

КОМП'ЮТЕРИЗОВАНЕ КІЛЬКІСНЕ ОЦІНЮВАННЯ ВНУТРІШНЬОПУХЛИННОЇ ВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ І ПРОЛІФЕРАЦІЇ КОЛОРЕКТАЛЬНИХ КАРЦИНОМ: МОРФОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

I. K. Хархаліс, О. В. Пославська¹

Ужгородський національний університет

¹*Дніпровський державний медичний університет*

Колоректальний рак (КРР) вважається маркером соціально-економічного розвитку, оскільки в економіці країн перехідного періоду рівень захворюваності на КРР має тенденцію до рівномірної зростання. Змінення способу життя збільшило захворюваність на КРР в останні десятиліття, а саме дієта з підвищеним споживанням продуктів тваринного походження та більш малорухливий спосіб життя призводить до зниження фізичної активності та збільшення поширеності надмірної маси тіла (метаболічного синдрому), що також стає все більш актуальною проблемою для України. Внутрішньопухлинна васкуляризація та проліферація розглядаються багатьма дослідниками як незалежний прогностичний фактор перебігу раку. Одним із практичних способів спостереження за ангиогенезом є дослідження гістологічних зрізів пухлин, де імуногістохімічним фарбуванням маркерами CD31 або CD34 виділяється ендотелій судин. Дослідження спрямовано на оцінювання внутрішньопухлинної васкуляризації та проліферації клітин колоректальних карцином за допомогою платформи Фіджі. Середня кількість CD-34-позитивних судин виявила достовірну різницю у вікових групах (зі збільшенням віку кількість судин зростала, $p < 0,05$); за гістологічним типом (найменша кількість судин виявлена в аденокарциномі аденомоподібного типу, найбільша – у мікропапілярній аденокарциномі, $p < 0,05$); за ступенем (у групі G2 кількість судин вірогідно більша, $p < 0,05$); а також у групі з метастазами кількість судин була достовірно вищою порівняно з групою без метастазів, $p < 0,05$.

Середня площа CD-34-позитивних судин показала вірогідну різницю у вікових групах (із збільшенням віку площа судин збільшувалася, $p < 0,05$); за гістологічним типом (найменша площа судин виявлена при аденокарциномі аденомоподібного типу, найбільша – при медулярній аденокарциномі, $p < 0,05$); а також у групі з G3 площа кровоносних судин була достовірно більшою ($p < 0,05$). Середній периметр CD-34-позитивних судин достовірно відрізнявся лише за гістологічним типом (найменший периметр судин у аденокарциноми аденомоподібного типу, найбільший – у мікропапілярній аденокарциноми, $p < 0,05$). Індекс проліферації зростав разом із середньою кількістю та середньою площею CD-34-позитивних судин (усі $p < 0,05$).

Ключові слова: колоректальний рак, васкуляризація пухлини, цифрова патологія, CD-34, Ki-67.

COMPUTERIZED QUANTIFICATION OF INTRA-TUMORAL VASCULARIZATION AND PROLIFERATION OF COLORECTAL CARCINOMA: A MORPHOMETRIC INVESTIGATION

I. K. Kharkhalis, O. V. Poslavska¹

Uzhhorod National University

¹*Dnipro State Medical University*

Background. Colorectal cancer (CRC) is considered a marker of socio-economic development, due to the fact that in countries experiencing a transition period in the economy, the incidence rate of CRC has a tendency to increase uniformly. Lifestyle changes have increased the incidence of CRC in recent decades, namely, a diet with increased consumption of animal products and a more sedentary lifestyle leads to a decrease in physical activity and an increase in the prevalence of excess body weight (metabolic syndrome), which also becomes increasingly urgent problem for Ukraine. Intratumoral vascularization and proliferation are considered by many researchers as an independent prognostic factor during cancer. One of the practical ways of observing angiogenesis is the study of histological sections of tumors, where the endothelium of vessels is distinguished by immunohistochemical staining with markers CD31 or CD34. The aim of the study was to evaluate intratumoral vascularization and cell proliferation in colorectal carcinomas using the Fiji platform.

Material and methods. The work examined the clinical and anatomical material of CRC of 37 patients (15 women and 22 men), which was obtained during operations (right hemicolectomy, resection of the sigmoid colon, Hartmann's operation, resection of the transverse colon, resection of the ileum); all of them were treated in the 2nd surgical department of the Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital in the period from 2019 to 2021. The age of the patients ranged from 27 to 82 years; the average age was 61.43 ± 14.90 years.

Results. The average number of CD-34-positive vessels showed a significant difference in age groups (with increasing age, the number of vessels increased, $p < 0.05$); by histological type (the smallest number of vessels was found in adenocarcinoma of the adenoma-like type, the largest in micropapillary adenocarcinoma, $p < 0.05$); by grade (in group G2, the

number of vessels was significantly higher, $p < 0.05$); and also in the group with metastases, the number of vessels was significantly higher compared to the group without metastases, $p < 0.05$.

The average area of CD-34-positive vessels showed a significant difference in age groups (with increasing age, the area of vessels increased, $p < 0.05$); by histological type (the smallest area of vessels was found in adenocarcinoma of the adenoma-like type, the largest in medullary adenocarcinoma, $p < 0.05$); and also, in the group with G3, the area of blood vessels was significantly larger ($p < 0.05$).

Conclusions. The average perimeter of CD-34-positive vessels showed a significant difference only by histological type (the smallest perimeter of vessels was found in adenocarcinoma of the adenoma-like type, the largest in micropapillary adenocarcinoma, $p < 0.05$).

The proliferation index increased along with the average number and average area of CD-34-positive vessels (all $p < 0.05$).

Keywords: colorectal cancer, tumor vascularization, digital pathology, CD-34, Ki-67.

Вступ. За оцінками International Agency for Research on Cancer у 2020 році виявили понад 1,88 мільйона нових випадків колоректального раку та 915 880 смертей від нього, що для чоловіків посіло 3 місце за показником захворюваності та 2 місце за показником смертності, а для жінок 3 місце за обома показниками серед усіх онкологічних захворювань [1]. КРК вважають маркером соціально-економічного розвитку, оскільки в країнах, що переживають перехідний період в економіці, рівень захворюваності на КРК має тенденцію до рівномірного зростання [2, 3]. Зміна способу життя підвищила захворюваність на КРК за останні десятиріччя, а саме, дієта із збільшенням споживання продуктів тваринного походження та малорухливий спосіб життя призводять до зниження фізичної активності та збільшення поширеності надлишкової маси тіла (метаболічний синдром) [4, 5], що також стає все більш актуальною проблемою для України. За оцінками Національного канцерреєстру України на 2020 рік рак ободової кишки продемонстрував 7883 нових випадків і 4299 смертей, а рак прямої кишки – 6572 нових випадків і 3637 смертей. Отже, за показником захворюваності рак ободової і прямої кишки для чоловіків посів 5 і 7 місце в, а за показником смертності 3 і 5 місце; для жінок за показником захворюваності – 5 і 8 місце, а за показником смертності – 3 і 6 місце відповідно [6].

Внутрішньо-пухлинна васкуляризація та проліферація багатьма дослідниками розглядаються як незалежний прогностичний фактор перебігу онкозахворювань [7-11]. Одним із практичних способів спостереження за ангиогенезом є дослідження гістологічних зрізів пухлин, де ендотелій судин виділяють шляхом імуногістохімічного фарбування маркерами CD31 або CD34 [11]. Розподіл судин, кількість та площа їх розповсюдження об'єднані терміном «щільність мікросудин», і як показують дослідження відрізняється в різних пухлинах [10-12].

Об'єктивні методи оцінювання гістологічних зрізів у медичних дослідженнях включають аналіз цифрових зображень, що одержують за допомогою камер і світлових або конфокальних мікроскопів. Але рішення діагностичних і наукових завдань при роботі з візуальною інформацією вимагає знання специфічних методів цифрового оброблення й аналізу отриманих мікрофотографій. Володіння навиками застосування програмного забезпечення для аналізу цифрових зображень, нажаль, не входить до освітньої програми магістрів та аспірантів медичних закладів нашої країни, що у патоморфологів викликає необхідність додаткової самоосвіти в цій галузі або колаборації з такими спеціалістами немедичного профілю. Одним із зручних інструментів для аналізу зображень біологічних об'єктів являється платформа з відкритим кодом Fiji, що розроблена саме для науковців і має доволі зрозумілий інтерфейс (розробка ініційована автором Wayne Rasband, США). Вмонтовані в Fiji плагіни Colour Deconvolution та Immuno Ratio дозволяють аналізувати імуногістохімічно забарвлені препарати з отриманням кількісного оцінювання експресії маркеру [13-15].

Мета дослідження: оцінити внутрішньопухлинну васкуляризацію і проліферацію клітин колоректальних карцином за допомогою платформи Fiji.

Матеріал і методи дослідження. Досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків), що отримано під час оперативних утручань (правобічна геміколектомія, резекція сигмоподібної кишки, операція Гартмана, резекція поперечно-ободової кишки, резекція клубової кишки). Всі пацієнти проходили лікування в 2 хірургічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні імені І. І. Мечникова м. Дніпра в період із 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27-82 роки, середній вік склав $61,4 \pm 14,9$ років.

За гістологічною будовою всі спостереження представлені колоректальною карциномою (КРК) помірного (31 випадок) і низького (6 випадків) ступеня диференціювання. Гістопатологічні підтипи включали: аденокарциному (АК) NOS 19 випадків, зубчасту АК 7 випадків, мікропапілярну АК 3 випадки, медулярну АК 3 випадки, муцинозна АК 2 випадки, перстне-подібноклітинна АК 2 випадки та 1 АК типу like-аденома.

Із них із локалізацією у висхідній частині обо- дової кишки 5 випадків, у печінковому куті 9 ви- падків, у поперечно-ободовій кишці 6 випадків, у селезінковому куті 1 випадок, у ректо-сигмоїдно- му сполученні 5 випадків, у сигмоподібній кишці 10 випадків та у прямій кишці 1 випадок. Отже, всі спостереження КРК розділились на правобічні КРК (20 випадків) і лівобічні КРК – 17 спосте- режень. Також весь матеріал розподілено на дві групи в залежності від наявності метастазів: без метастазів 30 КРК, із метастазами – 7 спостережень (6 – у лімфатичних вузлах черевної порожнини та 1 – в печінці).

Морфологічний метод дослідження. Зразки пухлин КРК фіксованих у формаліні та залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровського обласного патологоанатомічного бюро». Парафі- нові зрізи 4-5 мкм отримано на мікротомі Microm HM-340 і забарвлено за стандартною методикою гематоксиліном та еозином. Два патологоанатома незалежно один від одного перевіряли скельця на точність діагнозу та наявність артефактів. За внутрішній контроль приймали нормальну тка- нину товстої кишки, що зустрічалась у скельцях на границі з пухлинною тканиною. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу «Primo Star» (об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$).

Імуногістохімічний метод дослідження. Парафінові зрізи наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування анти- генів і пригнічення активності ендогенної перок- сидази, проводили інкубацію зрізів із первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C протягом 30 хвилин. Використовувалися первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250), CD34 (sp1, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision) у вологих камерах близько 30 хвилин при кімнатній температурі. Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від

20 секунд до 3 хвилин, із проявом у вигляді корич- невого забарвлення, далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини. Наступна дегідратація та включення в бальзам здійснювалися відповідно до розповсюджених методик.

Для цифрової морфометрії використовували ка- меру мікроскопу Zeiss Primo Star – AxioCam ERC 5s із ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору збережено в форматі *.jpg і оброблено за допомогою плат- форми Fiji з визначенням кількості, параметрів периметру та площі CD34-позитивних судин із метою оцінювання васкуляризації та розрахунком відсотків Ki-67-позитивних інтрануклерних реак- цій плагіном ImmunoRatio [13].

Відповідно до рекомендацій Melling N. із спі- вавт. (2016) для статистичного аналізу результати фарбування маркером Ki-67 розподілено на три групи (слабка, помірна, висока) за відсотком Ki- 67-позитивних пухлинних клітин: низький Ki-67 – 0 %-10 %; помірний Ki-67 – 10 %-25 %; високий Ki-67 – 25% і більше [8].

Статистичний аналіз даних проводили в про- грамному середовищі R version 3.4.1 (2017-06- 30) – «Single Candle» Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюєть- ся безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Для порівняння значень показників цифрової морфометрії «площа», «периметр», «коефіцієнт круглості» судин, а також індексу проліферації за маркером Ki-67, розрахованих за допомогою плагіну ImmunoRatio в платформи Fiji, спочатку за допомогою критерію Шапіро-Вілка перевірялась відповідність розподілу показника в кожній групі на нормальність. У випадку відмінності розпо- ділу від нормального, для перевірки відмінності середніх значень використовувався непараме- тричний U-критерій Манна-Уїтні. Для вибірок із нормальним розподілом, для порівняння середніх значень використовували t-критерій Стьюдента. Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводилось за допо- могою точного тесту Фішера. Для всіх критеріїв відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$. Дані в таблицях представлені як $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення).

Результати та їх обговорення. Для відокрем- лення скупчення судин із оточуючих пухлинних

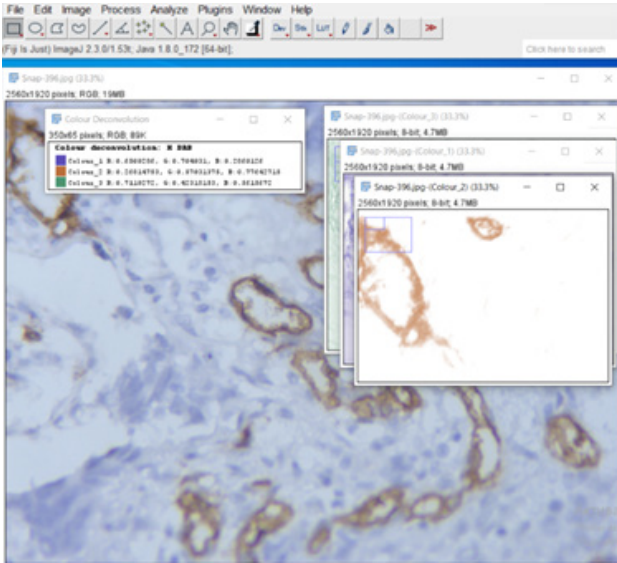


Рис. 1. Процедура Colour Deconvolution для відокремлення структур забарвлених хромо-ге-ном DAB у платформи Fiji: Image>Color>Colour Deconvolu-tion>Vectors> H&DAB

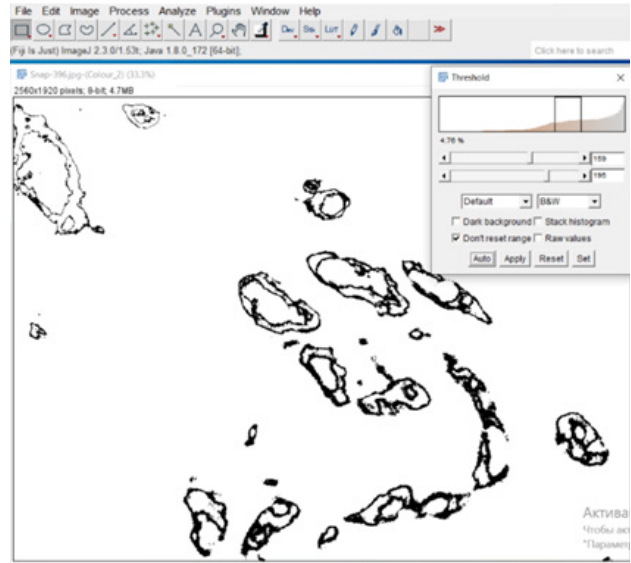


Рис. 2. Сегментація в платформи Fiji: Image>Adjust> Threshold (із регуляцією поро-гових значень яскравості для отримання чітких меж судин)

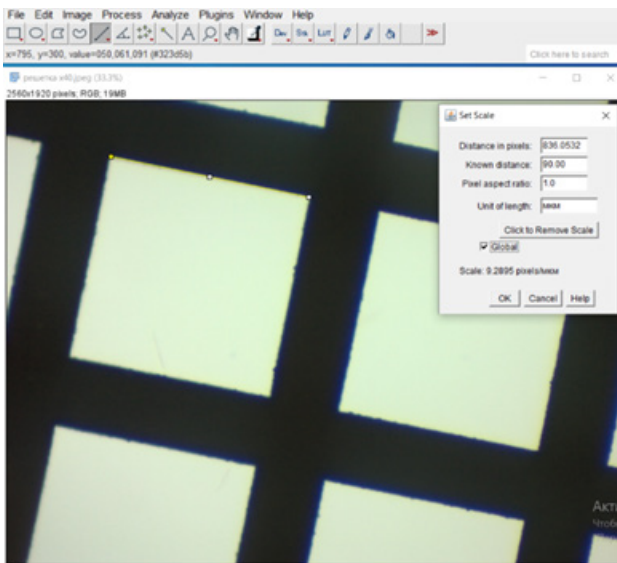


Рис. 3. Процес калібрування в платформи Fiji з використанням сітки з відомим розмір-ом комірки Analyze>Set Scale> Known distance (90 мкм) > Global

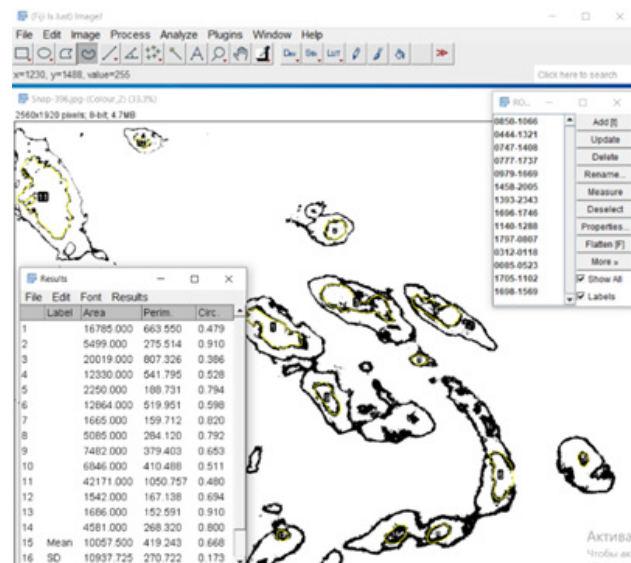


Рис. 4. Процес вимірювання параметрів судин із збереженням результатів у платформи Fiji: ROI Manager>t>Measure>Results> Summarize

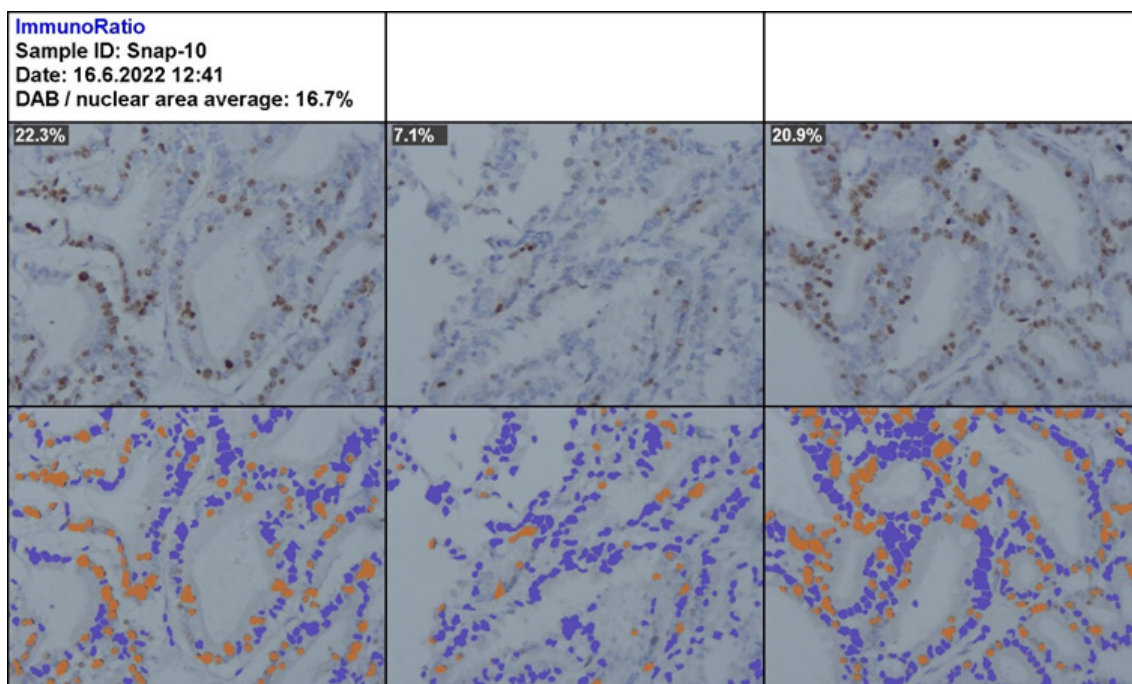


Рис. 5. Автоматичне вимірювання індексу проліферації у платформі Fiji плагіном ImmunoRatio: Plugins>ImmunoRatio>nuclear area average

тканин при забарвленні ІГХ методом із маркером CD34 у платформі Fiji спочатку використовували процедуру Colour Deconvolution, що виділяє тільки структури, забарвлені хромогеном DAB (рис. 1).

Остаточну сегментацію для подальшого розрахунку параметрів судин у пухлинній тканині КРК проводили через регуляцію порогових значень яскравості (вікно Threshold), це дозволяє також покращити контрастність об'єктів, якщо їх границі нечіткі або незрозумілі (рис. 2).

З метою точного розрахунку параметрів судин у пухлинній тканині КРК проводили калібрування з використанням фотографії сітки з відомим розміром комірки (90 мкм×90 мкм) – переведення пікселів у мікрометри (рис. 3). Далі, використовуючи інструмент для вимірювання довжини об'єктів неправильної форми, вручну обводили внутрішній діаметр зрізу судин, щоб розрахувати їх кількість, площу в мкм² та діаметр у мкм (рис. 4). Для збереження вимірів використовували ROI Manager. Натискання кнопки Measure дає вікно Results із значеннями всіх площ і периметрів судин, що можна використовувати для розрахунку середньої або сумарної площі, середнього периметру судин тощо. Для отримання найбільш достовірних даних васкуляризації із кожного випадку було проаналізовано три поля зору із збільшенням ×400.

Також у цих ділянках пухлин, як найбільш васкуляризованих, було оцінено рівень проліферації за маркером Ki-67, що автоматично розраховувався плагіном ImmunoRatio (рис. 5).

Розподіл середніх значень кількості, площі та периметру судин за клініко-морфологічними характеристиками пухлин представлено в табл. 1.

Висновки. 1. Середня кількість CD-34-позитивних судин показала достовірну різницю в групах за віком (із збільшенням віку, кількість судин збільшувалась, $p < 0,05$); за гістологічним типом (найменша кількість судин виявилась в аденокарциномі типу like-аденома, найбільша – в мікропапілярній аденокарциномі, $p < 0,05$); за grade (в групі G2 кількість судин було достовірно більше, $p < 0,05$); а також у групі з метастазами кількість судин була достовірно вищою, порівняно з групою без метастазів, $p < 0,05$.

2. Середня площа CD-34-позитивних судин показала достовірну різницю в групах за віком (із збільшенням віку, площа судин збільшувалась, $p < 0,05$); за гістологічним типом (найменша площа судин виявилась в аденокарциномі типу like-аденома, найбільша – в медулярній аденокарциномі, $p < 0,05$); а також у групі з G3 площа судин була достовірно більше ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Розподіл середніх значень кількості, площі та периметру судин за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Середня кількість CD34-позитивних судин (M±SD)	Середня площа CD34-позитивних судин (M±SD)	Середній периметр CD34-позитивних судин (M±SD)
Чоловіки	22 (59,5)	9,00±3,89	315,42±183,79	79,59±25,45
Жінки	15 (40,5)	9,13±4,74	342,34±261,59	81,34±31,15
P		p>0,05	p>0,05	p>0,05
Вік				
<49	8 (21,6)	7,00±1,77	324,61±187,73	75,56±14,66
50-75	23(62,2)	9,13±3,60	352,24±237,65	84,01±30,54
>75	6 (16,2)	11,5±6,95	229,32±150,19	72,14±29,38
P		p<0,05	p<0,05	p>0,05
Правобічні	20 (54,0)	8,65±3,63	354,54±241,44	84,40±29,65
Лівобічні	17 (46,0)	9,53±4,85	293,15±182,30	75,47±24,74
P		p>0,05	p>0,05	p>0,05
АК NOS	19 (51,4)	9,47±4,98	329,28±151,66	85,68 ±26,37
Зубчаста АК	7 (18,9)	8,57±2,99	323,54±314,98	76,36 ±33,31
Мікропапілярна АК	3 (8,1)	13,33±3,78	236,05±89,18	68,36 ±7,74
АК	3 (8,1)	7,33±0,57	666,82±261,11	101,95 ±32,37
Медулярна АК	2 (5,4)	6,50±0,70	155,87±3,72	53,82 ±2,94
Муцинозна АК	2 (5,4)	7,50±0,70	220,67±66,02	73,25±21,98
Перстнеподіб. АК	1 (2,7)	5,00±0,32	91,64±24,61	43,49 ±9,89
АК like-adenoma				
P		p<0,05	p<0,05	p<0,05
G2	31 (83,8)	9,45±4,46	303,91±194,46	78,87±27,72
G3	6 (16,2)	7,00±1,09	442,21±297,82	87,67±27,53
P		p<0,05	p<0,05	p>0,05
Без метастазів	30 (81,1)	8,80±3,41	313,47±193,97	79,18±26,25
З метастазами	7 (18,9)	10,14±6,91	313,47±193,97	85,08±34,27
P		p<0,05	p>0,05	p>0,05
Ki-67				
<10 %	6 (16,2)	7,67±1,97	229,65±105,68	71,36±20,08
10-25 %	13 (35,1)	8,46±3,13	369,15±257,59	86,30±31,11
>25 %	18 (48,7)	9,94±5,24	327,65±208,89	78,94±27,24
P		p<0,05	p<0,05	p>0,05

Примітка: КРК – колоректальна карцинома, АК – аденокарцинома, АК NOS – аденокарцинома неспецифікована, M±SD – середнє±стандартне відхилення

3. Середній периметр CD-34-позитивних судин показав достовірну різницю тільки за гістологічним типом (найменший периметр судин виявилась в аденокарциномі типу like-аденома, найбільший – у мікропапілярній аденокарциномі, $p < 0,05$).

Література.

1. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 71 (3). – P. 209-249.

2. Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study / N. M. Heather, A. Ward, M. Jenab et al. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2019. – Vol. 17 (7). – P. 1323-1331.e6.

3. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views / L. J. Hofseth, J. R. Hebert, A. Chanda et al. // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* volume. – 2020. – Vol. 17. – P. 352-364.

4. Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer / R. E. Graff, S. Möller, M. N. Passarelli et al. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2017. – Vol. 15 (8). – P. 1256-1264.

5. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors / C.M. Johnson, C. Wei, J.E. Ensor et al. // *Cancer Causes Control*. – 2013. – Vol. 24. – P. 1207-1222.

6. Рак в Україні, 2019-2020. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби [Електроний ресурс] / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович, Є. Л. Горох та ін. // Бюлетень Національного канцер-реєстру України. – 2021. – № 22. – Режим доступу до ресурсу http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/.

7. Evaluation of Intra-Tumoral Vascularization in Hepatocellular Carcinomas / Q. Zhang, J. Wu, X. Bai, T. Liang // *Front. Med*. – 2020. – Vol. 7. – P. 584250.

8. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer / N. Melling, C. M. Kowitz, R. Simon et al. // *J Clin Pathol*. – 2016. – Vol 69. – P. 209-214.

References.

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Scientific Reports*. 71(3), 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

4. Індекс проліферації за Ki-67 збільшувався разом із середньою кількістю та середньою площею CD-34-позитивних судин (всі $p < 0,05$).

9. Особливості колоректального фенотипу карцином невідомої первинної локалізації / Пославська О. В., Шпонька І. С., Гриценко П. О. // Вісник Української медичної стоматологічної академії «Актуальні проблеми сучасної медицини». – 2018. – Т. 18, № 3 (63). – С.111-115.

10. Relationships between vascularization and proliferation in invasive breast cancer / Beliën J. A., van Diest P. J., Baak J. P. // *J Pathol*. – 1999. – Vol. 189 (3). – P. 309-18.

11. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer / Y. L. Ma, J. Y. Peng, P. Zhang et al. // *Med Oncol*. – 2010. – Vol. 27. – P. 304-309.

12. Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections / C. F. Chantrain, Y. A. DeClerck, S. Groshen, G. McNamara // *J Histochem Cytochem*. – 2003. – Vol. 51 (2). – P. 151-158.

13. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise et al. // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9 (7). – P. 676-682.

14. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців / Пославська О. В. // *Морфологія*. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 122-126.

15. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ / Пославська О. В. // *Морфологія*. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 377-381.

2. Murphy, N., Ward, H. A., Jenab, M., Rothwell, J. A., Boutron-Ruault, M.-C., Carbonnel, F., Gunter, M. J. (2018). Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.07.030.

3. Hofseth, L. J., Hebert, J. R., Chanda, A., Chen, H., Love B. L., Pena, M. M., Murphy E. A. et al. (2020). Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 17:352-364. DOI: 10.1038/s41575-019-0253-4.
4. Graff, R. E., Möller, S., Passarelli, M. N., Witte J. S., Skytthe A., Christensen, K., Tan Q., Adami H-O., Czene K. et al. (2017). Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 15(8):1256-1264. DOI: 10.1016/j.cgh.2016.12.041.
5. Johnson C. M., Wei C., Ensor J. E., Johnson C. M., Wei, C. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 24: 1207-1222. DOI: 10.1007/s10552-013-0201-5.
6. Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. I., Horokh, Ye. L. et al. (2021). Rak v Ukraini, 2019-2020. Zakhvoriuvanist, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby. Biuleten Natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy № 22. [Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service. Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine No. 22.]. URL: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/.
7. Zhang, Q., Wu, J., Bai, X., Liang, T. (2020). Evaluation of Intra-Tumoral Vascularization in Hepatocellular Carcinomas. *Front. Med*. 7:584250. DOI: 10.3389/fmed.2020.584250.
8. Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Simon R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., Izbicki J. R., Marx A. H. (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 69(3):209-214. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-202985.
9. Poclavcka, O. V., Shponka, I. C., Hrytsenko, P. O. (2018). Ocoblyvocti kolorektalnoho fenotypu kartsynom nevidomoi pervynnoi lokalizatsii. [Features of the colorectal phenotype of carcinomas of unknown primary location]. *Vicnyk Ukrainckoi medychnoi ctomatologichnoi akademii «Aktualni problemy suchacnoi medytsyny»*. 18(3): 111-115. [In Ukrainian].
10. Beliën, J. A., van Diest, P. J., Baak, J. P. (1999). Relationships between vascularization and proliferation in invasive breast cancer. *J Pathol.*;189(3): 309-318. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199911)189:3<309::AID-PATH457>3.0.CO;2-0.
11. Ma, Y. L., Peng, J. Y., Zhang, P., Liu W-J., Huang L., Qin H-L. (2010). Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol*. 27: 304-309. DOI: 10.1007/s12032-009-9210-3.
12. Chantrain, C. F., DeClerck, Y. A., Groshen, S., McNamara, G. (2003) Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections. *J Histochem Cytochem*. 51(2):151-158. DOI: 10.1177/002215540305100203.
13. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 9(7): 676-82. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
14. Poslavska, O. V. (2015). Metodolohiia vykorystannia prohramnoho zabezpechennia dlia analizu tsyfrovoykh mikrofotohrafii na bazi kursu patomorfologhii z metoiu pidvyshchennia profesiinoho rivnia studentiv i naukovtsiv. [The methodology of using software for the analysis of digital photomicrographs based on the course of pathomorphology in order to improve the professional level of students and scientists]. *Morfologhiia*. 9(3): 122-126. [In Ukrainian].
15. Poslavska, O. V. (2016). Vyznachennia liniinykh rozmiriv ta ploshch okremykh morfologichnykh obektiv na mikrofotohrafiiakh za dopomohoiu prohramy ImageJ. [Determining the linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program]. *Morfologhiia*. 10(3): 377-381. [In Ukrainian].

ORCID:

Ihor K. Kharkhalis: 0000-0001-9487-4785

Oleksandra V. Poslavska: 0000-0002-3133-8413