративен панколитис со активна инфламација, можноста за појава на КРК достигнува 30% во четвртата декада од болеста (11,19,20).

Се смета дека и Кроновата болест е поврзана со ризик за појава на КРК и тој е сличен или понизок во споредба со ризикот којшто го имаат пациентите со улцеративен колитис (11,12). Податоците во врска со ризикот за појава на КРК кај пациентите со Кронова болест се оскудни, но во мета анализа спроведена во 2006

година од страна на Canavan C. и соработниците, било утврдено дека ризикот за појава на КРК и рак на тенкото црево е сигнификантно покачен кај пациентите со Кронава болест и дека кумулативниот ризик од КРК изнесува 2,9% по период од 10 години од поставувањето на дијагнозата (21).

Како позначајни фактори на ризик за појава на КРК се сметаат и: расата и полот, при што се наведува дека појавата и смртноста од КРК е значајно повисока кај Афроамериканците во споредба со белите Американци и дека смртноста е значително почеста кај мажите отколку кај жените; абдоминалната ирадијација кај возрасните пациенти кои се третирани со абдоминална радиотерапија во детството заради малигна болест; пациентите со цистична фиброза и акромегалија и пациентите со бубрежна трансплантација.

Фактори кои се поврзани со понизок ризик за појава на рак се: обезност, дијабет и инсулинска резистенција, долготрајна консумација на црвено и процесирано месо (процесираното месо го зголемува ризикот за појава на КРК за 18% при употреба на 50 гр процесирано месо дневно), пушење, консумација на алкохол (7% покачен ризик за 10 гр етанол дневно), терапија за депривација на андроген, холецистектомија, присуство на коронарна срцева болест, ендометријален карцином, некои бактерии и вируси како што се *Helicobacter pylori*, колонизација на дебелото црево со патогени соеви на *E. coli*, инфекција со HPV и други (11).

### **1.3 Туморски маркери**

КРК е најчест тумор на гастроинтестиналниот тракт чија инциденција и морталитет се во постојан пораст и покрај напредокот на хируршките техники и напредокот во дозирањето и планирањето на неoadјувантната и адјувантна хемотерапија (1,2). Тоа го прави КРК предмет на постојано истражување со цел да се предвиди стабилноста или прогресијата на болеста, а секако и исходот кај пациентите со колоректален карцином. Одредувањето на прогнозата на пациентите со КРК доминантно се базира врз стадиумот на болеста, односно локалната раширеност на болеста, присуството или отсуство на метастази во регионалните лимфни јазли и присуството или отсуство на далечни метастази

(2,3,25), како и врз други фактори како што се: позитивната хируршка маргина, лимфоваскуларната инвазија, туморскиот градус, туморското пупење и цревна опструкција, параметри кои се вброени во клиничко-патолошките предиктори (22-25).

Ракот во организмот се јавува кога ќе се промени дезоксирибонуклеинската (ДНК) секвенца во гените, така што генот нема да биде во состојба да ја инструктира клетката во којашто се наоѓа, да создаде нормален протеин кој тој ген го енкодира. Клетките кои содржат мутирани гени ја губат контролата на раст (26). КРК е хетерогена болест која се карактеризира со отклонување во повеќе молекуларни патишта, настанато во тек на неговиот еволутивен процес (27). Во почетокот КРК е индолентна болест која станува симптоматска кога ќе прогредира во напреднат стадиум. Кај КРК се најдени бројни генетски мутации, кои покажуваат различни стапки на мутации кај пациентите со КРК, па дури и кај различна локализација на КРК во десниот или левиот колон. Најчестите мутации детектирани кај КРК ги опфаќаат мутациите на APC, KRAS, NRAS, BRAF V600E, TP53, ERBB2, EGFR, POLE, POLD1, MMR и други. Со појавата на молекуларното профилирање и генетската експресија на КРК, колоректалниот карцином е поделен во 4 молекуларни поттипови поради потребата, индикацијата и имплементацијата на персонализирана терапија според генетскиот потпис на туморот (27).

Појавата на генски биомаркери како што се APC, KRAS, DCC, p53, BRAF, TGF- $\beta$ , CIMP и бројни други во комбинација со клиничко-патолошките карактеристики на неопазмата е утврдено дека даваат повеќе информации за текот на болеста. Сознанијата, пак, дека пациенти со одредени мутации, на пример KRAS, не реагираат на третманот со моноклонални антитела при присутна метастатска болест, претставуваат база за нови обиди за окривање параметри кои би послужиле како основа за пронаоѓање нови терапии со можност за персонализиран пристап кон пациентите. Ваквите терапии се базираат на изучувањето на сложените процеси на регулација на клеточната пролиферација



во присуство на бројни мутирани гени на клетката кои ја контролираат делбата и состојбата на мирување на клетките (28-31).

#### **1.4 Имунолошкиот систем и контрола на туморската прогресија**

Во поново време се потенцира улогата на имуниот систем во контролата на туморската прогресија (32-37).

Уште Рудолф Вирхов пред 150 години опишал инфилтрати од леукоцити во тумори и поставил хипотеза дека неоплазмите се јавуваат на место на хронично воспаление. Подоцна е утврдена поврзаноста на хроничното воспаление со одредени типови на карциноми какви што се: карциномот на желудник поврзан со хронично воспаление поради присуство на *Helicobacter pylori*, карциномот на црниот дроб поврзан со хепатитис Б и Ц инфекциите и карциномот на грлото на матката предизвикан од присуство на HPV. Утврдено е и дека ризикот за појава на КРК е зголемен кај болни од инфламаторна цревна болест, улцеративен колитис и Кронава болест, како што погоре е веќе кажано (32).

Постојано се зголемуваат соопштенијата за силното влијание на воспалителниот инфилтрат, односно „тумор-асоцирачките лимфоцити“ (ТАЛ), наречени и тумор-инфилтрирачки лимфоцити (ТИЛ), кај малигните солидни тумори. Покрај сознанијата дека хроничното воспаление е вклучено во појавата на неоплазмите, многу клинички и експериментални показатели ја разоткриваат протективната улога на имуните клетки во однос на канцерската прогресија. Идејата дека имунолошкиот систем ги препознава неоплазмите потекнува од Paul Ehrlich и е поддржана од Lewis Thomas и Macfarlane Burnet, за да се претвори во концепт во кој се смета дека имуните клетки се способни за елиминирање на канцерските и да се преточи во теорија за имунолошки надзор -“immune surveillance”, во која се поддржува тезата дека имунолошкиот систем врши надзор над новопојавените канцерски клетки и може да ги уништи (26). Зголемената инциденција на малигни неоплазми кај имунокомпромитирани лица оди во прилог на оваа теорија, но појавата на тумори кај имунокомпетентни лица укажува на тоа дека имунолошкиот надзор е несоодветен и дека туморите може да ја избегнат туморската контрола.

Сепак, сè повеќе студии укажуваат на фактот дека имуниот систем може да ја превенира туморската прогресија во повеќе видови хумани малигни неоплазми какви што се: малигниот меланом, карциномот на дојка, хепатоцелуларниот карцином, колоректалниот карцином и други. Високата густина на помнечки Т лимфоцити и цитотоксични Т лимфоцити, како и пониската густина на инфилтрирачки макрофаги корелираат со подолго преживување на пациентите (32-38). Се смета и дека терцијарните лимфоидни структури присутни во тумор-здружената строма играат улога во одбраната на домаќинот од туморската прогресија (34).

Ваквите литературни податоци се основа за понатамошни истражувања за потврдување на улогата на имуниот систем во прогресијата на неоплазмите, како и за понатамошни истражувања во областа на терапијата со персонализиран пристап.

## **2. МОТИВ**

Мотив за изработка на оваа студија претставува постојаната експанзија на карциномите на дигестивниот тракт, посебно на дебелото црево и високата стапка на морталитет кај пациентите заболени од КРК. Поновите сознанија за влијанието на имуниот одговор врз тежината на болеста и нејзината прогноза претставуваат истражувачки предизвик како придонес во базичните познавања на прогресијата на малигните тумори, што, пак, може да претставува добра основа за развој на нови терапевтски модалитети.

## **3. ПРЕДМЕТ**

Предмет на истражувањето беше да се испита влијанието на тумор-асоцирачките/инфилтрирачки лимфоцити врз прогресијата на колоректалниот карцином, преку одредување на густината на лимфоцитниот инфилтрат во инвазивниот фронт на неоплазмата и да се спореди густината на ТАЛ со елементите од TNM класификацијата (локален раст, нодални метастази), стадиумот, степенот на диференцираност на туморот и лимфатичната инвазија на туморот.

## **4. ХИПОТЕЗИ**

Тумор-асоцирачките Т лимфоцити имаат влијание врз прогресијата на неоплазмата и нивното количество во вид на клеточен инфилтрат во предел на инвазивниот фронт на неоплазмата е здружено со поповолни клинички и морфолошки параметри кај пациентите со КРК.

Формирањето на терцијарни лимфоидни структури (фоликули) (ТЛС) во инвазивниот фронт на неоплазмата е здружено со поповолни параметри за преживување на пациентите.

## **5. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКИОТ ТРУД**

1. Да се одреди стадиумот на болеста.
2. Да се одреди семиквантитативно густината на CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцити и CD68+ макрофаги во инвазивниот фронт на неоплазмата.
3. Да се одреди густината на терцијарни лимфоидни структури во инвазивниот фронт на неоплазмата.
4. Да се корелираат количеството на CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцити и CD68+ макрофаги со градусот на карциномот, проширеноста на локалниот раст (Т статус), присуството на метастази во регионалните лимфни јазли (N статус), лимфатичната инвазија на неоплазмата, стадиумот на болеста.
5. Да се направи корелација помеѓу густината на CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцити CD68+ макрофаги и терцијарните лимфоидни структури со ТАЛ и помеѓу себе.

## **6. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ**

### **6.1 Пациенти**

Во студијата беа вклучени 103 пациенти со КРК оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје, чиј оперативен материјал беше обработен на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Студијата беше ретроспективно-проспективна. Ретроспективно беа обработени 60

пациенти, при што се користеа нивната историја на болеста од Универзитетската клиника за дигестивна хирургија и архивските парафински блокови, хистопатолошки препарати и хистопатолошки наоди од Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. За дополнителните имунохистохемиски боења беа направени дополнителни пресеци од постојните парафински калапи од неоплазмата на пациентите.

## **6.2 Методи**

Кај сите пациенти со КРК оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија беше спроведена сликовна дијагностичка процедура (КТ на абдомен и мала карлица), колоноскопија со биопсија и предоперативна подготовка. Кај сите пациенти беше спроведена стандардна оперативна процедура со минимум извадени 12 лимфни јазли, според локализацијата на туморот, што ги исполнува критериумите за одредување на стадиумот на болеста.

За карциномите на цекум, асцендентниот колон и дел од трансверзалниот колон се направи десна хемиколектомија, или проширена десна хемиколектомија, која опфаќа дел од терминалниот илеум, цекум, асцендентниот колон и десна флексура со дел од трансверзалниот колон.

За карциномите на левиот колон и ректум се направи операција според локализацијата на неоплазмата, и тоа: ампутација на ректум, ресекција на ректосигмоидниот колон или лева хемиколектомија.

Во постоперативниот период кај пациентите беше спроведена супституциона терапија со електролитни раствори, корекција на електролитен дефицит, корекција на анемија со трансфузија на крв, корекција на хипопротеинемија со давање плазма или албумин. Кај сите пациенти беше спроведена профилакса за тромбоза и контролирана аналгезија за контрола на постоперативната болка и кај сите пациенти беше спроведен постоперативен диететски режим.

### **6.2.1 Клинички параметри**

За целите на оваа студија клинички беа обработени следните параметри:

1. Пол
2. Возраст
3. Локализација на неоплазмата
4. Присуство на далечни метастази (со помош на сликовни дијагностики или интраоперативно).

### **6.2.2 Хистопатолошки параметри**

Од патохистолошките извештаи беа преземени:

1. Типот и степенот на диференцијација (G-градус)
2. T, N и M параметарот од pTNM класификацијата (AJCC 2010)
3. Стадиумот на болеста (патолошки, контролиран со клиничкиот во однос на далечни метастази)
4. Дополнително се одреди инфилтративниот фронт на неоплазмата и беа направени имунохистохемиски боења на тумор-асоцирачките лимфоцити со CD4, CD8, CD20, CD68 антитела.

### **6.2.3 Имунохистохемиски боења**

Дополнителните имунохистохемиски боења беа изведени со стандардна процедура користена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје, со користење на Immunoperoxidase LSAB + system и специфични примарни моноклонални антитела против:

1. CD4 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12
2. CD8 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B
3. CD20 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD20, Clone L26
4. CD68 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1
5. CD21 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD21, Clone 1F8, за детектирање на дендритичните клетки во терцијарните лимфоидни фоликули.

Густината на присутни лимфоцитни клетки во инфилтративниот фронт на карциномот за секој маркер поединечно беше одредувана семиквантитативно, и тоа:

А) 0 ако во инфилтративниот фронт на неоплазмата беа најдени ретки клетки (на 10 последователни видни полиња);

Б) + ако во инфилтративниот фронт беше најден лесно изразен лимфоцитен инфилтрат (тенки нишки или ретки насобири);

В) ++ ако во инфилтративниот фронт беше најден умерено изразен лимфоцитен инфилтрат (лента од воспалителни клетки во инвазивниот фронт или чести прескокнувачки насобири);

Г) +++ ако во инфилтративниот фронт беше најден обилан лимфоцитен инфилтрат (дебел слој на воспалителни клетки во предел на инвазивниот фронт).

Беше детектирано и присуство на терцијарни лимфни структури (фоликули) кои беа поединечно изброени и во анализата на имунолошкиот одговор како параметар беше користен нивниот вкупен број кај секој поединечен случај. При тоа, терцијарните лимфни структури беа квантифицирани како:

А) 0 ако во инфилтративниот фронт на неоплазмата не беа најдени терцијарни структури;

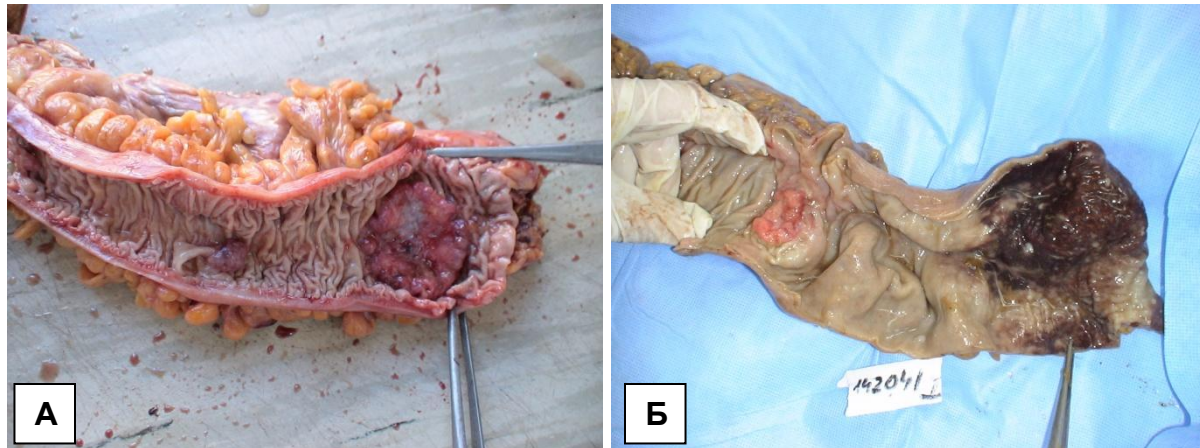
Б) + ако во инфилтративниот фронт на неоплазмата беа најдени 1-5 терцијарни структури;

В) ++ ако во инфилтративниот фронт на неоплазмата беа најдени 5-10 терцијарни структури;

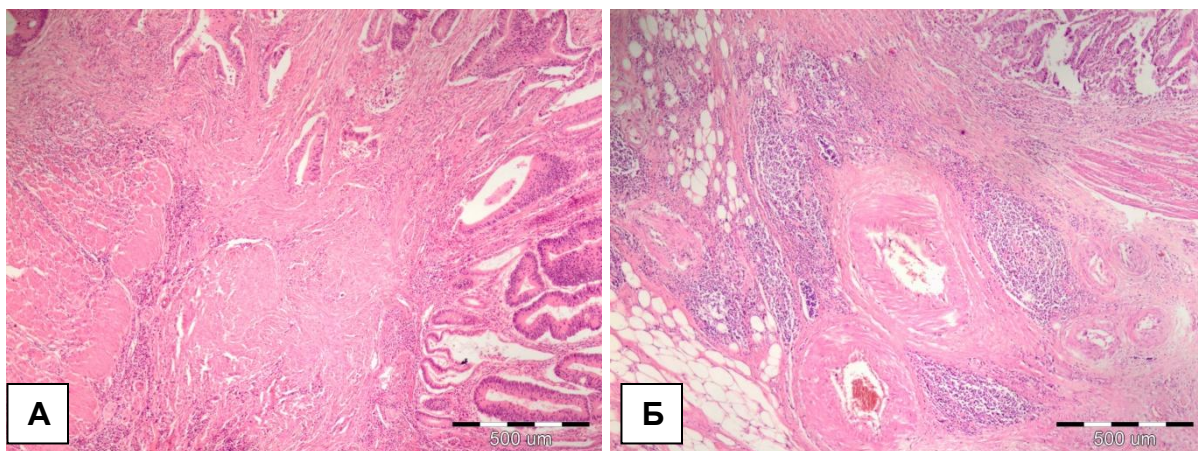
Г)+++ ако во инфилтративниот фронт на неоплазмата беа најдени над 10 терцијарни структури.

Туморите кај кои преобладаше гнојна воспалителна реакција во стромата на неоплазмата беа исклучени од студијата, со цел да се анализираат ТАЛ.

Добиените податоци статистички беа обработени при што се корелираа густината на обоените (со маркер) клетки со сите горенаведени клинички и морфолошки параметри.

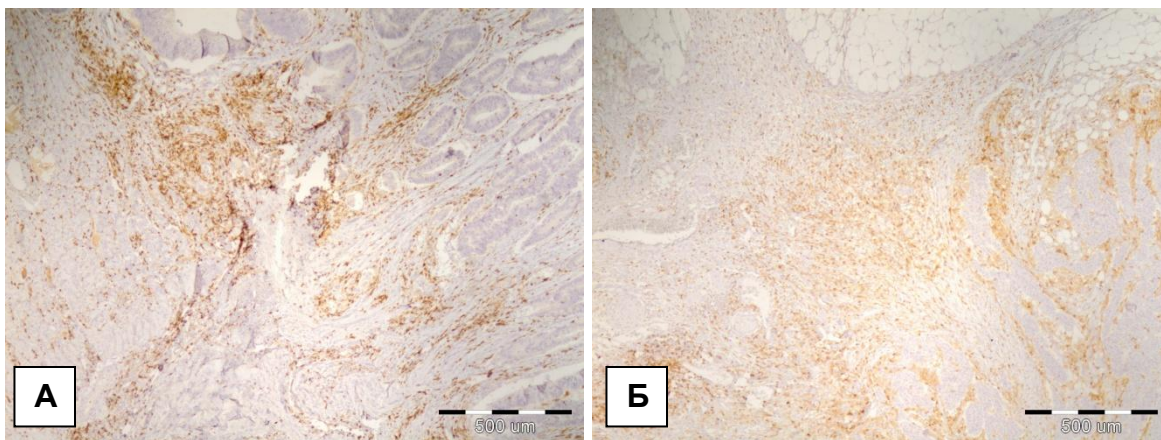


Слика1. Макроскопски приказ на колоничен карцином. а) Десно се наоѓа голем егзофитичен карцином, а лево од него на оддалеченост од неколку цм се наоѓа солитарен полип. б) Централно во луменот на цревото се наоѓа мал егзофитичен карцином, за кој индиректно може да се заклучи дека го стенозира луменот, затоа што луменот на цревото над него е дилатиран, мукозата израмнета, а на десната страна се наоѓа и голема хеморагична зона

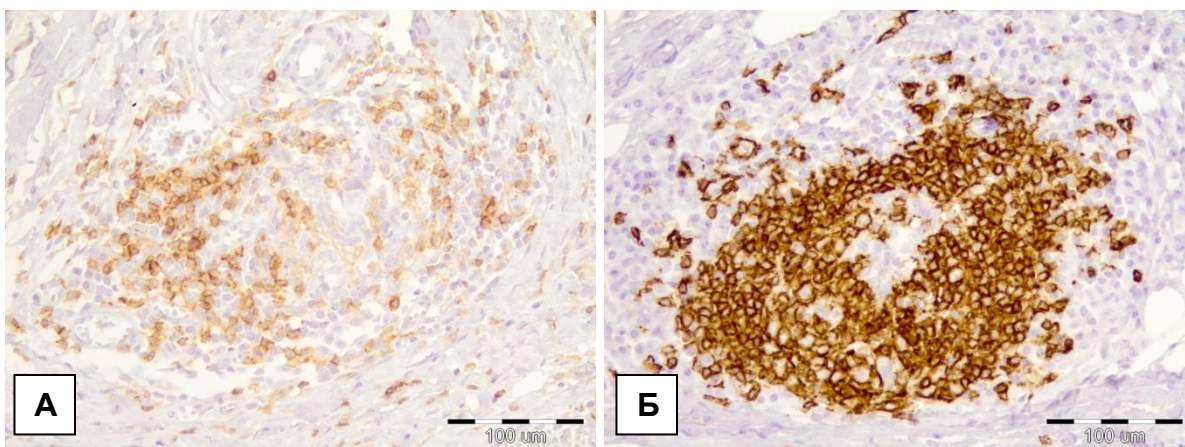


Слика 2. а) Оскудна (+) лимфоцитна инфилтрација во инвазивниот фронт на неоплазмата (HE. 10 x 4) б) Обилна (+++) лимфоцитна инфилтрација во инвазивниот фронт на неоплазмата (HE 10 x 4)

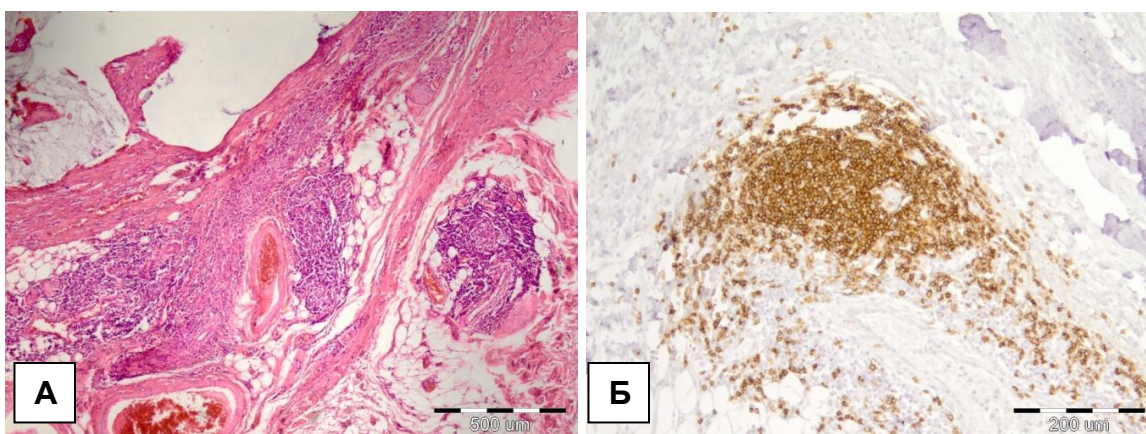




Слика 3. а) Умерена (++) CD4+ лимфоцитна инфилтрација/густина (10 x 4) б) Обилна (+++) CD4+ лимфоцитна инфилтрација (10 x 4)

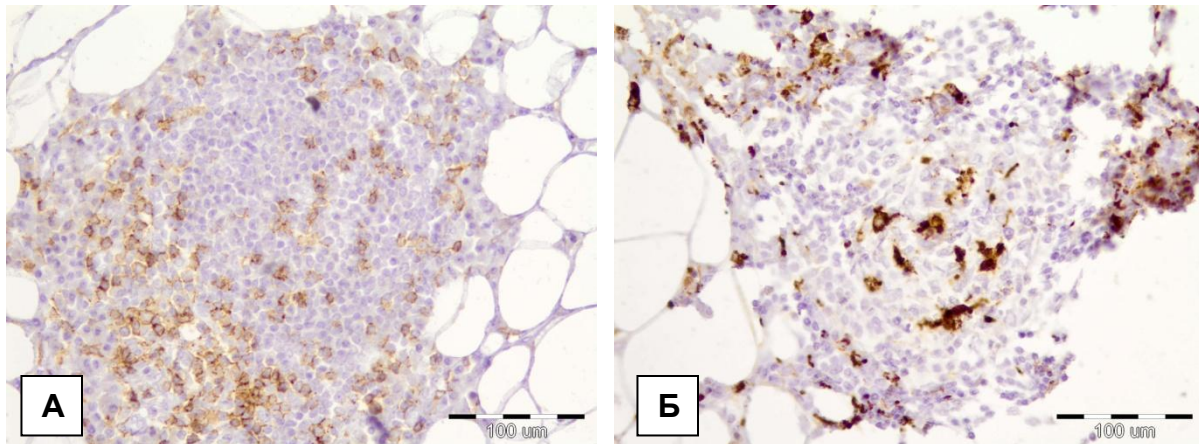


Слика 4. а) Поголемо зголемување за приказ на CD4+ клетки (10 x 20). б) Исто зголемување (поголемо) за приказ на CD20+ клетки во инвазивниот фронт на КРК кои формираат ТЛС (10 x 20).

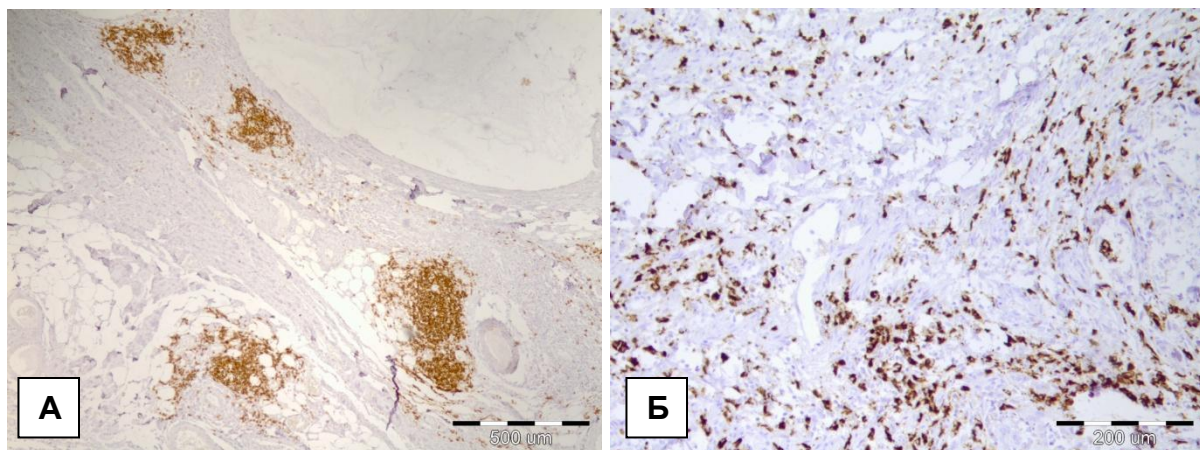




Слика 5. ТЛС во инвазивниот фронт на КРК а) Добро формирана ТЛС во инвазивниот фронт на неоплазмата на десната страна на микрофотографијата (10 x 4). б) Истата ТЛС прикажана со имунобоење со антителото против CD 20+. Клетките околу венулата се CD20+ (10 x10).



Слика 6. Микрофотографии на ТЛС. а) CD4+ Т лимфоцити на периферијата на лимфниот фоликул (10 x 20). б) CD21+ дендритични клетки во центарот на Б зоната (10 x 20)



Слика 7. а) CD20+ зони на ТЛС (10 x 4) б) Дифузно распространети CD68 + клетки со густина ++ (10 x4)

### 6.3 Статистичка анализа

Сите податоци од интерес беа статистички обработени со следните статистички методи:

- статистичките серии беа обработени табеларно и графички;
- структурата на нумеричките статистички серии беше анализирана со помош на централна тенденција (просек) и мерките на дисперзија (стандардна девијација);
- анализа на односите помеѓу нумеричките статистички серии беше направена со помош на Pearson-ови коефициент на корелација;
- структурата на атрибутивните статистички серии беше анализирана со помош на односи и пропорции;
- анализа на односите помеѓу атрибутивните статистички серии беше направена со помош на Pearson-овиот  $\chi^2$  тест, а доколку стануваше збор за неправилна дистрибуција со Fisher-овиот exact тест;
- тестирање на значајност на разлики помеѓу две аритметички средини кај зависни примероци (во испитуваните групи) беше направено со Student-ов t-test за зависни примероци, а доколку стануваше збор за неправилна дистрибуција со непараметарскиот Wilcoxon-ов тест на еквивалентни парови.
- тестирање на значајност на разлики помеѓу две аритметички средини кај независните примероци (помеѓу испитуваните групи) беше направено со Student-овиот t-test за независни примероци, а доколку стануваше збор за неправилна дистрибуција со непараметарскиот Mann Whitney U Test;
- тестирањето на значајноста на разликите помеѓу аритметичките средини (помеѓу групите) беше направено со анализа на варијанса (one-way ANOVA), а помеѓу три и повеќе аритметички средини во самата група со Friedman ANOVA.

Статистички значајна разлика се сметаше доколку  $p < 0,05$ . Статистичката обработка на податоците беше реализирана со програмот SPSS 15.

## 7. РЕЗУЛТАТИ

### 7.1 ДЕМОГРАФСКИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ И КАРАКТЕРИСТИКИ НА ТУМОРОТ И БОЛЕСТА

Во ова истражување беа вклучени 68 (66.02%) испитаници од машки пол и 35 (33,98%) испитаници од женски пол. Пациентите беа на просечна возраст од 64,57  $\pm$  11,5 години, најмладиот пациент имаше 30 години, најстариот беше на возраст од 97 години (табела 1).

Табела 1. Полова структура на испитаниците

| варијабла                        | n (%)             |
|----------------------------------|-------------------|
| пол                              |                   |
| мажи                             | 68 (66,02)        |
| жени                             | 35 (33,98)        |
| mean $\pm$ SD (64,57 $\pm$ 11,5) | min-max (30 – 87) |

Анализата на локализацијата на неоплазмата на дебелото црево покажа дека во оваа група на пациенти со КРК, ректумот и сигмоидниот колон беа најчести локализации на неоплазмата (30,09%, односно 28,16%) (табела 2).

Табела 2. Дистрибуција на КРК по локализација

| Варијабла                    | n (%)             |
|------------------------------|-------------------|
| локализација                 |                   |
| <b>coecum</b>                | <b>12 (11,65)</b> |
| <b>colon ascendens</b>       | <b>9 (8,74)</b>   |
| <b>flexurae hepaticae</b>    | <b>3 (2,91)</b>   |
| <b>colon transversum</b>     | <b>5 (4,85)</b>   |
| <b>flexurae lienalis</b>     | <b>3 (2,91)</b>   |
| <b>colon descendens</b>      | <b>3 (2,91)</b>   |
| <b>colon sigmoideum</b>      | <b>29 (28,16)</b> |
| <b>colon rectosigmoideum</b> | <b>8 (7,77)</b>   |
| <b>rectum</b>                | <b>31 (30,09)</b> |

Во табела 3 прикажана е дистрибуцијата на пациентите во однос на Т, N и M параметрите од рТНМ класификацијата, како и дистрибуцијата во однос на стадиумот на болеста, лимфната инвазија и степенот на диференцираност на неоплазмата.

Во однос на локалната раширеност на примарниот тумор, односно Т статусот, пациентите најчесто имаа неоплазма со Т3 статус (Т стадиум) – 60 (58,25%).

Регионалните лимфни јазли беа зафатени кај 47 (45,63%) пациенти, а далечни метастази имаа 6 (3,88%) пациенти. Лимфатична инвазија беше регистрирана кај 49 (47,57%) пациенти. Во однос на степенот на диференцираност, најголем број од пациентите имаа тумор со умерен степен на диференцираност - 83 (80,58%). Кај најголем број пациенти, карциномот на дебело црево беше дијагностициран во II и III стадиум - 42 (40,78%) и 44 (42,72%), соодветно.

Табела 3. Дистрибуција на пациентите според клиничко-патолошките карактеристики

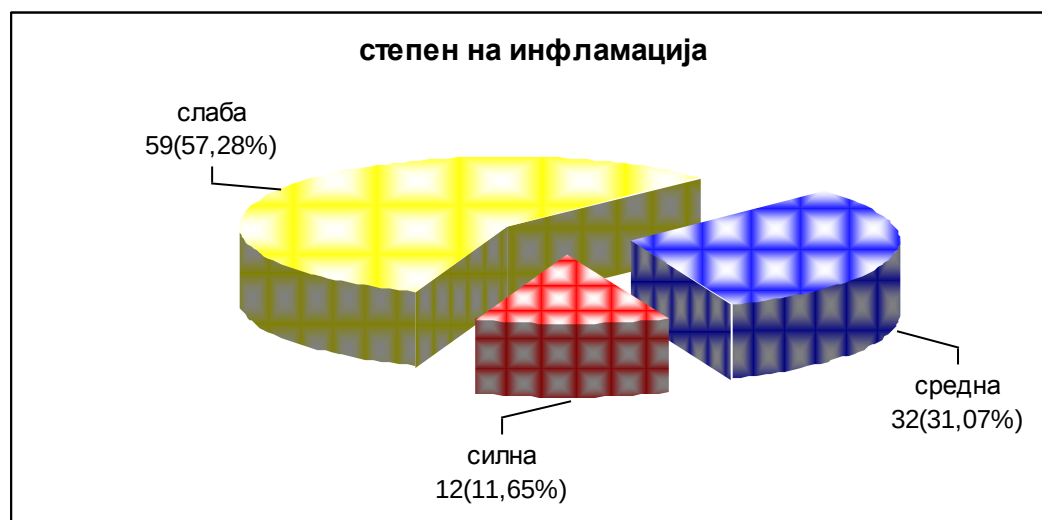
| Варијабла                                          | n (%)      |
|----------------------------------------------------|------------|
| <b>Тумор</b>                                       |            |
| T1                                                 | 5 (4,85)   |
| T2                                                 | 7 (6,79)   |
| T3                                                 | 60 (58,25) |
| T4                                                 | 31 (30,09) |
| <b>N - Зафатеност на регионалните лимфни јазли</b> |            |
| не                                                 | 56 (54,37) |
| да                                                 | 47 (45,63) |
| <b>M - Далечни метастази</b>                       |            |
| не                                                 | 97 (94,17) |
| да                                                 | 6 (5,82)   |
| <b>L - Лимфатична инвазија</b>                     |            |
| нема                                               | 54 (52,43) |
| има                                                | 49 (47,57) |
| <b>Степен на диференцираност на туморот</b>        |            |
| добро                                              | 5 (4,85)   |
| умерено                                            | 83 (80,58) |
| лошо                                               | 15(14,56)  |
| <b>Stage – клинички стадиум</b>                    |            |
| I                                                  | 11 (10,68) |
| II                                                 | 42 (43,68) |

|     |            |
|-----|------------|
| III | 44 (39,80) |
| IV  | 6 (5,83)   |

## 7.2. ГУСТИНА НА ТАЛ

На слика 8 е прикажана дистрибуцијата на густината на ТАЛ (инфламација/воспалителен инфилтрат) во неоплазмите кај пациентите со КРК.

Кај најголем број пациенти беше детектиран оскуден лимфоцитен инфилтрат – 59 (57,28%), а по нив следеа 32 (31,07%) пациенти со умерен инфилтрат, и 12 (11,65%) пациенти со наод на силно изразен лимфоцитен инфилтрат.



Слика 8. Густина на ТАЛ во анализираната серија

### 7.2.1 Локализација

Во табела 4 прикажана е дистрибуцијата на слаба, средна и силно изразена густина на лимфоцитната инфилтрација во зависност од локализацијата на неоплазмата.

Слаб степен на инфилтрација (ниска густина на лимфоцитни клетки) беше детектиран кај сите 3 неоплазми на десцендентниот колон; а низок степен на густина на лимфоцитни клетки беше најдена и кај повеќе од 60% од неоплазмите

на цекум – 8/12 (66,67%), на асцендентниот колон – 6/9 (66,67%), на лиеналната флексура – 2/3 (66,67%) и на ректосигмоидниот дел на колонот – 5/8 (62,5%).

Умерена густина на ТАЛ најчесто беше најдена кај пациентите со локализација на карциномот на хепаталната флексура – 2/3 (66,67%).

Силно изразена инфилтрација не беше регистрирана кај ниту еден пациент со локализација на карциномот на асцендентниот колон, хепаталната флексура, лиеналната флексура и десцендентниот колон (табела 4).

**Табела 4. Дистрибуција на густината на ТАЛ според локализација на туморот**

| Локализација       | Густина на ТАЛ |                 |                  |                 |
|--------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                    | N              | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |
| coecum             | 12             | 8 (66,67)       | 3 (25)           | 1 (8,33)        |
| colon ascendens    | 9              | 6 (66,67)       | 3 (33,33)        | 0               |
| flexurae hepaticae | 3              | 1 (33,33)       | 2 (66,67)        | 0               |
| colon transversum  | 5              | 2 (40)          | 2 (40)           | 1 (20)          |
| flexurae lienalis  | 3              | 2 (66,67)       | 1 (33,33)        | 0               |
| colon descendens   | 3              | 3 (100)         | 0                | 0               |
| colon sigmoideum   | 29             | 17 (58,62)      | 7 (24,14)        | 5 (17,24)       |
| rectosigmoideum    | 8              | 5 (62,5)        | 2 (25)           | 1 (12,5)        |
| rectum             | 31             | 15 (48,39)      | 12 (38,71)       | 4 (12,9)        |

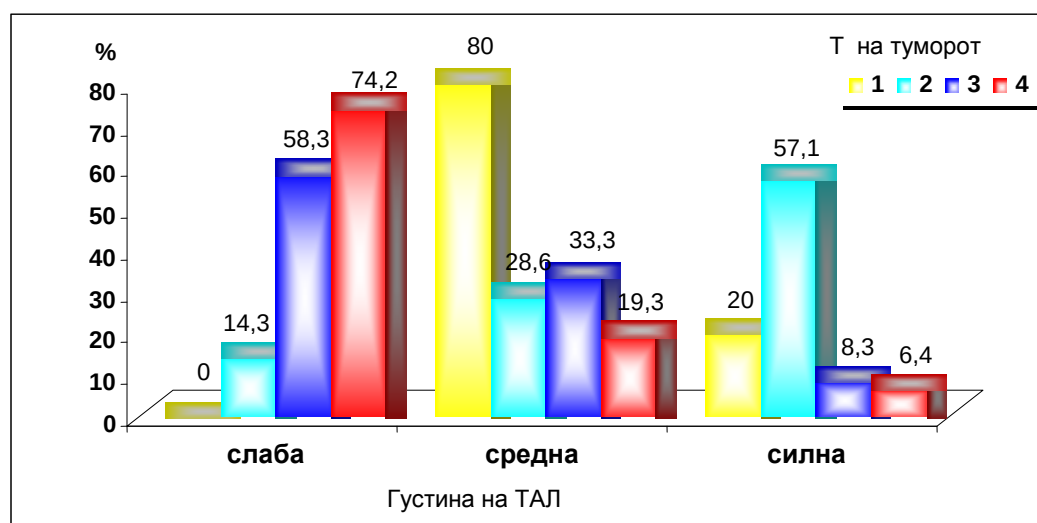
### 7.2.2 Т статус (локален раст на туморот)

Густината на ТАЛ сигнификантно се разликуваше во зависност од локалниот раст на туморот ( $p=0,0018$ ). Помала густина на ТАЛ значајно почесто беше регистрирана кај неоплазмите со повисок Т статус. Од резултатите прикажани во

табела 5 се гледа ниска (слаба) густина на лимфоцитните клетки кај 23/31 (74,19%) неоплазми со Т4, 35/60 (58,33%) неоплазми со Т3, а висока густина, односно силна инфилтрација кај 4/7 (57,14%) неоплазми со Т2 и 1/4 (20%) со Т1 (табела 5, слика 9).

**Табела 5. Густина на ТАЛ според Т статус**

| Т                              | Густина на ТАЛ |            |            |           | p-value            |
|--------------------------------|----------------|------------|------------|-----------|--------------------|
|                                | N              | +          | ++         | +++       |                    |
|                                |                | (слаба)    | (средна)   | (силна)   |                    |
|                                |                | (n=59)     | (n=32)     | (n=12)    |                    |
| T1                             | 5              | 0          | 4 (80)     | 1 (20)    | <b>0,0018**</b>    |
| T2                             | 7              | 1 (14,29)  | 2 (28,57)  | 4 (57,14) |                    |
| T3                             | 60             | 35 (58,33) | 20 (33,33) | 5 (8,33)  |                    |
| T4                             | 31             | 23 (74,19) | 6 (19,35)  | 2 (6,45)  |                    |
| <b>p (Kruskal-Vallis test)</b> |                |            |            |           | <b>**p&lt;0,01</b> |



**Слика 9. Графички приказ на густината на ТАЛ според Т статусот**



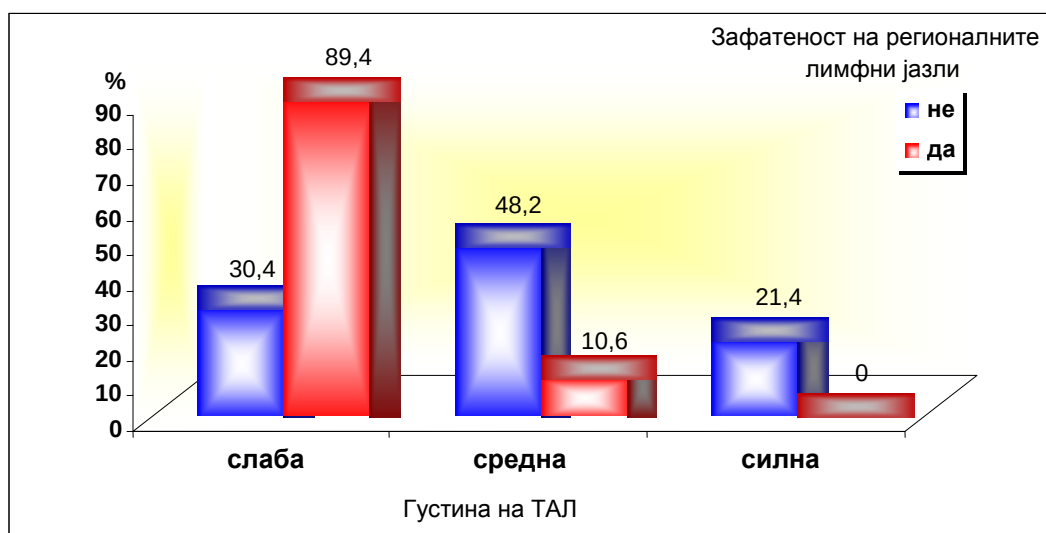
### 7.2.3 N статус

Густината на ТАЛ сигнификантно се разликуваше помеѓу пациентите без и со зафатеност на регионалните лимфни јазли ( $p < 0,0001$ ). Пациентите со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли почесто од оние без зафатеност на регионалните лимфни јазли имаа слаба густина на лимфоцитни клетки (89,36% vs 30,36%), а поретко имаа умерена и силна инфилтрација (10,64% vs 48,21%, 0% vs 21,43%, соодветно) (табела 6, слика 10).

**Табела 6. Густина на ТАЛ според N статусот**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на ТАЛ  |                  |                 | p-value           |
|-----------------------------------------|----|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
|                                         |    | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |                   |
| не                                      | 56 | 17 (30,36)      | 27 (48,21)       | 12 (21,43)      | <b>&lt;0,0001</b> |
| да                                      | 47 | 42 (89,36)      | 5 (10,64)        | 0               |                   |

**p (Chi-square test)**



**Слика 10. Графички приказ на густината на ТАЛ според N статусот**

### 7.2.4 Инвазија на лимфни садови

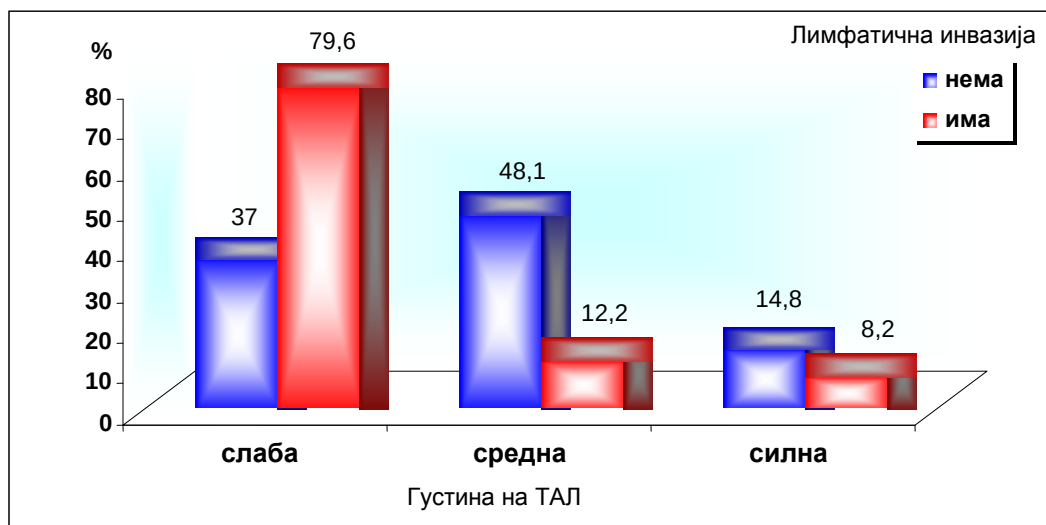
Беше најдена статистички сигнификантна разлика помеѓу пациентите без и со лимфатична инвазија во однос на густината на ТАЛ ( $p=0,00005$ ).

Пациентите со лимфатична инвазија почесто имаа слаба (ниска) густина на инфилтрирачки клетки (79,59% vs 37,04%), додека пациентите без лимфатична инвазија почесто имаа умерена и силна инфилтрација (48,15% vs 12,24%, 14,81% vs 8,16%, соодветно) (табела 7, слика 11).

**Табела 7. Густина на ТАЛ според лимфатична инвазија**

| Лимфатична инвазија | Густина на ТАЛ |                 |                  |                 | p-value   |
|---------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------|
|                     | N              | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |           |
| нема                | 54             | 20 (37,04)      | 26 (48,15)       | 8 (14,81)       | 0,00005** |
| има                 | 49             | 39 (79,59)      | 6 (12,24)        | 4 (8,16)        |           |

p (Chi-square test) \*\*p<0,01



**Слика 11. Графички приказ на густината на ТАЛ според лимфатичната инвазија**

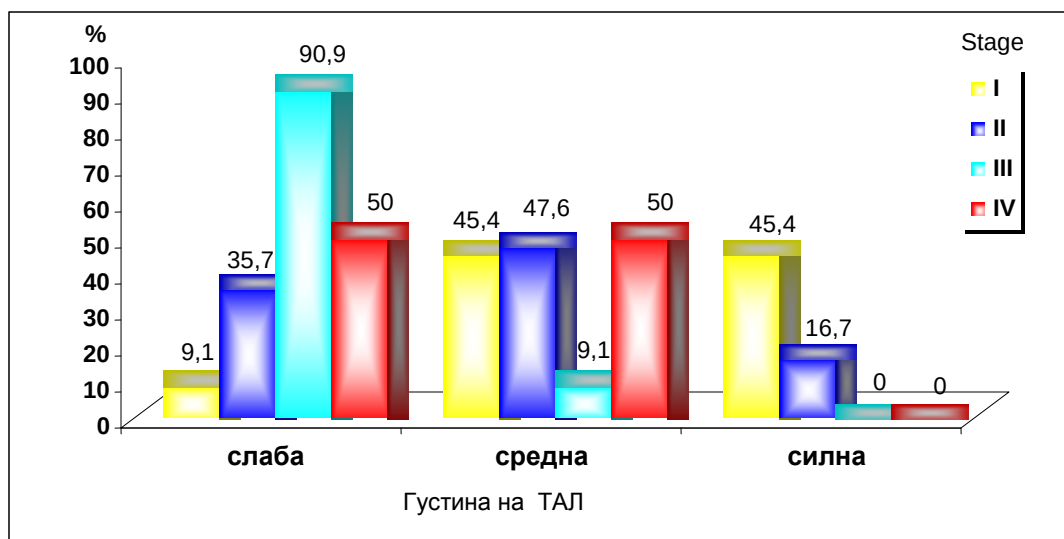
### 7.2.5 Стадиум на болеста

Густината на ТАЛ сигнификантно се разликуваше помеѓу пациентите со прв, втор, трет и четврти стадиум на болеста ( $p < 0,0001$ ). Помал степен на инфилтрација значајно почесто имаа пациентите кај кои болеста беше дијагностицирана во понапреднат стадиум.

Слаба инфилтрација најчесто беше детектирана кај пациентите со стадиум III - 40/44 (90,91%), но и кај 50% од пациентите со стадиум IV. Средно изразена инфилтрација почесто беше детектирана кај пациентите со стадиум II и I – 20/42 (47,62%) и 5/11 (45,45%). Силна инфилтрација имаа 5/11 (45,45%) пациенти со стадиум I и 7/42 (16,67%) пациенти со стадиум II, а ниту еден пациент со стадиум III и IV (табела 8, слика 12).

Табела 8. Густина на ТАЛ според стадиум на болеста

| Стадиум                 | Густина на ТАЛ |            |            |           | p-value |
|-------------------------|----------------|------------|------------|-----------|---------|
|                         | N              | слаба      | средна     | силна     |         |
|                         |                | (n=59)     | (n=32)     | (n=12)    |         |
| I                       | 11             | 1 (9,09)   | 5 (45,45)  | 5 (45,45) | <0,0001 |
| II                      | 42             | 15 (35,71) | 20 (47,62) | 7 (16,67) |         |
| III                     | 44             | 40 (90,91) | 4 (9,09)   | 0         |         |
| IV                      | 6              | 3 (50)     | 3 (50)     | 0         |         |
| p (Kruskal-Wallis test) |                |            |            |           |         |



Слика 12. Графички приказ на густината на ТАЛ според стадиумот на болеста

#### 7.2.6 Диференцираност на туморот ( G)

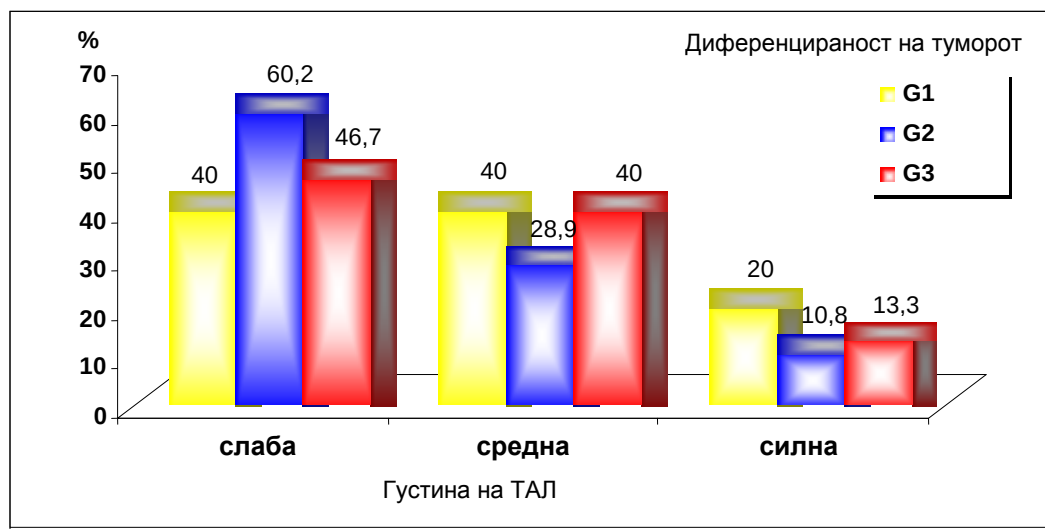
Не беше најдена статистички сигнификантна разлика во степенот на инфилтрација со ТАЛ помеѓу пациентите со добра, умерена и лоша диференцираност на туморот ( $p=0,9$ ).

Слаба инфилтрација имаа 2/5 (40%) добро диференцирани тумори, 50/83 (60,24%) умерено диференцирани и 7/15 (46,67%) лошо диференцирани тумори (табела 9, слика 13).

Табела 9. Густина на ТАЛ според хистолошкиот градус на туморот

| Степен на диференцираност на туморот (G) | N  | Густина на ТАЛ  |                  |                 | p-value |
|------------------------------------------|----|-----------------|------------------|-----------------|---------|
|                                          |    | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |         |
| G1                                       | 5  | 2 (40)          | 2 (40)           | 1 (20)          | 0,9 ns  |
| G2                                       | 83 | 50 (60,24)      | 24 (28,92)       | 9 (10,84)       |         |
| G3                                       | 15 | 7 (46,67)       | 6 (40)           | 2 (13,33)       |         |

p (Kruskal-Wallis test)



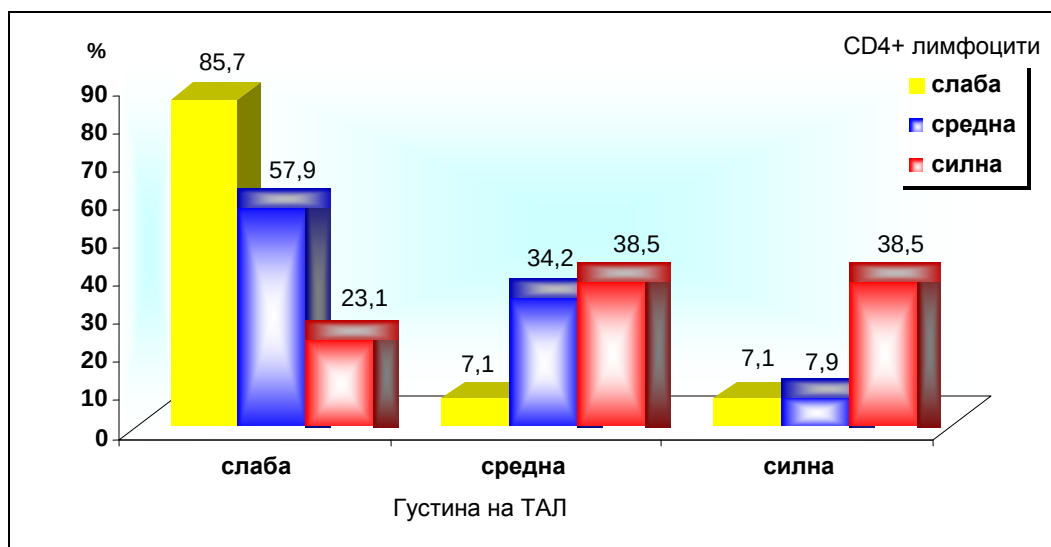
Слика 13. Графички приказ на густината на ТАЛ според хистолошкиот градус на туморот

### 7.3 ТИПОВИ НА ЛИМФОЦИТИ ВО ТАЛ

Во инфилтратот од ТАЛ, густината на CD4+ лимфоцити сигнификантно се разликуваше во зависност од густината на ТАЛ ( $p=0,003$ ). Голема густина на CD4+ лимфоцити беше идентификувана значајно почесто кај туморите со умерена и силна клеточна инфилтрација, односно повисока густина на ТАЛ (38,46%).

Табела 10. Густина на CD4+ лимфоцити во ТАЛ и сооднос со густината на ТАЛ

| CD4+<br>лимфоцити<br>густина | Густина на ТАЛ |                 |                  |                 | p-value   |
|------------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------|
|                              | N              | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |           |
| слаба                        | 14             | 12 (85,71)      | 1 (7,14)         | 1 (7,14)        | 0,003 sig |
| средна                       | 76             | 44 (57,89)      | 26 (34,21)       | 6 (7,89)        |           |
| силна                        | 13             | 3 (23,08)       | 5 (38,46)        | 5 (38,46)       |           |

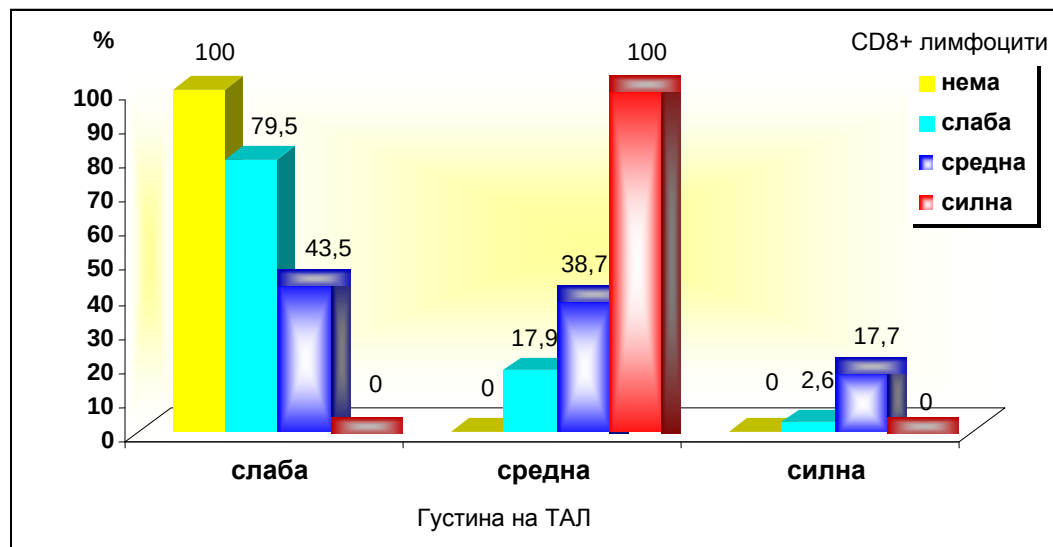


**Слика 14. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите и густината на ТАЛ**

За  $p=0,002$  беше потврдена статистички сигнификантна разлика за густината на CD8+ лимфоцити во однос на густината на ТАЛ. Средна густина на CD8+ лимфоцитите значајно почесто беше детектирана кај туморите со силно изразена инфилтрација со ТАЛ (17,74%). Слаба експресија значајно почесто беше детектирана кај туморите со слабо изразена инфилтрација со ТАЛ (79,49%).

**Табела 11. Густина на CD8+ лимфоцити во ТАЛ и сооднос со густината на ТАЛ**

| CD8+<br>лимфоцити<br>густина | Густина на ТАЛ |                 |                  |                 | p-value   |
|------------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------|
|                              | N              | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |           |
| нема                         | 1              | 1 (100)         | 0                | 0               | 0,002 sig |
| слаба                        | 39             | 31 (79,49)      | 7 (17,95)        | 1 (2,56)        |           |
| средна                       | 62             | 27 (43,55)      | 24 (38,71)       | 11 (17,74)      |           |
| силна                        | 1              | 0               | 1 (100)          | 0               |           |

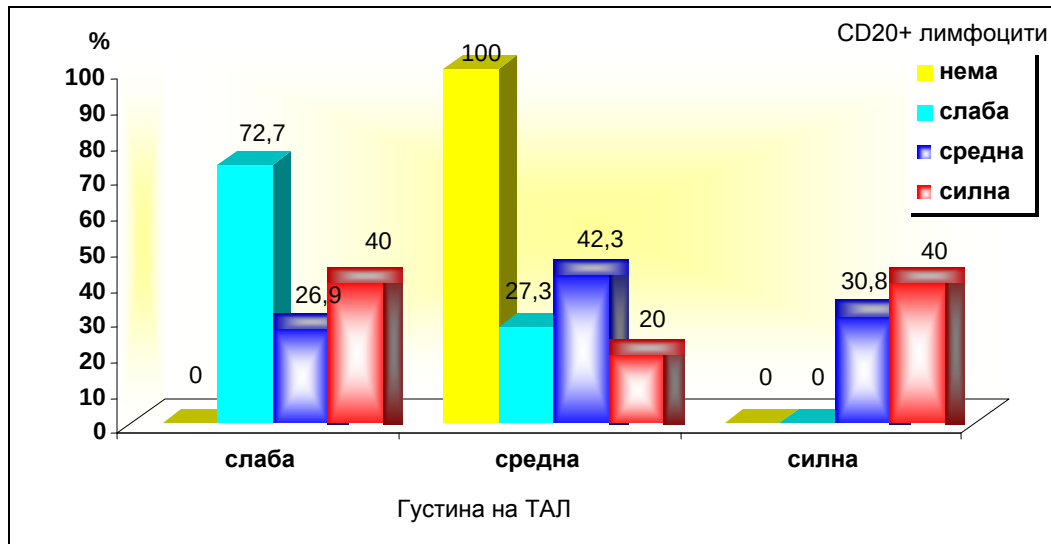


**Слика 15. Графички приказ на густината на CD8+ лимфоцитите и густината на ТАЛ**

Густината на CD20+ лимфоцити сигнификантно се разликуваше во зависност од густината на ТАЛ ( $p < 0,0001$ ). Силна експресија на CD20+ лимфоцити беше идентификувана значајно почесто кај туморите со умерено и обилно количество на ТАЛ (30,77%, односно 40%).

**Табела 12. Густина на CD20+ лимфоцити во ТАЛ и сооднос со густината на ТАЛ**

| CD20+<br>лимфоцити<br>густина | Густина на ТАЛ |                 |                  |                 | p-value         |
|-------------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
|                               | N              | слаба<br>(n=59) | средна<br>(n=32) | силна<br>(n=12) |                 |
| нема                          | 1              | 0               | 1 (100)          | 0               | < 0,0001<br>sig |
| слаба                         | 66             | 48 (72,73)      | 18 (27,27)       | 0               |                 |
| средна                        | 26             | 7 (26,92)       | 11 (42,31)       | 8 (30,77)       |                 |
| силна                         | 10             | 4 (40)          | 2 (20)           | 4 (40)          |                 |



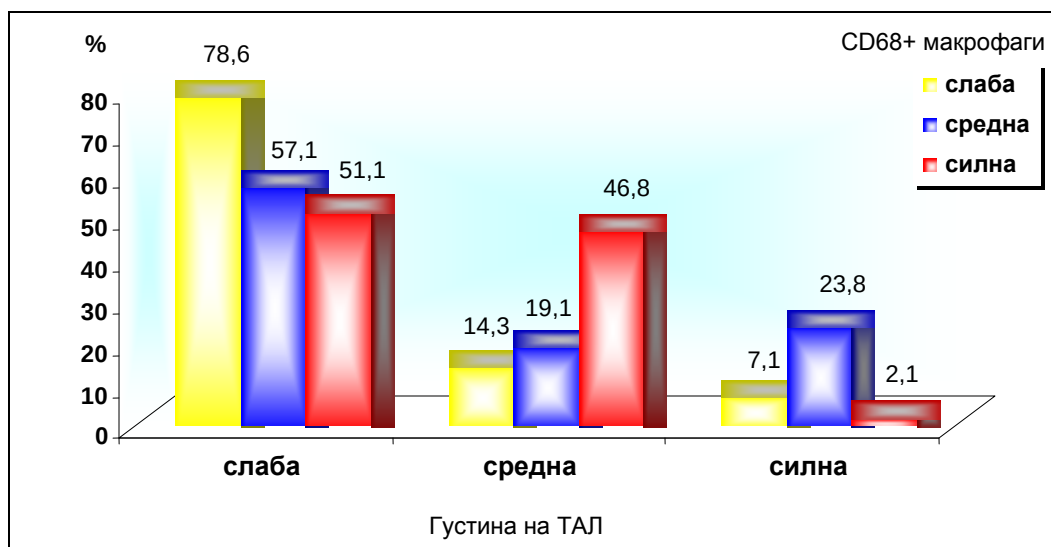
**Слика 16. Графички приказ на густината на CD20+ лимфоцитите и густината на ТАЛ**

Густината на CD68+ клетките (макрофаги) сигнификантно се разликуваше во зависност од густината на ТАЛ ( $p=0,0001$ ). Во групата тумори со ниска густина на ТАЛ најчесто беше детектирана ниска (слаба) густина на CD68+ клетки (78,57%); во групата со средна густина на ТАЛ најчесто беше детектирано обилно количество (голема густина) на CD68+ клетки (46,81%); а во групата тумори со голема густина на ТАЛ најчесто беше детектирана средна густина на CD68+ макрофаги (23,81%).

**Табела 13. Густина на CD68+ макрофагите во ТАЛ и сооднос со густината на ТАЛ**

| CD68+<br>лимфоцити<br>густина | Густина на ТАЛ |            |            |            | p-value    |
|-------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
|                               | N              | слаба      | средна     | силна      |            |
|                               |                | (n=59)     | (n=32)     | (n=12)     |            |
| слаба                         | 14             | 11 (78,57) | 2 (14,29)  | 1 (7,14)   | 0,0001 sig |
| средна                        | 42             | 24 (57,14) | 8 (19,05)  | 10 (23,81) |            |
| силна                         | 47             | 24 (51,06) | 22 (46,81) | 1 (2,13)   |            |





Слика 17. Графички приказ на густината на CD68+ макрофагите и густината на ТАЛ

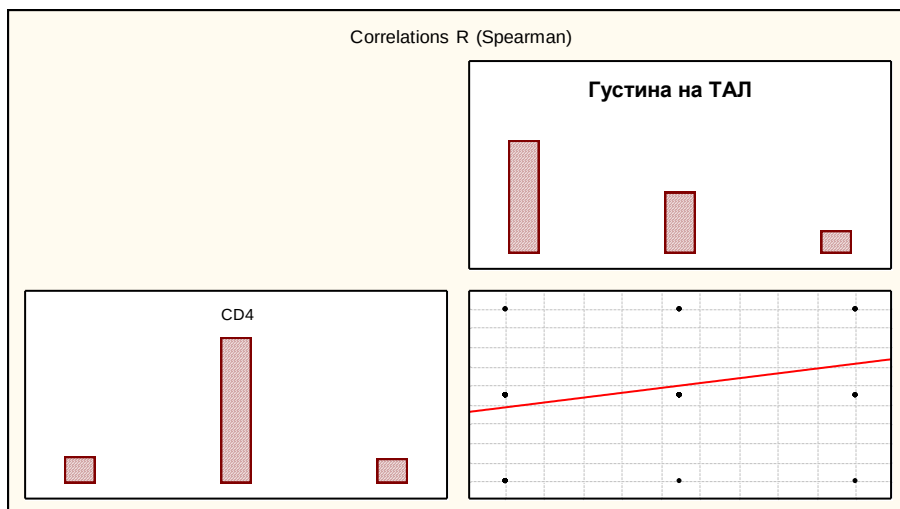
### 7.3.1 Корелации

Испитуваната корелација помеѓу густината на ТАЛ и густината на различни типови лимфоцити покажа дека густината на ТАЛ сигнификантно корелираше со густината на CD4+ лимфоцити ( $p=0,0004$ ), со CD8+ лимфоцитите ( $p=0,00007$ ) и CD20+ лимфоцитите ( $p=0,000004$ ), а несигнификантно со степенот на експресија на CD68+ макрофагите ( $p=0,43$ ). Сите овие корелации беа позитивни и директни, што покажува дека густината на ТАЛ во туморите расте со зголемување на густината на CD4+, CD8+, и CD20+ лимфоцитите, и обратно.

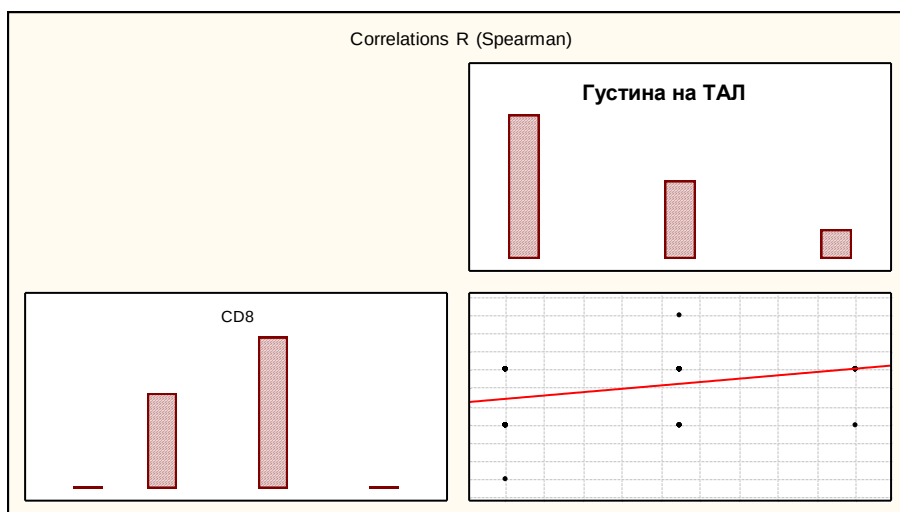
Табела 14. Корелации помеѓу типовите на лимфоцити и ТАЛ

|             | Spearman | t-test | p-level        |
|-------------|----------|--------|----------------|
|             | R        |        |                |
| CD4+ / ТАЛ  | 0,342    | t=3,66 | p=0,0004 sig   |
| CD8+ / ТАЛ  | 0,381    | t=4,14 | p=0,00007 sig  |
| CD20+ / ТАЛ | 0,436    | t=4,87 | p=0,000004 sig |
| CD68+ / ТАЛ | 0,078    | t=0,78 | p=0,43 ns      |

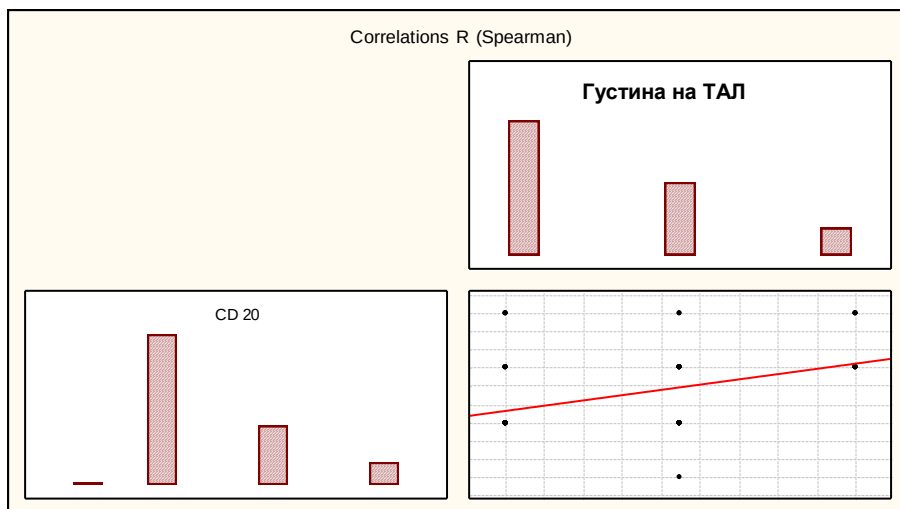
\*\* $p<0.01$



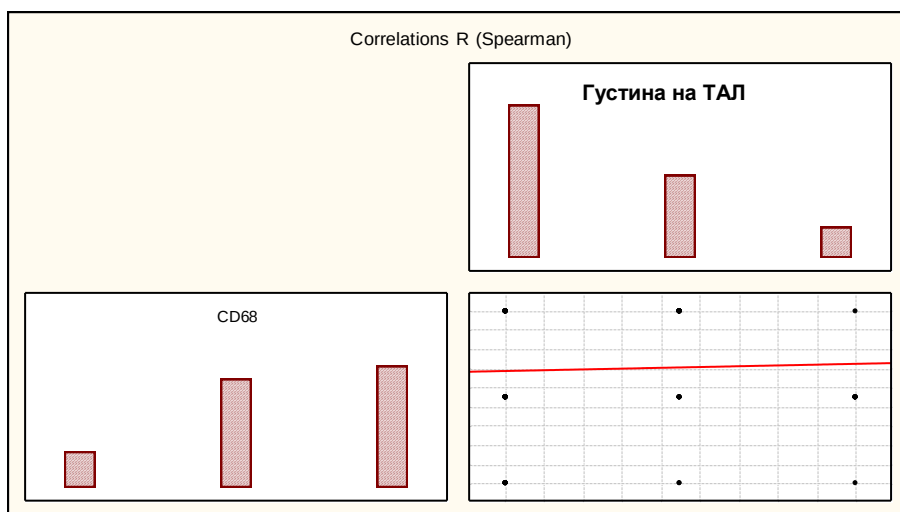
Графикон 1. Корелација помеѓу CD4+ лимфоцити и ТАЛ



Графикон 2. Корелација помеѓу CD8+ лимфоцити и ТАЛ



Графикон 3. Корелација помеѓу CD20+ лимфоцити и ТАЛ



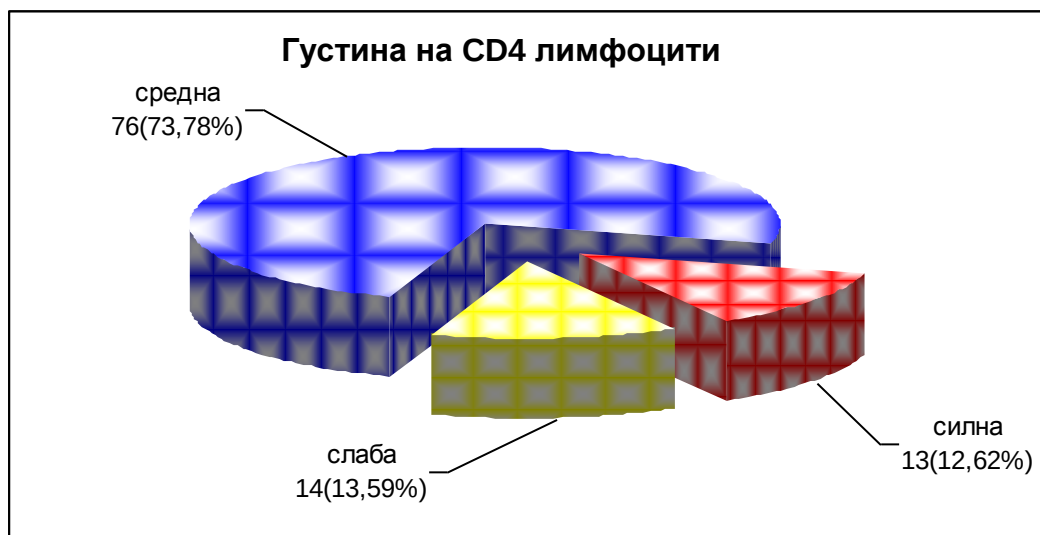
Графикон 4. Корелација помеѓу CD68+ макрофагите и ТАЛ

## 7.4 CD4+ ЛИМФОЦИТИ

### 7.4.1 Дистрибуција на густина

На слика 18 е прикажана дистрибуцијата на густината на CD4+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата кај пациентите со КРК.

Кај најголем број пациенти беше детектирано присуство на средно изразен клеточен инфилтрат од CD4+ лимфоцити во неоплазмите – 76 (73,79%), по што следуваа пациенти со слабо изразен – 14 (13,59%) и со силно изразен CD4+ инфилтрат – 13 (12,62%).



**Слика 18. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите во анализираната серија**

### 7.4.2 Локализација

Анализата на резултатите за густината на CD4+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на неоплазмата во зависност од локализацијата на туморот покажа дека најголема густина беше детектирана кај неоплазмите локализирани во сигмоидниот дел на колонот – 6/29 (20,69%). Силно изразен CD4+ инфилтрат беше детектиран и кај 2/12 (16,67%) неоплазми во цекум, 2/5 (40%) неоплазми локализирани во трансверзалниот колон, 1/3 (33,33%) во

лиеналната флексура, и 2/31 (6,45%) неоплазми во ректумот. Слаба густина на CD4+ лимфоцити беше детектирана кај 5/12 (41,67%) неоплазми во цекум, 1/9 (11,11%) во асцендентниот колон, 2/3 (66,67%) неоплазми во десцендентниот колон, 3/29 (10,34%) неоплазми локализирани во сигмоидниот дел од колонот, 1/8 (12,5%) во ректосигмоидниот колон и кај 2/31 (6,45%) локализирани неоплазми во ректумот (табела 15).

**Табела 15. Дистрибуција на густината на CD4+ лимфоцитите според локализација**

| Локализација       | Густина на CD4+ лимфоцити |                 |                  |                 |
|--------------------|---------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                    | N                         | слаба<br>(n=14) | средна<br>(n=76) | силна<br>(n=13) |
| coecum             | 12                        | 5 (41,67)       | 5 (41,67)        | 2 (16,67)       |
| colon ascendens    | 9                         | 1 (11,11)       | 8 (88,89)        | 0               |
| flexurae hepaticae | 3                         | 0               | 3 (100)          | 0               |
| colon transversum  | 5                         | 0               | 3 (60)           | 2 (40)          |
| flexurae lienalis  | 3                         | 0               | 2 (66,67)        | 1 (33,33)       |
| colon descendens   | 3                         | 2 (66,67)       | 1 (33,33)        | 0               |
| colon sigmoideum   | 29                        | 3 (10,34)       | 20 (68,97)       | 6 (20,69)       |
| rectosigmoideum    | 8                         | 1 (12,5)        | 7 (87,5)         | 0               |
| rectum             | 31                        | 2 (6,45)        | 27 (87,1)        | 2 (6,45)        |

#### 7.4.3 Т Статус

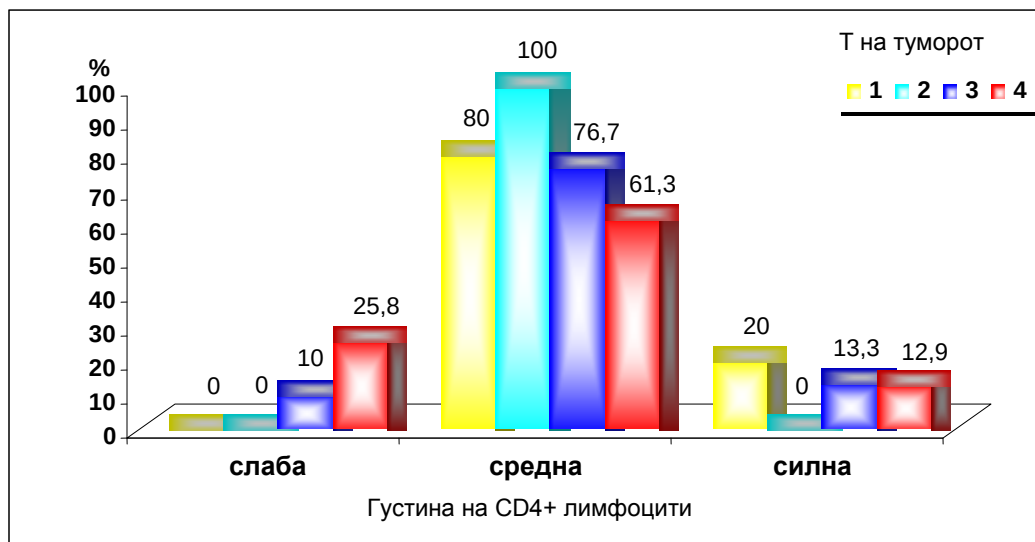
Резултатите од истражувањето покажаа дека густината на CD4+ лимфоцити сигнификантно зависеше од локалниот раст на болеста, односно од Т статусот на туморот ( $p=0,034$ ).

Мала густина на CD4+ лимфоцити не беше детектирана кај пациентите со T1 и T2, а беше детектирано кај 6 (10%) пациенти со T3, и кај 8 (25,81%) со T4 статус. Умерена густина на CD4+ лимфоцити почесто беше детектирана кај туморите со T1 – 4/5 (80%) и T2 – 7/7 (100%) (табела 16, слика 19).

**Табела 16. Густина на CD4+ лимфоцитите според Т статус**

| Т         | Густина на CD4+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value  |
|-----------|---------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------|
|           | N                         | слаба<br>(n=14) | средна<br>(n=76) | силна<br>(n=13) |          |
| <b>T1</b> | 5                         | 0               | 4 (80)           | 1 (20)          | p=0,034* |
| <b>T2</b> | 7                         | 0               | 7 (100)          | 0               |          |
| <b>T3</b> | 60                        | 6 (10)          | 46 (76,67)       | 8 (13,33)       |          |
| <b>T4</b> | 31                        | 8 (25,81)       | 19 (61,29)       | 4 (12,9)        |          |

p (Kruskal-Wallis test) \*p<0,05



**Слика 19. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите според Т статусот**

#### 7.4.5 N статус

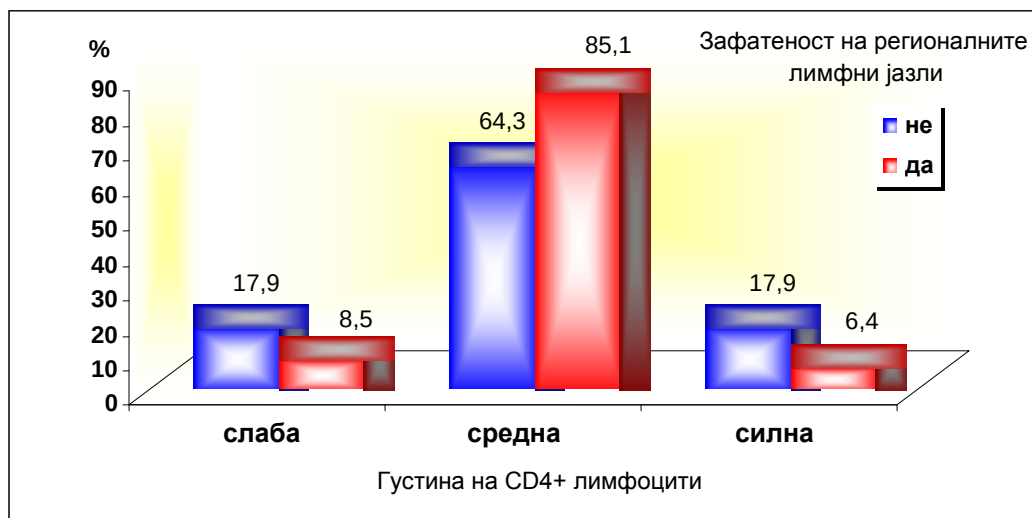
Статистичката анализа не потврди сигнификанта разлика во густината на CD4+ лимфоцити помеѓу пациентите без и со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли ( $p=0,055$ ).

Силно изразен CD4+ лимфоцитен инфилтрат незначајно почесто имаа пациентите без зафатеност на регионалните лимфни јазли во споредба со пациентите со зафатени регионални лимфни јазли (17,86% наспроти 6,38%) (табела 17, слика 20).

**Табела 17. Густина на CD4+ лимфоцитите според зафатеност на лимфни јазли**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на CD4+ лимфоцити |                  |                 | p-value    |
|-----------------------------------------|----|---------------------------|------------------|-----------------|------------|
|                                         |    | слаба<br>(n=14)           | средна<br>(n=76) | силна<br>(n=13) |            |
| не                                      | 56 | 10 (17,86)                | 36 (64,29)       | 10 (17,86)      | p=0,055 ns |
| да                                      | 47 | 4 (8,51)                  | 40 (85,11)       | 3 (6,38)        |            |

p (Chi-square test)



**Слика 20. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите според зафатеноста на лимфните јазли**

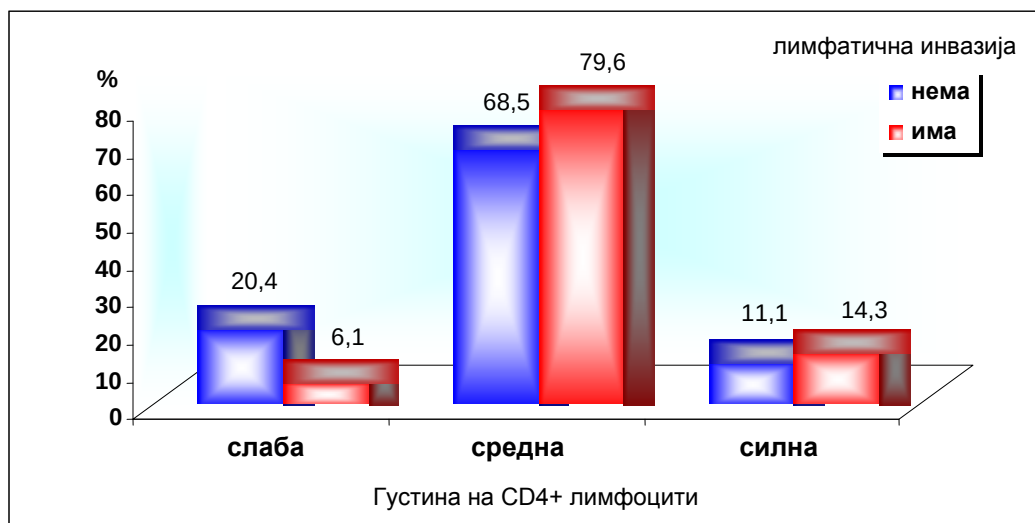
#### 7.4.6 Инвазија на лимфни простори

Не беше најдена статистички сигнификантна разлика во густината на CD4+ лимфоцити помеѓу пациентите без и со лимфатична инвазија ( $p=0,11$ ). Умерена густина на CD4+ лимфоцити беше детектирана и кај пациентите без и кај пациентите со лимфатична инвазија (68,52%, односно 79,59%) (табела 18, слика 21).

**Табела 18. Густина на CD4+ лимфоцитите според лимфатична инвазија**

| Лимфатична инвазија | N  | Густина на CD4+ лимфоцити |                  |                 | p-value   |
|---------------------|----|---------------------------|------------------|-----------------|-----------|
|                     |    | слаба<br>(n=14)           | средна<br>(n=76) | силна<br>(n=13) |           |
| нема                | 54 | 11 (20,37)                | 37 (68,52)       | 6 (11,11)       | p=0,11 ns |
| има                 | 49 | 3 (6,12)                  | 39 (79,59)       | 7 (14,29)       |           |

p (Chi-square test)



**Слика 21. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите според лимфатична инвазија**



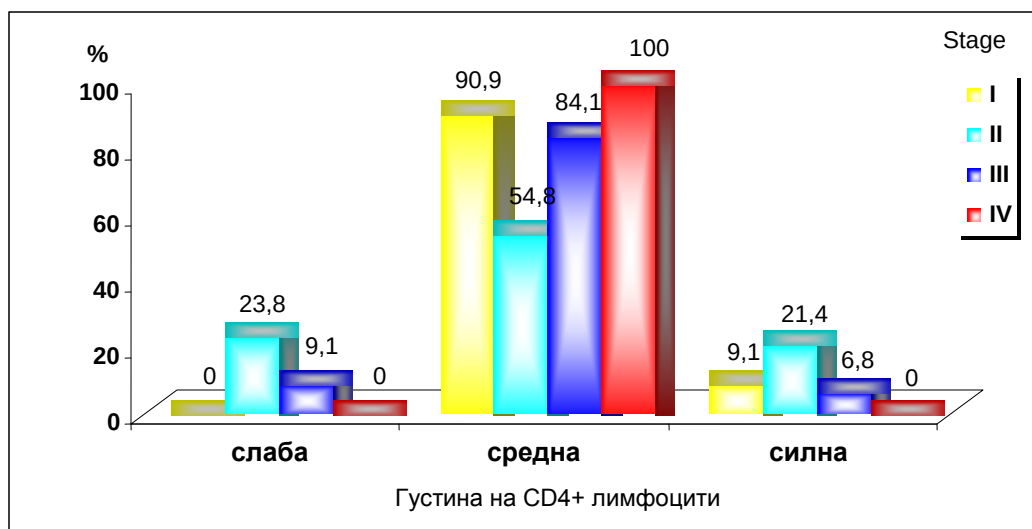
#### 7.4.7 Стадиум

CD4+ лимфоцитниот инфилтрат беше слабо изразен најчесто кај пациентите со неоплазма во стадиум II (23,81%); CD4+ лимфоцитниот инфилтрат со умерена густина беше најчест кај пациентите со IV стадиум на болеста (100%), додека силно изразен CD4+ лимфоцитен инфилтрат почесто беше детектиран кај пациентите со стадиум II (21,43%) и стадиум I (9,09%).

Прикажаните разлики во густината на CD4+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата во зависност од стадиумот на карциномот не беа статистички сигнификантни ( $p=0,11$ ) (табела 19, слика 22).

**Табела 19. Густина на CD4+ лимфоцитите според стадиум на болеста**

| Стадиум                 | Густина на CD4+ лимфоцити |            |            |           | p-value   |
|-------------------------|---------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
|                         | N                         | слаба      | средна     | силна     |           |
|                         |                           | (n=14)     | (n=76)     | (n=13)    |           |
| I                       | 11                        | 0          | 10 (90,91) | 1 (9,09)  | p=0,11 ns |
| II                      | 45                        | 10 (23,81) | 26 (25,24) | 9 (21,43) |           |
| III                     | 41                        | 4 (9,09)   | 34 (33,00) | 3 (6,82)  |           |
| IV                      | 6                         | 0          | 6 (100)    | 0         |           |
| p (Kruskal-Wallis test) |                           |            |            |           |           |



Слика 22. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите според стадиумот на болеста

#### 7.4.8 Диференцираност на туморот (G)

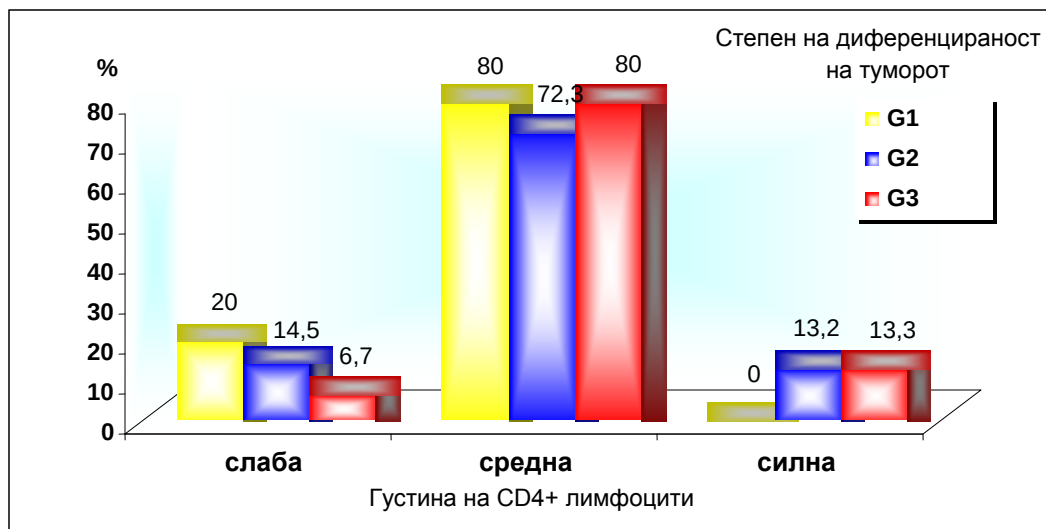
Статистичката анализа не потврди сигнификантна разлика во густината на CD4+ лимфоцитите во зависност од степенот на диференцираност на туморот ( $p=0,63$ ).

Средно изразен CD4+ лимфоцитен инфилтрат беше регистриран кај пациентите со добра, умерена и лоша туморска диференцираност (80%, 72,29%, 80%, соодветно) (табела 20, слика 23).

Табела 20. Густина на CD4+ лимфоцитите според степенот на диференцираност

| Степен на диференцираност на туморот | N  | Густина на CD4+ лимфоцити |            |            | p-value   |
|--------------------------------------|----|---------------------------|------------|------------|-----------|
|                                      |    | слаба                     | средна     | силна      |           |
|                                      |    | (n=14)                    | (n=76)     | (n=13)     |           |
| G1                                   | 5  | 1 (20)                    | 4 (80)     | 0          | p=0,63 ns |
| G2                                   | 83 | 12 (14,46)                | 60 (72,29) | 11 (13,25) |           |
| G3                                   | 15 | 1 (6,67)                  | 12 (80)    | 2 (13,33)  |           |

p (Kruskal-Wallis test)



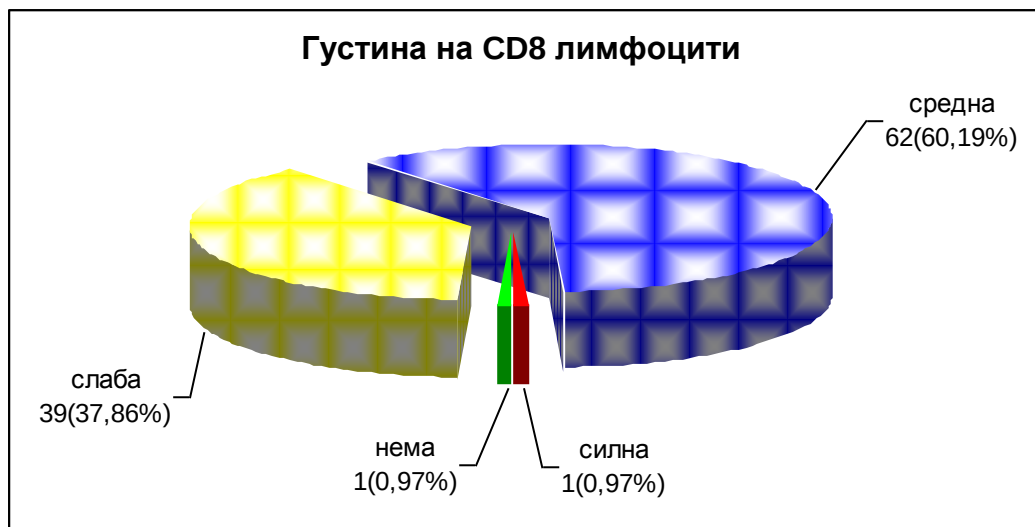
Слика 23. Графички приказ на густината на CD4+ лимфоцитите според степенот на диференцираност на туморот

## 7.5 CD8+ ЛИМФОЦИТИ

### 7.5.1 Дистрибуција на густината

На слика 24 е прикажана дистрибуцијата на густината на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата кај KPK во испитуваната група.

Кај најголем број пациенти беше детектирано присуство на средно изразен клеточен инфилтрат од CD8+ лимфоцити – 62 (60,12%). Слабо изразен инфилтрат беше утврден кај 39 (37,86%) неоплазми; немаше клеточен инфилтрат од CD8+ лимфоцити кај еден пациент, и кај еден пациент беше регистриран силно изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат.



**Слика 24. Дистрибуција на густината на CD8+ лимфоцитите во анализираната серија**

### 7.5.2 Локализација

Резултатите прикажани во табела 21 покажуваат дека пациентот кај кој не беа најдени CD8+ лимфоцити имаше карцином на сигмоидниот колон, а пациентот со силно изразен инфилтрат од CD8+ лимфоцити имаше карцином на цекумот. Слабо изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај сите 3 пациенти со карцином на десцендентниот колон, кај 2/3 (66,67%) пациенти со локализација на карциномот на хепаталната флексура, кај 50% пациенти со локализација на цекумот, а немаше пациенти со карцином на трансверзалниот колон со слаба густина на CD8+ лимфоцити. Средно изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај сите 5 пациенти со карцином на трансверзалниот колон, кај 7/9 (77,78%) пациенти со карцином на асцендентниот колон, кај 21/31 (67,74%) пациенти со карцином на ректумот, кај 2/3 (66,67%) на лиеналната флексура, кај околу 50% од пациентите со тумор на сигмоидниот дел од колонот, а немаше пациенти со карцином на десцендентниот колон со детектирана умерена густина на CD8+ лимфоцити.

**Табела 21. Дистрибуција на CD8+ лимфоцитите според локализација на туморот**

| Локализација       | Густина на CD8+ лимфоцити |               |                 |                  |                |
|--------------------|---------------------------|---------------|-----------------|------------------|----------------|
|                    | N                         | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=39) | средна<br>(n=62) | силна<br>(n=1) |
| coecum             | 12                        | 0             | 6 (50)          | 5 (41,67)        | 1 (8,33)       |
| colon ascendens    | 9                         | 0             | 2 (22,22)       | 7 (77,78)        | 0              |
| flexurae hepaticae | 3                         | 0             | 2 (66,67)       | 1 (33,33)        | 0              |
| colon transversum  | 5                         | 0             | 0               | 5 (100)          | 0              |
| flexurae lienalis  | 3                         | 0             | 1 (33,33)       | 2 (66,67)        | 0              |
| colon descendens   | 3                         | 0             | 3 (100)         | 0                | 0              |
| colon sigmoideum   | 29                        | 1 (3,45)      | 13 (44,83)      | 15 (51,72)       | 0              |
| rectosigmoideum    | 8                         | 0             | 2 (25)          | 6 (75)           | 0              |
| rectum             | 31                        | 0             | 10 (32,26)      | 21 (67,74)       | 0              |

### 7.5.3 Т статус

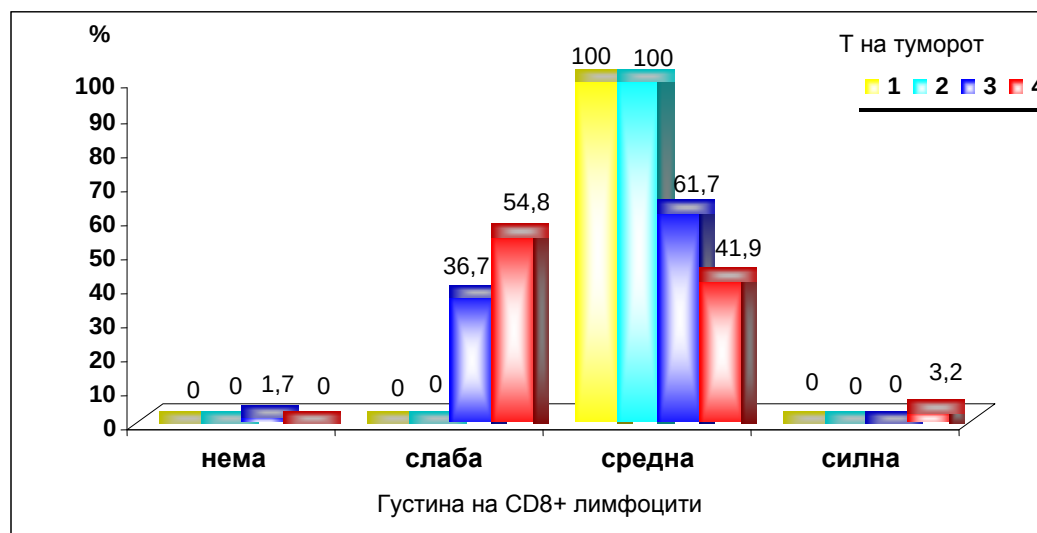
Статистичката анализа потврди дека густината на CD8+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на туморот сигнификантно зависеше од локалниот раст на болеста, односно од Т статусот на туморот ( $p=0,006$ ).

Слабо изразен CD8+ инфилтрат значајно почесто имаа пациентите со Т4 локален раст и Т3 локален раст на туморот (54,84%, односно 36,67%); немаше пациенти со Т1 и Т2 со слабо изразен CD8+ инфилтрат. Средно изразен инфилтрат од CD8+ леукоцити почесто имаа пациентите со помал Т на туморот, односно сите пациенти со Т1 и Т2, а поретко пациентите со повисок Т на туморот, односно 41,94% со Т4 и 61,67% со Т3 на туморот (табела 22, слика 25).

Табела 22. Густина на CD8+ лимфоцитите според Т статусот

| Т  | Густина на CD8+ лимфоцити |               |                 |                  |                | p-value |
|----|---------------------------|---------------|-----------------|------------------|----------------|---------|
|    | N                         | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=39) | средна<br>(n=62) | силна<br>(n=1) |         |
| T1 | 5                         | 0             | 0               | 5 (100)          | 0              | 0,006** |
| T2 | 7                         | 0             | 0               | 7 (100)          | 0              |         |
| T3 | 60                        | 1 (1,67)      | 22 (36,67)      | 37 (61,67)       | 0              |         |
| T4 | 31                        | 0             | 17 (54,84)      | 13 (41,94)       | 1 (3,23)       |         |

p (Kruskal-Wallis test) \*\*p<0,01



Слика 25. Графички приказ на густината на CD8+ лимфоцитите според Т статусот

#### 7.5.4 N Статус

Густината на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на КРК беше сигнификантно помала кај пациентите со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли ( $p=0,024$ ). Така, во групата пациенти без зафатеност на регионалните лимфни јазли, кај 26,79% беше детектиран слабо изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат, а кај 69,64% од пациентите средно изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат. Во групата, пак, пациенти со зафатени регионални

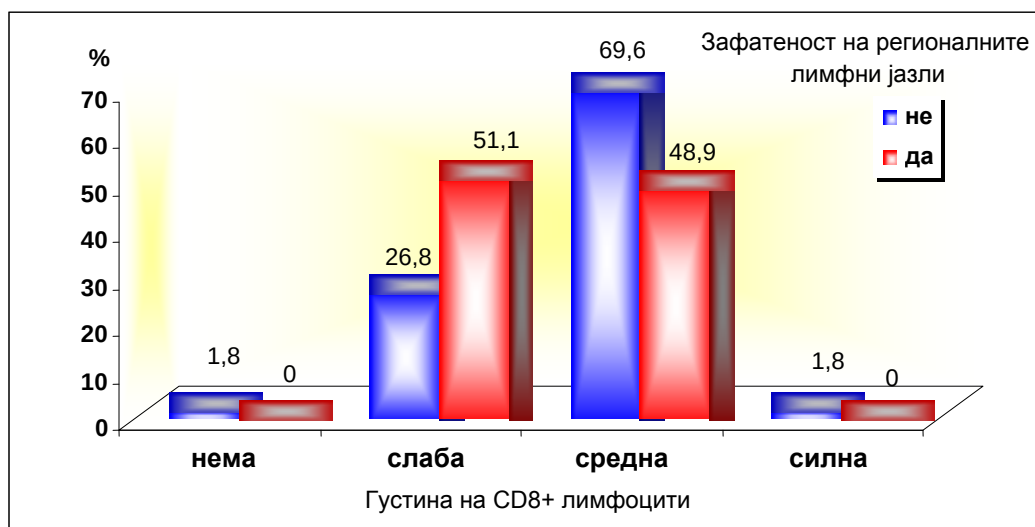
лимфни јазли, слабо изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат имаа 51,06% од пациентите, а средно изразен 48,94% од пациентите (табела 23, слика 26).

**Табела 23. Густина на CD8+ лимфоцитите според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на CD8+ лимфоцити |                 |                  |                | p-value |
|-----------------------------------------|----|---------------------------|-----------------|------------------|----------------|---------|
|                                         |    | нема<br>(n=1)             | слаба<br>(n=39) | средна<br>(n=62) | силна<br>(n=1) |         |
| не                                      | 56 | 1 (1,79)                  | 15 (26,79)      | 39 (69,64)       | 1 (1,79)       | 0,024*  |
| да                                      | 47 | 0                         | 24 (51,06)      | 23 (48,94)       | 0              |         |

p (Fisher exact two-tailed test)

\*p<0,05



**Слика 26. Густина на CD8+ лимфоцитите според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

### 7.5.5 Инвазија на лимфните садови

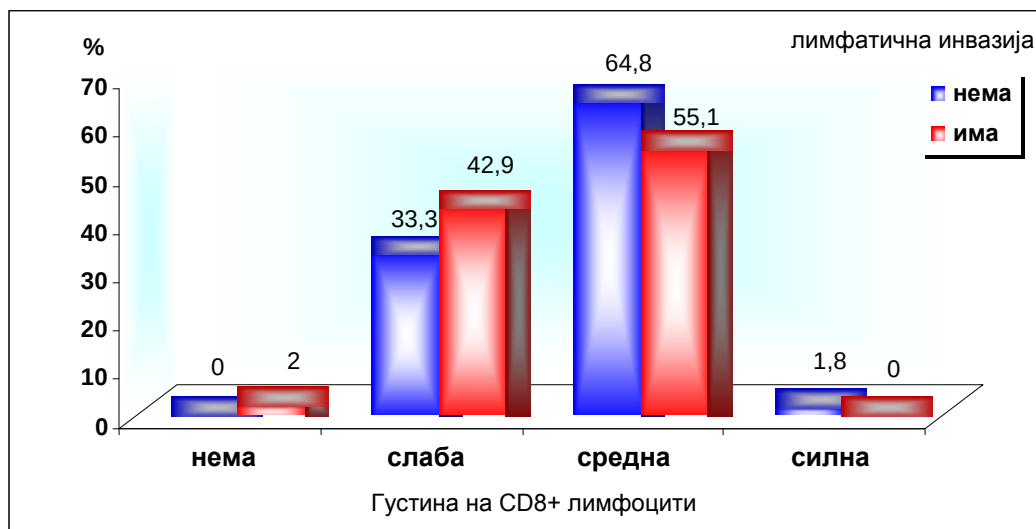
Густинатата на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт беше помала кај пациентите со КРК и со лимфатична инвазија, но без статистичка сигнификантност (p=0,38).

Слаб CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 33,33% од пациентите без, а кај 42,86% од пациентите со лимфатична инвазија, додека средно изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 64,81% од пациентите без, а кај 55,1% од пациентите со лимфатична инвазија (табела 24, слика 27).

**Табела 24. Густина на CD8+ лимфоцитите според лимфатична инвазија**

| Лимфатична инвазија | Густина на CD8+ лимфоцити |               |                 |                  |                | p-value |
|---------------------|---------------------------|---------------|-----------------|------------------|----------------|---------|
|                     | N                         | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=39) | средна<br>(n=62) | силна<br>(n=1) |         |
| нема                | 54                        | 0             | 18 (33,33)      | 35 (64,81)       | 1 (1,85)       | 0,36 ns |
| има                 | 49                        | 1 (2,04)      | 21 (42,86)      | 27 (55,1)        | 0              |         |

p (Fisher exact two-tailed test)



**Слика 27. Графички приказ на густината на CD8+ лимфоцитите според лимфатична инвазија**



### 7.5.6 Стадиум на болеста

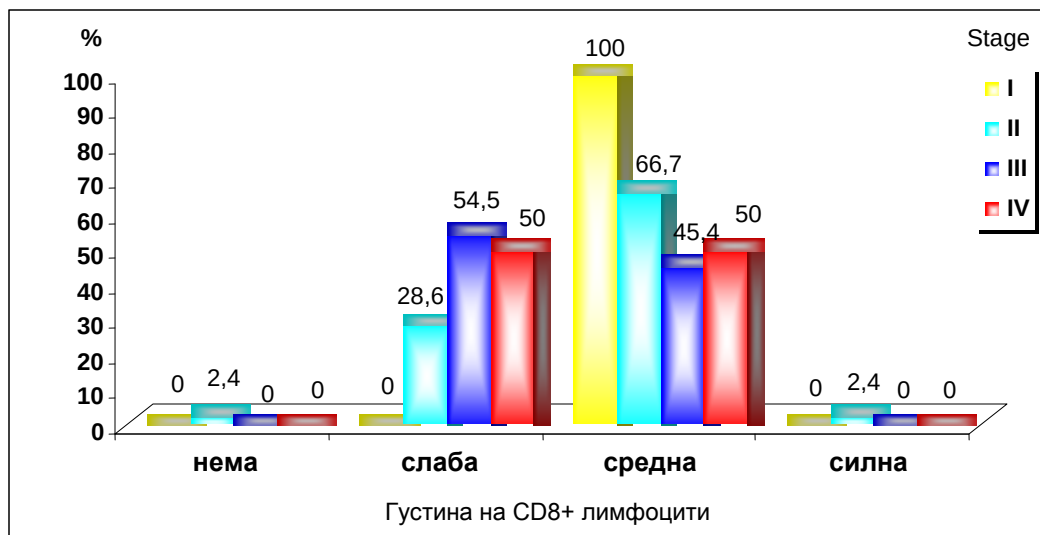
Пациентите со повисок стадиум на карцином на дебелото црево имаа сигнификантно помала густина на CD8+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на карциномот на дебелото црево ( $p=0,0055$ ).

Од прикажаните резултати во табела 25 се забележува дека слабо изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше регистриран кај 28,57% од пациентите со стадиум II на болеста, кај 54,55% со стадиум III, односно кај 50% од пациентите со стадиум IV, додека умерено изразен CD8+ лимфоцитен инфилтрат беше регистриран кај 100% од пациентите со стадиум I на болеста, кај 66,67% со стадиум II, кај 45,45% со стадиум III, и кај 50% пациенти со стадиум IV (табела 25, слика 28).

**Табела 25. Густина на CD8+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

| Стадиум | Густина на CD8+ лимфоцити |          |            |            |          | p-value  |
|---------|---------------------------|----------|------------|------------|----------|----------|
|         | N                         | нема     | слаба      | средна     | силна    |          |
|         |                           | (n=1)    | (n=39)     | (n=62)     | (n=1)    |          |
| I       | 11                        | 0        | 0          | 11 (100)   | 0        | 0,0055** |
| II      | 42                        | 1 (2,38) | 12 (28,57) | 28 (66,67) | 1 (2,38) |          |
| III     | 44                        | 0        | 24 (54,55) | 20 (45,45) | 0        |          |
| IV      | 6                         | 0        | 3 (50)     | 3 (50)     | 0        |          |

p (Kruskal-Wallis test) \*\* $p<0,01$



**Слика 28. Графички приказ на густината на CD8+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

#### **7.5.7 Степен на диференцираност на туморот ( G)**

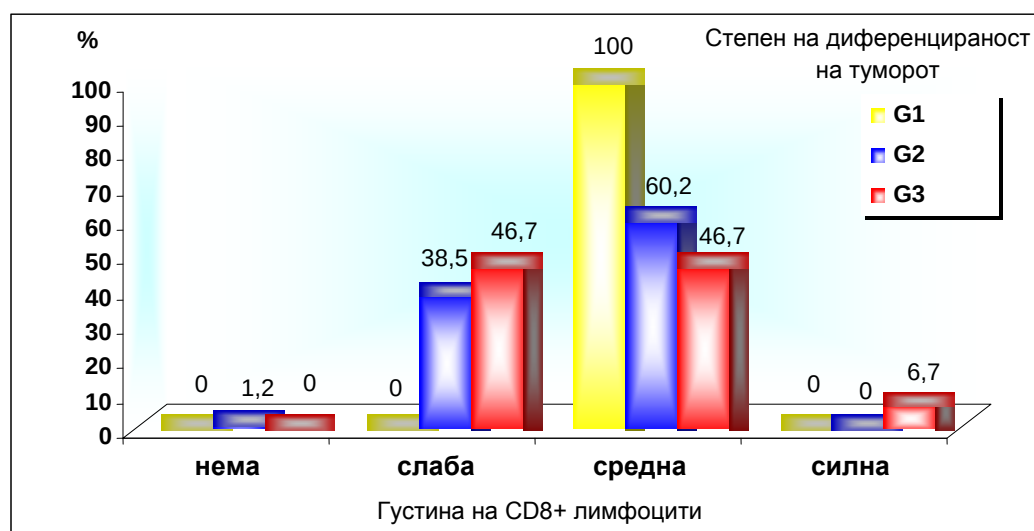
Дистрибуцијата на густината на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата во зависност од степенот на диференцираност на туморот покажа ниска густина кај 32 (38,55%) пациенти со умерен степен на диференцираност, и кај 7 (46,67%) со лошо диференциран тумор, додека средно изразена густина на CD8+ лимфоцити беше регистрирана кај сите 5 пациенти со добро диференциран тумор, 50 (60,24%) со умерено диференциран тумор, и 7 (46,67%) пациенти со лошо диференциран тумор.

Овие опишани разлики во густината на CD8+ лимфоцити, а во зависност од степенот на диференцираност на туморот не беа доволни да се потврдат и статистички како сигнификантни ( $p=0,063$ ) (табела 26, слика 29).

**Табела 26. Густина на CD8+ лимфоцитите според степенот на диференцираност**

| Степен на диференцираност на туморот | N  | Густина на CD8+ лимфоцити |                 |                  |                | p-value     |
|--------------------------------------|----|---------------------------|-----------------|------------------|----------------|-------------|
|                                      |    | нема<br>(n=1)             | слаба<br>(n=39) | средна<br>(n=62) | силна<br>(n=1) |             |
| добро                                | 5  | 0                         | 0               | 5 (100)          | 0              | 0,063<br>ns |
| умерено                              | 83 | 1 (1,2)                   | 32 (38,55)      | 50 (60,24)       | 0              |             |
| лошо                                 | 15 | 0                         | 7 (46,67)       | 7 (46,67)        | 1 (6,67)       |             |

p (Kruskal-Wallis test)



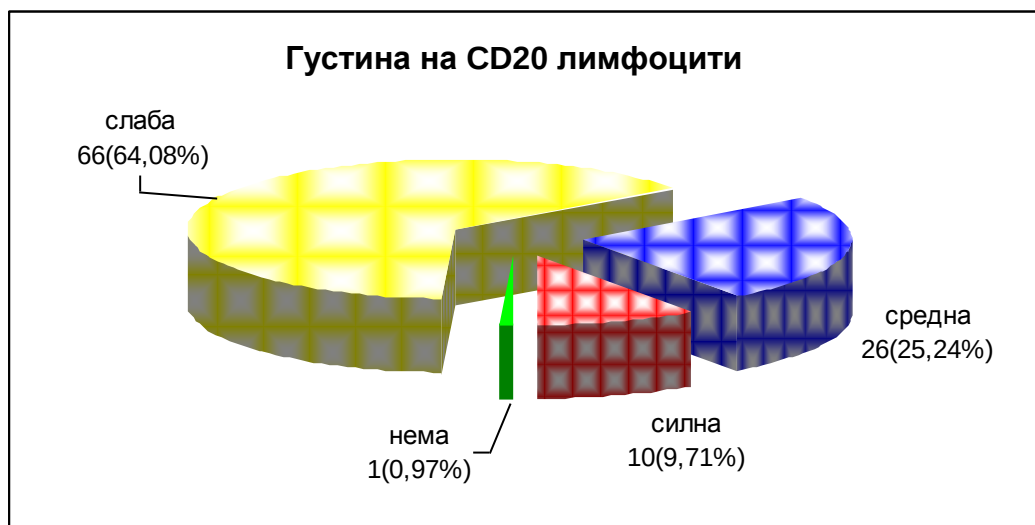
**Слика 29. Графички приказ на густината на CD8+ лимфоцитите според степенот на диференцираност**

## 7.6 CD20+ ЛИМФОЦИТИ

### 7.6.1 Дистрибуција на густината

На слика 30 е прикажана дистрибуцијата на густината на CD20+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмите во анализираната група случаи.

Кај најголем број случаи беше детектирано присуство на слабо изразен клеточен инфилтрат од CD20+ лимфоцити – 66 (64,08%), следено од средно изразен – 26 (25,24%), силно изразен CD20+ инфилтрат – 10 (9,71%). Кај еден пациент во инфилтративниот фронт на неоплазмата не беа најдени CD20+ лимфоцити.



**Слика 30. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите во анализираната серија**

### 7.6.2 Локализација

Пациентот кај кој не беа најдени CD20+ лимфоцити имаше карцином на ректумот. Слабо изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај сите 3 пациенти со карцином на лиеналната флексура и кај сите 3 пациенти со карцином на десцендентниот колон, потоа кај 8/9 (88,89%) со локализација на карциномот на асцендентниот колон, 6/8 (75%) на ректосигмоидниот дел на колонот, 2/3 (66,67%) на хепаталната флексура, 19/31 (61,29%) пациенти со локализација на карциномот на ректумот, 7/12 (58,33%) на цекумот, 16/29 (55,17%) на сигмоидниот колон, и кај 2/5 (40%) пациенти кај кои карциномот беше локализиран на трансверзалниот колон.

Средно изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 3/5 (60%) пациенти со карцином на трансверзалниот колон, кај 5/12 (41,67%) пациенти со

карцином на цекумот, 10/29 (34,48%) на сигмоидниот колон, 1/3 (33,33%) на хепаталната флексура, 5/31 (16,13%) на ректумот, 1/8 (12,5%) на ректосигмоидниот дел на колонот, и кај 1/9 (11,11%) пациенти со локализација на карциномот на асцендентниот колон.

Силно изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 6/31 (19,35%) пациенти со локализација на карциномот на ректумот, 1/8 (12,5%) на ректосигмоидниот дел на колонот, и кај 3/29 (10,34%) на сигмоидниот колон (табела 27).

**Табела 27. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според локализација на туморот**

| Локализација      | Густина на CD20+ лимфоцити |               |                 |                  |                 |
|-------------------|----------------------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                   | N                          | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |
| coecum            | 12                         | 0             | 7 (58,33)       | 5 (41,67)        | 0               |
| colon ascendens   | 9                          | 0             | 8 (88,89)       | 1 (11,11)        | 0               |
| flex hepaticae    | 3                          | 0             | 2 (66,67)       | 1 (33,33)        | 0               |
| colon transversum | 5                          | 0             | 2 (40)          | 3 (60)           | 0               |
| flex lienalis     | 3                          | 0             | 3 (100)         | 0                | 0               |
| colon descendens  | 3                          | 0             | 3 (100)         | 0                | 0               |
| colon sigmoideum  | 29                         | 0             | 16 (55,17)      | 10 (34,48)       | 3 (10,34)       |
| rectosigmoideum   | 8                          | 0             | 6 (75)          | 1 (12,5)         | 1 (12,5)        |
| rectum            | 31                         | 1 (3,23)      | 19 (61,29)      | 5 (16,13)        | 6 (19,35)       |

### 7.6.3 T Статус

Беше утврдена статистички сигнификантна разлика во густината на CD20+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на туморот помеѓу туморите со различен локален раст, односно T1, T2, T3 и T4 ( $p=0,0002$ ). Помала густина на

CD20+ лимфоцити значајно почесто беше детектирана кај пациентите со повисок Т на туморот (понапреднат локален раст).

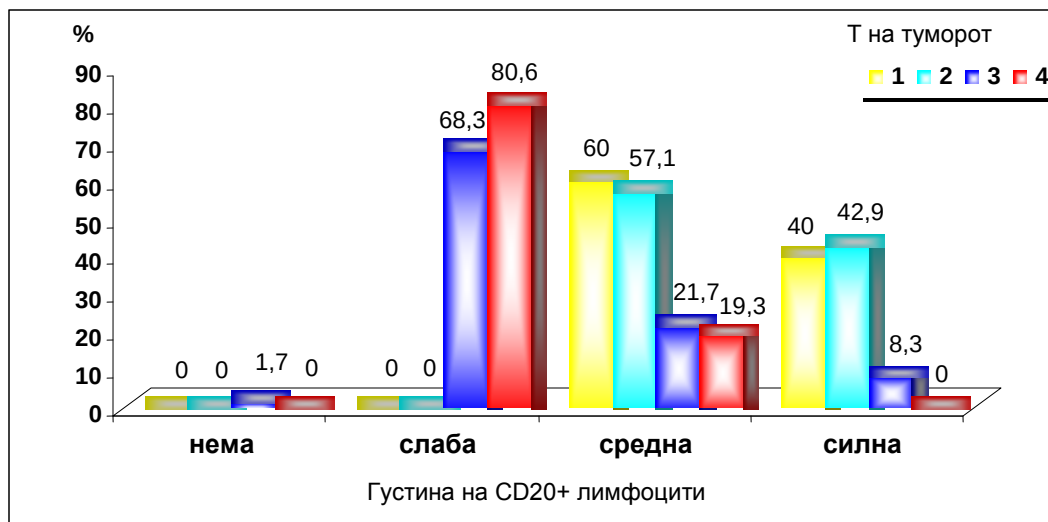
Во нашиот материјал, мала густина на CD20+ лимфоцити имаа пациентите со Т3 и Т4 статус (68,33%, односно 80,65% пациенти).

Средно изразен инфилтрат од CD20+ лимфоцити, односно умерена густина имаа почесто пациентите со понизок Т на туморот, односно сите пациенти со Т1; повеќе од 50% пациенти со Т2 - 4/7 (57,14%) а поретко пациентите со повисок Т на туморот, односно 13/60 (21,67%) со Т3 и 6/31 (19,35%) со Т4 на туморот. Голема густина на CD20+ лимфоцити беше детектирана кај 2/5 (40%) пациенти со Т1, 3/7 (42,86%) со Т2, 5/60 (8,33%) со Т3, и ниту еден пациент со тумор со Т4 статус (табела 28, слика 31).

**Табела 28. Дистрибуција на CD20+ лимфоцитите според Т статусот**

| Т         | Густина на CD20+ лимфоцити |               |                 |                  |                 | p-value  |
|-----------|----------------------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|----------|
|           | N                          | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |          |
| <b>T1</b> | 5                          | 0             | 0               | 3 (60)           | 2 (40)          | 0,0002** |
| <b>T2</b> | 7                          | 0             | 0               | 4 (57,14)        | 3 (42,86)       |          |
| <b>T3</b> | 60                         | 1 (1,67)      | 41 (68,33)      | 13 (21,67)       | 5 (8,33)        |          |
| <b>T4</b> | 31                         | 0             | 25 (80,65)      | 6 (19,35)        | 0               |          |

**p (Kruskal-Wallis test) \*\*p<0,01**



**Слика 31. Графички приказ на густината на CD20+ лимфоцитите според Т статусот на туморот**

#### 7.6.4 N статус

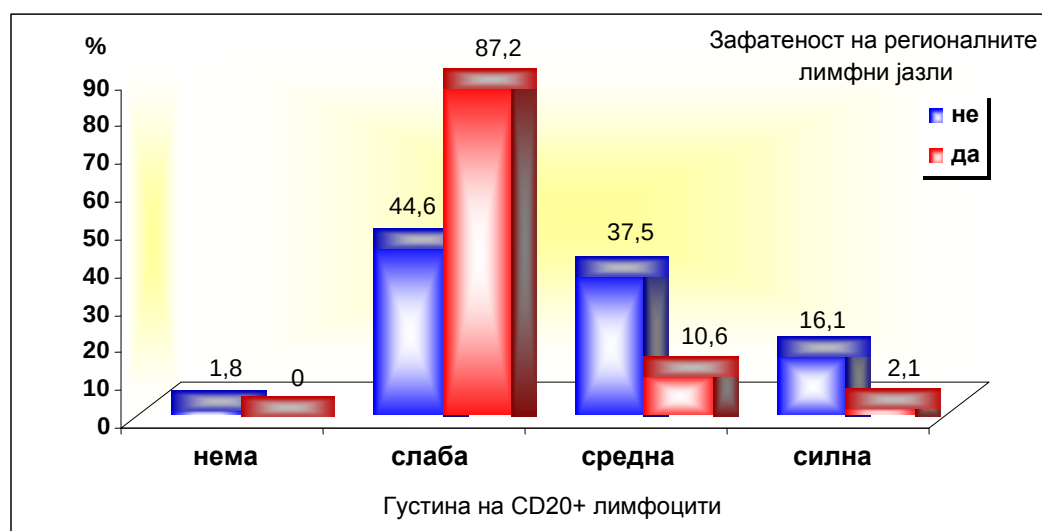
Густината на CD20+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата сигнификантно зависеше од раширеноста на болеста во регионалните лимфни јазли ( $p < 0,001$ ).

Слаба густина на CD20+ лимфоцити значајно почесто имаа пациентите со зафатени регионални лимфни јазли отколку пациентите без нивна зафатеност (87,23% наспроти 44,64%), додека, пак, средна и силна густина на CD20+ лимфоцити значајно поретко имаа пациентите со зафатени регионални лимфни јазли отколку пациентите без нивна зафатеност (10,64% vs 37,5%, 2,13% vs 16,07%, соодветно) (табела 29, слика 32).

**Табела 29. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на CD20+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value |
|-----------------------------------------|----|----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|---------|
|                                         |    | нема<br>(n=1)              | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |         |
| не                                      | 56 | 1 (1,79)                   | 25 (44,64)      | 21 (37,5)        | 9 (16,07)       | < 0,001 |
| да                                      | 47 | 0                          | 41 (87,23)      | 5 (10,64)        | 1 (2,13)        |         |

p (Fisher exact, two-tailed test)



**Слика 32. Графички приказ на дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

### 7.6.5 Инвазија на лимфни садови

Пациентите без и со лимфатична инвазија имаа сигнификантно различна густина на CD20+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата ( $p=0,001$ ).

Пациентите со лимфатична инвазија во споредба со пациентите без лимфатична инвазија имаа значајно почесто слабо изразен инфилтрат од CD20+ лимфоцити



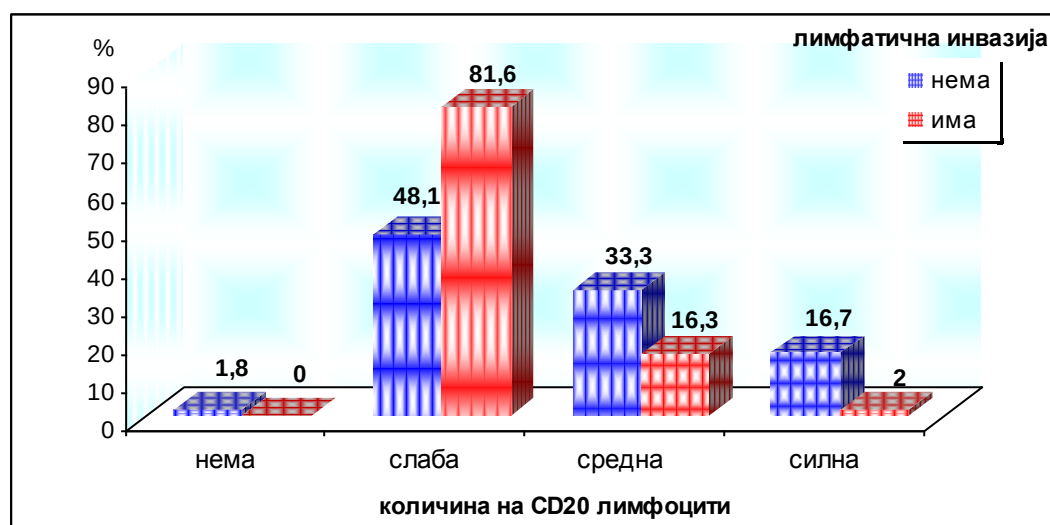
(81,63% наспроти 48,15%), а значајно поретко умерено и силно изразен инфилтрат (16,33% vs 33,33%, 2,04% vs 16,67%, соодветно) (табела 30, слика 33).

**Табела 30. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според инвазија на лимфните садови**

| Лимфатична инвазија | N  | Густина на CD20+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value        |
|---------------------|----|----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|
|                     |    | нема<br>(n=1)              | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |                |
| нема                | 54 | 1 (1,85)                   | 26 (48,15)      | 18 (33,33)       | 9 (16,67)       | <b>0,001**</b> |
| има                 | 49 | 0                          | 40 (81,63)      | 8 (16,33)        | 1 (2,04)        |                |

p (Fisher exact, two tailed test)

\*\*p<0.01



**Слика 33. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на CD20+ лимфоцитите според инвазија на лимфните садови**

#### 7.6.6 Стадиум на болеста

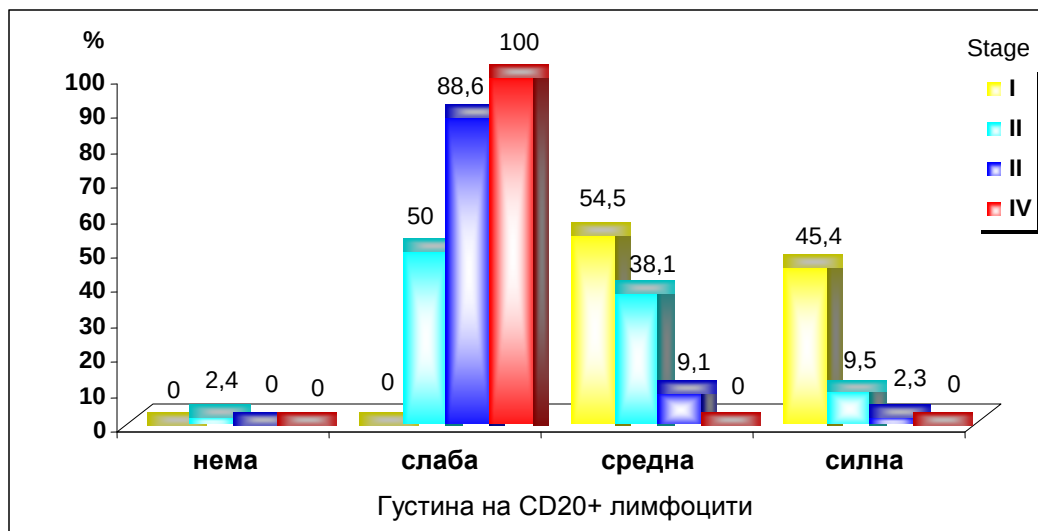
Стадиумот на болеста во кој беше дијагностициран карциномот имаше сигнификантно влијание врз густината на CD20+ лимфоцитите во

инфилтративниот фронт на неоплазмата ( $p < 0,0001$ ). Помала густина на CD20+ лимфоцити значајно почесто имаа пациентите со повисок стадиум на болеста.

Ниска густина на CD20+ лимфоцити имаа сите 6 пациенти со најнапреднат стадиум на болеста (IV), по што следуваа оние со стадиум III (88,64%), и стадиум II (50%), а ниту еден пациент со стадиум I, односно со умерена густина на CD20+ лимфоцити (табела 31, слика 34).

**Табела 31. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

| Стадиум                 | Густина на CD20+ лимфоцити |               |                 |                  |                 | p-value |
|-------------------------|----------------------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|---------|
|                         | N                          | нема<br>(n=1) | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |         |
| I                       | 11                         | 0             | 0               | 6 (54,55)        | 5 (45,45)       | <0,0001 |
| II                      | 45                         | 1 (2,38)      | 24 (23,30)      | 16 (38,1)        | 4 (9,52)        |         |
| III                     | 41                         | 0             | 36 (34,95)      | 4 (9,09)         | 1 (2,27)        |         |
| IV                      | 6                          | 0             | 6 (100)         | 0                | 0               |         |
| p (Kruskal-Wallis test) |                            |               |                 |                  |                 |         |



**Слика 34. Графички приказ на дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

### 7.6.7 Градус на туморот

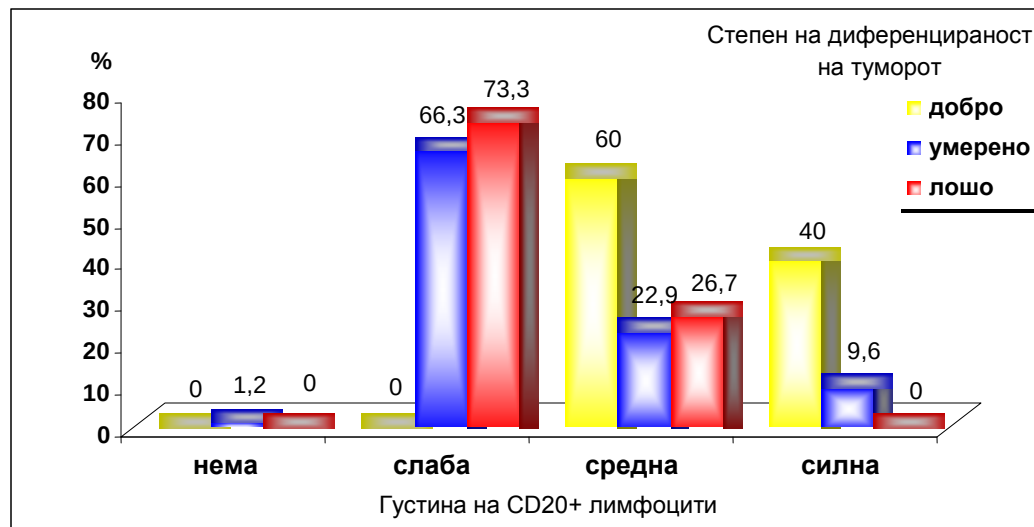
Анализата на резултатите за влијанието на степенот на диференцираност на туморот врз густината на CD20+ лимфоцити во инфилтративната зона на неоплазмата покажа дека ваков лимфоцитарен инфилтрат беше послабо изразен кај полошо дифренцираните тумори, но без статистичка сигнификантност ( $p=0,089$ ).

Слабо изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 66,27% од умерено диференцираните и 73,33% од лошо диференцираните тумори; средно изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше регистриран кај 60% од добро диференцираните, 22,89% од умерено и кај 26,67% од лошо диференцираните тумори; силно изразен CD20+ лимфоцитен инфилтрат беше детектиран кај 40% од добро диференцираните и 9,64% од умерено диференцираните тумори (табела 32, слика 35).

**Табела 32. Дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според градусот на неоплазмата**

| Степен на диференцираност на туморот | N  | Густина на CD20+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value     |
|--------------------------------------|----|----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------|
|                                      |    | нема<br>(n=1)              | слаба<br>(n=66) | средна<br>(n=26) | силна<br>(n=10) |             |
| добро                                | 5  | 0                          | 0               | 3 (60)           | 2 (40)          | 0,089<br>ns |
| умерено                              | 83 | 1 (1,2)                    | 55 (66,27)      | 19 (22,89)       | 8 (9,64)        |             |
| лошо                                 | 15 | 0                          | 11 (73,33)      | 4 (26,67)        | 0               |             |

p (Kruskal-Wallis test)



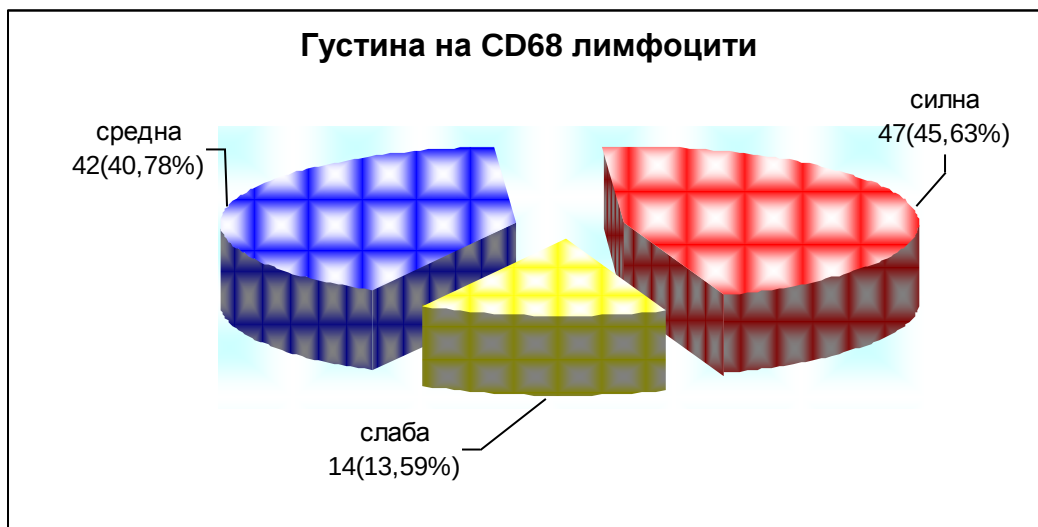
**Слика 35. Графички приказ на дистрибуција на густината на CD20+ лимфоцитите според градусот на неоплазмата**

## 7.7 CD68+ КЛЕТКИ/МАКРОФАГИ

### 7.7.1 Дистрибуција на густината

На слика 36 прикажана е дистрибуцијата на густината на макрофагите (CD68+ клетки) во испитуваната група неоплазми во оваа студија, кај пациенти со КРК.

Кај најголем број пациенти беше детектирано присуство на силно изразен клеточен инфилтрат од CD68+ клетки – 47 (45,63%), проследено од средно изразен – 42 (40,78%) и слабо изразен CD68+ инфилтрат – 14 (13,59%).



**Слика 36. Дистрибуција на густината на CD68+ макрофагите во анализираната серија**

### 7.7.2 Локализација

Анализата на резултатите за густината на CD68+ макрофагите во инфилтративниот фронт на неоплазмата во зависност од локализацијата на туморот покажа дека ниска густина на овие клетки беше детектирана најчесто кај локализација на туморот на десцендентниот колон – 2/3 (66,67%), а потоа кај тумори локализирани на асцендентниот колон – 2/9 (22,22%), додека, пак, воопшто не беше детектирана кај карциноми на хепаталната и лиеналната флексура; умерена густина на CD68+ макрофаги беше детектирана најчесто кај карциноми на цекумот – 7/12 (58,33%), а потоа кај локализација на сигмоидниот колон – 14/29 (48,28%), и ректумот – 13/31 (41,94%), а кај ниту еден случај со карцином на лиеналната флексура. Силна густина на CD68+ макрофаги беше детектирана кај сите три карциноми на лиеналната флексура, висок процент на тумори на хепаталната флексура – 2/3 (66,67%) и ректосигмоидниот дел на колонот – 5/8 (62,5%), кај повеќе од 50% од карциноми на асцендентниот колон –

5/9 (55,56%), додека, пак, кај ниту еден пациент со карцином на десцендентниот колон (табела 33).

**Табела 33. Дистрибуција на густината на CD68+ макрофагите според локализацијата**

|                           | Густина на CD68+ клетки |           |            |            |
|---------------------------|-------------------------|-----------|------------|------------|
|                           | N                       | слаба     | средна     | силна      |
|                           |                         | (n=14)    | (n=42)     | (n=47)     |
| <b>coecum</b>             | 12                      | 1 (8,33)  | 7 (58,33)  | 4 (33,33)  |
| <b>colon ascendens</b>    | 9                       | 2 (22,22) | 2 (22,22)  | 5 (55,56)  |
| <b>flexurae hepaticae</b> | 3                       | 0         | 1 (33,33)  | 2 (66,67)  |
| <b>colon transversum</b>  | 5                       | 1 (20)    | 2 (40)     | 2 (40)     |
| <b>flexurae lienalis</b>  | 3                       | 0         | 0          | 3 (100)    |
| <b>colon descendens</b>   | 3                       | 2 (66,67) | 1 (33,33)  | 0          |
| <b>colon sigmoideum</b>   | 29                      | 3 (10,34) | 14 (48,28) | 12 (41,38) |
| <b>rectosigmoideum</b>    | 8                       | 1 (12,5)  | 2 (25)     | 5 (62,5)   |
| <b>rectum</b>             | 31                      | 4 (12,9)  | 13 (41,94) | 14 (45,16) |

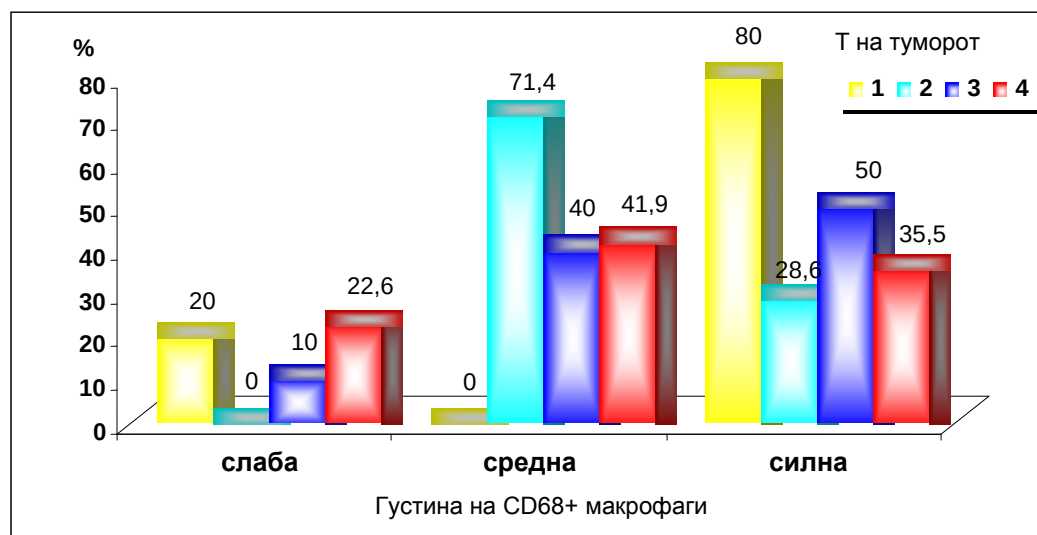
### 7.7.3 Т Статус

Густината на CD68+ макрофагите не зависеше сигнификантно од Т статусот, односно локалниот раст на туморот ( $p=0,21$ ). Ниска густина на макрофаги беше најдена кај 7/31 (22,58%) пациенти со T4, но и кај 1/5 (20%) со T1. Умерена густина на CD68+ макрофаги беше најдена најчесто кај тумори со T2 - 5/7 (71,43%) пациенти, додека голема густина на CD68+ макрофаги беше најдена најчесто кај тумори со T1 – 4/5 (80%), но голема густина беше присутна и кај 50% од туморите со T3 статус (табела 34, слика 37).

**Табела 34. Дистрибуција на густината на CD68+ макрофагите според Т статусот на туморот**

| Т | Густина на CD68+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value |
|---|----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|---------|
|   | N                          | слаба<br>(n=14) | средна<br>(n=42) | силна<br>(n=47) |         |
| 1 | 5                          | 1 (20)          | 0                | 4 (80)          | 0,21 ns |
| 2 | 7                          | 0               | 5 (71,43)        | 2 (28,57)       |         |
| 3 | 60                         | 6 (10)          | 24 (40)          | 30 (50)         |         |
| 4 | 31                         | 7 (22,58)       | 13 (41,94)       | 11 (35,48)      |         |

p (Kruskal-Wallis test)



**Слика 37. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на CD68+ макрофагите според Т статусот на туморот**

#### 7.7.4 N статус

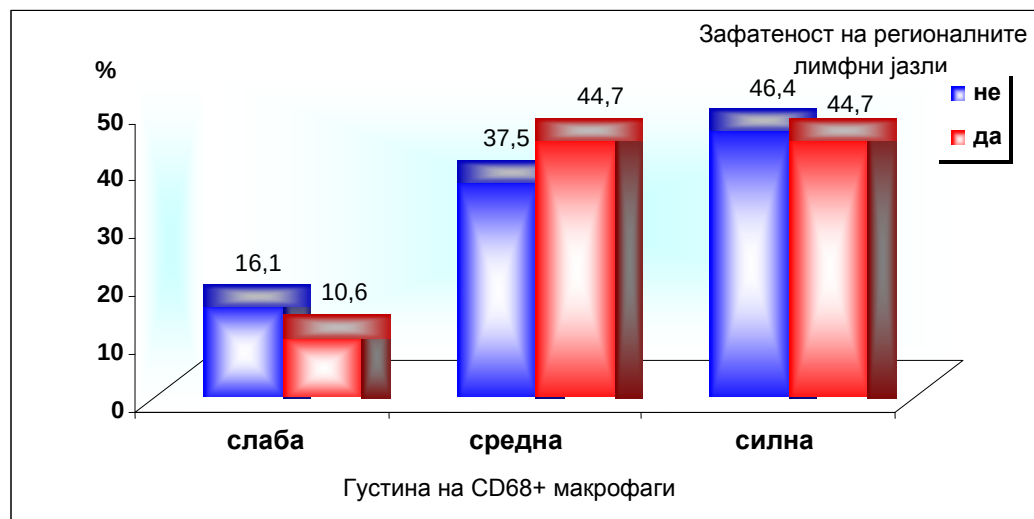
Ниска густина на CD68+ макрофаги беа детектирани кај 16,07% од пациентите без и 10,64% со зафатени регионални лимфни јазли; умерена густина беше детектирана кај 44,68% од пациентите со и 37,5% без зафатени регионални лимфни јазли и голема густина кај 44,68% од пациентите со и 46,43% без зафатени регионални лимфни јазли.

Овие опишани разлики во дистрибуцијата на пациенти без и со зафатени регионални лимфни јазли, а во однос на густината на CD68+ макрофаги во инфилтратот на неоплазмата беа недоволни за статистичка сигнификантност ( $p=0,64$ ) (табела 35, слика 38).

**Табела 35. Дистрибуција на густината на CD68+ макрофагите според зафатеност на лимфните јазли**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на CD68+ лимфоцити |                  |                 | p-value   |
|-----------------------------------------|----|----------------------------|------------------|-----------------|-----------|
|                                         |    | слаба<br>(n=14)            | средна<br>(n=42) | силна<br>(n=47) |           |
| не                                      | 56 | 9 (16,07)                  | 21 (37,5)        | 26 (46,43)      | p=0,64 ns |
| да                                      | 47 | 5 (10,64)                  | 21 (44,68)       | 21 (44,68)      |           |

p (Chi-square test)



**Слика 38. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на CD68+ макрофагите според зафатеност на лимфните јазли**



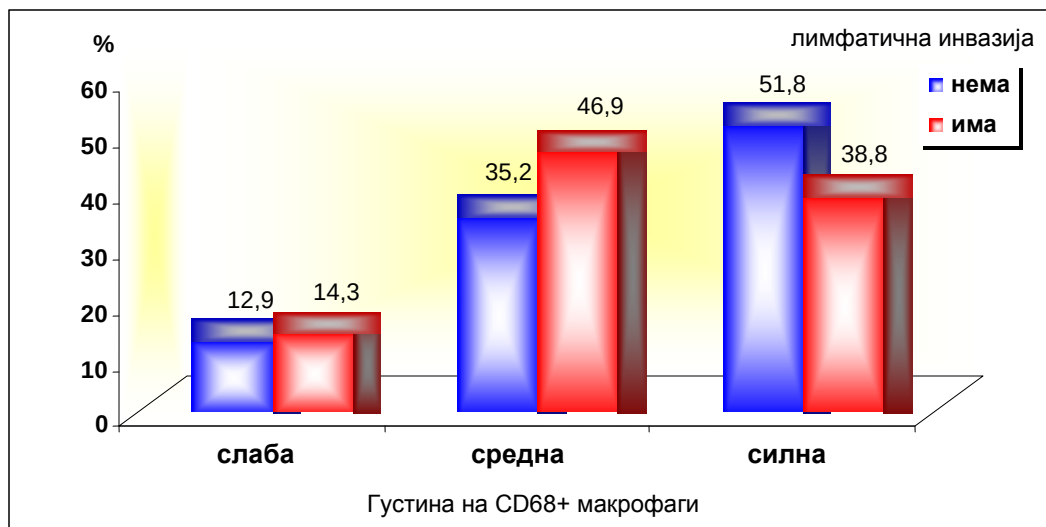
### 7.7.5 Лимфатична инвазија

Не беше најдена сигнификантна разлика помеѓу пациентите без и со лимфатична инвазија во однос на густината на CD68+ макрофагите во инфилтратот на неоплазмата ( $p=0,39$ ).

Процентот на пациенти без и со лимфатична инвазија со слабо изразен инфилтрат од CD68+ макрофаги беше 12,96% наспроти 14,29%, со средно изразен инфилтрат 35,19% наспроти 46,94% и со силно изразен инфилтрат 51,85% наспроти 38,78% (табела 36, слика 39).

**Табела 36. Дистрибуција на густината на CD68+ макрофагите според инвазија во лимфните садови**

| Лимфатична<br>инвазија | Густина на CD68+ макрофаги |           |            |            | p-value   |
|------------------------|----------------------------|-----------|------------|------------|-----------|
|                        | N                          | слаба     | средна     | силна      |           |
|                        |                            | (n=14)    | (n=42)     | (n=47)     |           |
| нема                   | 54                         | 7 (12,96) | 19 (35,19) | 28 (51,85) | p=0,39 ns |
| има                    | 49                         | 7 (14,29) | 23 (46,94) | 19 (38,78) |           |
| p (Chi-square test)    |                            |           |            |            |           |



**Слика 39. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на CD68+ макрофагите според инвазија во лимфните садови**

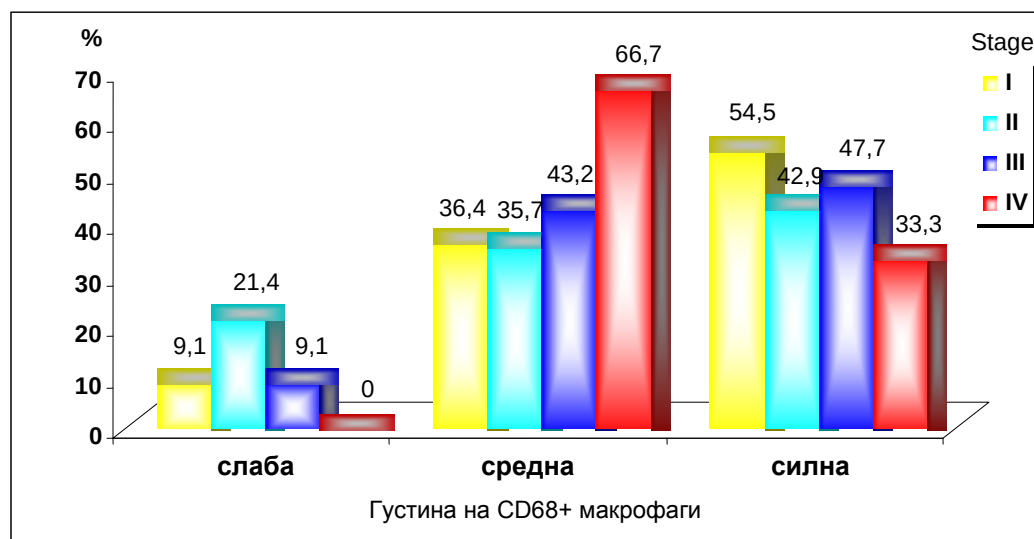
#### 7.7.6 Стадиум на болеста

Статистичката анализа не потврди сигнификантна разлика во густината на CD68+ макрофаги кај пациентите со различен стадиум на болеста ( $p=0,3$ ). Така, од прикажаната дистрибуција се забележува дека мала густина на CD68+ макрофаги беа најдени кај 9,09% од пациентите со стадиум I, но и со стадиум III. Умерена густина на CD68+ макрофаги најчесто имаа пациентите со стадиум IV – 4/6 (66,67%), но и висок процент пациенти со стадиум I – 4/11 (36,36%). Голема густина на CD68+ лимфоцити беше најдена кај повеќе од половина пациенти со стадиум I – 6/11 (54,55%), но и висок процент пациенти со стадиум IV – 2/6 (33,33%) (табела 37, слика 40).

**Табела 37. Дистрибуција на густината на CD68+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

| Стадиум | CD68+ лимфоцити |                 |                  |                 | p-value |
|---------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|---------|
|         | N               | слаба<br>(n=14) | средна<br>(n=42) | силна<br>(n=47) |         |
| I       | 11              | 1 (9,09)        | 4 (36,36)        | 6 (54,55)       | 0,3 ns  |
| II      | 42              | 9 (21,43)       | 15 (35,71)       | 18 (42,86)      |         |
| III     | 44              | 4 (9,09)        | 19 (43,18)       | 21 (47,73)      |         |
| IV      | 6               | 0               | 4 (66,67)        | 2 (33,33)       |         |

p (Kruskal-Wallis test)



**Слика 40. Графички приказ на дистрибуција на густината на CD68+ лимфоцитите според стадиумот на болеста**

### 7.7.7 Градус на туморот

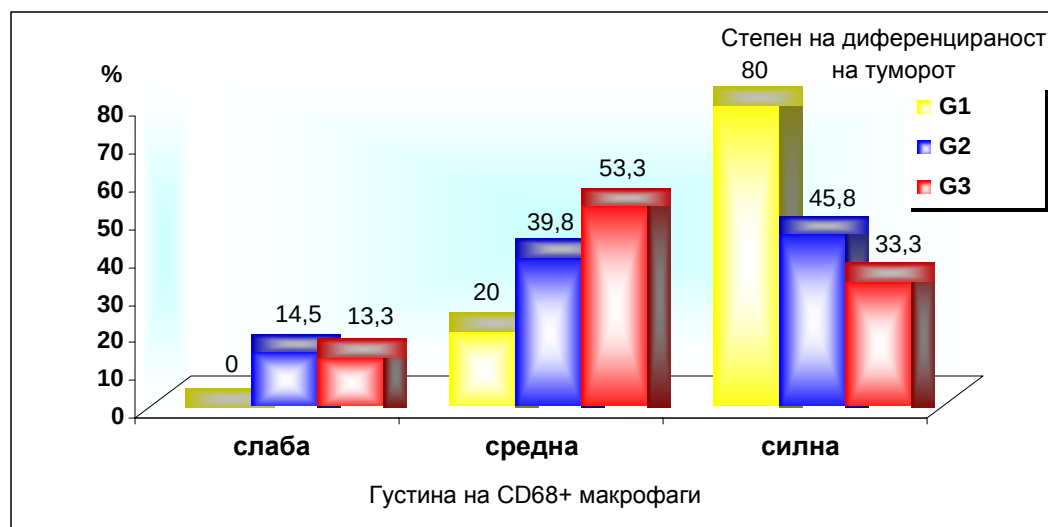
CD68+ макрофагниот инфилтрат беше послабо изразен кај полошо диференцираните карциноми на дебелото црево, но разликата во дистрибуцијата на добро, умерено и лошо диференцирани тумори во однос на слабо, средно и силно изразен CD68+ макрофаген инфилтрат статистички не беше сигнификантна ( $p=0,27$ ).

Слабо изразен CD68+ макрофаген инфилтрат беше детектиран најчесто кај умерено диференцираните тумори – 12/83 (14,46%), средно изразен инфилтрат од CD68+ макрофаги најчесто беше регистриран кај лошо диференцираните тумори – 8/15 (53,33%), а силно изразен CD68+ макрофаген инфилтрат беше детектиран во инфилтративната зона на добро диференцираните тумори – 4/5 (80%) (табела 38, слика 41).

**Табела 38. Дистрибуција на густината на CD68+ лимфоцитите според градусот на диференцираност на туморот**

| Степен на диференцираност на туморот | N  | Густина на CD68+ лимфоцити |                  |                 | p-value |
|--------------------------------------|----|----------------------------|------------------|-----------------|---------|
|                                      |    | слаба<br>(n=14)            | средна<br>(n=42) | силна<br>(n=47) |         |
| добро                                | 5  | 0                          | 1 (20)           | 4 (80)          | 0,27 ns |
| умерено                              | 83 | 12 (14,46)                 | 33 (39,76)       | 38 (45,78)      |         |
| лошо                                 | 15 | 2 (13,33)                  | 8 (53,33)        | 5 (33,33)       |         |

p (Kruskal-Wallis test)

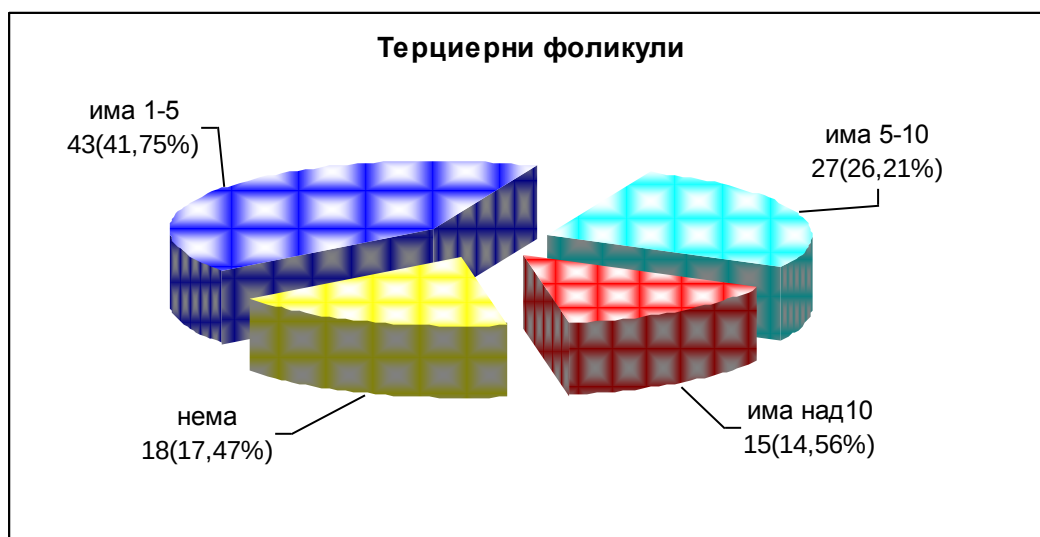


**Слика 41. Дистрибуција на густината на CD68+ лимфоцитите според градусот на диференцираност на туморот**

## 7.8 ТЕРЦИЈАРНИ ЛИМФОИДНИ СТРУКТУРИ (фоликули)

### 7.8.1 Дистрибуција на густината

На слика 42 е прикажана дистрибуцијата на густината на терцијарни лимфоидни структури во инфилтративниот фронт на неоплазмата во анализираната група неоплазми кај пациентите со КРК од оваа серија. Кај најголем број пациенти беше детектирано присуство на 1 до 5 терцијарни фоликули – 43 (41,75%), по што следеа 27 (26,21%) пациенти со присуство на 5 до 10 терцијарни фоликули, 18 (17,48%) пациенти без терцијарни фоликули, и 15 (14,56%) пациенти со наод на повеќе од 10 терцијарни фоликули во инфилтративниот фронт на неоплазмата.



Слика 42. Дистрибуција на терцијарните лимфни фоликули во анализираната серија

### 7.8.2 Локализација

Терцијарни фоликули не беа најдени кај пациентите со карцином на трансверзалниот и десцендентниот колон. Од 1 до 5 терцијарни фоликули во инфилтратот на неоплазмата беа најдени кај сите 3 пациенти со карцином на десцендентниот колон, и кај висок процент пациенти со карцином на лиеналната

флексура – 2/3 (66,67%), односно 50% од пациентите со карцином на цекумот, а кај ниту еден пациент со карцином на хепаталната флексура. Од 5 до 10 терцијарни фоликули беа најдени најчесто кај пациентите со карцином на хепаталната флексура – 2/3 (66,67%), а кај ниту еден пациент со локализација на туморот на лиеналната флексура и десцендентниот колон. Најголема густина на терцијарни фоликули, повеќе од 10, беа најдени најчесто кај ректална локализација на карциномот – 8/31 (25,81%), а кај ниту еден пациент со карцином на цекумот, хепатална флексура, лиенална флексура и десцендентниот колон (табела 39).

**Табела 39. Дистрибуција на ТЛС според локализација на туморот**

| Локализација              | Густина на терцијарни фоликули |                |                   |                    |                     |
|---------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|
|                           | N                              | нема<br>(n=18) | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |
| <b>coecum</b>             | 12                             | 3 (25)         | 6 (50)            | 3 (25)             | 0                   |
| <b>colon ascendens</b>    | 9                              | 2 (22,22)      | 4 (44,44)         | 2 (22,22)          | 1 (11,11)           |
| <b>flexurae hepaticae</b> | 3                              | 1 (33,33)      | 0                 | 2 (66,67)          | 0                   |
| <b>colon transversum</b>  | 5                              | 0              | 2 (40)            | 1 (20)             | 2 (40)              |
| <b>flexurae lienalis</b>  | 3                              | 1 (33,33)      | 2 (66,67)         | 0                  | 0                   |
| <b>colon descendens</b>   | 3                              | 0              | 3 (100)           | 0                  | 0                   |
| <b>colon sigmoideum</b>   | 29                             | 7 (24,14)      | 13 (44,83)        | 6 (20,69)          | 3 (10,34)           |
| <b>rectosigmoideum</b>    | 8                              | 1 (12,5)       | 3 (37,5)          | 3 (37,5)           | 1 (12,5)            |
| <b>rectum</b>             | 31                             | 3 (9,68)       | 10 (32,26)        | 10 (32,26)         | 8 (25,81)           |

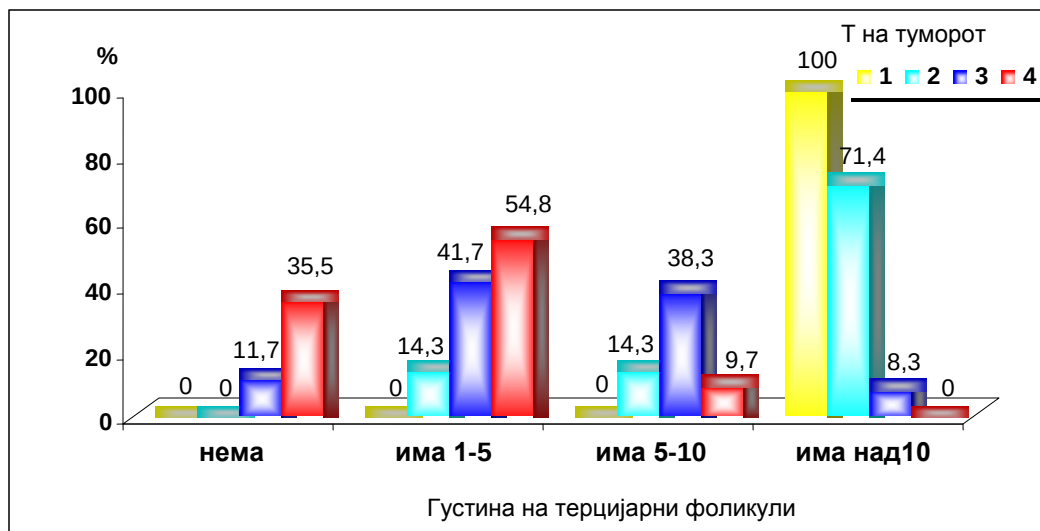
### 7.8.3 Т Статус

За вредност на  $p < 0,0001$ , статистичката анализа потврди сигнификантно влијание на локалниот раст врз туморот на густината на терцијарните фоликули во инфилтративната зона на неоплазмата. Нивната густина беше значајно поголема кај туморите со понизок Т статус.

Кај сите 5 пациенти со Т1, во инфилтративниот фронт на неоплазмата беа изброени повеќе од 10 терцијарни лимфоидни структури. Во групата од 7 пациенти со тумор Т2 исто така најчесто беа регистрирани повеќе од 10 терцијарни фоликули – 5/7 (71,43%). Во групата од 60 пациенти со Т3, во инфилтратот на неоплазмата најчесто беа регистрирани од 1 до 5 терцијарни фоликули – 25/60 (41,67%). И во групата пациенти со Т4 на туморот, најчесто имаше од 1 до 5 терцијарни фоликули – 11/31 (35,48%). Кај ниту еден пациент со Т4 не беа најдени повеќе од 10 терцијарни лимфоидни структури во инвазивниот фронт на нивната неоплазма (табела 40, слика 43).

**Табела 40. Дистрибуција на густината на ТЛС според Т статусот на туморот**

| Т                       | Густина на терцијарни фоликули |                |                   |                    |                     | p-value |
|-------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------|
|                         | N                              | нема<br>(n=18) | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |         |
| 1                       | 5                              | 0              | 0                 | 0                  | 5 (100)             | <0,0001 |
| 2                       | 7                              | 0              | 1 (14,29)         | 1 (14,29)          | 5 (71,43)           |         |
| 3                       | 60                             | 7 (11,67)      | 25 (41,67)        | 23 (38,33)         | 5 (8,33)            |         |
| 4                       | 31                             | 11<br>(35,48)  | 17 (54,84)        | 3 (9,68)           | 0                   |         |
| p (Kruskal-Wallis test) |                                |                |                   |                    |                     |         |



**Слика 43. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на ТЛС според Т статусот на туморот**

#### 7.8.4 N статус

Густината на терцијарни лимфоидни структури сигнификантно се разликуваше помеѓу пациентите без и со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли ( $p=0,000011$ ).

Кај пациентите со зафатени регионални лимфни јазли почесто од оние без зафатени јазли не беа најдени терцијарни фоликули (29,79% наспроти 7,14%). Кај нив исто така почесто беа најдени од 1 до 5 терцијарни фоликули (55,32% наспроти 30,36%). Пациентите со зафатени регионални лимфни јазли поретко од оние без зафатени јазли имаа од 5 до 10 и повеќе од 10 терцијарни фоликули (10,64% наспроти 39,29%; 4,26% наспроти 23,21%) (табела 41, слика 44).

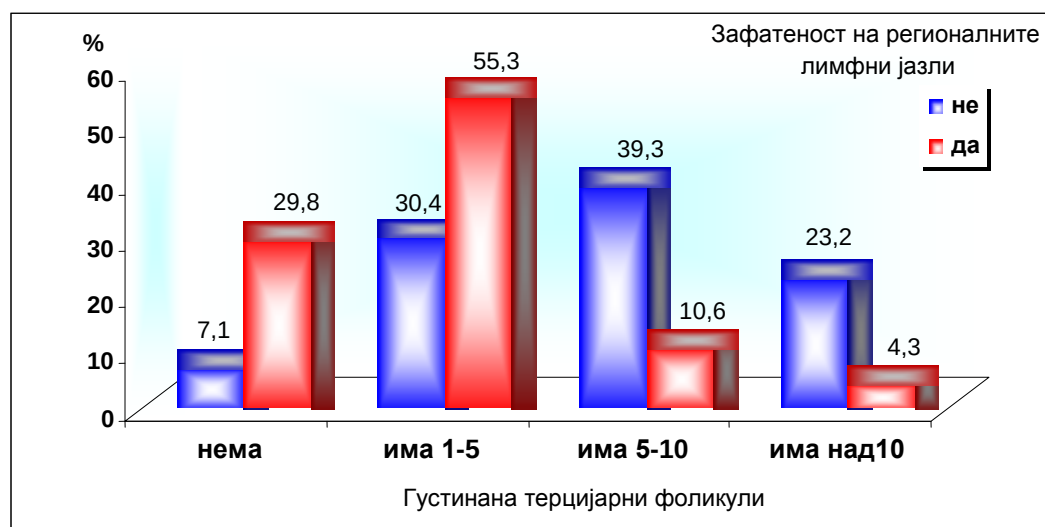


**Табела 41. Дистрибуција на густината на ТЛС според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

| Зафатеност на регионалните лимфни јазли | N  | Густина на терцијарни фоликули |                   |                    |                     | p-value      |
|-----------------------------------------|----|--------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------|
|                                         |    | нема<br>(n=18)                 | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |              |
| не                                      | 56 | 4 (7,14)                       | 17<br>(30,36)     | 22<br>(39,29)      | 13<br>(23,21)       | p=0,000011** |
| да                                      | 47 | 14<br>(29,79)                  | 26<br>(55,32)     | 5 (10,64)          | 2 (4,26)            |              |

p (Chi-square test)

\*\*p<0,01



**Слика 44. Дистрибуција на густината на ТЛС според зафатеност на регионалните лимфни јазли**

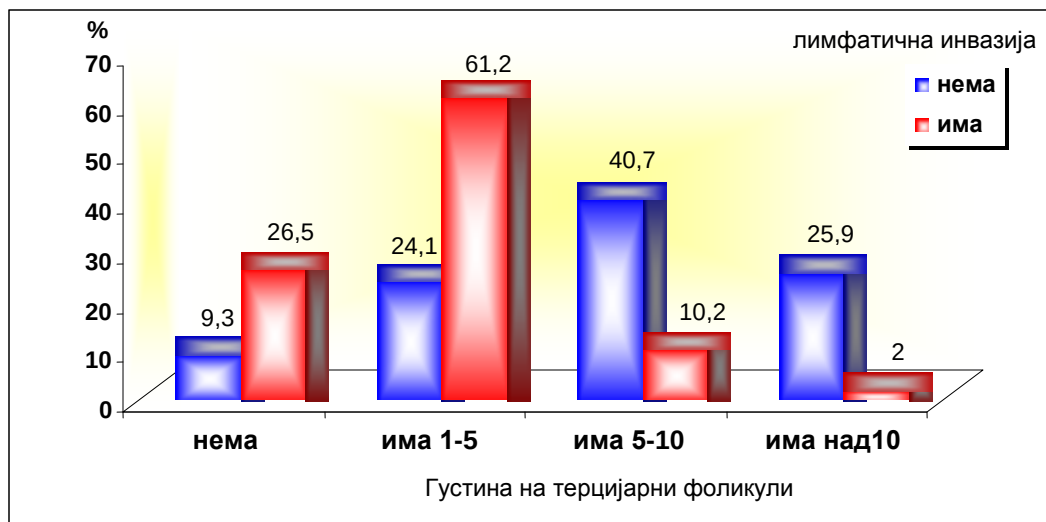
### 7.8.5 Инвазија на лимфни садови

Пациентите без и со лимфатична инвазија сигнификантно се разликуваа во однос на наодот на терцијарни лимфоидни структури (p=0,000001).

Пациентите со лимфатична инвазија почесто од оние без лимфатична инвазија немаа терцијарни фоликули во инфилтративната зона на неоплазмата ( 26,53% наспроти 9,26%). Тие исто така почесто од пациентите без лимфатична инвазија имаа мал број на терцијарни фоликули, од 1 до 5 (61,22% наспроти 24,07%). Поголем број терцијарни фоликули почесто беа изброени кај пациентите без лимфатична инвазија; од 5 до 10 терцијарни фоликули имаа 40,74% пациенти без, а 10,2% со лимфатична инвазија, додека повеќе од 10 терцијарни фоликули беа изброени кај 25,93% од пациентите без и само еден пациент со лимфатична инвазија (табела 42, слика 45).

**Табела 42. Дистрибуција на густината на ТЛС според инвазијата во лимфните садови**

| Лимфатична<br>инвазија | Густина на терцијарни фоликули |                |                   |                    |                     | p-value      |
|------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------|
|                        | N                              | нема<br>(n=18) | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |              |
| нема                   | 54                             | 5 (9,26)       | 13<br>(24,07)     | 22<br>(40,74)      | 14<br>(25,93)       | p=0,000001** |
| има                    | 49                             | 13(26,53)      | 30<br>(61,22)     | 5 (10,2)           | 1 (2,04)            |              |
| p (Chi-square test)    |                                |                |                   |                    |                     |              |
| **p<0,01               |                                |                |                   |                    |                     |              |



**Слика 45. Графички приказ на дистрибуцијата на густината на ТЛС според инвазија во лимфните садови**

### 7.8.6 Стадиум на болеста

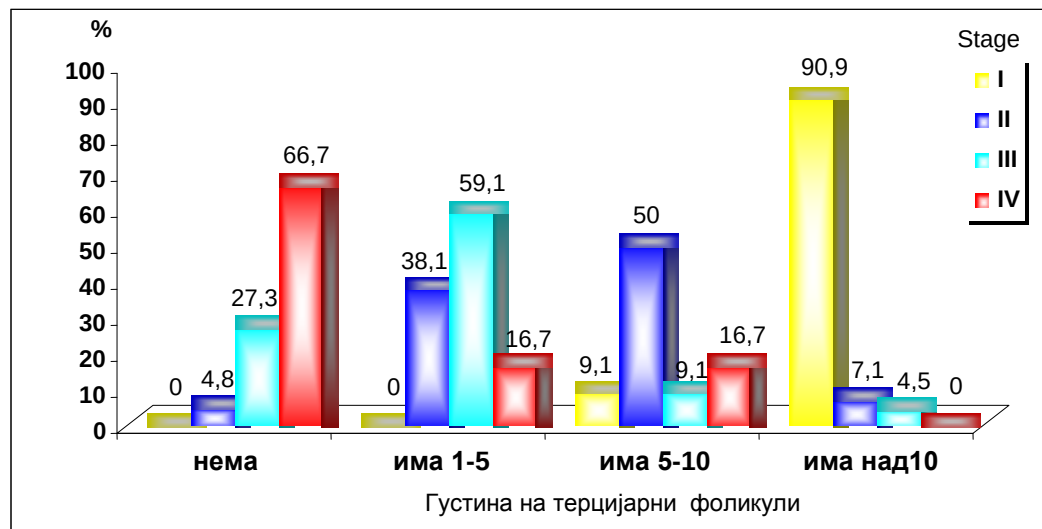
Наодот на терцијарни фоликули во инфилтративниот фронт на неоплазмата сигнификантно зависеше од стадумот во кој болеста беше дијагностицирана ( $p < 0,0001$ ). Помала густина на вакви лимфоидни структури имаа пациентите со колоректален карцином во понапреднат стадиум.

Прикажаната дистрибуција во табелата 43 покажува дека терцијарни фоликули не беа детектирани кај најголем број од пациентите со IV стадиум на болеста - 4/6 (66,67%), терцијарни фоликули во број од 1 до 5 беа најдени најчесто кај пациентите со III стадиум - 26/44 (59,09%), терцијарни фоликули од 5 до 10 најчесто беа најдени кај пациентите со стадиум II – 21/42 (50%), а најголема густина на терцијарни фоликули, над 10, во инфилтратот на неоплазмата беа најдени најчесто кај пациентите со прв стадиум на болеста – 10/11 (90,91%) (табела 43, слика 46).

Табела 43. Дистрибуција на густината на ТЛС според стадиумот на болеста

| Стадиум | Густина на терцијарни фоликули |                |                   |                    |                     | p-value |
|---------|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------|
|         | N                              | нема<br>(n=18) | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |         |
| I       | 11                             | 0              | 0                 | 1 (9,09)           | 10 (90,91)          | <0,0001 |
| II      | 42                             | 2 (4,76)       | 16 (38,1)         | 21 (50)            | 3 (7,14)            |         |
| III     | 44                             | 12<br>(27,27)  | 26 (59,09)        | 4 (9,09)           | 2 (4,55)            |         |
| IV      | 6                              | 4 (66,67)      | 1 (16,67)         | 1 (16,67)          | 0                   |         |

p (Kruskal-Wallis test)



Слика 46. Графички приказ на дистрибуција на густината на ТЛС според стадиумот на болеста

#### 7.8.7 Диференцираност на туморот (G)

Пациентите со добра, умерена и лоша диференцираност на туморот имаа сигнификантно различна густина на терцијарни лимфоидни структури ( $p=0,028$ ).

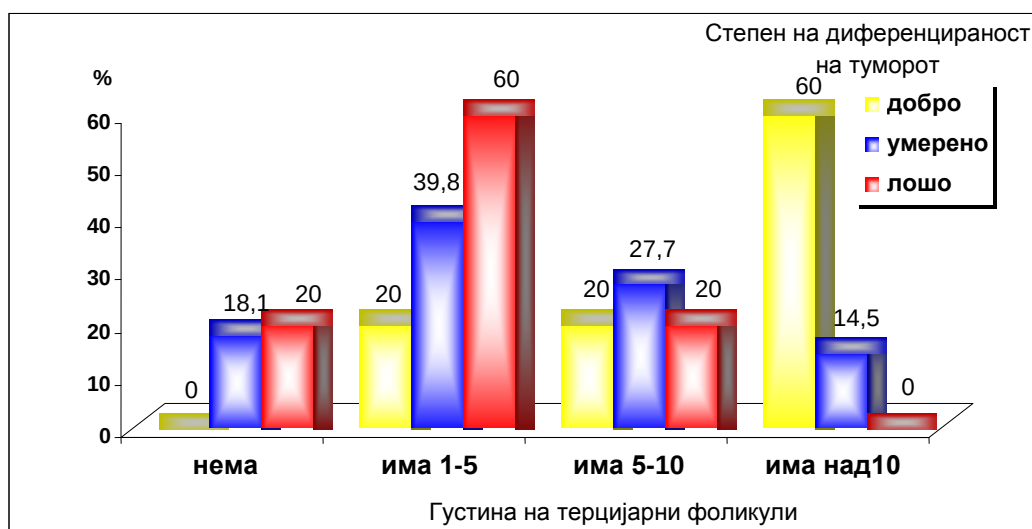
Во групата добро диференцирани тумори имаше најголема густина на терцијарни фоликули, односно кај 3/5 (60%) пациенти беа најдени над 10 терцијарни фоликули. Во групата умерено и лошо диференцирани тумори, најголем број, односно процент имаа од 1 до 5 терцијарни фоликули – 33/83 (39,76%) и 9/15 (60%) пациенти (табела 44, слика 47).

**Табела 44. Дистрибуција на густината на ТЛС според градусот на диференцираност на туморот**

| Степен на диференцираност на туморот | Терцијарни фоликули |                |                   |                    |                     | p-value       |
|--------------------------------------|---------------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------|
|                                      | N                   | нема<br>(n=18) | има 1-5<br>(n=43) | има 5-10<br>(n=27) | има над10<br>(n=15) |               |
| добро                                | 5                   | 0              | 1 (20)            | 1 (20)             | 3 (60)              | <b>0,028*</b> |
| умерено                              | 83                  | 15(18,07)      | 33 (39,76)        | 23 (27,71)         | 12 (14,46)          |               |
| лошо                                 | 15                  | 3 (20)         | 9 (60)            | 3 (20)             | -                   |               |

p (Kruskal-Wallis test)

\*p<0,05



**Слика 47. Графички приказ на дистрибуција на густината на ТЛС според градусот на диференцираност на туморот**

## 7.9. КОРЕЛАЦИИ

Во ова истражување беа анализирани и меѓусебните корелации, односно поврзаности помеѓу CD4+, CD8+, CD20+, CD68+ лимфоцитите, густината на ТАЛ и терцијарните фоликули и нивната поврзаност со Т статусот, стадиумот на болеста и степенот на диференцираност на туморот.

### 7.9.1 Густина на ТАЛ

Корелацијата, односно поврзаноста помеѓу густината на ТАЛ со бројот на терцијарни фоликули, градусот и стадиумот на болеста беше сигнификантна за  $p < 0,01$ , а несигнификантна со степенот на диференцираност на туморот ( $p = 0,76$ ).

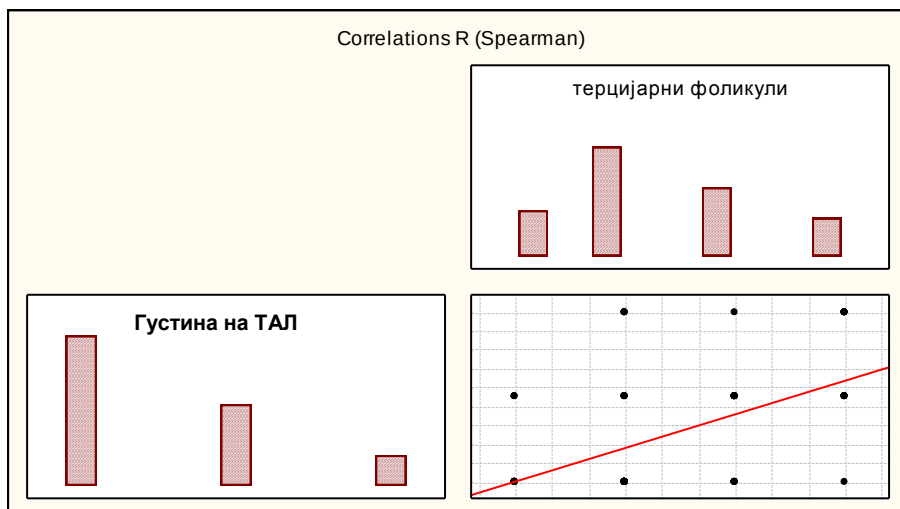
Густината на ТАЛ позитивно или директно корелираше со бројот на терцијарни фоликули ( $R = 0,534$ ), односно поголемата густина на ТАЛ беше поврзана со поголем број терцијарни фоликули, и обратно.

Густината на ТАЛ негативно, индиректно корелираше со локалниот раст на туморот ( $R = -0,352$ ) и со стадиумот на болеста ( $R = -0,566$ ), односно поголема густина беше поврзана со понизок Т (локален раст) и стадиум на болеста, и обратно (табела 45, графикон 5 а-в).

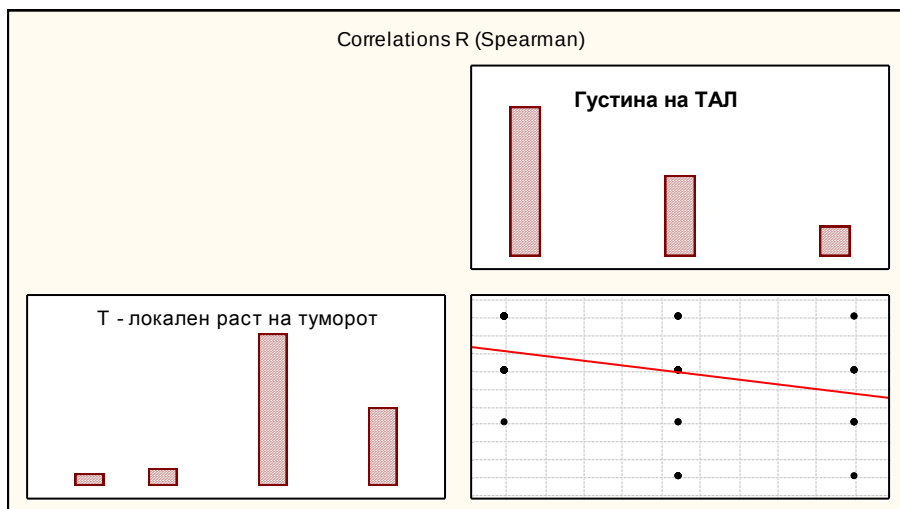
**Табела 45. Корелација на ТАЛ со анализираниите параметри**

| Инфламација               | Spearman | t-test | p-level     |
|---------------------------|----------|--------|-------------|
|                           | R        |        |             |
| ТАЛ / терцијарни фоликули | 0,534    | t=6,35 | p<0,0001**  |
| ТАЛ / Т                   | -0,352   | t=3,78 | p=0,00027** |
| ТАЛ / стадиум             | -0,566   | t=6,90 | p<0,0001**  |
| ТАЛ / G                   | 0,031    | t=0,31 | p=0,76      |

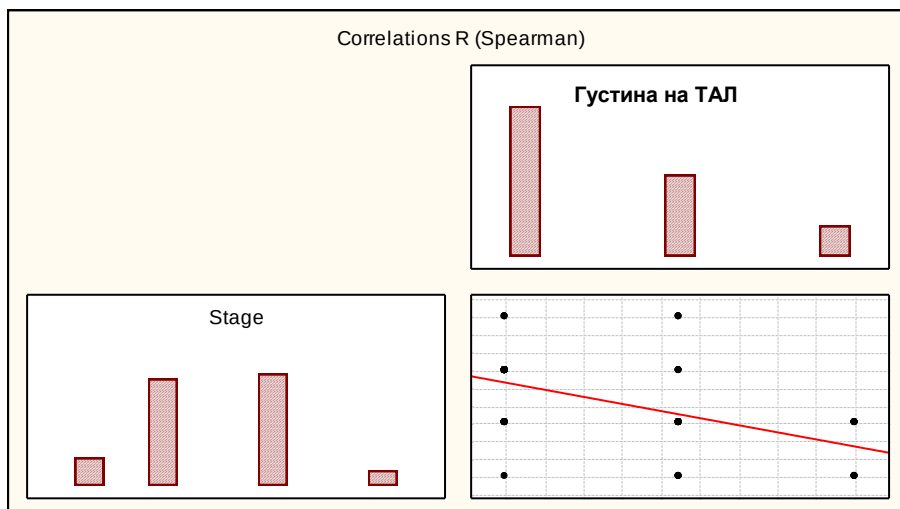
**\*\*p<0,01**



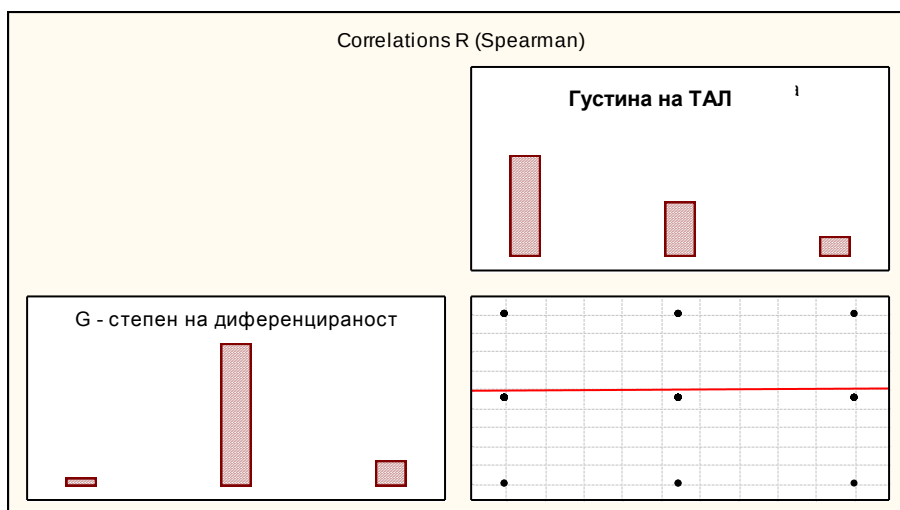
Графикон 5. Корелација на ТАЛ со ТЛС



Графикон 5а. Корелација на ТАЛ со Т статус (локален раст на туморот)



**Графикон 5б. Корелација на ТАЛ со стадиумот на болеста**



**Графикон 5в. Корелација на ТАЛ со градусот на диференцираност**

### 7.9.2 CD4+

Густината на CD4+ лимфоцити, позитивно, односно директно корелираше со останатите елементи од инфилтративниот фронт на неоплазмата, односно со густината на CD8+ лимфоцити ( $R=0,387$ ), CD20+ лимфоцити ( $R=0,016$ ), CD68+ макрофаги ( $R=0,153$ ), со бројот на терцијарни фоликули ( $R=0,039$ ), и со густината на ТАЛ ( $R=0,342$ ). Ова значи дека густината на CD4+ лимфоцити се зголемуваше со зголемување на густината на CD8+ и CD20+ лимфоцити, CD68+ макрофаги, со зголемување на бројот на терцијарни фоликули и со зголемување на густината на



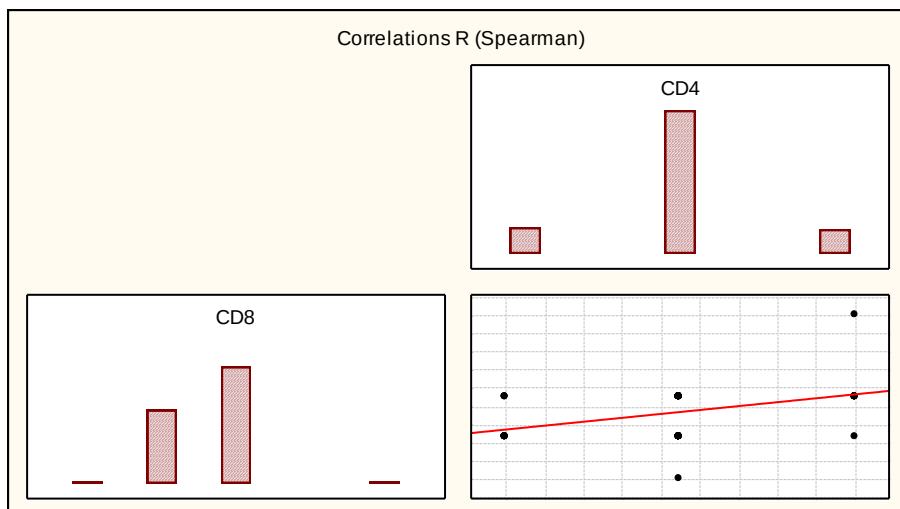
ТАЛ, и обратно, со намалување на сите овие елементи во инфилтративниот фронт на неоплазмата се намалуваше и густината на CD4+ лимфоцити. Како статистички сигнификантна корелација беше потврдена поврзаноста помеѓу CD4+ и CD8+ лимфоцити ( $p=0,000055$ ), и поврзаноста помеѓу CD4+ и густината на ТАЛ ( $p=0,00041$ ).

Густината на CD4+ лимфоцити негативно корелираше со локалниот раст на туморот ( $R= -0,155$ ), со стадиумот на болеста ( $R= -0,034$ ), и со степенот на диференцираност ( $R= -0,091$ ), што значи дека густината на CD4+ лимфоцити беше помала кај туморите со повисок градус, понапреднат стадиум и полош степен на диференцираност на туморот, и обратно. Но, ниту една од овие три корелации не беше потврдена статистички како сигнификантна, односно значајна ( $p>0,05$ ) (табела 46, графикон 6 а-е).

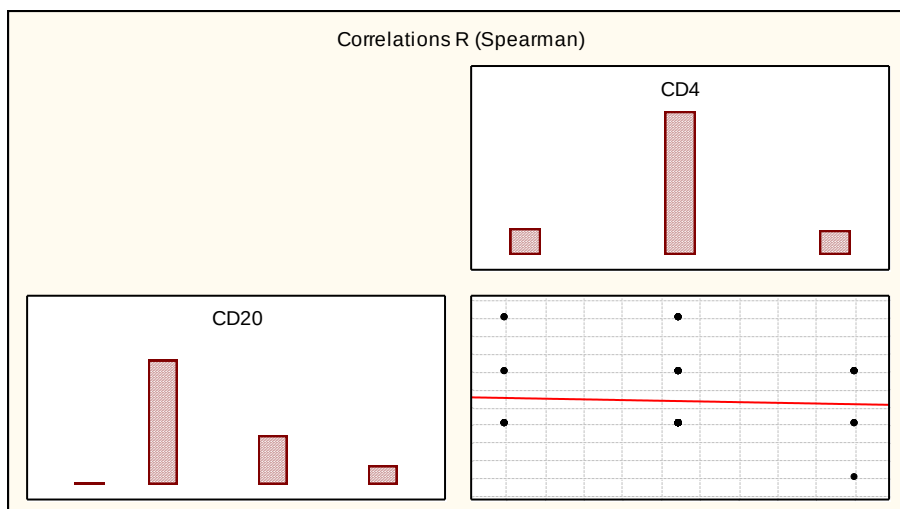
**Табела 46. Корелација на густината на CD4+ лимфоцитите со анализираните параметри**

| CD4+                          | Spearman<br>R | t-test                 | p-level     |
|-------------------------------|---------------|------------------------|-------------|
| CD4+ / CD 8+                  | 0,387         | t=4,21<br>p=0,000055** |             |
| CD4+ / CD 20+                 | 0,016         | t=0,16                 | p=0,87      |
| CD4+ / CD 68+                 | 0,153         | t=1,55                 | p=0,12      |
| CD4+ / терцијарни<br>фоликули | 0,039         | t=0,39                 | p=0,69      |
| CD4+ / ТАЛ                    | 0,342         | t=3,66                 | p=0,00041** |
| CD4+ / T                      | -0,155        | t=1,57                 | p=0,12      |
| CD4+ / Stage                  | -0,034        | t=0,34                 | p=0,74      |
| CD4+ / G                      | -0,091        | t=0,92                 | p=0,36      |

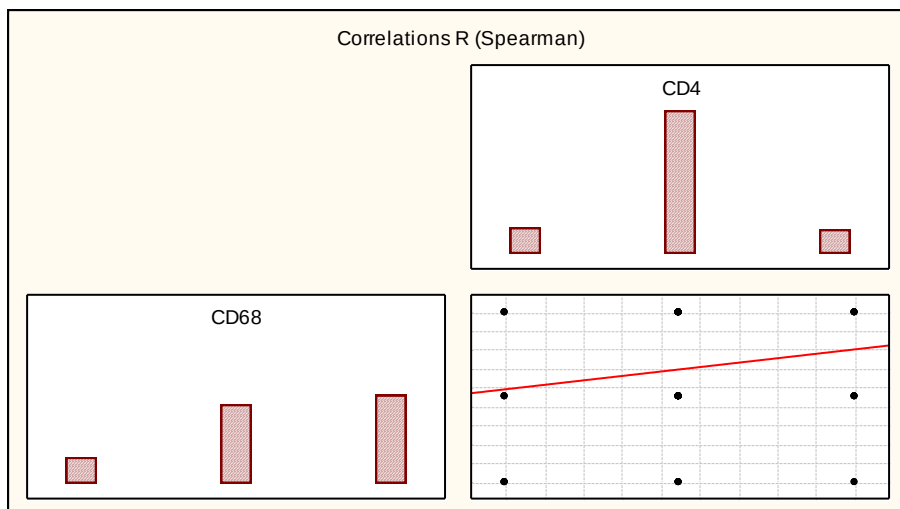
\*\*p<0,01



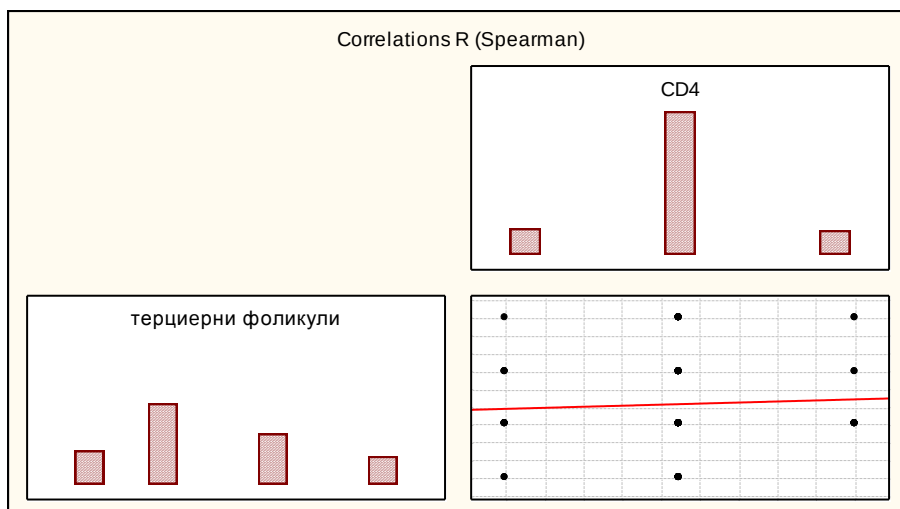
Графикон 6. Корелација на CD4+ лимфоцитите со CD8+ лимфоцитите



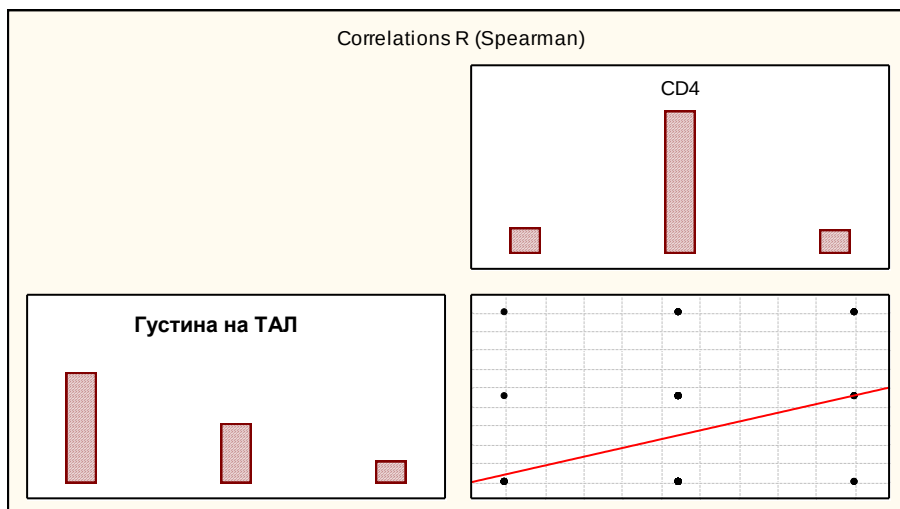
Графикон 6а. Корелација на CD4+ лимфоцитите со CD20+ лимфоцитите



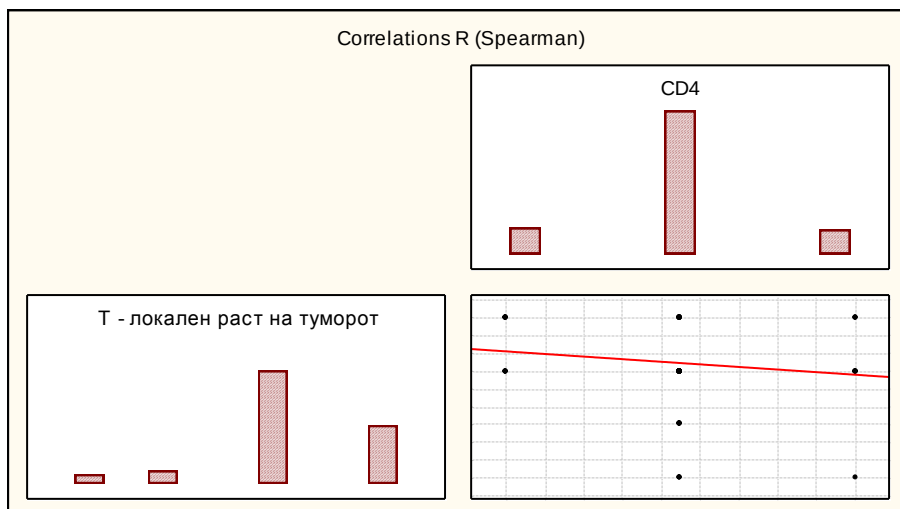
Графикон 6б. Корелација на CD4+ лимфоцитите со CD68+ лимфоцитите



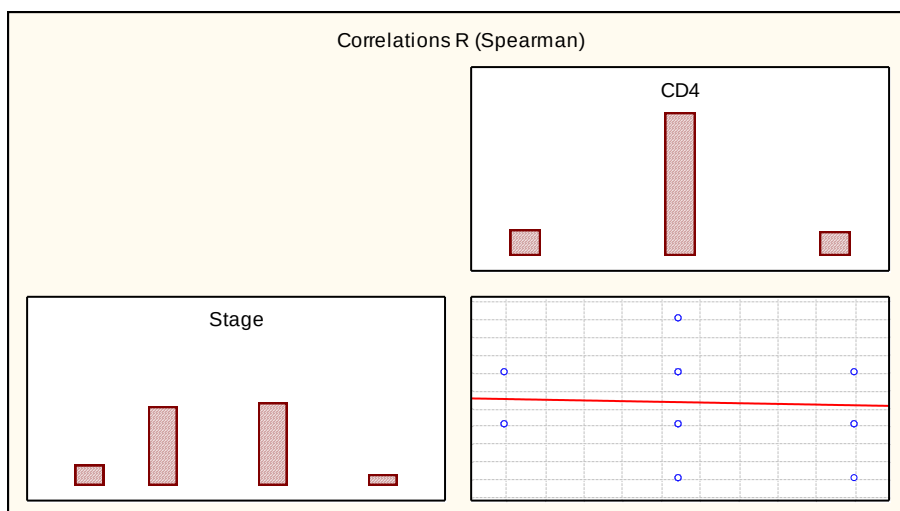
Графикон 6в. Корелација на CD4+ лимфоцитите со ТЛС



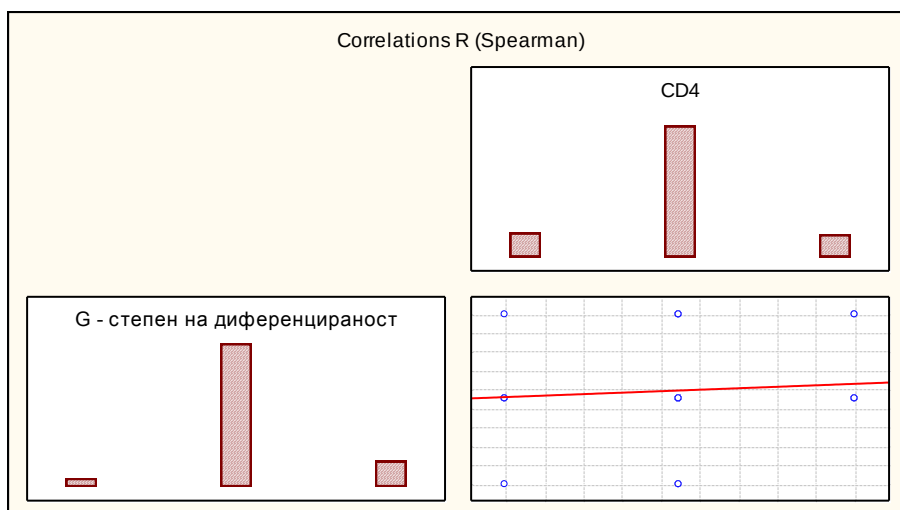
Графикон 6г. Корелација на CD4+ лимфоцитите со ТАЛ



Графикон 6д. Корелација на CD4+ лимфоцитите со Т статусот



Графикон 6г. Корелација на CD4+ лимфоцитите со стадиумот на болеста



Графикон 46е. Корелација на CD4+ лимфоцитите со градусот на диференцираност

### 7.9.3 CD8+

Густина на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата позитивно, директно сигнификантно корелираше со густина на CD68+ лимфоцити ( $R=0,38$ ;  $p=0,000074$ ), со бројот на терцијарни фоликули ( $R=0,545$ ;  $p<0,0001$ ), и со густина на ТАЛ ( $R=0,381$ ;  $p=0,000073$ ); густина на CD8+ лимфоцити се зголемуваа со зголемување на густина на CD68+ лимфоцити,

со зголемување на бројот на терцијарни фоликули и со зголемување на густината на ТАЛ, и обратно.

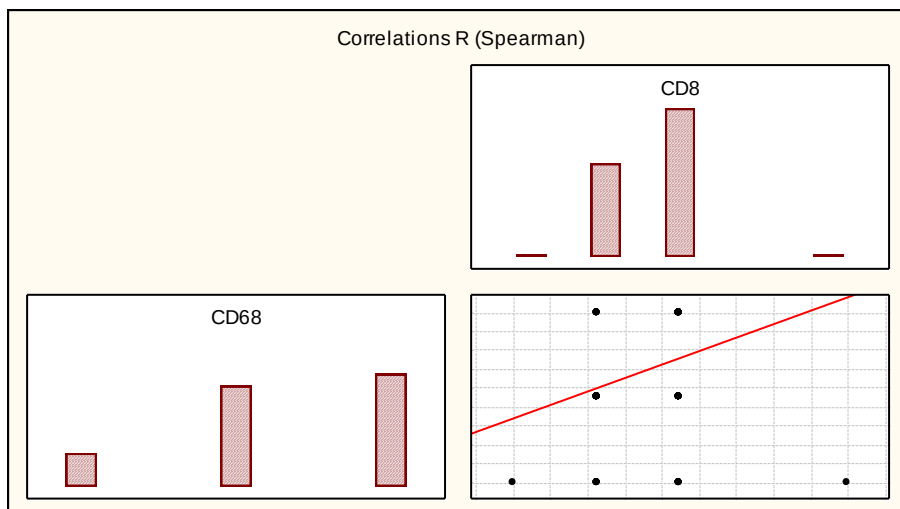
Густината на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата негативно, индиректно корелираше со Т статусот на туморот ( $R = -0,271$ ;  $p = 0,0056$ ), и со стадиумот на болеста ( $R = -0,324$ ;  $p = 0,00084$ ), односно густината на CD8+ лимфоцити беше помала кај туморите со повисок Т и понапреднат стадиум на болеста, и обратно.

Корелацијата помеѓу густината на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на неоплазмата и степенот на диференцираност на туморот беше исто така негативна, но статистички несигнификантна ( $p = 0,28$ ) (табела 47, графикон 7 а-д).

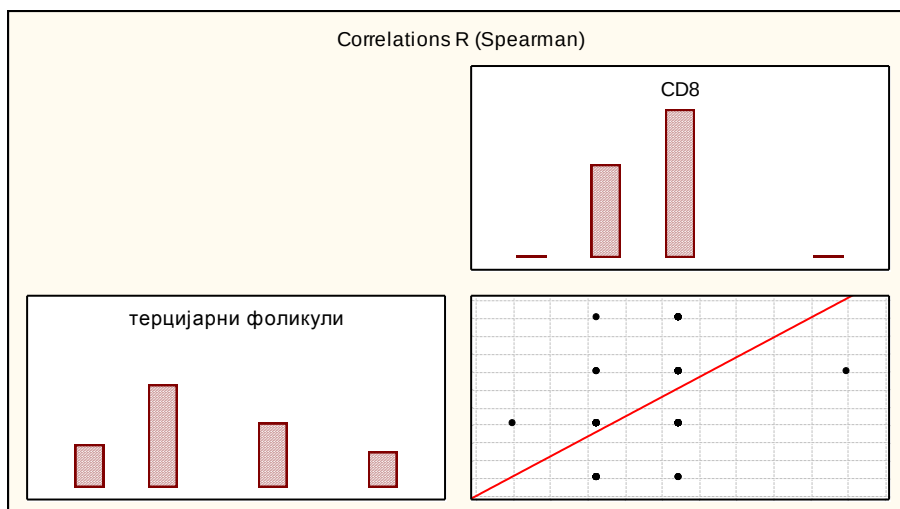
**Табела 47. Корелација на густината на CD8+ лимфоцитите со анализираните параметри**

| CD8+                       | Spearman<br>R | t-test | p-level      |
|----------------------------|---------------|--------|--------------|
| CD8+ / CD68+               | 0,380         | t=4,13 | p=0,000074** |
| CD8+ / терцијарни фоликули | 0,545         | t=6,53 | p<0,0001**   |
| CD8+ / ТАЛ                 | 0,381         | t=4,14 | p=0,000073** |
| CD8+ / Т                   | -0,271        | t=2,83 | p=0,0056**   |
| CD8+ / Stage               | -0,324        | t=3,44 | p=0,00084**  |
| CD8+ / G                   | -0,107        | t=1,08 | p=0,28       |

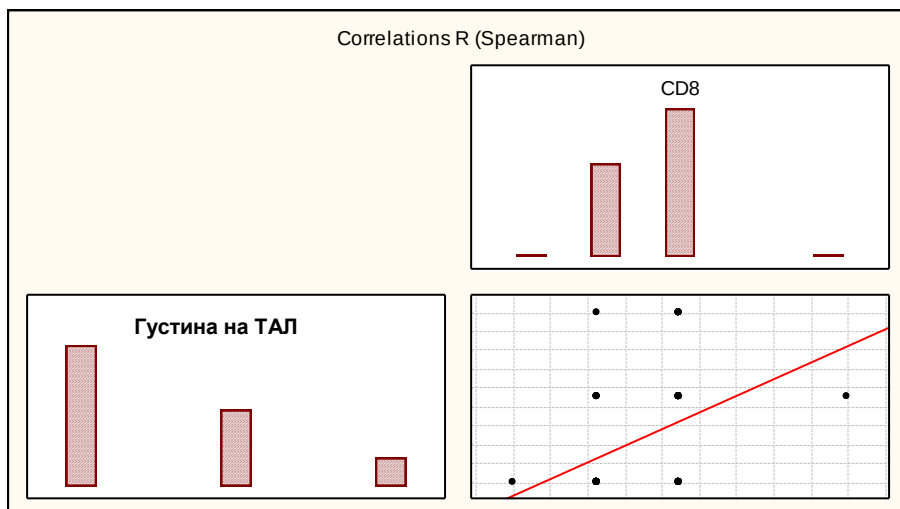
\*\*p<0,01



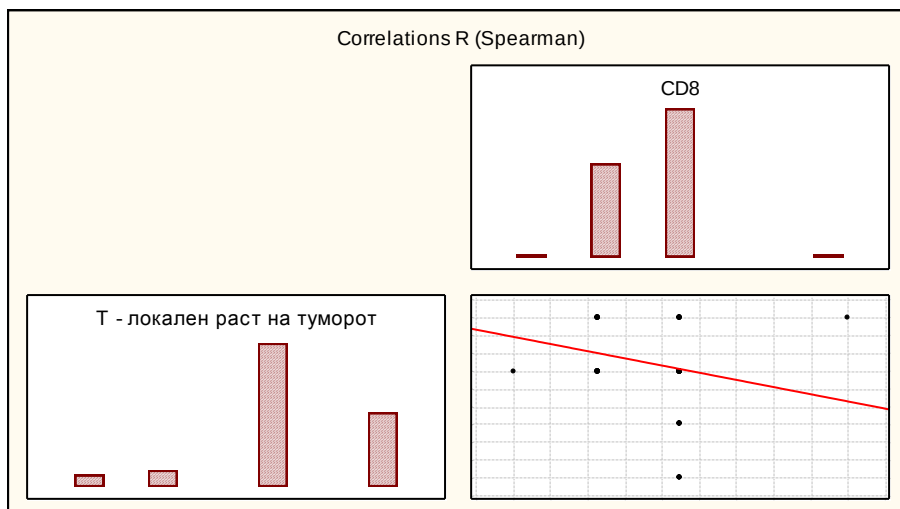
Графикон 7. Корелација на CD8+ лимфоцитите со густината на CD68+ лимфоцитите



Графикон 7а. Корелација на CD8+ лимфоцитите со густината ТЛС

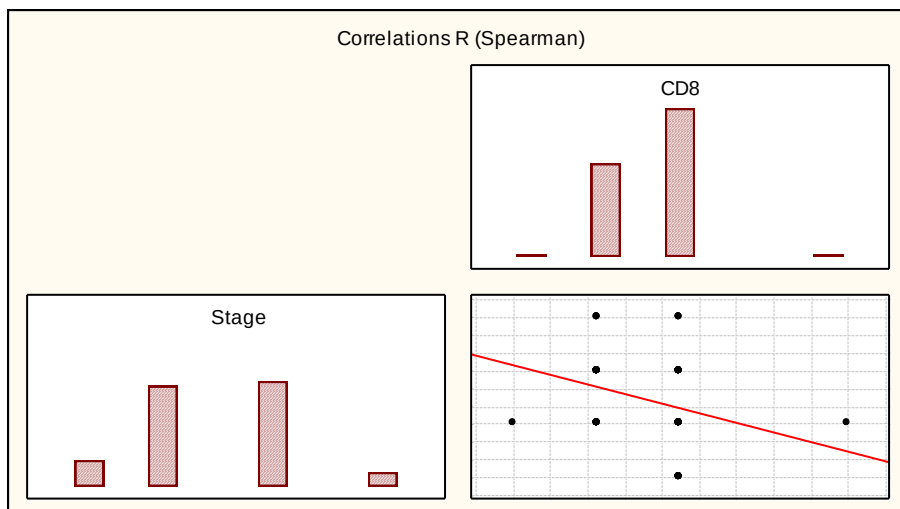


Графикон 7б. Корелација на CD8+ лимфоцитите со густината ТАЛ

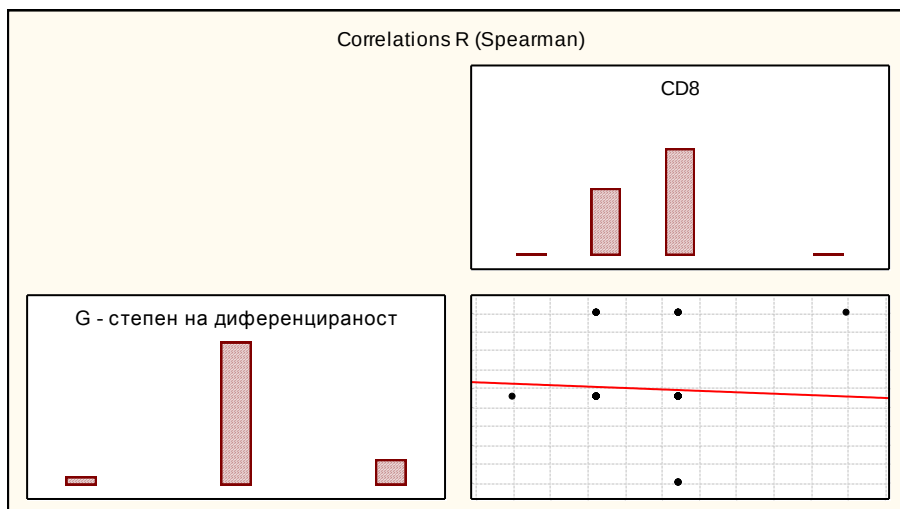


Графикон 7в. Корелација на CD8+ лимфоцитите со Т локалниот раст на туморот





Графикон 7г. Корелација на CD8+ лимфоцитите со стадиумот на болеста



Графикон 7д. Корелација на CD8+ лимфоцитите со градусот на туморот (степен на диференцираност)

#### 7.9.4 CD20+

Густината на CD20+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на неоплазмата позитивно сигнификантно корелираше со густината на CD8+ лимфоцитите ( $R=0,367$ ;  $p=0,00013$ ), со бројот на терцијарни лимфоидни структури ( $R=0,574$ ;  $p<0,0001$ ), и со густината на ТАЛ ( $R=0,436$ ;  $p=0,000004$ ). Според тоа, густината на

CD20+ лимфоцитите се зголемуваше со зголемување на густината на CD8+ лимфоцитите, со зголемување на бројот на терцијарни фоликули, со зголемување на густината на ТАЛ, и обратно.

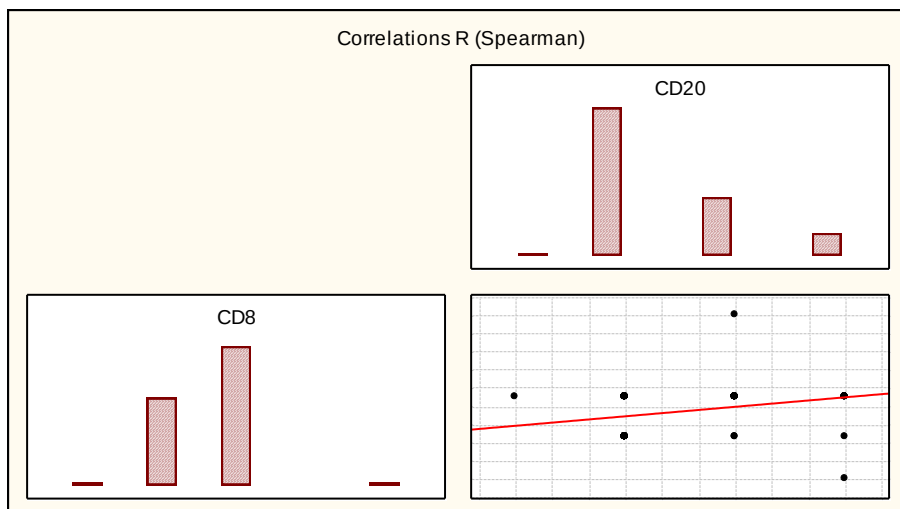
Негативна, односно индиректна статистички сигнификантна корелација се потврди помеѓу густината на CD20+ лимфоцитите со локалниот раст на туморот ( $R = -0,407$ ;  $p = 0,00002$ ), со стадиумот на болеста ( $R = -0,564$ ;  $p < 0,0001$ ) и со степенот на диференцираност на туморот ( $R = -0,22$ ;  $p = 0,025$ ). Ваквата негативна поврзаност значи дека густината на CD20+ лимфоцити беше помала кај туморите со повисок Т, понапреднат стадиум, полоша диференцираност на туморот, и обратно.

Корелацијата помеѓу густината на CD20+ и CD68+ макрофаги во инфилтративниот фронт на неоплазмата беше несигнификантна, односно промената во густината на CD20+ лимфоцити не беше значајно поврзана со промената на густината на CD68+ лимфоцити (табела 46, графикон 8 a-f).

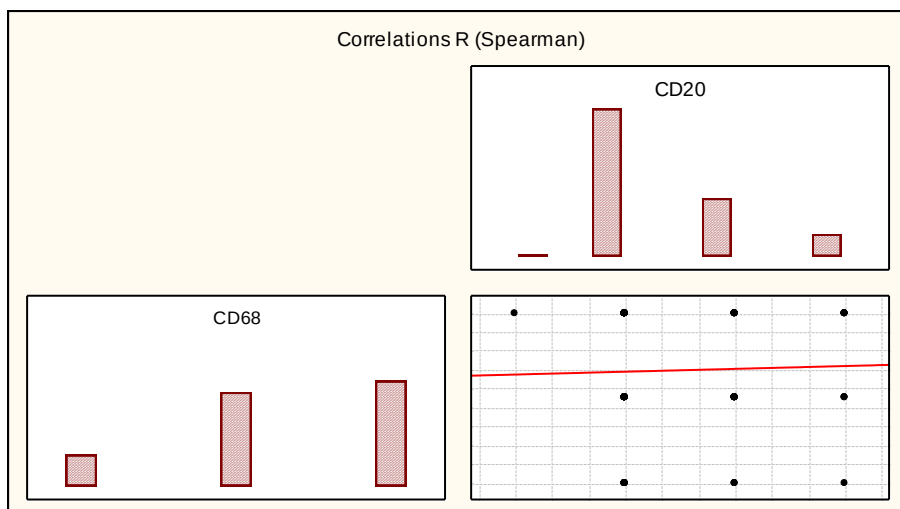
**Табела 48. Корелација на CD20+ лимфоцитите со анализираните параметри**

| CD20+                          | Spearman | t-test                 | p-level     |
|--------------------------------|----------|------------------------|-------------|
|                                | R        |                        |             |
| CD20+ / CD8+                   | 0,367    | t=3,97                 | p=0,00013** |
| CD20+ / CD68+                  | 0,00094  | t=0,09                 | p=0,92      |
| CD20+ / терцијарни<br>фоликули | 0,574    | t=7,04                 | p<0,0001**  |
| CD20+ / ТАЛ                    | 0,436    | t=4,87<br>p=0,000004** |             |
| CD20+ / Т                      | -0,407   | t=4,48                 | p=0,00002** |
| CD20+ / stage                  | -0,564   | t=6,87                 | p<0,0001**  |
| CD20+ / G                      | -0,220   | t=2,27                 | p=0,025*    |

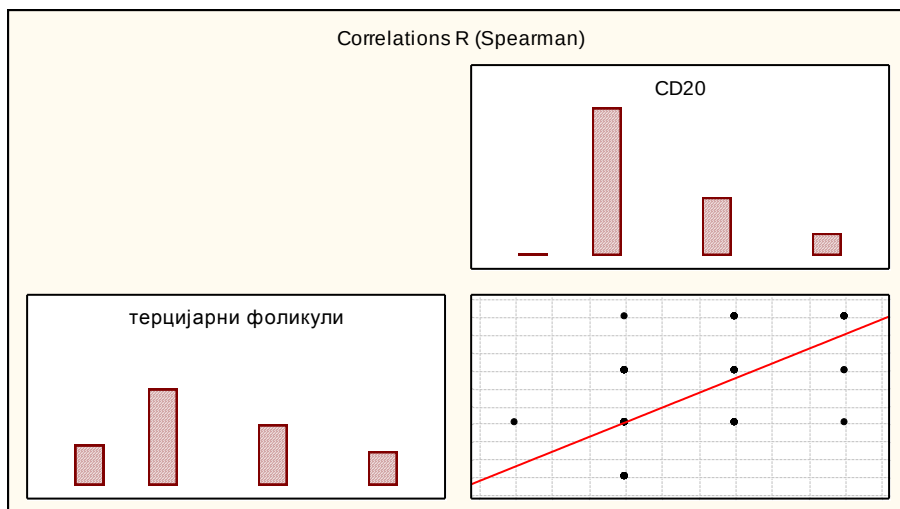
\*p<0,05 \*\*p<0,01



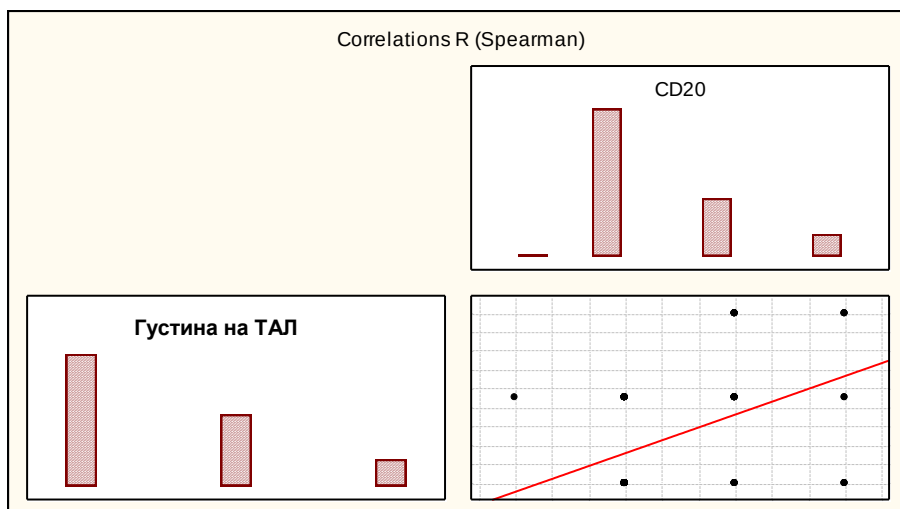
Графикон 8. Корелација на CD20+ лимфоцитите и CD8+ лимфоцитите



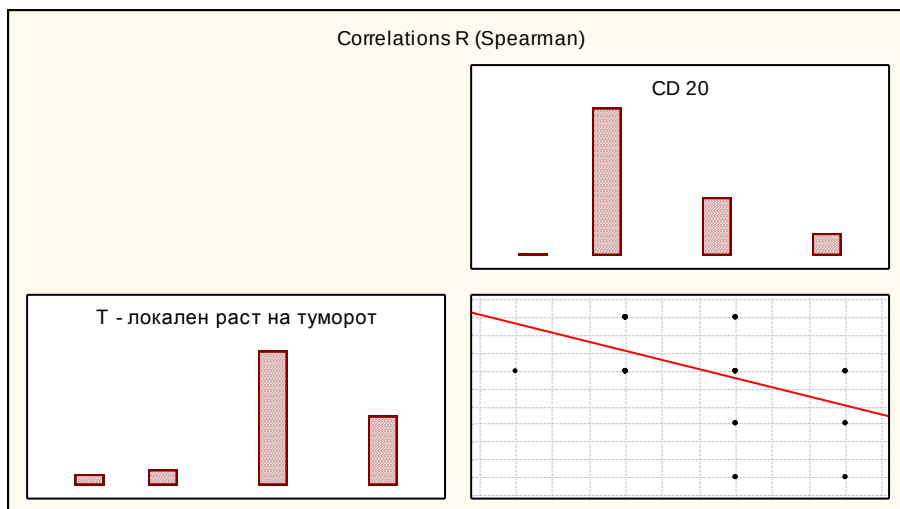
Графикон 8а. Корелација на CD20+ лимфоцитите и CD68+ макрофагите



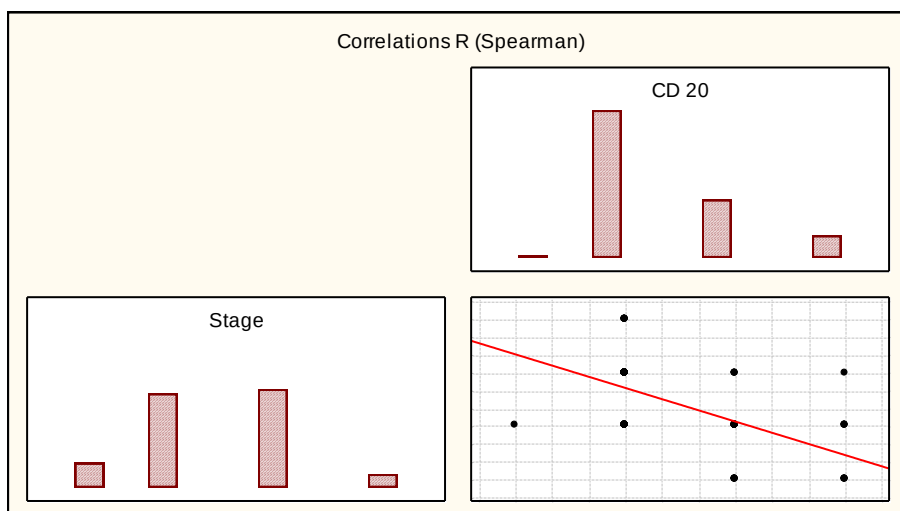
Графикон 8б. Корелација на CD20+ лимфоцитите и ТЛС



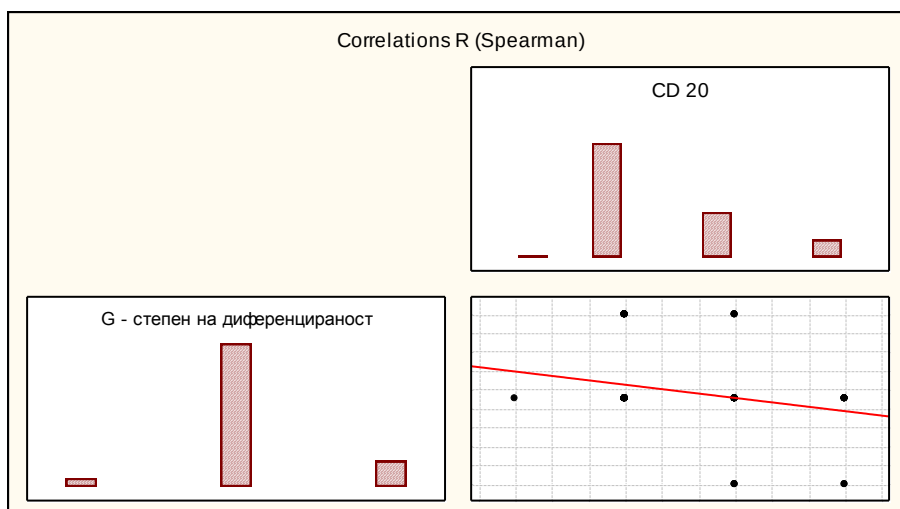
Графикон 8в. Корелација на CD20+ лимфоцитите и густината на ТАЛ



Графикон 8г. Корелација на CD20+ лимфоцитите и Т статусот на туморот



Графикон 8д. Корелација на CD20+ лимфоцитите и стадиумот на болеста



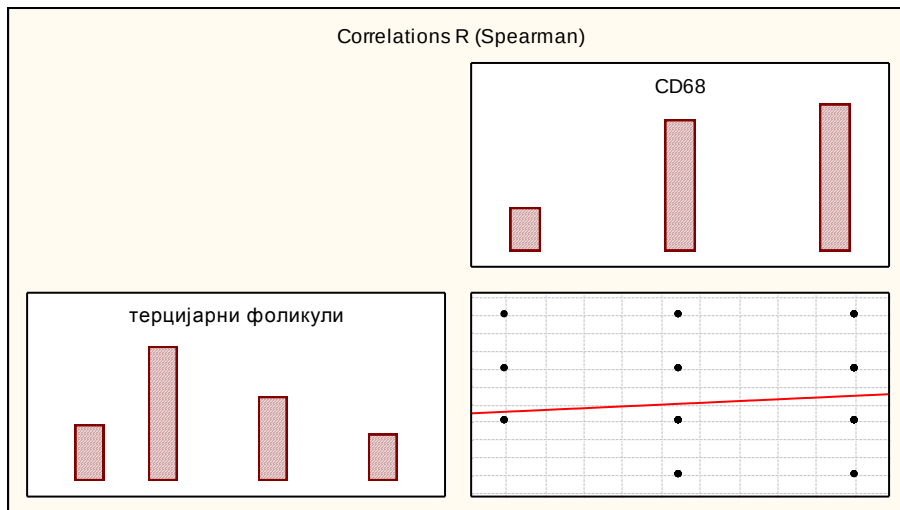
Графикон 8f. Корелација на CD20+ лимфоцитите и градусот на диференцијација

#### 7.9.5 CD68+

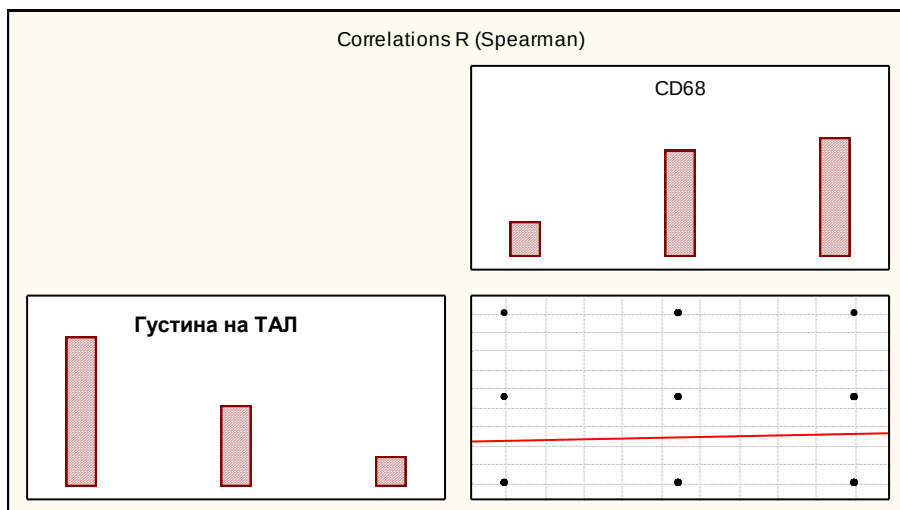
Густината на CD68+ лимфоцитите несигнификантно корелираше со бројот на терцијарни фоликули ( $R=0,154$ ;  $p=0,12$ ), со густината на ТАЛ ( $R=0,078$ ;  $p=0,43$ ), со локалниот раст на туморот ( $R= -0,159$ ;  $p=0,11$ ), со стадиумот на болеста ( $R= 0,025$ ;  $p=0,79$ ) и со степенот на диференцираност на туморот ( $R= -0,143$ ;  $p=0,15$ ) (табела 49, графикон 9 а-г).

Табела 49. Корелација на CD68+ макрофагите со анализираните параметри

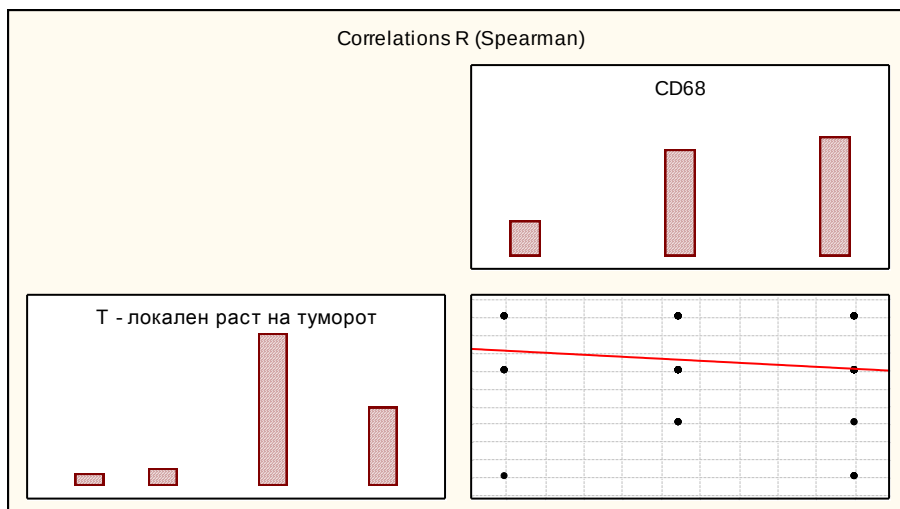
| CD68+ |   |                     | Spearman | t-test  | p-level |
|-------|---|---------------------|----------|---------|---------|
|       |   |                     | R        |         |         |
| CD68+ | / | терцијарни фоликули | 0,154    | t=1,57  | p=0,12  |
| CD68+ | / | ТАЛ                 | 0,078    | t=0,78  | p=0,43  |
| CD68+ | / | T                   | -0,159   | t=1,62  | p=0,11  |
| CD68+ | / | Stage               | 0,025    | t= 0,25 | p=0,79  |
| CD68+ | / | G                   | -0,143   | t=1,45  | p=0,15  |



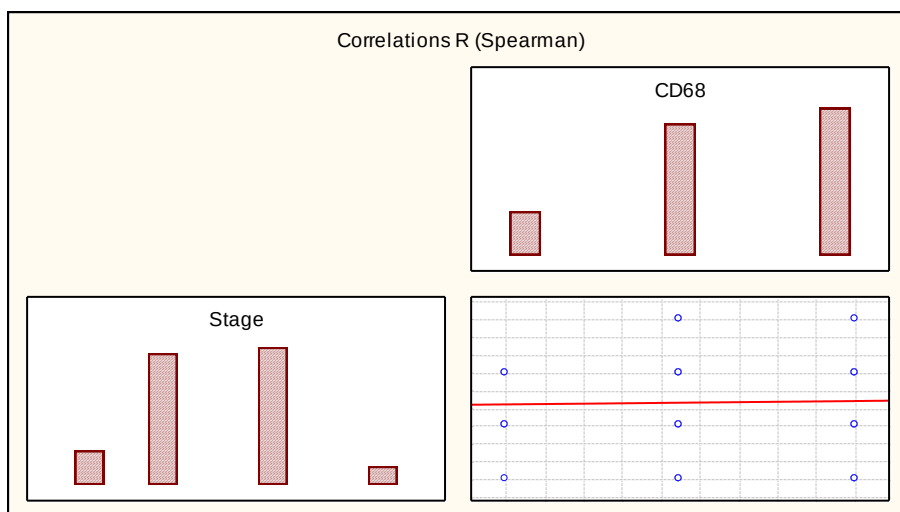
Графикон 9. Корелација на CD68+ макрофагите со ТЛС



Графикон 9а. Корелација на CD68+ макрофагите со густината на ТАЛ

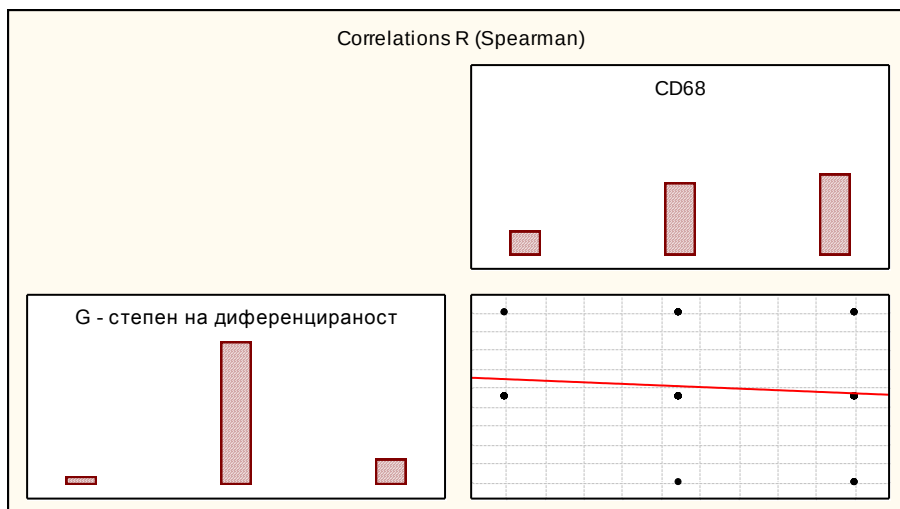


Графикон 9б. Корелација на CD68+ макрофагите со T статусот на туморот



Графикон 9в. Корелација на CD68+ макрофагите со стадиумот на болеста





Графикон 9г. Корелација на CD68+ макрофагите со градусот на диференцијација

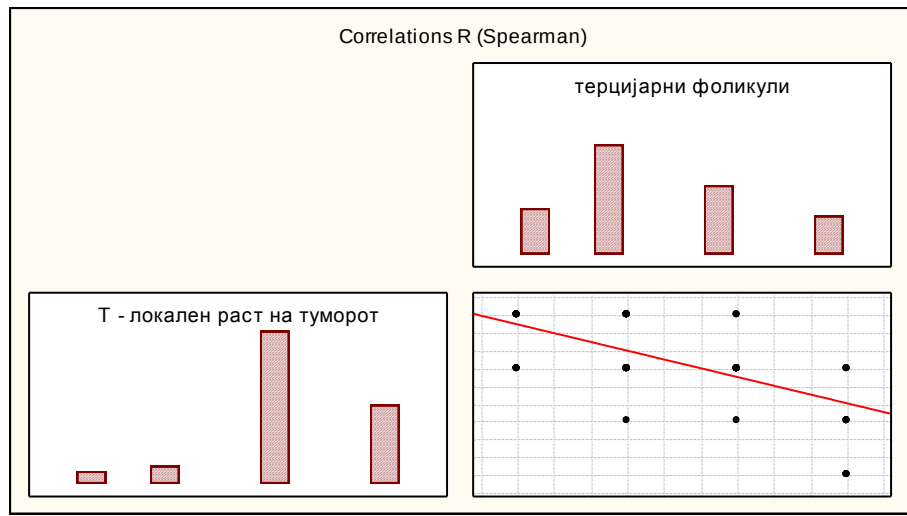
### 7.9.6 Терцијарни лимфоидни структури

Бројот на терцијарни лимфоидни структури негативно, индиректно корелираше со Т статусот на туморот ( $R = -0,576$ ), со стадиумот на болеста ( $R = -0,635$ ), и со степенот на диференцираност ( $R = -0,243$ ). Ова значи дека бројот на терцијарни фоликули беше поголем кај туморите со помал Т (локален раст), понизок стадиум и подобра диференцираност, и обратно. Сите овие три корелации се потврдија и статистички како сигнификантни, и тоа, поврзаноста на бројот на терцијарните фоликули со Т стадиумот и стадиумот на болеста беше за вредност на  $p < 0,0001$ , а со степенот на диференцираност за вредност на  $p < 0,05$  (табела 50, графикон 10 а-б).

Табела 50. Корелација на ТЛС со анализираниите параметри

| Терцијарни фоликули              | Spearman<br>R | t-test<br>t | p-level    |
|----------------------------------|---------------|-------------|------------|
| терцијарни фоликули / Т          | -0,576        | t=7,09      | p<0,0001** |
| терцијарни фоликули /<br>стадиум | -0,635        | t=8,26      | p<0,0001** |
| терцијарни фоликули / G          | -0,243        | t=2,52      | p=0,013*   |

\*p<0,05 \*\*p<0,01



Графикон 10. Корелација на ТЛС со Т статусот на туморот (локалниот раст на туморот)

## 8. ДИСКУСИЈА

### 8.1 ОПШТО

Кога Rudolf Virchow ги опишал воспалителните клетки кај туморите ја поставил теоријата за тоа дека туморите се појавуваат во позадина на хронични воспаленија, што се потврдува со фактот дека ризикот за појава на колоректален карцином е поголем кај пациентите со улцерозен колитис и со Кророва болест. И покрај сознанието дека хроничното воспаление е ризик за појава на малигна неоплазма, многу клинички и експериментални студии ја нагласуваат заштитната улога на имунолошките клетки во прогресијата на карциномот, па оттука и тврдењата и сознанијата дека имунолошкиот одговор игра клучна улога во борбата против растот на туморот и негова дисеминација (32).

Прогресијата на карциномот претставува сложен процес којшто е под влијание на генетски, епигенетски и фактори од околината, но исто така е процес на интеракција на карциномските клетки со нивната микросредина, односно строма. Туморската строма е изградена од различни клетки, меѓу кои се наоѓаат и воспалителните клетки, кои припаѓаат на вродениот и стекнат имун систем (36, 39,40).

Туморската строма (канцер-здружена строма), спротивно на нормалната ткивна строма е погодна средина за ширење на малигните тумори и игра значаја улога во нивниот раст (41,42). Се смета дека интеракциите помеѓу стромата и клетките кај малигните тумори исто така играат значајна улога во нивната прогресија. Во текот на овој процес туморските клетки трпат влијане од сигналите кои доаѓаат од стромалните, ендотелните, инфламаторни и имуни клетки (43). Инфламаторните клетки во туморската строма имаат двојна улога; тие се инволвирани во туморската прогресија, но тумор-инфилтрирачките лимфоцити, исто така наречени и тумор-асоцирачки лимфоцити, кои исто така се присутни во стромата на малигните солидни тумори, се вклучени во елиминација на малигните клетки и превенција на метастазирањето. Поинаку кажано, инфламаторните клетки го

промовираат туморскиот раст, а имуните клетки ја контролираат туморската прогресија и исходот (32,44).

ТАЛ содржат Т лимфоцити, вклучувајќи цитотоксични лимфоцити, кои се составен дел од ефекторниот механизам на антитуморскиот имунитет, како и Б лимфоцити кои може да формираат терцијарни лимфоидни структури (43-46).

Контролата на имуниот систем над туморот се базира на теоријата на 3Е правилото, односно 3-фазната интеракција помеѓу туморот и имуниот систем на домаќинот:

1. Елиминација – фаза во која имуниот систем ги елиминира туморските клетки
2. Еквилибриум - фаза во која имуниот систем го контролира туморот
3. Бегство (Escape) - фаза во која туморските клетки развиваат резистенција на имуниот систем на домаќинот (43,47).

## **8.2 Т И Б ЛИМФОЦИТИ**

Досегашните истражувања покажале дека лимфоцитите кои го инфилтрираат туморот, односно тумор-инфилтрирачките лимфоцити се предоминантно Т лимфоцити меѓу кои се идентификуваат два суптипа: CD4+ и CD8+ Т лимфоцити. CD4+ Т лимфоцитите се Т помошнички клетки, додека CD8+ Т лимфоцитите се цитотоксични клетки способни да ја убијат „таргет клетката“, односно туморската клетка, чии експонирани антигени кои CD8+ Т лимфоцитите се способни да ги препознаат. Тие се способни да ги деструираат туморските клетки во директна клеточна интеракција, со ослободување на литични компоненти (40,49-53).

CD4+ Т лимфоцитите се клетки помошнички, кои сами си ја регулираат својата пролиферација и го координираат имуниот одговор, со стимулирање на другите имуно клетки. Тие се поделени на подгрупи: Т помошнички 1 (Th1) и Т помошнички 2 (Th2) клетки. Th1 CD4+ Т лимфоцитите се одговорни за

пролиферација на цитотоксичните Т лимфоцити, кои учествуваат во убивањето на туморските клетки.

Покрај Т лимфоцитите, меѓу ТАЛ се најдени и Б CD20+ лимфоцити, аранжирани во агрегати, заедно со други имуно клетки. Во лимфните жлезди и другото лимфоидно ткиво Б лимфоцитите примаат сигнали за раст, диференцијација и афинитетна матурација од фоликуларните Т помошнички имуно клетки. Тие диференцираат во плазма клетки и помнечки клетки со долг животен век (54). Процес на лимфоидна неогенеза е опишан кај инфективни болести, хронични воспаленија, автоимуни болести и хронично отфрлање на графт (44,54-56).

ТЛС (терцијарни лимфоидни структури) се привремени акумулации на лимфоидни клетки кои се развиваат во нелимфоидно ткиво, кога во ткивото има хронична инфламација. ТЛС се идентично градени како во лимфоидните органи, односно лимфните јазли. Тие содржат Б зона, во која може да се формира герминативен центар, Т клеточна зона, матурни дендритични клетки и ендотелни венули (46).

Формирањето на ТЛС е опишано кај повеќе солидни малигни тумори, вклучувајќи го КРК (44), но улогата на CD20+ лимфоцитите во терцијарните лимфоидни структури кои се наоѓаат кај овие неоплазми не е до крај разјаснета и сè уште е во фаза на истражување (44). Се смета дека Б лимфоцитите, заедно со другите имуно клетки играат важна улога во инфламаторниот инфилтрат во раните фази на КРК (44,48) и дека ТАЛ влијаат на локалниот и системски антитуморски одговор (48).

Во овие услови Т и Б клетките соработуваат за да создадат силен имун одговор и притоа Б клетките го засилуваат Т клеточниот одговор преку антиген презентација, костимулација и модулација на миграцијата и функцијата на дендритичните клетки (44,54).

Денес е утврдено дека повеќето пациенти со малигни неоплазми развиваат тумор-специфични антитела и дека Б клетките имаат значајна улога во имуниот одговор кон неоплазмата како со разгорување на со канцер-здруженото воспаление, така и

со ефектите што ги имаат врз Т лимфоцитите, макрофагите и клетките од миелоидната лоза (54).

Во ова истражување спроведено за изработка на докторската дисертација беше утврдена статистички сигнификантна корелација помеѓу анализираните суптипови на лимфоцити со негативна корелација помеѓу CD4+ и CD20+ клетките и CD8+ и CD20+, како и позитивна корелација помеѓу CD4+ и CD8+ клетките. Густината на CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцитите беше во статистички значајна позитивна корелација и со густината на ТАЛ. Густината на CD20+ лимфоцитите беше во статистички значајна позитивна корелација со густината на ТАЛ, густината на CD8+ лимфоцитите и бројот на ТЛС.

Овие корелации сугерираат взаемна врска во функцијата на имуните клетки во еден заеднички имун одговор кон туморските антигени.

Како и други тумори, така и КРК за време на фазата на прогресија е инфилтриран од варијабилно количество на воспалителни клетки, меѓу кои Т и Б лимфоцити, макрофаги и маст клетки ( 43,45,48).

ТАЛ се концентрирани во стромата на инвазивниот фронт на туморот. Повеќе автори ја анализирале улогата на ТАЛ во туморската прогресија и преживувањето на пациентите со КРК (37,49-53).

Во литературата се присутни соопштенија дека висока густина на ТАЛ е почеста кај КРК со понизок стадиум, кај тумори со понизок Т статус, кај КРК без нодални и без далечни метастази (26,34,39).

Некои автори сметаат дека видот, густината и локализацијата на имунолошките клетки во колоректалниот карцином може да бидат супериорен и независен прогностички фактор за прогресија на туморот. Galon J. и соработниците ги карактеризирале тумор-инфилтрирачките имуни клетки кај КРК со профилирање на генската експресија и имунохистохемиски. Тие утврдиле дека типот, густината и локализацијата се подобри претскажувачи за преживувањето на пациентите со КРК во однос на тековните хистопатолошките параметри за одредување на

стадиумот на болеста. Авторите заклучиле дека стекнатиот имун одговор влијае врз однесувањето на хуманите тумори и дека ТАЛ може да бидат вреден прогностички фактор при третманот на КРК (32).

Иако долго време се сметало дека колоректалниот карцином е лош имуноген тумор, новите сознанија сугерираат дека постои значителен имун одговор кон оваа болест и дека присуството на имуниот одговор е поврзано со подобрена прогноза на пациентите со колоректален карцином, односно дека зголеменото присуство на Т цитотоксични лимфоцити е поврзано со отсуство на рани метастази и отсуство на рани рецидиви и дека типот, густината и локацијата на имуните клетки имаат прогностичко значење кај колоректалниот карцином (32,37,45)

Оттука произлегува дека тумор-асоцирачките лимфоцити може да обезбедат важни прогностички информации кај пациентите со колоректален карцином кои би се искористиле за третман со адјувантна терапија во различен стадиум на карциномот (44).

Rorropen KM. и соработниците прогностичкото влијание на ТАЛ го анализирале уште во 1997 година и заклучиле дека ТАЛ, ТНМ класификацијата, хистолошкиот градус и Dukes-овиот стадиум се сигнификантни предикторни фактори кај пациентите со КРК. Тие утврдиле дека ТАЛ се и независен предиктивен фактор за преживувањето без рецидив (57).

ТЛС, исто како и ТАЛ, се детектирани во инвазивниот фронт на неоплазмите кај различни типови малигни тумори и се смета дека нивната густина е во корелација со пролонгирано преживување на пациентите со карцином на градата, серозен оваријален карцином, неситноклеточен белодробен карцином и КРК (32, 44,54). Сепак, литературните податоци за улогата на ТЛС во имуниот одговор кај КРК, како и податоците за корелацијата на густината на ТЛС со прогностичките фактори од ТНМ класификацијата се сè уште ограничени во споредба со податоците достапни за улогата на ТАЛ.

Се смета дека ТЛС во солидните тумори имаат улога во организацијата на локалниот имун одговор и во регрутирање на лимфоцити. Di Caro G. и соработниците, тргнувајќи од објавените податоци дека ТЛС имаат улога во клиничкиот исход на пациентите со КРК, ја анализирале појавата на ТЛС, нивната корелација со ТАЛ и нивното клиничко значење кај 351 пациент со II и III стадиум неметастатска болест и исто така ја анализирале улогата на ТЛС во регрутирањето на лимфоцитите во глумчешки модел. Авторите нашле организирани ТЛС и кај хуманиот и кај глумчешкиот модел на КРК кои корелираше со густината на CD3+ тумор-инфилтрирачките лимфоцити. Тие утврдиле дека ТАЛ се населуваат во ТЛС и заклучиле дека густината на ТЛС и ТАЛ корелираат и се координирани во предвидувањето на подобра прогноза кај пациентите со КРК во ран стадиум. Авторите заклучиле дека ТЛС претставуваат нов биомаркер за КРК (32).

Meshcheryakova A. и соработниците ја анализирале густината на Б лимфоцитите и ТЛС на границата од црнодробни метастази кај 65 пациенти со КРК и нашле големо количество акумулирани CD45+ и CD20+ лимфоцити на границата на метастатскиот депозит. Со униваријантна анализа потврдиле дека пациентите со висока густина на CD20+ лимфоцити и ТЛС имале статистички понизок ризик за рецидив и биле со пролонгирано преживување. Авторите заклучиле дека количеството на Б лимфоцити и ТЛС претставува нов прогностички маркер, кој е супериорен над клиничко-патолошките параметри кај пациентите со КРК (58).

Резултатите од анализата на ТАЛ во инвазивниот фронт на карциномот во групата пациенти со колоректален карцином, анализирани во оваа студија за изработка на докторската дисертација, покажаа присуство на Т (CD4+ и CD8+) и В (CD20+) лимфоцити и дека нивната густина сигнификантно корелира со клиничко-патолошките параметри за прогресија на болеста. Густината на ТАЛ беше повисока кај пациентите со понизок стадиум (I и II) на болеста, кај тумори со помала локална инвазија, кај пациенти без нодални метастази и кај тумори без лимфатична инвазија. Густината на CD8+ и CD20+ лимфоцити во неоплазмата беше поголема кај пациентите без метастази во лимфните жлезди и со понизок



стадиум на болеста. Помала густина на CD20+ лимфоцити беше најдена во неоплазмите на пациентите со понапреден локален раст на неоплазмата и лимфатична туморска инвазија. Оттука произлегува дека густината на тумор-асоцирачките лимфоцити може да претставува параметар за прогресија на неоплазмата кај пациентите со колоректален карцином.

Во однос на ТЛС, во ова студија беше најдена значајна статистичка разлика во густината на ТЛС кај пациентите со различен стадиум, различен Т статус, со и без лимфатична инвазија и со различен градус на диференцијација. Густината на ТЛС беше повисока кај пациентите со понизок стадиум, понизок Т статус, пациентите без лимфатична инвазија и кај пациентите кои имаа подобро диференцирани тумори.

Кај пациентите со КРК активацијата на имунолошкиот систем се одвива преку две компоненти: локален имунолошки одговор (во туморската средина) и системски имунолошки одговор (крвта) (59).

Повеќето студии кои го истражуваат и анализираат имунолошкиот одговор кај пациенти со КРК се задржуваат на локалниот имунолошки одговор, бидејќи улогата на системскиот имунитет врз туморската прогресија не е со сигурност докажана (60). Како и да е, испитувањата на туморската микросредина како резервоар на имунолошки клетки против малигниот процес има одредени ограничувања бидејќи ова испитување не е лесно, тешко е достапно и не е евтино (61).

Истражувањата објавени во литературата одат во насока на паралелно испитување на системскиот и локалниот имунолошки одговор кај пациенти со малигна болест. Добиените резултати од периферната крв како деривати на системскиот одговор, како и микроскопското испитување на туморската микросредина може да бидат корисен показател за дијагнозата и прогнозата на болеста, а исто така да помогнат и во давање насоки во индивидуалната онколошка терапија (62).

Клиничките и патолошките карактеристики на неоплазмата, изолирани, не даваат доволно прогностички податоци и информации. Околу 25% од пациентите кои се во стадиум I и II од болеста, имаат рецидив во одреден период по операција и можеби би имале корист од адјувантна терапија, додека околу 25% од пациентите со зафатеност на регионалните лимфни јазли (стадиум III) се излечиви само со хируршка интервенција (63).

Постојат повеќе начини со кои може да се зголеми прогностичката валидност на стадиумот на болеста: со зголемување на бројот на лимфни јазли кои се анализираат, со зголемување на сензитивноста на тестовите кои се користат за детекција на метастатски лимфни нодуси и со користење на технолологија за генетска анализа (63-68), но и имунолошкиот одговор веќе подолго време се поврзува со излекување на малигната болест (69).

Како што погоре е веќе кажано, од литературните податоци станува евидентно дека Т клетките во туморите се позитивно асоцирани со добра прогноза кај пациентите со КРК (70-72). CD4+ и CD8+ Т клетките се најчесто инволвирани клетки во туморското ткиво (63).

Ниското ниво на Т регулаторни клетки во литературата се поврзува со подобар исход кај пациентите со карцином на дојка и колоректален карцином (73-75).

Други автори, пак, од друга страна, реферираат за корелација на високото ниво на Т регулаторни клетки и позитивниот исход кај пациентите (76-78).

Мојата хипотеза беше дека локалниот антитуморски имун одговор може да биде корисен предиктор за исходот и прогнозата кај пациенти со КРК. Анализата на моите резултати за густината на CD4+ лимфоцитите во инфилтративниот фронт на неоплазмата во зависност од локализацијата на туморот, покажа дека најголема густина беше детектирана кај неоплазмите локализирани на сигмоидниот дел од колонот, а густината на CD4+ лимфоцитите, пак, сигнификантно зависеше од локалниот раст на болеста. Статистичката анализа не потврди сигнификантна разлика во густината на CD4+ лимфоцитите помеѓу пациентите без и со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли.

Силно изразен CD4+ лимфоцитен инфилтрат почесто имаа пациентите без зафатеност на регионалните лимфни јазли, но несигнификантно. CD4+ лимфоцитниот инфилтрат беше оскуден најчесто кај пациентите со колоректален карцином во стадиум III; со умерена густина беше најчест кај пациентите со IV стадиум на болеста, додека силно изразен CD4 лимфоцитен инфилтрат почесто беше детектиран кај пациентите со стадиум II и стадиум I.

Анализата на резултатите за густината на CD8+ лимфоцитите покажа дека густината на овие клетки во инфилтративниот фронт на туморот сигнификантно зависеше од локалниот раст на болеста. Количеството на CD8+ лимфоцитите во инвазивниот фронт на туморот во ова истражување беше сигнификантно помало кај пациентите со раширеност на болеста во регионалните лимфни јазли. Пациентите со повисок стадиум на карцином на дебелото црево имаа сигнификантно помала густина на CD8+ лимфоцити во инфилтративниот фронт на карциномот на дебелото црево.

Студијата на Matsutani Sh. и соработниците, изработена во Јапонија, публикувана во 2018 година, анализира 64 пациенти со ректален карцином. На сите пациенти во материјалот земен при биопсија во тек на поставување на дијагнозата им била испитана густината на тумор-инфилтрирачките лимфоцити со акцент на CD8+ лимфоцитите. По спроведена хемо/радиотерапија, и по спроведниот оперативен третман повторно била направена анализа на густината на CD8+ клетките. Пациентите кои во биоптичниот материјал имале поголема густина на CD8+ лимфоцити, одговориле на хемо/радиотерапијата позитивно (responders), а во материјалот добиен со ресекција на цревата густината на CD8+ клетките била поголема. Овие пациенти имале подобар исход. Авторите сметаат дека подолгото преживување кај овие пациенти се должи на подобар локален имунитет кој се зголемил и со примената хемо/радиотерапија. Пациентите кои имале ниско ниво на CD8+ во биоптичниот материјал не одговориле на онколошката терапија, дури покажале и повеќе несакани ефекти (non-responders). Овие пациенти имале ниско ниво на CD8+ во материјалот земен од ресекција на туморот и клинички имале лоша прогноза. Авторите во оваа студија заклучуваат дека со анализа на CD8+

клетките од материјалот земен од биопсија може да се планира терапијата кај пациентот, односно да се донесе одлука пациентите со поголема густина на CD8+ клетките прво да примат онколошка терапија, а потоа да биде спроведен хируршки третман, додека кај пациентите со мала густина на CD8+ лимфоцити веднаш да се спроведе хируршки третман. Покрај планот за лекување, со одредување на густината на TAL клетките во биоптичниот материјал при поставување на дијагнозата може да се добие и прогноза за исходот на болеста, и статусот на овие клетки во биоптичниот материјал може да се сметаат за клинички предиктори за текот на болеста и осетливоста кон онколошката терапија (79).

Резултатите во јапонската студија се во корелација со резултатите од базични експериментални студии изработени на глувци, кои покажуваат дека хемо- и радиотерапијата биле поефикасни кај имунокомпетентни глувци отколку кај имунодефициентни глувци (80,81).

Yasuda K. и соработниците анализирале 48 случаи на ректален карцином и исто така утврдиле дека високата густина на ТАЛ, односно CD4+ и CD8+ лимфоцитите биле во значајна корелација со редукција на туморот по радиотерапија и степенот на диференцијација на туморот. Тие утврдиле дека густината на CD8+ лимфоцитите бил независен прогностички фактор за комплетен одговор на радиотерапијата. Авторите заклучуваат дека Т лимфоцитите и нивниот одговор кај пациентите со ректален карцином игра значајна улога во одговорот на туморот кон радиотерапија (82).

Повеќе автори ја анализирале густината на Т лимфоцитите и кај КРК и кај други малигни тумори и ја анализирале и нивната улога во одговорот на нехируршката терапија, при што утврдиле дека кај пациентите со поголема густина на CD8+ лимфоцити хемотерапијата е поефикасна бидејќи стимулира создавање на нови имунолошки клетки и го зголемува нивниот цитотоксичен ефект (83-86).

Се смета дека секоја фракција од ТАЛ има посебен ефект во антитуморскиот имунитет. Како што веќе погоре е кажано, густината на CD8+ клетките пред и по

неoadјувантната терапија е предиктор за исход кај пациентите со КРК. Активираниите CD8+ клетки се способни за директно убивање на туморското ткиво и имаат круцијална улога во антитуморскиот имунитет. Густината на CD4+ пред и по неoadјувантната терапија, според некои автори, нема сигнификантно влијание врз ефикасноста од терапијата, додека други автори реферираат дека густината на CD4+ клетките позитивно корелира со антитуморскиот имун статус и поради тоа имаат добар одговор на хемо/радиотерапијата (87-89).

Разликите во резултатите на студиите се должи на фактот дека сите фракции на CD4+ Т лимфоцитите (Th1, Th2, Th17, Th регулаторни клетки и Т фоликуларни помошнички клетки) имаат различни улоги во антитуморскиот имунитет. Th1 помошничките клетки имаат способност да ги активираат CD8+ Т клетките и со тоа го поттикнуваат антитуморскиот имунитет (87-89).

### **8.3 МАКРОФАГИ**

Макрофагите се дел од вродениот имун систем кои ги препознаваат, деструираат и фагоцитираат патогените. Макрофагите исто така ги препознаваат и автологните туморски клетки, клетките инфицирани со вируси и клетките кои се во фаза на апоптоза (90-92). Покрај тоа, тие имаат улога и во регулирањето на ефекторните клетки и на хуморалниот и на клеточниот имунитет. Тие се и антиген-презентирачки клетки и презентираат антигени со цел Т лимфоцитите да го препознаат „туѓиот антиген“. Активираниите макрофаги се стекнуваат со микроцидни и тумороцидни својства.

Макрофагите се вклучени во процесите на заздравување на рана, репарација, ремоделирање на коските, граф наспроти домаќин реакцијата, акутно и хронично воспаление. Тие исто така се присутни и во туморската строма на солидните тумори и тогаш се наречени тумор-асоцирачки макрофаги - TAM (94,95). Во туморската строма макрофагите се вклучени во сложени хемиски интеракции со сите други клетки од оваа микросредина. Се смета дека и макрофагите во туморската строма имаат двојна улога, една за промоција на туморскиот раст и метастазирање, и друга која е антитуморска (93-100). Макрофагите се активираат

преку сигнали од околината и се регулирани од страна на продуктите на Т лимфоцитите и клетките природни убијци. Во вакви услови тие добиваат фенотип на М1 или М2 макрофаги. М1 макрофагите се активираат преку продуктите на Th1 лимфоцитите, генерално IFN- $\gamma$  и липополисахаридите ослободени од сидот на бактериите, додека М2 макрофагите се активираат преку продуктите на Th2 лимфоцитите, односно преку интерлеукин IL-4, IL-10 и IL-13. М1 макрофагите се вклучени во уништувањето на патогените и туморските клетки, додека М2 макрофагите го модулираат инфламаторниот одговор и може да промовираат ангиогенеза и ремоделирање на туморската строма (95,101-103). Ваквата улога на М2 TAM, како клетки кои промовираат миграција, инвазија и метастазирање е опишана кај карцином на градата, цервикален карцином и карцином на мочниот меур (104), а објавени се и податоци за претклинички и клинички докази за здруженост на големата густина на TAM со лоша прогноза (105). Спротивно на ова, во литературата се наоѓаат и податоци за пациенти со висока густина на TAM, кои се со подобра прогноза и преживување (106-109). Се смета дека ваквите разлики во објавените податоци се должат на присуството на различен фенотип на макрофагите, односно дека М1 макрофагите посредуваат во издржливоста кон интраклеточните паразити и тумори (108,109).

Студијата на Angela D. и соработниците од 2016 година ја анализираше прогностичката улога на CA9, CD31, CD68 и CD20 кај пациенти со примарен операбилен аденокарцином на панкреас, третирани со операција и адјувантна хемотерапија. Експресијата на овие типови на лимфоцити била корелирана со клиничките и патолошки карактеристики и вкупното преживување. Густината на CD68 во стромата сигнификантно корелирала со преживување без прогресија и без далечни метастази (110).

Студијата, пак, на Shujun S. и соработниците, од 2016 година, изработена во Јапонија, ја анализираше поврзаноста на CD68+ макрофагите во стромата на планоцелуларен карцином на ларинкс со прогнозата и исходот на болеста. Заклучокот од анализата бил дека големата густина на CD68 тумор-асоцирачките

макрофаги заедно со CD34 игра важна улога во развојот на метастази и во ангиогенезата на туморот (111).

Zhou Q. и соработниците анализирале 160 случаи на пациенти со КРК во стадиум IIB и IV во однос на густината на CD68+ макрофагите во инвазивниот фронт на туморот, корелирана со клиничко-патолошките параметри, потенцијалните црнодробни метастази и 5-годишното преживување. Авторите утврдиле дека густината на TAM била во корелација и со инциденцијата на црнодробните метастази и со преживувањето на пациентите и дека претставува независен прогностички фактор за преживувањето. Преживувањето било подолго кај пациентите со повисока густина на TAM. Авторите заклучуваат дека TAM имаат протективна улога кај КРК.

Во истражувањето направено за оваа докторска дисертација макрофагите во инвазивниот фронт на неоплазмата беа боени со CD68 - Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, односно со моноклонално антители кое ги бележи M1 макрофагите.

Кај најголем број пациенти беше детектирано присуство на силно изразен клеточен инфилтрат од CD68+ клетки – 47 (45,63%), по што следеше средно изразен – 42 (40,78%) и слабо изразен CD68+ инфилтрат – 14 (13,59%).

Во оваа студија не беше најдена значајна разлика во густината на CD68+ TAM кај туморите со различен T стадиум и различна диференцираност и кај пациентите со и без нодални метастази, со и без лимфатична инвазија и со различен стадиум на болеста. Густината на TAM несигнификантно беше помала кај полошо диференцираните карциноми на дебелото црево, кај пациентите со лимфатична инвазија, со нодални метастази и тумори со повисок T статус.

Густината на CD68+ клетките (макрофаги) сигнификантно се разликуваше во зависност од густината на ТАЛ ( $p=0,0001$ ). Во групата тумори со ниска густина на ТАЛ најчесто беше детектирана ниска (слаба) густина на CD68+ клетки (78,57%); во групата со средна густина на ТАЛ најчесто беше детектирано обилно количество на CD68+ клетки (46,81%), а во групата тумори со обилно количество

на ТАЛ најчесто беше детектирано средно количество на CD68+ макрофаги (23,81%).

Густината на ТАЛ несигнификантно корелираше со степенот на експресија на CD68+ макрофагите ( $p=0,43$ ).

#### **8.4 ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОРИ, ИМУНИТЕТ И ТЕРАПИЈА**

Кај околу 75% од пациентите со КРК може да се изведе куративна ресекција, но кај околу 10% ресекцијата не е можна поради напредниот локален раст. Кај останатите приближно 20% (113) до 50% (114) од пациентите во времето на дијагностицирање се наоѓаат далечни метастази (115).

Прогностичките фактори кај КРК се бројни и опфаќаат клинички, хистопатолошки, молекуларни параметри, зафаќање на перитонеумот (карциноза), хируршки компликации (дехисценции, инфекции) и други. На прогнозата на пациентите со КРК исто така влијаат и покаченото ниво на лактат-дехидрогеназата, бројот на белите крвни клетки, нивото на серумскиот албумин, црнодробните трансаминази, нивото на хемоглобин, бројот на тромбоцитите, нивоата на туморските маркери СЕА и СА19-9, хистолошкиот тип на неоплазмата (муцинозен или прстен печат КРК), KRAS, BRAF, EGFR мутациите (113-122).

Помеѓу повеќето прогностички фактори, од кои како најсилни се сметаат стадиумот на болеста, лимфоваскуларната инвазија, позитивната хируршка маргина, предоперативното ниво на СЕА, повисокиот градус, и туморското пупење и постоперативните компликации имаат големо негативно влијание врз онколошкиот исход (123-126).

Најчестата постоперативна компликација кај пациенти оперирани од КРК е дехисценција на анастомозата. Оваа компликација кај операција на КРК се јавува помеѓу 3% и 15% и најмногу зависи од локализацијата на туморот, хируршката техника, предоперативната општа состојба на пациентот (хипопротеинемија, анемија, дијабет, хронични заболувања) и постоперативната нега (127).



Неколку студии покажуваат дека дехисценцијата на анастомозата како хируршка компликација и присуството на интраабдоминална инфекција - перитонит се поврзани со појава на рецидив на неоплазмата и повисока стапка на морталитет (128-135).

Тежината на интраабдоминалната инфекција (перитонит - локален или генерализиран, интраабдоминални апсцеси) како компликација на дехисценцијата исто така се поврзува со зголемен ризик од рецидив на болеста (136,137).

Поврзаноста помеѓу постоперативниот системски инфламаторен одговор и појавата на туморски рецидиви сугерира дека е можна поврзаност на фактори кои се ослободуваат во тек на инфламаторниот одговор кои може да го стимулираат и поткрепат развојот на резидуални канцерогени клетки од хируршкото поле, венската крв и да придонесат за создавање на микрометастази. Во литературата се опишуваат зголемена експресија на циркуирачки проинфламаторни и проангиогенски фактори кои корелираат со појава на рецидив (138,139).

Имуните клетки со протуморски ефект ги вклучуваат: неутрофилите, регулаторните Т лимфоцити, макрофагите, плазмоцитоидните дендритични клетки и други кои се вклучени во инфламаторниот одговор. Имуните клетки со антитуморски ефект ги вклучуваат: клетките природни убијци, дендритичните клетки, Т цитотоксичните лимфоцити и други. Присуството на овие клетки во туморската микросредина и во крвта е здружено со подобар или полош клинички исход кај пациентите со малигни тумори (140).

Појавата на тумор-специфични антигени во крвта на некои пациенти со КРК покажува дека и хуморалниот имунитет има значајна улога во имуниот одговор кон неоплазмата (54).

Напредокот на новите лекови (irinotecan или oxaliplatin) и таргет-терапијата (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) овозможи средното преживување на пациентите со КРК да порасне од 12 месеци во средните деведесетти години на минатиот век до 30 месеци во последните неколку години. Сепак, и покрај напредокот во хемотерапевтските протоколи и напредокот во раното откривање

на КРК, исходот кај повеќето пациенти е лош. Покрај тоа, биолошкото однесување на КРК е различно кај различни пациенти. Пациенти со болест во ист стадиум имаат различна прогноза и различен одговор на терапијата и изгледа дека некои прогностички параметри стануваат позначајни од другите (113).

Поради сето горе образложено, неопходни се дополнителни континуирани истражувања со цел да се утврдат нови прогностички маркери кај пациентите со малигни тумори, вклучувајќи ги и пациентите со КРК, со цел да се обезбеди основа за развој на нови терапевтски модалитети.

Локалниот имунолошки одговор кај пациентите со КРК се потврдува како значаен фактор за одговорот на хемотерапија и радиотерапија и претставува фактор за носење одлука за терапевтски третман на пациентите со КРК.

Истражувањата за локалниот имун одговор кај пациентите со КРК, како што е ова истражување за изработка на оваа докторска дисертација, се актуелни и потребни кај секој поединечен пациент со КРК со цел да се продолжи животот или терапијата кај овие пациенти да овозможи излекување.

## **9. ЗАКЛУЧОЦИ**

1. Густината на ТАЛ сигнификантно се разликува кај неоплазми со различен локален раст, при што густината е помала кај неоплазми со понапреднат локален раст.
2. Густината на ТАЛ сигнификантно се разликува кај пациентите со и без метастатски депозит во регионалните лимфни јазли, при што густината на ТАЛ е пониска кај пациентите со метастатска болест.
3. Густината на ТАЛ сигнификантно се разликува кај неоплазмите со и без лимфатична инвазија; таа е пониска кај неоплазмите со лимфатична инвазија.
4. Густината на ТАЛ сигнификантно се разликува кај пациентите со различен стадиум. Густината на ТАЛ опаѓа со растење на стадиумот на болеста.

5. Не е најдена разлика во густината на ТАЛ во зависност од локализацијата на неоплазмата.
6. Густината на CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцити и CD68+ макрофаги сигнификантно се разликува во зависност од густината на ТАЛ.
7. Густината на CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцитите сигнификантно зависи од локалниот раст на неоплазмата. Густината на CD4+, CD8+ и CD20+ лимфоцитите опаѓа при пораст на Т статусот.
8. Густината на CD8+ и CD20+ лимфоцити е сигнификантно помала кај пациентите со метастатски депозит во регионалните лимфни јазли и кај пациентите со повисок стадиум на болеста.
9. Густината на CD20+ лимфоцити е сигнификантно помала и кај пациентите со лимфатична инвазија.
10. Густината на CD68+ макрофаги не е значајно поврзана со испитуваните клиничко-патолошки параметри (Т, метастази во лимфни јазли, стадиум, лимфатична инвазија, градус).
11. Бројот на ТЛС е сигнификантно понизок кај неоплазмите со повисок Т статус, пациентите со нодални метастази, пациентите со лимфатична инвазија, полошо диференцираните неоплазми и пациентите со повисок стадиум на болеста.
12. Густината на ТАЛ е во статистички значајна позитивна корелација со бројот на терцијарни лимфоидни структури.
13. Густината на CD4+ лимфоцитите е во статистички значајна позитивна корелација со густината на ТАЛ и густината на CD8+ лимфоцитите.
14. Густината на CD8+ лимфоцитите е во статистички значајна позитивна корелација со густината на ТАЛ, густината на CD68+ макрофаги и бројот на ТЛС.

15. Густината на CD20+ лимфоцитите е во статистички значајна позитивна корелација со густината на ТАЛ, густината на CD8+ лимфоцитите и бројот на ТЛС.
16. Густината на CD20+ лимфоцитите е во статистички значајна негативна корелација со локалниот раст на туморот, стадиумот на болеста и степенот на диференцијација на туморот, односно густината на CD20+ лимфоцити е помала кај туморите со понапреднат локален раст, полоша диференцираност и повисок стадиум на болеста.
17. Бројот на терцијарни лимфоидни структури е во статистички значајна негативна корелација со Т статусот на туморот, со стадиумот на болеста и со степенот на диференцираност на туморот, односно бројот на терцијарни лимфоидни структури е помал кај тумори со напреднат локален раст и полоша диференцираност и кај пациенти со повисок стадиум на болеста.
18. Густината на ТАЛ и ТЛС игра важна улога во контролата на растот на туморот во фазата на елиминација и еквилибриум, и густината на ТАЛ и на ТЛС може да биде параметар за одредување на прогресијата на КРК.
19. Густината на ТАЛ и ТЛС влијае на прогресијата на КРК, а со тоа и на прогнозата на болеста кај пациентите.

## 10. ЛИТЕРАТУРА

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 2017; 3:524.
2. Section IV: Colon and Rectum: Neoplasm in surgery of the colon & rectum. Churchill Livingstone. 1997.
3. Johnson R, Marsh R, Carson J, Seymour K. A comparison of two methods of palliation of large bowel obstruction due to irremovable colon cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 2004; 86:99-103.
4. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med* 2016; 32:158-16. Available from: <https://doi.org/10.1159/000446488>
5. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:621-30.
6. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 2018; 124:2785.
7. Altobelli E, D'Aloisio F, Angeletti P. Colorectal cancer screening in countries of European Council outside of the EU-28. *World J Gastroenterol*. 2016 May 28; 22(20): 4946–4957. doi: 10.3748/wjg.v22.i20.4946
8. World Health Rankings. Macedonia: Colon-Rectum Cancers. Available from: <https://www.worldlifeexpectancy.com/macedonia-colon-rectum-cancers>
9. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1353.

10. Klabunde CN, Cronin KA, Breen N, et al. Trends in colorectal cancer test use among vulnerable populations in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20:1611.
11. Macrae AF, Goldberg MR, Savarese MFD. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. UpToDate. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>
12. Singh KE, Taylor TH, Pan CG, et al. Colorectal Cancer Incidence Among Young Adults in California. *J Adolesc Young Adult Oncol* 2014; 3:176.
13. Tawadros PS, Paquette IM, Hanly AM, et al. Adenocarcinoma of the rectum in patients under age 40 is increasing: impact of signet-ring cell histology. *Dis Colon Rectum* 2015; 58:474.
14. Schulmann K, Pox C, Tannapfel A, Schmiegeler W. The patient with multiple intestinal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21(3):409-26.
15. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3:464.
16. Locker GY, Lynch HT. Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer* 2004; 3:215.
17. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326:658.
18. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, et al. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer* 2014; 120:35.
19. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228.

20. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(44):16389-97. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16389
21. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(8):1097-1104.
22. Roscher R, Frank R, Wagner R, Safi F, Veger HG. Surgical treatment results in colonic obstruction. *Chirurg* 1991; 62(3):201-5.
23. Rudy DR, Zdon MJ. Update on colorectal cancer. *Am Fam Physician*. 2000; 61(6):1759-70.
24. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1420–5.
25. Sobin L, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours*. New York: Wiley-Liss; 2002.
26. Dzivenu KO, O'Donnell-Tormey J. *Cancer and the immune system: The Vital Connection*. New York: Cancer Research Institute; 2003.
27. Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, Katsanos KH, Christodoulou DK, Pentheroudakis G. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann Gastroenterol*. 2017; 30(6):613-21. doi:10.20524/aog.2017.0191.
28. Kinzler K, Vogelstein G. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 1996; 87:159-70
29. Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C. Common occurrence of APC and K-ras gene mutation in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 1995; 108:383-92.
30. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog msh2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75:1027-38.

31. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62:623-651.
32. Di Caro G, Marchesi F, Laghi L, Grizzi F. Immune cells: plastic players along colorectal cancer progression. *J Cell Mol Med* 2013; 17(9):1088-95.
33. Valerie C, Han Chong T, Jean-Pierre A. Immune Microenvironment in Tumor Progression: Characteristics and Challenges for Therapy. *J Oncol* 2012; doi: 10.1155/2012/608406
34. Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, et al. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 2014; 35:571-80.
35. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Saute's-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010; 29:1093-102.
36. Pages F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *New England J Med* 2005; 353:2654-66.
37. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predicts clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-4.
38. Qiang Zhou, Rui-Qing Peng, Xiao-Jun Wu, Qing Xia, Jing-Hui Hou, Ya Ding, et al. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Translat Med* 2010; 8:13.
39. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 6:2059–72.
40. Pages F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 2008; 4:981-7.
41. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin Jr EW, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23:366-77.



42. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59:5002-11.
43. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010; 29:1093–1102.
44. Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Pesce S, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. Tertiary Intratumor Lymphoid Tissue in Colo-Rectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2012; 4(1):1-10. doi: 10.3390/cancers4010001
45. Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, Pauwels P, Peeters M. Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. *Cancer Microenviron* 2011; 4:377–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0068-5>
46. Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Dieu-Nosjean MC. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol* 2016; 7:407. eCollection 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00407
47. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991–8.
48. de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; 7:411-23.
49. Shunyakov L, Ryan CK, Sahasrabudhe DM, Khorana AA. The influence of host response on colorectal cancer prognosis. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 1:38–45.
50. Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 3:369–76.
51. Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not

complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006; 116:1–10.

52. Titu LV, Monson JR, Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51:235–47.

53. Atkinson EA, Bleackley RC. Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit Rev Immunol* 1995; 15:359–84.

54. Nelson BH. CD20+ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes *J Immunol*. 2010; 185(9):4977-82. doi: 10.4049/jimmunol.1001323.

55. Carlsen HS, Baekkevold ES, Johansen FE, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut* 2002; 51:364-71.

56. Grabner R, Lotzer K, Dopping S, Hildner M, Radke D, Beer M, et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Exp Med* 2009; 206:233-48.

57. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997; 181:318–24.

58. Meshcheryakova A, Tamandl D, Bajna E, Stift J, Mittlboeck M, Svoboda M, et al. B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PloS One* 2014; 9:e99008. doi: 10.1371/journal.pone.0099008.

59. Wargo JA, Reddy SM, Reuben A, Sharma P. Monitoring immune responses in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2016; 41:23–31.

60. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63:45–57.

61. Stroncek DF, Butterfield LH, Cannarile MA, Dhodapkar MV, Greten TF, Grivel JC, et al. Systematic evaluation of immune regulation and modulation. *J Immunother Cancer* 2017; 5:21.
62. Choi J, Maeng GH, Lee SJ, Kim JY, Kim WD, et al. Diagnostic value of peripheral blood immune profiling in colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2018; 94(6): 312–21. doi: 10.4174/astr.2018.94.6.312
63. Kemp RA, Black MA, McCall J, Yoon HS, Phillips V, Anjomshoaa A, Reeve AE. T cell subpopulations in lymph nodes may not be predictive of patient outcome in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:78.
64. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 1995; 122: 321-6.
65. Gonen M, Schrag D, Weiser MR. Nodal staging score: a tool to assess adequate staging of node-negative colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6166-71.
66. Edler D, Ohrling K, Hallstrom M, Karlberg M, Ragnhammar P. The number of analyzed lymph nodes - a prognostic factor in colorectal cancer. *Acta Oncol (Stockholm, Sweden).* 2007; 46:975-81.
67. Bilchik A, Nissan A, Wainberg Z, Shen P, McCarter M, Protic M, et al. Surgical quality and nodal ultrastaging is associated with long-term disease-free survival in early colorectal cancer: an analysis of 2 international multicenter prospective trials. *Ann Surg* 2010; 252: 467-74. discussion 474-66.
68. Orntoft TF. [DNA microarrays (DNA chips) used in molecular medical research]. *Ugeskr Laeger* 2003; 165: 786-90.
69. Anjomshoaa A, Nasri S, Humar B, McCall JL, Chatterjee A, Yoon HS, et al. Slow proliferation as a biological feature of colorectal cancer metastasis. *Br J Cancer* 2009; 101:822-8.

70. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-48.
71. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:2654-66.
72. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3491-4.
73. Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun* 2007; 7:7.
74. Clarke SL, Betts GJ, Plant A, Wright KL, El-Shanawany TM, Harrop R, et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2006; 1:e129-10.1371/journal.pone.0000129.
75. Yaqub S, Henjum K, Mahic M, Jahnsen FL, Aandahl EM, Bjornbeth BA, Tasken K. Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:813-21.
76. Frey DM, Drieser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2010; 126:2635-43.
77. Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:186-92.
78. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009; 58:520-9.

79. Matsutani S, Shibutani M, Maedan K, Nagahara H, Fukuoka T, Nakao S, et al. Significance of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Cancer Sci* 2018; 109:996-79.
80. Plotnikov A, Niego B, Ophir R, Korenstein R, Keisari Y. Effective treatment of mouse metastatic prostate cancer by low electric field enhanced chemotherapy. *Prostate* 2006; 66:1620-30.
81. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13:1050-9.
82. Yasuda K, Nirei T, Sunami E, Nagawa H, Kitayama J. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiat Oncol* 2011; 6:49.
83. Gupta A, Sharma A, von Boehmer L, Surace L, Knuth A, van den Broek M. Radiotherapy supports protective tumor-specific immunity. *Oncoimmunology*. 2012; 1:1610-1.
84. Andre F, Dieci MV, Dubsky P, et al. Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:28-33.
85. Noble F, Mellows T, McCormick Matthews LH, et al. Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65:651-62.
86. Teng F, Meng X, Kong L, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, forkhead box P3, programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 expressions before and after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Trans Res* 2015; 166:e1.
87. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298-306.

88. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Can Res* 2011; 71:1263-71.
89. Xie Y, Akpınarli A, Maris C, et al. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* 2010; 207:651-7.
90. Hallam S, Escorcio-Correia M, Soper R, Schultheiss A, Hagemann T. Activated macrophages in the tumour microenvironment – dancing to the tune of TLR and NF-κB. *J Pathol* 2009; 219(2):143–52. doi: 10.1002/path.2602
91. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953–64.
92. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23:549–55.
93. Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. *Blood*. 2006; 108:408–409.
94. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007; 117:1155–66.
95. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:618–31.
96. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13:265–70.
97. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- $\alpha$  dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 2004; 25:1543–9.

98. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Bernasconi S, Allavena P, Gaetano B, et al. Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *J Immunol* 2000; 164:733-8
99. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001; 193:727-40.
100. Dave SD, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gasoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004; 351:2159–69.
101. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23-35.
102. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454:436–44.
103. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677–86.
104. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71–8.
105. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 3:254–65.
106. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003; 4:960–8.
107. Oberg A, Samii S, Stenling R, Lindmark G. Different occurrence of CD8+, CD45R0+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors. *Int J Colorectal Dis* 2002; 1:25–9.

108. Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2003; 2:309–313.
109. Zhou Q, Peng RQ, Wu XJ, Xia Q, Hou JH, Ding Y, et al. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Transl Med* 2010; 8:13. <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/13>
110. Diana A, Wang ML, D Costa Z, Azad A, Silva AM, et al. Prognostic role and correlation of CA9, CD31, CD 68 and CD20 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 45:72819-32.
111. Sun S, Pan X, Zhao L, Zhou J, Wang H, Sun Y. The Expression and Relationship of CD68-Tumor-Associated Macrophages and Microvascular Density With the Prognosis of Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2016; 9:270-7.
112. Zhou Q, Peng RQ, Wu XJ, Xia Q, Hou JH, Ding Y, et al. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Transl Med* 2010; 8:13 <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/13>
113. De Divitiis C, Nasti G, Montano M, Fisichella R, Laffaioli VR, Berretta M. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: Between hope and reality. *World J Gastroenterol* 2014; 20:15049–59. doi: 10.3748/wjg.v20.i41.15049
114. Pahlman L. Colorectal Cancer. In: Cremer M, Krejs G, Ramodori G, Madsen RJ. editors. *Gastroenterology and Hepatology*. London: McGraw-Hill; 1999. p.351–364.
115. Caliskan C, Guler N, Karaca C, Makay O, Firat O, Korkut MA. Negative prognostic factors in colorectal carcinoma: An analysis of 448 patients. *Indian J Surg* 2010; 72(3):243-248. doi:10.1007/s12262-010-0052-1.
116. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:581–92.



117. Köhne CH, Kretzschmar A, Wils J. First-line chemotherapy for colorectal carcinoma - we are making progress. *Onkologie* 1998; 21:280–9.
118. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986; 57:1866–70.
119. Kemeny N, Braun DW. Prognostic factors in advanced colorectal carcinoma. Importance of lactic dehydrogenase level, performance status, and white blood cell count. *Am J Med* 1983; 74:786–94.
120. Graf W, Bergström R, Pahlman L, Glimelius B. Appraisal of a model for prediction of prognosis in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A:453–7.
121. Graf W, Glimelius B, Pahlman L, Bergström R. Determinants of prognosis in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1991; 27:1119–23.
122. Kulendran M, Stebbing FJ, Marks GC, Rockall AT. Predictive and Prognostic Factors in Colorectal Cancer: A Personalized Approach. *Cancers (Basel)* 2011; 3:1622–38. doi:10.3390/cancers3021622
123. Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, Rafferty JF, Buie WD, Standards Practice Task Force of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the management of colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2012; 55(8):831–43.
124. Krezalek MA, Skowron KB, Guyton KL, Shakhsher B, Hyoju S, Alverdy JC. The intestinal microbiome and surgical disease. *Curr Probl Surg* 2016; 53(6):257–93.
125. Park EJ, Baik SH, Kang J, Hur H, Min BS, Lee KY, et al. The Impact of Postoperative Complications on Long-term Oncologic Outcomes After Laparoscopic Low Anterior Resection for Rectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(14):e3271.
126. Tohme S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Res* 2017; 77(7):1548–52.

127. Frasson M, Flor-Lorente B, Rodríguez JL, Granero-Castro P, Hervás D, Alvarez Rico MA, et al. ANACO Study Group. Risk Factors for Anastomotic Leak After Colon Resection for Cancer: Multivariate Analysis and Nomogram From a Multicentric, Prospective, National Study With 3193 Patients. *Ann Surg* 2015; 262(2):321–30.
128. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg* 2004; 240(2):255–9.
129. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92(9):1150–4.
130. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW, Seto CL. Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg* 2007; 11(1):8–15.
131. Katoh H, Yamashita K, Wang G, Sato T, Nakamura T, Watanabe M. Anastomotic leakage contributes to the risk for systemic recurrence in stage II colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2011; 15(1):120–9.
132. Krarup PM, Nordholm-Carstensen A, Jorgensen LN, Harling H. Anastomotic leak increases distant recurrence and long-term mortality after curative resection for colonic cancer: a nationwide cohort study. *Ann Surg* 2014; 259(5):930–8.
133. Salvans S, Mayol X, Alonso S, Messeguer R, Pascual M, Mojal S, et al. Postoperative peritoneal infection enhances migration and invasion capacities of tumor cells in vitro: an insight into the association between anastomotic leak and recurrence after surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2014; 260(5):939–43.
134. Alonso S, Pascual M, Salvans S, Mayol X, Mojal S, Gil MJ, et al. Postoperative intra-abdominal infection and colorectal cancer recurrence: a prospective matched cohort study of inflammatory and angiogenic responses as mechanisms involved in this association. *Eur J Surg Oncol* 2015; 41(2):208–14.

135. Kang J, Choi GS, Oh JH, Kim NK, Park JS, Kim MJ, et al. Multicenter Analysis of Long-Term Oncologic Impact of Anastomotic Leakage After Laparoscopic Total Mesorectal Excision: The Korean Laparoscopic Colorectal Surgery Study Group. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(29):e1202.
136. Markar S, Gronnier C, Duhamel A, Mabrut JY, Bail JP, Carrere N, et al. FREGAT (French Eso-gastric tumors) working group. FRENCH (Federation de Recherche EN CHirurgie), and AFC (Association Française de Chirurgie). The impact of severe anastomotic leak on long-term survival and cancer recurrence after surgical resection for esophageal malignancy. *Ann Surg* 2015; 262:972–80.
137. Artinyan A, Orcutt ST, Anaya DA, Richardson P, Chen GJ, Berger DH. Infectious postoperative complications decrease long-term survival in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer: a study of 12,075 patients. *Ann Surg* 2015; 261:497–505.
138. Bohle B, Pera M, Pascual M, Alonso S, Mayol X, Salvado M, et al. Postoperative intra-abdominal infection increases angiogenesis and tumor recurrence after surgical excision of colon cancer in mice. *Surgery* 2010; 147(1):120–6.
139. Pascual M, Alonso S, Parés D, Courtier R, Gil MJ, Grande L, et al. Randomized clinical trial comparing inflammatory and angiogenic response after open versus laparoscopic curative resection for colonic cancer. *Br J Surg* 2011; 98(1):50–9.
140. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(1):45-57. doi: 10.1007/s00262-013-1480-0.