

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aušrinė
NESTARENKAITĖ

Imuninio atsako storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje vertinimas skaitmeninės patologijos analitikos metodais

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2015–2020 metais Valstybiniame patologijos centre, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale, ir Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė – dr. Aida Laurinavičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina, M 001)

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010). Nuo 2015-10-01 iki 2019-06-18

VILNIUS UNIVERSITY

Aušrinė
NESTARENKAITĖ

Immune response assessment in a colorectal cancer microenvironment using digital pathology analytics

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2021

This dissertation was written during 2015–2020 at the National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, and at the Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University.

The research was supported by the Research Council of Lithuania.

Academic supervisor – Dr. Aida Laurinavičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine, M 001)

Academic consultant – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010). During 2015-10-01 and 2019-06-18

SANTRUMPOS

<i>BRAF</i>	– pelių sarkomos virusinio onkogeno homologas B (angl. <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>)
CIMP	– CpG salų hipermetilinimas (angl. <i>CpG island methylator phenotype</i>)
CIN	– chromosominis nestabilumas (angl. <i>chromosomal instability</i>)
CTL	– citotoksinis T limfocitas
CTLA4	– 4-asis citotoksinų T limfocitų antigenas (angl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
EGFR	– epiderminio augimo veiksnio receptorius (angl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
FDA	– JAV Maisto ir vaistų administracija (angl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FFPI	– formaline fiksuotas, parafine impregnuotas
G	– naviko diferenciacijos laipsnis
IHC	– imunohistochemija
IK	– invazijos kraštas
IN	– imunonuokrytis
<i>KRAS</i>	– Kirsten žiurkių sarkomos virusinio onkogeno homologas (angl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
LVI	– limfovaskulinė invazija
M	– tolimosios metastazės
MC	– masės centras
Mdn	– mediana
MHC	– audinių suderinamumo kompleksas (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MLH1	–1-asis mutL homologas (angl. <i>mutL homolog 1</i>), MMR sistemos baltymas
MMR	– DNR klaidingai suporuotų nukleotidų pažaidų taisymo sistema (angl. <i>DNA mismatch repair</i>)
MSH2	– 2-asis mutS homologas (angl. <i>mutS homolog 2</i>), MMR sistemos baltymas
MSH6	– 6-asis mutS homologas (angl. <i>mutS homolog 6</i>), MMR sistemos baltymas
MSI	– mikrosatelitų nestabilumas (angl. <i>microsatellite instability</i>)
MSS	– mikrosatelitų stabilumas (angl. <i>microsatellite stability</i>)
N	– naviko ir stromos sąveikos zonos naviko sritis

NIL	– navikus infiltruojantys limfocitai
NK	– naviko kraštas
NRAS	– neuroblastomos <i>RAS</i> virusinio onkogeno homologas (angl. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)
PD-1	– 1-asis programuotos ląstelės mirties baltymas (angl. <i>programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1	– 1-ojo programuotos ląstelės mirties baltymo ligandas (angl. <i>programmed death-ligand 1</i>)
PI	– pasikliautinis intervalas
PIK3CA	– genas, koduojantis fosfatidilinozitol-3-kinazės p110a katalizinį domeną (angl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>)
PMS2	– 2-asis PMS1 homologas (angl. <i>PMS1 homolog 2</i>), MMR sistemos baltymas
pN	– metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorija
Pne	– perineurinė invazija
PR	– proporcingoji rizika
PSO	– Pasaulio sveikatos organizacija
pT	– pirminio naviko išplitimo kategorija
S	– naviko ir stromos sąveikos zonos stromos sritis
SMAD4	– genas, koduojantis naviką slopinantį transkripcijos veiksnį (angl. <i>SMAD family member 4</i>)
SN	– standartinis nuokrypis
sp.	– spalva
SZ	– naviko ir stromos sąveikos zona
SŽN	– storosios žarnos navikas
SŽV	– storosios žarnos vėžys
TNM	– tarptautinė piktybinių navikų klasifikacijos sistema: T – pirminis navikas, N – limfmazgis, M – metastazė
TP53	– genas, koduojantis naviką slopinantį transkripcijos veiksnį (angl. <i>tumor protein P53</i>)
TS	– tikėtinumo santykis

TURINYS

ĮVADAS.....	10
Mokslinis aktualumas ir naujumas.....	12
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	14
Ginamieji disertacijos teiginiai.....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
1.1. Storosios žarnos vėžio epidemiologija.....	15
1.2. Storosios žarnos vėžio patogenezė.....	16
1.3. Storosios žarnos vėžio klasifikavimo kriterijai.....	18
1.3.1. Histopatologiniai klasifikavimo kriterijai.....	18
1.3.2. Molekuliniai klasifikavimo kriterijai.....	21
1.3.3. Klinikiniai prognoziniai ir predikciniai žymenys.....	22
1.4. Vėžio mikroaplinkos komponentai.....	25
1.5. Imuninis atsakas vėžio mikroaplinkoje.....	27
1.5.1. Imuninis atsakas ir mikrosatelitų nestabilumas.....	30
1.5.2. Imuninis atsakas ir imunoterapija.....	31
1.6. Imuninis atsakas audinio kontekste.....	33
1.6.1. Imuninio konteksto vizualus vertinimas.....	35
1.6.2. Imuninio konteksto vertinimas skaitmeninės patologijos metodais...	36
2. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI.....	41
2.1. Tiriamųjų pacientų imtys.....	41
2.2. Mėginių paruošimas.....	45
2.2.1. Imunohistocheminis dažymas.....	45
2.2.2. <i>MLH1</i> geno promotoriaus metilavimo tyrimas.....	46
2.3. Skaitmeninės patologijos analitikos metodai.....	47
2.3.1. Mikroskopinių preparatų skaitmenizavimas.....	48
2.3.2. Navikinio audinio klasifikavimas.....	49
2.3.3. Naviko mikroaplinkos ląstelių profiliavimas.....	50
2.3.4. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas.....	52

2.3.5. Imuninių ląstelių pasiskirstymo profilių sudarymas	56
2.3.6. Imunogradiento rodiklių apskaičiavimas	57
2.4. Statistinė analizė	58
3. REZULTATAI.....	60
3.1. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zona (I tiriamųjų pacientų imtis)	60
3.1.1. Naviko krašto nustatymas	60
3.1.2. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas	62
3.2. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (I tiriamųjų pacientų imtis)	67
3.2.1. Skaitmeninė storosios žarnos naviko vaizdo analizė	67
3.2.2. Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje rodikliai	68
3.2.3. Imuninio atsako rodiklių ir pataloginių pokyčių sąsajos	70
3.2.4. Imuninio atsako rodiklių tarpusavio sąsajos	71
3.2.5. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė	71
3.2.6. Imuninio atsako rodiklių faktorinė analizė	74
3.3. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (II tiriamųjų pacientų imtis).....	76
3.3.1. Skaitmeninė storosios žarnos naviko vaizdo analizė	76
3.3.2. Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje rodikliai	77
3.3.3. Imuninio atsako rodiklių ir pataloginių pokyčių sąsajos	79
3.3.4. Imuninio atsako rodiklių tarpusavio sąsajos	82
3.3.5. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė	82
3.3.6. Kombinuoti prognoziniai modeliai	87
4. REZULTATŲ APTARIMAS	89
4.1. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zona (I tiriamųjų pacientų imtis)	89
4.1.1. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo metodas	89
4.1.2. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas	91
4.2. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (I tiriamųjų pacientų imtis)	93

4.2.1. Imuninio atsako rodiklių prognozė	93
4.3. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (II tiriamųjų pacientų imtis).....	95
4.3.1. Imuninio atsako rodiklių prognozė	95
4.3.2. Kombinuoti prognoziniai modeliai	98
4.4. Tyrimo tęstinumas.....	101
IŠVADOS.....	102
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	103
PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	104
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	106
PRIEDAI	124
PADĖKA.....	130

ĮVADAS

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, storosios žarnos vėžys (SŽV) yra vienas dažniausių vėžinių susirgimų ir viena dažniausių onkologinių pacientų mirties priežasčių. Dėl vėžio diagnostikos pažangos ir personalizuoto gydymo pacientų išgyvenamumas ilgėja [1, 2]. Vis dėlto SŽV biologija yra labai įvairialypė, todėl, net esant panašioms klinikiniam, pataloginiams požymiams, stebima skirtinga ligos eiga ir atsakas į gydymą [3].

Pagrindiniai SŽV klasifikavimo kriterijai yra histopatologinės navikų charakteristikos. Tarptautinė piktybinių navikų klasifikacijos sistema (angl. *tumour-node-metastasis*; TNM) yra pamatinė anatomicinio vėžio išplitimo stadijavimo sistema, kuri lemia ligos prognozę [4]. Planuojant SŽV gydymą, atsižvelgiama ir į naviko lokalizaciją [5], taip pat į diferenciacijos laipsnį ir pumpuravimąsi – pastarųjų kriterijų vertinimą sudėtinga standartizuoti [6, 7]. Apskritai, histopatologinės navikų charakteristikos nėra pakankamai informatyvūs prognoziniai ir predikciniai žymenys. Taigi, siekiant tikslesnio SŽV klasifikavimo, pasitelkiami įvairūs navikų molekuliniai ir mikroaplinkos žymenys [8–10].

Kliniškai reikšmingų SŽV žymenų paiešką riboja šiam vėžio tipui būdingas didelis genetinis heterogeniškumas [11]. Šiuo metu SŽV diagnostika apima vos keletą molekulinį žymenų [12–14]: *KRAS* (angl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) ir *NRAS* (angl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) genų mutacijos yra predikciniai metastazavusio SŽV atsparumo biologinei, prieš epiderminio augimo veiksnio receptorių (EGFR) nukreiptai, terapijai žymenys; mikrosatelitų nestabilumas (MSI), tiriamas Linčo sindromo diagnostikos metu, taip pat yra predikcinis žymuo, skiriant adjuvantinę chemoterapiją II stadijos SŽV ir imunoterapiją metastazavusio SŽV atvejais. *BRAF* (angl. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) geno mutacijos siejamos su agresyvesne ligos eiga. Nustatytas *BRAF* mutuo to metastazavusio SŽV teigiamas atsakas į *BRAF* ir mitogeno aktyvinamų baltymų kinazių slopiklių bei biologinės anti-EGFR terapijos kombinaciją [15]. II stadijos SŽV atkryčio rizikai vertinti buvo sukurti keli genų raiškos testai, pavyzdžiui, *Oncotype DX*®, *ColoPrint*® ar *ColDx*®, bet dėl nepakankamų duomenų pridėtinei klinicinei ir predikicinei vertei pagrįsti šiuo metu jų naudojimas nėra rekomenduojamas [12, 16].

Intensyvūs pastarųjų dešimtmečių vėžio tyrimai atskleidė, kad didelę įtaką jo patogenezei ir progresavimui turi ir naviko mikroaplinkos kontekstas [17]. Vienas kliniškai svarbių veiksnių yra vietinis antinavikinis imuninis

atsakas [18, 19]. Dideli citotoksinių ir atminties navikus infiltruojančių limfocitų (NIL) tankiai koreliuoja su mažesne ligos progresavimo rizika ir su teigiamu atsaku į imuninės patikros taškų slopiklių terapijas esant įvairioms vėžio atmainoms [20–24]. Išsamūs SŽV tyrimai atskleidė NIL pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje heterogeniškumą ir pabrėžė imuninio konteksto svarbą, t. y. antinavikinio imuninio atsako veiksmingumas priklauso ne tik nuo NIL tipų ir absoliutaus tankio, bet ir nuo jų erdvinio pasiskirstymo audinyje [25]. Minėtina, kad vėliau šios sąsajos pastebėtos tiriant melanomas, krūties, plaučių vėžį [26–28]. Nustatyta, kad MSI storosios žarnos navikuose (SŽN) lemia didelį imunogeniškumą ir koreliuoja su gausiu imuniniu infiltratu [29] bei yra siejamas su ilgesniu pacientų išgyvenamumu [30, 31]. 2020 m. JAV Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration*; FDA) patvirtino 1-ojo programuotos ląstelės mirties baltymo (PD-1) slopiklių terapiją metastazavusio SŽV, kuriam būdingas MSI, pirmaeiliam gydymui, tačiau apie 60 proc. minėta liga sergančių pacientų terapinis atsakas nėra reikšmingas [32, 33]. Nauji duomenys rodo, kad tarp SŽN, kuriems būdingas MSI, pastebimi gana dideli NIL tankio skirtumai, taip pat 26–35 proc. navikų nepasižymi gausiu imuniniu infiltratu [34]. Taigi NIL tankio variacija šiuose navikuose iš dalies paaiškina MSI prognozinės ir predikcinės galios trūkumą ir kreipia dėmesį į imuninio konteksto tyrimus.

Skirtingais analitikos metodais ieškoma tinkamiausių NIL atsako naviko mikroaplinkoje rodiklių, kurie padėtų tiksliai prognozuoti ligos eigą. Objektyvesni ir tikslesni *in situ* imuninio infiltrato kiekybiniai matavimai atliekami skaitmenine patologijos vaizdo analize, o erdvinės statistikos metodai padeda išsamiau įvertinti imuninį kontekstą ir atskleisti jo pridėtinę prognozinę vertę. Pavyzdžiui, J. Galonas ir bendraautoriai 2012 m. pristatė SŽV skirtą *Immunoscore*® metodiką, kuri yra pagrįsta skaitmenine imunohistochemija (IHC) ir tiria visų bei citotoksinių T limfocitų tankius naviko šerdyje ir invazijos krašte (IK) [35]. 2018 m. *Immunoscore*® įvertis validuotas kaip nepriklausomas prognozinis rodiklis, pranokstantis standartinius šio vėžio tipo žymenis, įskaitant TNM kriterijus ir MSI požymius [36, 37]. Neseniai I. P. Nearchou ir bendraautoriai pasiūlė alternatyvų erdvinį imunoonkologijos įvertį, kuris kombinuoja kelis nepriklausomus imuninio atsako rodiklius: NIL ir skirtingų makrofagų populiacijų tankius naviko šerdyje ir IK bei NIL, esančių 50 µm spinduliu aplink naviko pumpurus IK periferijoje, tankį. Šiuo įverčiu stratifikuoti pacientai trijose nepriklausomose II stadijos SŽV sirgusių pacientų imtyse [38, 39]. Tiriant metastazavusio SŽV mikroaplinką, nustatyta, kad didelis citotoksinių T limfocitų tankis 15 µm spinduliu aplink navikines ląsteles yra

nepriklausomas pacientų ilgesnio išgyvenamumo prognozinis veiksnys [40]. Minėtina, kad metastazavusios melanomos atveju dideli citotoksinių T limfocitų ir 1-ąjį programuotos ląstelių mirties baltymo ligandą (PD-L1) sintetinančių imuninių ląstelių tankiai 20 μm spinduliu aplink navikines ląsteles yra predikciniai atsako į anti-PD-1 terapiją žymenys [41]. Apskritai, naujai kuriamos imuninio atsako naviko mikroaplinkoje profiliavimo sistemos pabrėžia imuninių ir navikinių ląstelių tarpusavio erdvinį sąveikų analizės informatyvumą [42, 43], vis dažniau siūlomi kombinuoti modeliai, kuriuose integruojamos kiekybinės ir erdvinės imuninio konteksto ir naviko histopatologinės, molekulinės ypatybės, taip stiprinant prognozinę modelio galią [38, 39].

Mokslinis aktualumas ir naujumas

Šiandien esamų naviko histopatologinių ir molekulinų žymenų nepakanka SŽV kliniškai klasifikuoti. Papildomos prognozinės informacijos gali suteikti naviko mikroaplinkos žymenys, ypač NIL, kurie atspindi paciento imuninį atsaką į naviką. Taikant skaitmeninės patologijos metodus, *in situ* imuninio atsako analize įrodyta, kad NIL tankis ir erdvinis pasiskirstymas naviko mikroaplinkoje koreliuoja su pacientų išgyvenamumu ir atsaku į imunoterapijas. Įprastai šie metodai yra pagrįsti NIL tankio skirtinguose naviko mikroaplinkos regionuose ir (arba) atstumų tarp imuninių ir navikinių ląstelių kiekybiniu vertinimu. Nauji skaitmeninės patologijos įrankiai leidžia integruoti įvairius imuninio konteksto aspektus, tačiau, galima teigti, kad erdvinės analitikos galimybės vis dar nėra išnaudotos ieškant prognozinų imuninio atsako rodiklių.

Rašant disertaciją, ieškota skaitmeninės vaizdo analizės ir erdvinės analitikos metodų, kuriais būtų galima nustatyti informatyvius imuninio atsako naviko mikroaplinkoje rodiklius, turinčius savarankišką prognozinę vertę SŽV sergančių pacientų imtyse. Derinant skaitmeninės vaizdo analizės ir dirbtinio intelekto įrankius bei šešiakampių gardelių analitikos principus, taikant unikalių vienareikšmiškai apibrėžtų matematinių taisyklių seką, sukurta metodika, kuria nustatomi naujo tipo rodikliai, pagrįsti NIL tankių profiliais naviko ir stromos sąveikos zonoje. Ši metodika: 1) taiko erdvinės analitikos metodus, skirtus sąveikos zonai tarp navikinio epitelio ir aplinkinės stromos audinio automatiškai nustatyti ir jai suskirstyti; 2) matuoja absoliutų NIL tankį ir jo kryptingą pokytį (imunogradientą) naviko srities link sąveikos zonoje; 3) nustato sąveikos zonos imunogradientu pagrįstus kombinuotus įverčius, kurie yra stiprūs nepriklausomi prognoziniai veiksniai SŽV sergančių pacientų imtyse.

Kitos imuninio atsako profiliavimo metodikos yra pagrįstos NIL tankiais, matuojamais naviko šerdyje ir IK [37], tačiau nevertina kryptingo NIL tankio profilio navikinio epitelio ir aplinkinės stromos sąveikos regionuose. Be to, šios metodikos įprastai naudoja fiksuoto pločio IK, kuris dėl dažnai netolygaus, infiltruojančio naviko augimo pobūdžio gali sukelti matavimų paklaidų. Priešingai, sąveikos zonos samprata ir metodas yra pagrįsti tam tikros naviko mikroaplinkos vietos, kuri apima naviko kraštą (NK) ir sąveikos zonos sritis link naviko ir stromos, tikimybe. Šis metodas grindžiamas vienareikšmiškai apibrėžtomis taisyklėmis ir leidžia pritaikyti kintančio pločio sąveikos zoną, kuri labiau atitinka navikinio audinio erdvinę įvairovę. Sąveikos zona gali būti pritaikyta įvairių imuninių infiltratų skirtinguose patologiniuose audiniuose ar audiniuose be patologijos tyrimams. Sąveikos zona ir joje matuojami imuninio atsako rodikliai yra pagrįsti didelio pajėgumo ir automatizuotomis kompiuterinėmis procedūromis, todėl nepriklauso nuo eksperto vizualaus vertinimo ir dažnai atspindi subvizualius požymius, kurių neįmanoma vertinti įprastiniais mikroskopijos metodais.

Disertacijoje siūlomi nauji imuninio atsako rodikliai. Jų prognozinė vertė tirta dviejose SŽV sergančių pacientų, gydytų Vilniaus ir Noringamo (Jungtinė Karalystė) sveikatos priežiūros institucijose, imtyse. Citotoksinių T ląstelių (CD8) imunogradientas (abiejose imtyse), B ląstelių (CD20) imunogradientas ir histologinis naviko augimo pobūdis (Noringame gydytų pacientų imtyje) buvo nepriklausomi prognoziniai pacientų bendrojo išgyvenamumo veiksniai. CD8 ir CD20 imunogradientai pranoko absoliutaus NIL tankio naviko mikroaplinkoje rodiklius ir standartinius klinikinius, patologinius ir molekulinis žymenis.

Sudaryti nauji kombinuoti modeliai pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti: CD8–CD20 imunogradiento įvertis, pagrįstas tik CD8 ir CD20 IHC žymenimis, ir imuninės sąveikos įvertis, kuris papildomai integruoja histologinį naviko augimo pobūdžio kriterijų. Šie įverčiai prognozinė galia pranoko navikų TNM kriterijus ir MSI požymius, kurie iki šiol yra vieni pagrindinių rodiklių, numatant SŽV klinikinę eigą ir atsaką, skiriant citotoksinę chemoterapiją ar imunoterapiją.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Šio **darbo tikslas** – sukurti kiekybinę ir automatizuotą skaitmeninę vaizdo analizę pagrįstą imuninio atsako vėžio mikroaplinkoje matavimo sistemą ir įvertinti jos prognozinę galią storosios žarnos vėžiu sergančių pacientų imtyse.

Iškelti **darbo uždaviniai**:

1. Sukurti skaitmeninę mikroskopinio vaizdo analizę ir erdvine statistika pagrįstą metodiką, skirtą imuninių ląstelių pasiskirstymui naviko mikroaplinkoje profiliuoti, ir informatyvius kiekybinius rodiklius imuniniam atsakui storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje matuoti.
2. Įvertinti imuninio atsako rodiklių prognozinę vertę dviejose nepriklausomose storosios žarnos vėžiu sergančių pacientų imtyse.
3. Sudaryti kombinuotus prognozinis modelius, taikytinus esant storosios žarnos vėžiui, ir nustatyti jų vertę, siejant su standartiniais klinikiniais, patologiniais ir molekuliniais rodikliais.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Naviko ir stromos sąveikos zonos imunogrado rodikliais įvertinti NIL yra nepriklausomi prognoziniai SŽV sergančių pacientų bendrojo išgyvenamumo veiksniai, informatyvesni negu absoliutus NIL tankis naviko mikroaplinkoje ir standartiniai klinikiniai, patologiniai ir molekuliniai rodikliai.
2. Kombinuoti CD8–CD20 imunogrado ir imuninės sąveikos įverčiai yra stiprūs nepriklausomi prognoziniai SŽV sergančių pacientų bendrojo išgyvenamumo veiksniai, pranokstantys navikų TNM kriterijus ir MSI požymius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Storosios žarnos vėžio epidemiologija

Kaip jau minėta, storosios žarnos vėžys (SŽV) yra vienas iš dažniausių onkologinių susirgimų. PSO Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros duomenimis (<<http://gco.iarc.fr>>), 2020 m. SŽV visame pasaulyje buvo trečia pagal naujų atvejų ir antra pagal mirčių skaičių vėžio atmaina, nustatoma abiem lytims: užregistruota daugiau kaip 1,9 mln. naujų atvejų (10 % visų vėžio atvejų) ir 935 tūkst. mirčių (9,4 % visų mirčių nuo vėžio). Minėtina, kad 2020 m. vyrai dažniausiai sirgo plaučių (14,5 % atvejų), prostatos (13,5 % atvejų) ir SŽV (10,9 % atvejų), o moterys – krūties (24,2 % atvejų), SŽV (9,5 % atvejų) ir plaučių (8,4 % atvejų) vėžiu; mirštamumas nuo SŽV siekė apie 48 proc. tiek vyrų, tiek moterų grupėse.

Kalbamaisiais metais panaši SŽV epidemiologijos statistika buvo ir Europos regione. Europos informacijos apie vėžį sistemos duomenimis (<<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>>), 2020 m. Lietuvoje SŽV buvo antra pagal naujų atvejų ir mirčių skaičių vėžio atmaina – užregistruoti 1892 nauji atvejai (11,4 % visų vėžio atvejų) ir 902 mirtys (11,1 % visų mirčių nuo vėžio). Lietuvoje vyrai dažniausiai sirgo prostatos (26,6 % atvejų), plaučių (13,2 % atvejų) ir SŽV (11,1 % atvejų), o moterys – krūties (21,7 % atvejų), SŽV (11,8 % atvejų) ir gimdos kūno (9,8 % atvejų) vėžiu; mirštamumas nuo SŽV siekė apie 48 proc. vyrų ir apie 45 proc. moterų grupėse.

Paskutiniaisiais dešimtmečiais pasaulyje pastebimos sergamumo onkologinėmis ligomis didėjimo tendencijos. Tai siejama su ilgėjančia gyvenimo trukme ir naujais vėžio diagnostikos metodais [2, 44]. Minėtina, kad sergamumo SŽV rodikliai skirtinguose pasaulio regionuose skiriasi 6–8 kartus. Šios lokalizacijos vėžį galima laikyti socialinės ir ekonominės raidos rodikliu, t. y. besivystančiose šalyse pastebimas koreliuojantis naujų susirgimų SŽV skaičiaus ir žmogaus socialinės raidos indekso didėjimas. Labai aukšto indekso šalyse (pavyzdžiui, JAV, Australijoje, Naujojoje Zelandijoje) kasmetinis susirgimų SŽV skaičius dabar yra pasiekęs *plateau* fazę arba ima mažėti [45]. Sergamumo SŽV didėjimas taip pat siejamas su kintančiais mitybos įpročiais, pavyzdžiui, didesnis raudonosios ir apdorotos mėsos vartojimas koreliuoja su didesne rizika sirgti gaubtinės žarnos vėžiu [46]. Kiti SŽV rizikos veiksniai: rūkymas, alkoholio vartojimas, nutukimas. Sveika mityba, papildyta daržovėmis ir vaisiais, didesnis fizinis aktyvumas storosios žarnos adenomų atsiradimo riziką sumažina 16–20 proc. [46, 47].

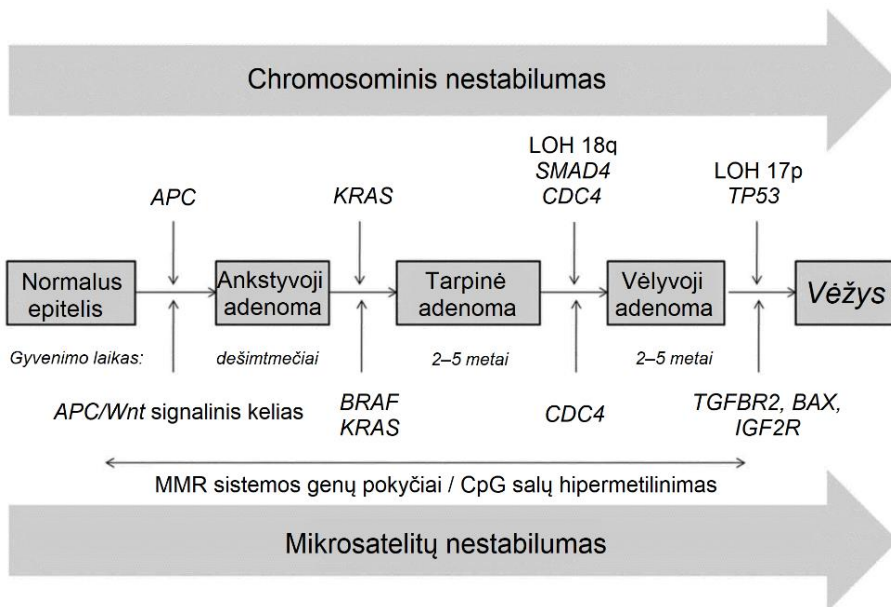
Sergant SŽV, išgyvenamumas labai priklauso nuo ligos stadijos diagnozės metu: JAV neišplitusio SŽV atveju pacientų 5 m. bendrasis

išgyvenamumas siekia apie 90 proc., vėžiui išplitus į sritinius limfmazgius – apie 70 proc., o išplitus į kitus organus – apie 10 proc. [48]. Lietuvoje 2008–2012 m. laikotarpiu SŽV sergančių pacientų 5 m. santykinis išgyvenamumas neišplitusio SŽV atveju siekė apie 80 proc., vėžiui išplitus į sritinius limfmazgius – apie 50 proc., o išplitus į kitus organus – apie 10 proc. [49]. Vis dėlto, lyginant skirtingų pasaulio regionų epidemiologinius duomenis, matyti reikšmingi SŽV sergančių pacientų išgyvenamumo skirtumai [2, 45]. Mirštamumo nuo SŽV mažėjimas registruojamas labiau išsivysčiusiose šalyse, kuriose vykdomos prevencinės patikros programos ir taikomos geriausia praktika pagrįstos individualizuotos gydymo metodikos [1, 2].

1.2. Storosios žarnos vėžio patogenezė

Apytiksliai 70 proc. SŽV atsiranda sporadiškai, 20–25 proc. susirgimų yra šeiminio vėžio atvejai ir tik 5–10 proc. atvejų yra susiję su paveldimais genetiniais pokyčiais [50]. Sporadinio SŽV patogenezę lemia keli molekuliniai mechanizmai: 1) 70–85 proc. SŽN nustatomas chromosominis nestabilumas (angl. *chromosomal instability*; CIN), kuris pasireiškia chromosomų skaičiaus ir struktūros pokyčiais (chromosominės translokacijos, amplifikacijos, delecijos, heterozigotiškumo praradimas ir kt.) [13]; 2) 30–40 proc. SŽN nustatomi epigenetiniai pokyčiai, CpG salų hipermetilinimas (angl. *CpG island methylator phenotype*; CIMP), kuris sukelia genų raiškos slopinimą; 3) 12–15 proc. SŽN būdingas mikrosatelitų, 20–200 bazių porų (bp) ilgio DNR sekų, sudarytų iš 1–5 bp pasikartojimų, nestabilumas (angl. *microsatellite instability*; MSI), kuris atsiranda dėl DNR klaidingai suporuotų nukleotidų pažaidų taisymo sistemos (angl. *DNA mismatch repair*, MMR) baltymų (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ir kt.) funkcijos praradimo; sporadiniai SŽN, kuriems būdingas MSI, yra siejami su CIMP fenotipu ir *MLH1* geno promotoriaus metilinimu. Šie molekuliniai mechanizmai sąlygoja ląstelių genetinį nestabilumą, protoonkogenų ir naviką slopinančių genų pokyčius, todėl palaiapsniui ląstelių genomuose kaupiasi įvairių mutacijų, kurios skatina vėžio vystymąsi [13, 50–52].

Dažniausiai SŽV vystymasis yra 10–20 m. trunkantis daugiaetapis procesas. Šį procesą 1990 m. E. R. Fearonas ir B. Vogelsteinas apibendrino adenomos-karcinomos seka [53]. Kaip vaizduojama 1.1 pav., ląstelėse besikaupiančios somatinės mutacijos lemia gerybinių storosios žarnos adenomų atsiradimą ir jų virsmą į piktybinius navikus. Karcinogenezę skatinančių genetinių pokyčių ląstelėse atsiranda tam tikru nuoseklumu, tačiau teigiama, kad karcinomai išsivystyti daugiau įtakos turi bendras šių pokyčių kiekis.



1.1 pav. Storosios žarnos adenomos-karcinomos seka (adaptuota pagal H. T. Nguyen ir kt. [54]). Schema apibendrina storosios žarnos vėžio patogenezės molekulinis mechanizmus ir nuosekliai išdėsto signalinius kelius, genus ar chromosomų regionus, kurių pokyčiai nulemia adenomos ir karcinomos susiformavimą. LOH 18q – heterozigotiškumo praradimas 18 chromosomos ilgajame petyje; LOH 17p – heterozigotiškumo praradimas 17 chromosomos trumpajame petyje.

Vienas iš ankstyviausių genetinių pokyčių, lemiančių storosios žarnos adenomos susiformavimą, yra naviką slopinančio *APC* (angl. *adenomatous polyposis coli*) geno mutacijos ar šio geno praradimas dėl chromosominių persitvarkymų. Sutrikus *APC* baltymo funkcijai, ląstelėse kaupiasi β -kateninas, kuris aktyvina Wnt (angl. *Wingless/integrase-1*) signalinį kelią, todėl pakinta žarnos audinio atsinaujinimo procesų homeostazė. *APC* geno mutacijos nustatomos 40–80 proc. visų sporadinių adenomų ir karcinomų [55, 56]. Paveldimos *APC* geno mutacijos sukelia šeiminės adenominės polipozės sindromą, kuris pasireiškia šimtais ar tūkstančiais polipų vidinėje storosios žarnos sienelėje, o negydomas sukelia vėžį (~1 % visų SŽV atvejų) [57]. Storosios žarnos gleivinės epitelio ląstelėse Wnt signalinio kelio aktyvinimą gali lemti ir β -katenino geno (*CTNBI*) mutacijos, tačiau jos būdingesnės karcinomos stadijai [56]. Kiti ankstyvieji genetiniai pokyčiai, siejami su storosios žarnos adenomos susiformavimu, yra aktyvinančios *KRAS* ir *BRAF* genų mutacijos – jos stimuliuoja RAS/MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*) signalinį kelią, kuris skatina ląstelių proliferacinį aktyvumą. *KRAS* geno mutacijos nustatomos 35–42 proc. adenomų ir karcinomų, *BRAF* geno mutacijos nustatomos 4–12 proc. ankstyvųjų

karcinomų [56]. Nors *KRAS* ir *BRAF* genai priklauso tam pačiam signaliniam keliui, *KRAS* geno mutacijos siejamos su CIN, o *BRAF* geno mutacijos yra ankstyvasis reiškinys navikuose, kuriems būdingas CIMP fenotipas ir MSI požymiai [51]. Kiti genetiniai pokyčiai, sietini su vėlesniais adenomos-karcinomos sekos etapais, yra heterozigotiškumo praradimas 17 ir 18 chromosomose, naviką slopinančių genų, pavyzdžiui, *SMAD4* (angl. *SMAD family member 4*), *CDC4* (angl. *cell division control protein 4*), *TP53* (angl. *tumor protein P53*), ar kitų reguliacinių genų, pavyzdžiui, *TGFBR2* (angl. *transforming growth factor beta receptor 2*), *BAX* (angl. *BCL2 associated X, apoptosis regulator*), *IGF2R* (angl. *insulin like growth factor 2 receptor*), pokyčiai [54].

1.3. Storosios žarnos vėžio klasifikavimo kriterijai

Vėžiui diagnozuoti atliekamas histopatologinių pokyčių tyrimas, vertinant audinio biopsijos ir operacinės medžiagos mikroskopinius preparatus. Histologinių preparatų analizė yra pamatinis tyrimas klinikiniam vėžio klasifikavimui ir ligos eigos prognozei. Gydytojai patologai, vadovaudamiesi sutartiniais histopatologiniais kriterijais [58, 59], vertina audinio ląstelių morfologiją, invaziją, analizuoja diagnostinius, prognozinčius ir predikcinius IHC bei molekulinčius žymenis.

1.3.1. Histopatologiniai klasifikavimo kriterijai

80 proc. storosios žarnos karcinomų yra adenokarcinomos. Kitos karcinomos – mucininės (10 % atvejų), dantytosios (8 % atvejų), žiedinių ląstelių (~1 % atvejų) – yra retesnės. PSO išskyrė keletą labai retų histologinių tipų, tokių kaip neuroendokrininės, plokščialąstelinės karcinomos, taip pat nediferencijuojamas karcinomas, kurių piktybiškumas, palyginti su adenokarcinomomis, yra ypač didelis [59]. Prognozuojant SŽV progresavimą ir metastazavimo riziką, remiamasi gairėse apibrėžtais histopatologiniais kriterijais:

- TNM sistema yra pagrindinė anatomicinio vėžio išplitimo stadijavimo sistema [4]. Klinikinė TNM klasifikacija remiasi klinikiniais duomenimis (ultragarso, kompiuterinės tomografijos, magnetinio rezonanso tomografijos ir kt.), ji tvirtinama atliekant histologinį biopsijos ir operacinės medžiagos tyrimą: įvertinamas pirminio SŽN išplitimas į audinius, t. y., ar navikas infiltruoja pogleivį (pT1), raumeninį audinį (pT2), serozinį audinį, ar nepadengtus pilvaplėve perikolinius, perirektinius audinius (pT3), arba, kai

tiesiogiai pažeidžia kitus organus, struktūras ir (ar) perforuoja visceralinę pilvaplėvę (pT4a, pT4b), tiriamas sritinių limfmazgių pažeidimas, t. y., ar metastazės nustatomos 1–3 limfmazgiuose (arba kitose šalia storosios žarnos esančiose struktūrose) (pN1a -1b, -1c), 4–6 limfmazgiuose (pN2a), 7 ir daugiau limfmazgių (pN2b). Atliekamas kitų organų audinių biopsijų ar operacinių medžiagos tyrimas pirminio naviko tolimosioms metastazėms patvirtinti (M kategorija). Apibendrinant šiuos kriterijus, nustatomas I–IV stadijos vėžys [59]. TNM klasifikaciją siūloma papildyti kitais histologiniais kriterijais, molekulinio ar *in situ* imuninio atsako profiliais [60–62]. Tarptautinė vėžio kontrolės sąjunga (angl. *Union for International Cancer Control*; UICC) rekomenduoja vėžio stadijas sieti tik su anatominiu ligos išplitimu diagnozės metu, o kitus veiksnius apibendrinti „prognozinių grupių“ kategorijomis, nes tiek vėžio išplitimas, tiek kitos jo histopatologinės ar molekulinės ypatybės yra savarankiški prognoziniai veiksniai [63].

- SŽV pagal pirminio naviko lokalizaciją yra skirstomas į dešinėsios pusės (kylančioji ir proksimalinė skersinė žarna) ir kairiosios pusės (nusileidžiančioji, distalinė skersinė ir riestinė žarna). Dešinėsios pusės SŽV dažniau diagnozuojamas moterims ir vyresniems pacientams, diagnozės metu dažniau yra pažengusios stadijos. Dešinėsios pusės SŽN siejami su CIMP fenotipu ir MSI požymiais bei *BRAF* geno mutacijomis, dažnai šie navikai pasižymi imunogenišku ir bloga diferenciacija. Kairiosios pusės SŽV dažniau diagnozuojamas vyrams ir jaunesniems pacientams. Kairiosios pusės SŽN yra siejamas su CIN fenotipu ir adenomos-karcinomos seka. Dešinėsios pusės I-II stadijos SŽV yra geros prognozės ir turi gerą atsaką į gydymą, tačiau vėžiui išplitus, prognozė ir atsakas į adjuvatinę ir taikinių terapijas yra daug blogesnis nei kairiosios pusės III-IV stadijos SŽV [64, 65]. Molekuliniai profiliai iš dalies paaiškina pastebimus histopatologinių charakteristikų ir klinikinės ligos eigos skirtumus dešinėsios ir kairiosios pusės SŽN atvejais [66].

- Naviko diferenciacijos laipsnis yra vienas iš pagrindinių kriterijų, charakterizuojančių vėžio polinkį plisti. Adenokarcinomos skirstomos į geros (G1), vidutinės (G2) ir blogos (G3) diferenciacijos, kai liaukinės struktūras formuoja atitinkamai >95 proc., 50–95 proc., <50 proc. navikinio epitelio [67]. Naviko diferenciacija koreliuoja su TNM kriterijais, pavyzdžiui, blogos diferenciacijos laipsnis yra siejamas su didesne metastazių sritiniuose limfmazgiuose rizika [68]. Vis dėlto naviko diferenciacijos laipsnio vertinimas nėra vieningai apibrėžtas. Tyrimai rodo, kad SŽN pagal diferenciaciją skirstant į dvi grupes padidinamas šio kriterijaus vertinimo ir prognozinis tikslumas [69]. PSO gairėmis siūloma

vertinti mažiausiai diferencijuotą naviko komponentą ir išskirti dvi kategorijas: žemos (G1/G2) ir aukštos (G3) diferenciacijos [59]. Taip pat tyrėjai šiam kriterijui standartizuoti siūlo vertinti blogos diferenciacijos laipsnio ≥ 5 ląstelių klasterių skaičių, kuris yra tikslesnis ir nepriklausomas prognozinis žymuo SŽV [70].

- Limfovaskulinė (LVI) ir perineurinė (Pne) invazijos – navikinių ląstelių išplitimas atitinkamai į limfagyslių ar kraujagyslių kanalus ir į nervus audinyje. Tai sąlygoja tolesnį ląstelių metastazavimą į sritinius limfmazgius ir atokiuosius organus, taip pat didina mikrometastazių riziką ankstyvosios stadijos vėžio atvejais. Šie kriterijai yra glaudžiai susiję su kitais navikinių ląstelių metastazavimo rizikos veiksniais. Nustatyta, kad limfovaskulinė ir perineurinė invazijos yra reikšmingi SŽV progresavimo veiksniai tiek pažengusios, tiek ankstyvosios stadijos vėžio atvejais [71–73].

- Naviko augimo pobūdį pirmieji apibrėžė J. R. Jassas ir bendraautoriai [74]: jie SŽV išskyrė ekspansyvų (tolygų, arba „stumiantį“) ir infiltruojantį (netolygų, arba „židininį“) naviko augimo frontus. Nustatyta, kad SŽN, kuriems būdingas infiltruojantis augimo frontas, susiję su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Minėtina, kad vėliau atliktuose kituose tyrimuose infiltruojantis naviko augimo frontas taip pat sietas su bloga SŽV prognoze ir ankstyvu atkryčiu [75, 76]. Infiltruojantis naviko augimas stipriai koreliuoja su neigiamais klinikiniais ir patologiniais veiksniais, pavyzdžiui, su aktyvinančiomis *BRAF* geno mutacijomis. Priešingai, ekspansyvus naviko augimas yra susijęs su maža navikinių ląstelių metastazavimo rizika, be to, koreliuoja su MSI. Tarptautinės vėžio kontrolės sąjungos gairėmis rekomenduojama naviko augimo pobūdį įtraukti kaip kriterijų, papildantį TNM sistemą [77], tačiau kol kas jo vertinimas nėra standartizuotas.

- SŽV būdingas pumpuravimosi fenomenas – tai ≤ 5 nediferencijuotų ląstelių klasterių formavimasis naviko IK. Daugeliu tyrimų nustatyta, kad gausūs pumpuravimosi židiniai yra nepriklausomas blogos prognozės veiksnys, esant ankstyvosios stadijos SŽV [78]. SŽN pastebimas ir intranavikinis pumpuravimasis, kuris siejamas su metastazėmis limfmazgiuose [6]. 2017 m. Tarptautinės naviko pumpuravimosi konsorciumo konferencijos (angl. *International Tumor Budding Consensus Conference*; ITBCC) pranešime buvo pristatyta standartizuota pusiau kiekybinė SŽN pumpuravimosi vertinimo sistema, kurią buvo pasiūlyta įtraukti į rutininę diagnostiką [6].

- Dalis SŽN pasižymi gausia limfocitine infiltracija naviko periferijoje. 1986 m. J. R. Jassas ir bendraautoriai pirmieji įrodė, kad limfocitų infiltratas naviko IK buvo nepriklausomas tiesiosios žarnos vėžiu sirgusių pacientų ilgesnio išgyvenamumo veiksnys, papildantis prognozę pagal TNM kriterijus

[79]. Tyrėjai pasiūlė šio vėžio tipo klasifikavimo sistemą, į kurią įtraukė dviejų kategorijų limfocitinės infiltracijos kriterijų: limfocitinė reakcija laikyta „gausia“, kai ties naviko IK buvo matyti tankus limfocitų infiltratas, priešingu atveju, ji laikyta „negausia“ [74]. Vėliau kitais tyrimais patvirtinta, kad didelis limfocitų tankis naviko periferijoje koreliuoja su limfocitų tankiu naviko šerdyje ir yra susijęs su efektyvesniu antinavikiniu imuniniu atsaku bei ilgesniu pacientų išgyvenamumu SŽV ir kitų vėžio tipų atveju [80–82]. SŽN, kuriems būdinga MSI, pasižymi uždegiminės Krono ligos tipo limfocitine infiltracija, t. y. gausūs limfocitų agregatai (su germinaliniais centrais ar be jų) pasiskirstę žarnos sienoje atokiau IK. Šios struktūros taip pat yra aktyvaus antinavikinio imuninio atsako žymuo [83]. Histologinio tyrimo metu NIL ir Krono ligos tipo limfocitinei infiltracijai vertinti taikomos pusiau kiekybinės metodikos [84].

1.3.2. Molekuliniai klasifikavimo kriterijai

Vėžio vystymasis yra daugiapakopis procesas, kurį skatina ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir apoptozės pokyčiai. Išsamios navikinių ląstelių genomų ir genų raiškos analizės atskleidė genetinių pažaidų kompleksiskumą ir ląstelių kloninės ekspansijos dinamiką [85]. Didelis SŽV genominis nestabilumas ir intranavikinis heterogeniškumas atsiskleidžia histologinių ir molekulinį potipių įvairove [86, 87]. Visus genetinių ir epigenetinių pokyčių derinius, lemiančius ląstelių neoplastinę transformaciją, apibendrinti visiems navikams sudėtinga, tačiau, vertinant SŽV, išskirti pagrindiniai molekuliniai profiliai:

- 2012 m. Vėžio genomo atlase (angl. *The Cancer Genome Atlas*; TCGA) pristatyti integruotos SŽV somatinių pokyčių analizės duomenys: apibendrinti 224 SŽN (navikinis ir nepakitęs audiniai) egzomų sekų, DNR kopijų skaičiaus, genų promotorių metilinimo, RNR ir mikroRNR raiškos pokyčiai. SŽN suklasifikuoti, juos skirstant į dvi grupes: 16 proc. navikų pasižymėjo dideliu mutacijų dažniu, siejamu su MMR sistemos genų pažaidomis ir MSI (13 % atvejų) arba su DNR polimerazės ϵ (POLE) mutacijomis (3 % atvejų); kiti 84 proc. navikų turėjo stabilius mikrosatelitus (MSS), pasižymėjo mažu mutacijų dažniu, tačiau dideliu somatinių DNR kopijų pokyčių skaičiumi ir mutacijomis *APC*, *TP53*, *KRAS*, *SMAD4*, ir *PIK3CA* (angl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) genuose. Gaubtinės ir tiesiosios žarnų adenokarcinomos genetiniu lygmeniu nesiskyrė, tačiau navikams, kurių lokalizacija buvo

dešiniojoje storosios žarnos pusėje, buvo būdingesnis didelis mutacijų dažnis [88, 89].

- 2015 m. SŽV tipavimo konsorciumas apibendrina >4 000 pacientų navikų genų raiškos profiliavimo duomenis, susiejo juos su genomikos, proteomikos duomenimis ir išskyrė 4 molekulinis tipus (angl. *consensus molecular subtypes*; CMS) [90]: 14 proc. atvejų priskirti CMS1 („MSI imuninis“), 37 proc. – CMS2 („kanoninis“), 13 proc. – CMS3 („metabolinis“), 23 proc. – CMS4 („mezenchiminis“) tipui, likę 13 proc. atvejų priskirti mišrių navikų kategorijai. Nustatyta, kad CMS1 tipo navikuose yra padidėjusių antinavikinį imuninį atsaką (citotoksinių T ir Th1 ląstelių atsaką) aktyvinančių genų raiška, didžiąjai daugumai šių navikų būdingas genų hipermetilimas, MSI, didelis mutacijų, įskaitant *BRAF* geno mutacijas, dažnis. CMS1 navikų prognozė yra gera, tačiau, ligai progresuojant ar kartojantis, pacientų mirties rizika smarkiai išauga. CMS2–CMS4 tipus vienija CIN mechanizmai, tačiau CMS3 navikai yra mišresni, t. y. juose nustatoma tiek DNR kopijų skaičiaus pokyčių, tiek genų hipermetilimo ir MSI. Šio tipo navikai išsiskiria dideliu *KRAS* geno mutacijų dažniu. CMS2 navikai charakterizuojami Wnt ir MYC signalinių kelių aktyvumu. CMS3 navikai siejami su pakitusiu metabolinių signalų perdavimu; CMS2 ar CMS3 navikai, kuriems būdingi MSS, nėra imunogeniški ir pasižymi silpnu NIL atsaku. CMS4 navikai siejami su epitelinį-mezenchiminį perėjimą kontroliuojančių genų, taip pat transformuojančio augimo faktoriaus β (TGF β), angiogenezės procesų ir stromos infiltratų aktyvumu. Pastarasis tipas siejamas su greičiau progresuojančia liga ir blogesniu pacientų išgyvenamumu. Atskiru tyrimu buvo įrodyta, kad CMS tipai yra reikšmingi prognoziniai bendrojo išgyvenamumo veiksniai metastazavusio SŽV atveju. CMS2 ir CMS3 tipai buvo predikciniai metastazavusio SŽV atsako į kombinuotas adjuvantines terapijas žymenys [91]. Šiuo metu CMS yra pagrindinė SŽV molekulinio klasifikavimo sistema, į kurią atsižvelgiama kuriant personalizuoto gydymo strategijas [92].

1.3.3. Klinikiniai prognoziniai ir predikciniai žymenys

SŽV patogenezė yra labai daugialypė, todėl, kaip jau minėta, net panašių klinikinių ir patologiinių požymių atvejais ligos eiga ir atsakas į gydymą skiriasi [3]. Pagrindinis kriterijus ligos eigai prognozuoti ir gydymui parinkti išlieka TNM stadijos.

Amerikos vėžio bendruomenės (angl. *American Cancer Society*; ACS) duomenimis, 39 proc. pacientų SŽV diagnozuojamas ankstyvojoje ligos stadijoje. Neišplitusiu I–II stadijos SŽV sergančių pacientų 5 m. bendrasis išgyvenamumas siekia ≥ 90 proc. [48]. Šie pacientai įprastai gydomi tik chirurginiu būdu. Išimtis yra II stadijos SŽV, kuriam būdingi mikrometastazių rizikos veiksniai (limfovaskulinė, perineurinė invazija ar kt.). Šis SŽV gydomas adjuvantine chemoterapija, tačiau gydymo efektyvumas išlieka abejotinas [93]. 20–30 proc. ankstyvosios stadijos SŽV sergančių pacientų liga progresuoja, o laiku skirtas tinkamas terapinis gydymas galėtų padėti progresavimo išvengti [20].

III stadijos, į sritinius limfmazgius išplitusiu SŽV sergančių pacientų 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybė siekia 69–71 proc. Po operacijos šie pacientai gydomi adjuvantine chemoterapija ir (ar) biologine terapija. Gydymas koreliuoja su ilgesniu išgyvenamumu, tačiau nemaža dalis pacientų neatsako į terapiją arba jų ligos eiga yra geresnė, nesant terapijos. Pavyzdžiui, adjuvantinė chemoterapija yra efektyvi apie 20 proc. III stadijos SŽV sergančių pacientų, kitiems ši terapija yra labiau toksiška negu naudinga [94–96]. SŽV išplitus į kitus organus, gydoma taikant įvairias chemoterapijos kombinacijas, taikinių terapiją, imunoterapiją. 5 m. išgyvena tik 7–12 proc. pacientų, kuriems nustatyta atokiųjų metastazių [11, 48, 97]. Taigi TNM stadijos nėra pakankamai informatyvus prognozinis ir predikcinis žymuo.

Planuojant SŽV gydymą, gali būti atsižvelgiama ir į naviko lokalizaciją [5], taip pat į naviko diferenciacijos laipsnį ir pumpuravimąsi, tačiau šiuos kriterijus sudėtinga standartizuoti, dėl subjektyvaus vertinimo jie nėra pakankamai tikslūs [6, 7].

SŽV patogenezės molekuliniai mechanizmai gana išsamiai ištirti, atliekama daug tyrimų, ieškant terapinių taikinių ir predikcinių žymenų, tačiau kliniškai reikšmingų žymenų paiešką riboja šiam vėžio tipui būdingas didelis genetinis heterogeniškumas [11]. Šiuo metu SŽV diagnostikai taikomi keli molekuliniai žymenys [12, 14]:

- *KRAS* ir *NRAS* genų mutacijos yra predikciniai metastazavusio SŽV atsparumo biologinei anti-EGFR monokloninių antikūnų terapijai žymenys. Mutuoti RAS baltymai lemia nuo EGFR nepriklausomą RAS/MAPK signalinio kelio stimuliaciją, o tai kelia nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją ir didina jų išgyvenamumą [98]. Aktyvinančios *KRAS* ir *NRAS* genų mutacijos (2–4 egzonuose) nustatomos atitinkamai 42–46 proc. ir 3–4 proc. visų metastazavusio SŽV atvejų [99].

- *BRAF* geno mutacijos lemia agresyvesnę SŽV eigą ir yra siejamos su blogesne prognoze bei atsaku į adjuvantinę chemoterapiją [100]. *BRAF* genas, kaip ir *RAS* genai, yra to paties RAS/MAPK signalinio kelio narys. Panašiai kaip mutuoti *RAS* baltymai, mutotas *BRAF* baltymas skatina nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją ir didesnę jų išgyvenamumą [98]. Aktyvinančių *BRAF* geno (V600 kodono) mutacijų nustatoma 8 proc., kitų *BRAF* geno mutacijų – 1,3 proc. visų metastazavusio SŽV atvejų [99]. Remiantis dalies atliktų tyrimų rezultatais, *BRAF* geno mutacijas bandyta sieti su metastazavusio SŽV atsparumu biologinei anti-EGFR terapijai, tačiau įrodymų neigiamai predikcinei reikšmei patvirtinti nepakako [101]. Naujausiais klinikiniais tyrimais nustatyta, kad *BRAF* mutuoju (V600 kodone) metastazavusiu SŽV sergančių pacientų bendrasis išgyvenamumas ir atsakas į taikinių terapiją reikšmingai gerėja taikant kombinuotą *BRAF* ir mitogenu aktyvinamų baltymų kinazių slopiklių bei anti-EGFR terapiją [15].

- *PIK3CA* kinazės yra vienos svarbiausių veiksmų PI3K/Akt/mTOR signaliniame kelyje, kuris reguliuoja ląstelių proliferaciją ir išgyvenamumą. Solidiniuose navikuose, įskaitant SŽN, dažnai aptinkama aktyvinančių *PIK3CA* geno mutacijų (9 ir 20 egzonuose), kurios skatina ląstelių plitimą ir metastazavimą. Vis dėlto *PIK3CA* mutacijų sąsajos su SŽV sergančių pacientų išgyvenamumu yra nevienareikšmės – dalis tyrimų rodo, kad *PIK3CA* mutacijos koreliuoja su geresne prognoze arba neturi reikšmingų prognozinių sąsajų, kitais tyrimais *PIK3CA* mutacijos siejamos su vėžio kamieninių ląstelių gyvybingumu ir atsparumu adjuvantinei chemoterapijai [102, 103].

- MSI požymiai tiriami diagnozuojant SŽV, susijusį su paveldimu Linčo sindromu (~3 % visų atvejų), taip pat MSI yra predikcinis II stadijos SŽV atsparumo adjuvantinei chemoterapijai žymuo [13, 93]. MSI sukelia onkogenų ir navikus slopinančių genų koduojamų baltymų funkcijos praradimą. Tai lemia didelį genomo mutacijų dažnį ir neopeptidų įvairovę, todėl MSI navikai yra labai imunogeniški ir pasižymi didesniu NIL tankiu negu MSS navikai. MSI buvo validuotas kaip savarankiškas predikcinis teigiamo atsako į anti-PD-1 imunoterapiją žymuo, gydant metastazavusį SŽV [32].

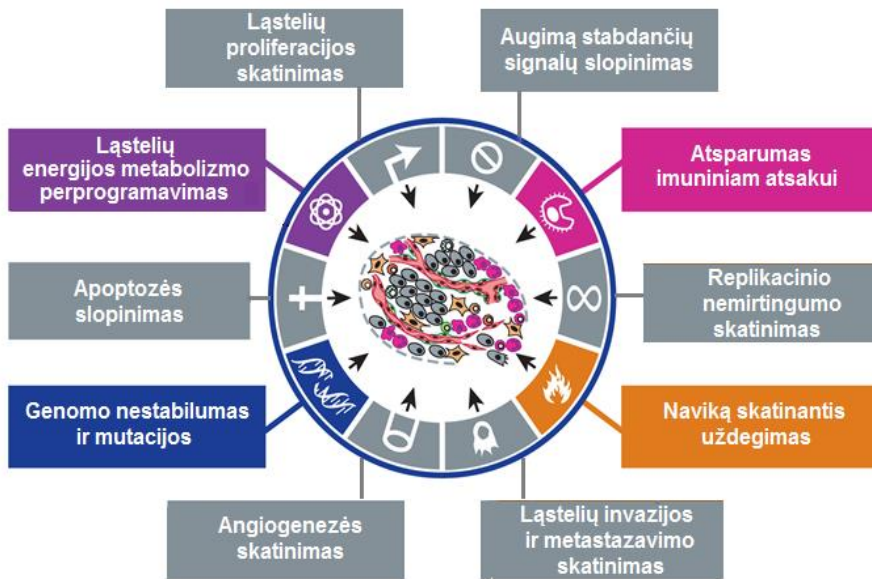
- Apibendrinus pastarąjį dešimtmetį atliktų SŽV genų raiškos tyrimų duomenis, sukurti keli II stadijos SŽV recidyvo rizikai prognozuoti skirti genų raiškos profiliavimo testai, pavyzdžiui, *Oncotype DX*®, *ColoPrint*® ir *ColDx*®. Šie testai yra validuoti naudoti klinikinėje praktikoje, tačiau, esant nepakankamai duomenų pridėtinei klinikinei naudai ir predikcinei reikšmei pagrįsti, šiandien jų naudoti nerekomenduojama [12, 16].

1.4. Vėžio mikroaplinkos komponentai

Ilgą laiką į vėžio genezę žvelgta labiau iš navikinių ląstelių perspektyvos. 2000 m. D. Hanahanas ir R. A. Weinbergas, analizuodami skirtingų vėžio tipų ląstelių genotipus, išskyrė šešis vėžio vystymosi požymius (1.2 pav., pilkos ikonos), kuriais akcentavo navikinių ląstelių gebėjimą: 1) savarankiškai apsirūpinti būtinais augimo signalais; 2) įgyti atsparumą augimą slopinantiems signalams; 3) išvengti programuotos ląstelių mirties (apoptozės); 4) palaikyti neribotą replikacinį potencialą; 5) skatinti ilgalaikį angiogenezės procesą; 6) plisti į aplinkinius audinius ir metastazuoti [104].

Minėti požymiai navikinėms ląstelėms leidžia įveikti antinavikinius apsaugos mechanizmus audinyje. Taigi kuriamų biologinių terapijų pagrindinis taikynys yra navikinės ląstelės. Vis dėlto kol kas didelei daliai pacientų biologinės terapijos nėra veiksmingos, nes ilgainiui vėžys įgyja atsparumą terapijai ir progresuoja toliau [105, 106].

2011 m. D. Hanahanas ir R. A. Weinbergas apibendrina naujus tyrimų duomenis ir išskyrė du papildomus vėžio vystymosi požymius: 1) energijos metabolizmo perprogravimą, kuriuo skatinama ląstelių proliferacija ir jų išgyvenamumas; 2) gebėjimą išvengti antinavikinio imuninio atsako (ypač T ir B limfocitų, makrofagų ir natūraliųjų žudikių atsako). Tyrėjai taip pat įvardijo pagrindines visų vėžio požymių atsiradimo priežastis – tai navikinių ląstelių genominis nestabilumas ir mutabilumas bei naviką infiltruojančių imuninių ląstelių sukiamas uždegimas (1.2 pav., skirtingomis spalvomis išryškintos ikonos). Šia klasifikacija pabrėžiama neatsiejama naviko mikroaplinkos komponentų ir signalinių sąveikų įtaka vėžio biologijai, taip pat į naviko mikroaplinkos komponentus orientuotų terapijų potencialas [107].



1.2 pav. Vėžio vystymosi požymiai (adaptuota pagal D. Hanahaną ir kt. [104, 107])

Taigi navikinių ląstelių fiziologiniai pokyčiai, prisitaikymas išgyventi, proliferuoti ir plisti priklauso nuo sąveikų su šias ląsteles supančios stromos ląstelėmis ir tarpląstelinio užpildo elementais [108, 109]. Daugialypis ir dinamiškas naviko mikroaplinkos kontekstas atsispindi galimu dvejopu – naviką slopinančiu arba skatinančiu – poveikiu. Skirtingų naviko mikroaplinkos komponentų poveikis gali priklausyti nuo vėžio lokalizacijos, tipo, išplitimo stadijos. Be to, tuo pat metu šie komponentai navikines ląsteles gali veikti skirtingai. Kai kuriuose navikuose stromos ląstelės supiktybėja. Tai palanku navikui progresuoti [110].

Naviko mikroaplinkos ląsteles galima skirstyti į tris pagrindines klases [17, 111, 112]: 1) infiltruojančios imuninės ląstelės – tai limfocitai, kurie specifiskai atpažįsta navikines ląsteles ir jas naikina, taip pat uždegiminės ląstelės, kurios reguliuoja antinavikinio imuninio atsako aktyvumą, reguliuoja angiogenezę, apoptozę ir kitus procesus navikiniame audinyje; 2) su vėžiu susiję fibroblastai, miofibroblastai, kurie reguliuoja angiogenezę, pritraukia ir aktyvina imunines ląsteles, skatina navikinių ląstelių proliferaciją, išgyvenamumą, invaziją ir metastazavimą, dalyvauja metaboliniame perprogramavime; 3) angiogeninės kraujagyslių ląstelės – endotelinės ląstelės, kurios reguliuoja angiogenezę, sintetina parakrinius trofinius veiksnius, pritraukia imunines ląsteles, reguliuoja citotoksinių T limfocitų ir natūraliųjų žudikių atsaką, skatina navikinių ląstelių plitimą.

Kitas svarbus naviko mikroaplinkos komponentas yra tarpląstelinis užpildas, kurį sudaro įvairios skaidulinės molekulės, glikoproteinai, proteoglikanai, polisacharidai ir kt. Tarpląstelinis užpildas yra nuolat degraduojamas fermentų, tada užpildomas fibroblastų gaminamais baltymais. Dėl šių pertvarkymų audinys nuolat aprūpinamas augimo veiksniais, kurie palaiko homeostazę ir regeneruoja audinį. Tarpląstelinis užpildas ne tik suteikia audiniui struktūrą, bet ir tiesiogiai ar parakriniais mechanizmais sąveikauja su naviko mikroaplinkos ląstelėmis. Dažniausiai, esant ankstyvosioms vėžio stadijoms, tarpląstelinis užpildas kartu su stromos ląstelėmis slopina naviko vystymąsi, tačiau, ligai progresuojat, gali įgyti naviką skatinančių savybių [108, 113]. Neatsiejama naviko mikroaplinkos sąveikų dinamikos dalis yra parakrininės, endokrinės signalinės molekulės (citokinai, chemokinai, augimo veiksniai ir kt.), kurios reguliuoja navikinių ląstelių ir naviko mikroaplinkos komponentų aktyvumą, pokyčius ir tarpusavio ryšius [114].

Dėl funkcijų ir sąveikų įvairovės, taip pat dėl specifinių audinio savybių, apibendrinti naviko mikroaplinkos komponentų klinikinę reikšmę gana sudėtinga, tačiau tyrimai atskleidžia potencialius prognozinis ir predikcinius žymenis. Pavyzdžiui, įprastai naviko mikroaplinkoje formuojasi tankesnis, tvirtesnis tarpląstelinis užpildas, kuris dažnai inkapsuliuoja navikinių ląstelių klasterius ir tampa barjeru chemoterapiniams vaistams patekti. Neleidžiama patekti ir deguoniui, maisto medžiagoms, metabolitams – tai sukelia hipoksiją ir metabolinį stresą. Minėtina, kad taip aktyvinami antiapoptotiniai ir atsparumo vaistams mechanizmai [115]. Tai tik keli iš galimų mechanizmų, kurie paaiškina su solidinių navikų tarpląstelinio užpildo struktūra siejamų žymenų prognozinį potencialą.

Vienas iš biologiškai ir kliniškai reikšmingiausių naviko mikroaplinkos veiksnių yra vietinis imuninis atsakas. Genų raiškos ir *in situ* baltymų tyrimais įrodyta, kad imuninio infiltrato komponentai koreliuoja su pacientų, sergančių skirtingo tipo ir išplitimo stadijos vėžiu, klinikine ligos eiga ir išgyvenamumu. Nustatyta, kad NIL yra stiprūs prognoziniai žymenys melanomos, SŽV, krūties, plaučių, gimdos kūno ir kitų vėžio tipų atvejais [23, 24, 37, 117].

1.5. Imuninis atsakas vėžio mikroaplinkoje

Naviką infiltruoja įvairios įgimto ir adaptyvaus imuniteto ląstelės. Jų funkcijos ir pasiskirstymas audinyje priklauso nuo vėžio tipo ir naviko mikroaplinkos komponentų visumos kiekvienu individualiu klinikiniu atveju. Imuninės ląstelės pasižymi tiek citotoksinėmis, tiek

imunosupresinėmis savybėmis, todėl antinavikinio imuninio atsako efektyvumui įtakos turi jų proporcijos ir tarpusavio sąveikos naviko mikroaplinkoje.

Įgimto imuninio atsako ląstelės infiltruoja pažeistą audinį ir sukelia uždegimą: šalina patogenus, pažeistas ląsteles, aktyvina ir kontroliuoja imuninį atsaką bei audinio regeneraciją. Ląstelės pasižymi audinių suderinamumo komplekso (angl. *major histocompatibility complex*; MHC) I ir II klasių molekulių bei kostimuliuojančių molekulių aktyvumu, sintetina uždegimą skatinančius citokinus ir chemokinus, kurie pritraukia, aktyvina efektorinius T ir B limfocitus. Vis dėlto, paskatintos tam tikrų naviko mikroaplinkos ar navikinių ląstelių signalų, uždegiminės ląstelės inicijuoja ir imunosupresinius procesus (siejamus su autoimuninės reakcijos ir audinio atsinaujinimo reguliavimu), todėl ilgai trunkantis uždegimas audinyje yra palankus navikui progresuoti [18, 19, 118]. Vienos gausiausių uždegiminių ląstelių naviko mikroaplinkoje yra [18, 118]:

- neutrofilai, skirstomi į N1 (naviką slopinančius) ir N2 (naviką skatinančius) fenotipus. N1 tipo neutrofilai paruošia efektorines T ląsteles navikinėms ląstelėms naikinti, skatina navikinių ląstelių apoptozę, išskiria ląstelių lizę skatinančias reaktyvias deguonies formas, dalyvauja humoraliniame imuniniame atsake. N2 tipo neutrofilai atlieka svarų vaidmenį, kurdami imunosupresinę naviko mikroaplinką. Jie skatina angiogenezę, naviko progresavimą ir metastazavimą, sukelia lėtinį uždegimą, slopina citotoksinius T limfocitus. N2 tipo neutrofilai į naviko mikroaplinką pritraukia makrofagus ir reguliacines T ląsteles, taip skatindami navikinių ląstelių išgyvenamumą.

- Makrofagai naikina navikines ląsteles, funkcionuoja kaip antigenus pristatančios ląstelės, tačiau gali skatinti angiogenezę, navikinių ląstelių proliferaciją, invaziją ir metastazavimą, slopinti apoptozę ir citotoksinių T limfocitų atsaką. Makrofagai yra plastiškos ląstelės. Navikui progresuojant, jos lengvai perprogramuoja savo genų raišką. Esant ankstyvosioms vėžio stadijoms, makrofagai aktyvinami klasikiniu keliu ir įgyja M1 fenotipą (uždegimą skatinantys makrofagai). M1 makrofagai pristato antigenus ir sintetina uždegiminius citokinus ir chemokinus, kurie skatina imuninį atsaką. Esant pažengusioms vėžio stadijoms, makrofagai aktyvinami alternatyviu keliu ir įgyja M2 fenotipą (uždegimą slopinantys makrofagai). Šie makrofagai sintetina kraujagyslių endotelio augimo faktorių ir antiuždegimines molekules, taip skatina angiogenezę ir imunosupresinius procesus. Be to, makrofagai gali slopinti natūraliųjų

žudikių ir T ląstelių aktyvumą bei sintetinti PD-L1, kuriuo slopina citotoksinius T limfocitus.

- Dendritinės ląstelės yra profesionalios antigenus pristatančios ląstelės – jos atpažįsta ir sunaikina patogenus ar negyvas navikines ląsteles, o jų peptidus pristato T ląstelėms, reziduojančioms antrinėse ir tretinėse limfoidinėse struktūrose.

Naviką infiltruojančios adaptyvaus imuninio atsako ląstelės yra specifinės naviko antigenams, jos tiesiogiai naikina navikines ląsteles ir sintetina citokinus, chemokinus, kurie reguliuoja citotoksinę reakciją. Vienos iš pagrindinių adaptyvaus atsako ląstelių [109, 119–121]:

- citotoksiniai T limfocitai (CTL), sintetinantys CD8 koreceptorių (CD8+), tiesiogiai naikina navikines ląsteles. CTL aktyvinami antigenais, kurie pateikiami per MHC I klasės molekules. Priešingai negu naiviosioms T ląstelėms, CTL kostimuliuojantys signalai antigenams atpažinti nėra reikalingi. CTL sintetina citokinus bei perforiną ir granzimus, kuriems būdingas citolitinis aktyvumas. CTL sąveikauja su atakuojama ląstele ir išleidžia citolitines granules į imunologinę sinapsę, taip sukelia ląstelės apoptozę.

- Pagalbinės T ląstelės, sintetinančios CD4 koreceptorių (CD4+), atpažįsta antigenus, kuriuos pateikia MHC II klasės molekules. Išskiriami skirtingi pagalbinių CD4+ T ląstelių tipai: Th1, Th2, Th17 ir kt. Th1 tipo ląstelės sintetina citokinus (INF- γ , IL-2, TNF- α ir kt.), stiprina uždegiminį imuninį atsaką, dalyvauja B ląstelių antikūnų gamyboje; Th2 tipo ląstelės sintetina citokinus (IL-4, -5, -6, -10, -13 ir kt.), kuriais skatina neuždegiminį imuninį atsaką, dalyvauja B ląstelių antikūnų gamyboje; Th17 tipo ląstelės yra pagrindinės efektorinės uždegimą skatinančios ląstelės, jos sintetina citokiną IL-17, kuris į naviką pritraukia makrofagus, neutrofilus.

- Reguliacinės CD4+ T ląstelės reguliuoja citotoksinių T ląstelių, pagalbinių CD4+ T ląstelių ir B ląstelių sąveikas su antigenais. Šios ląstelės dalyvauja palaikant periferinę imunologinę toleranciją, slopina imuninį atsaką ir užkerta kelią autoimuninei reakcijai. Jos sintetina imunosupresnius citokinus (IL-10, IL-35 ir kt.), sintetina Foxp3 (angl. *forkhead box P3*) transkripcijos veiksnį, kuris silpnina gretimų imuninių ląstelių atsaką.

- Atminties T ląstelės, sintetinančios CD45RO antigeną (CD45RO+). Po pirminio imuninio atsako atminties T ląstelės išlieka limfoidiniuose organuose ir periferiniuose audiniuose. Šios ląstelės, pakartotinai aktyvintos tais pačiais antigenais, gali tuoj pat atlikti efektorines funkcijas periferiniuose audiniuose. Vėliau vyksta jų kloninė ekspansija

limfoidiniuose organuose, taip formuojasi antrinis atsakas prieš antigenus. Šių ląstelių atsakas į antigenus yra daug greitesnis negu naiviųjų T ląstelių.

- B ląstelės, sintetinančios CD20 antigeną (CD20+), yra pagrindinės humoralinio atsako ląstelės. Jos daugiausiai lokalizuojasi naviko IK, tačiau infiltruoja ir naviko šerdį. Tyrimai parodė, kad, veikiant įvairiems naviko mikroaplinkos veiksniams, naviką infiltruojančios B ląstelės gali diferencijuotis į skirtingus potipius, kurie atlieka keletą funkcijų: išskiria naviko antigenams specifinius antikūnus (plazminės ląstelės), atlieka antigenus pateikiančių ląstelių funkciją, išskiria citokinus, taip pat gali atlikti imunosupresines funkcijas (reguliacinės B ląstelės). B ląstelės navikines ląsteles veikia ne tik tiesiogiai, bet ir reguliuodamos pagalbinių ir reguliacinių T ląstelių bei natūraliųjų žudikių aktyvumą. Taip pat B ląstelės, kartu su T ir dendritinėmis ląstelėmis, lokalizuojasi šalia naviko esančiose tretinėse limfoidinėse struktūrose, kurios siejamos su T ir B ląstelių pritraukimu, aktyvinimu ir proliferacija.

Taigi antinavikinio imuninio atsako aktyvumą naviko mikroaplinkoje reguliuoja daugybė skirtingų ląstelių tipų. Apibendrinant *in situ* imuninio infiltrato tyrimų duomenis, galima teigti, kad dažniausiai pirminiuose navikuose dideli bendrųjų (CD3+) limfocitų, Th1/CTL ir atminties T ląstelių tankiai slopina navikinių ląstelių invaziją ir metastazavimą, koreliuoja su geresne ligos eiga ir ilgesniu išgyvenamumu, sergant skirtingomis vėžio atmainomis, įskaitant SŽV [20, 21]. Naviko mikroaplinkoje tretinės limfoidinės struktūros, kuriose susitelkusios subrendusios dendritinės ląstelės, T ląstelės ir proliferuojančios B ląstelės, koreliuoja su intranavikine Th1/CTL ir B ląstelių infiltracija ir yra geros prognozės veiksnys SŽV ar kitų vėžio tipų atvejais [122].

1.5.1. Imuninis atsakas ir mikrosatelitų nestabilumas

Tyrimais nustatyta, kad daugelio vėžio tipų atvejais didelė naviko mutacijų našta (angl. *tumour mutational burden*; TMB) skatina navikui specifinių peptidų susiformavimą, todėl išauga tikimybė atsirasti potencialiai imunogeniškiems epitopams, kuriais aktyvinamas antinavikinis imuninis atsakas [123, 124]. Navikinių ląstelių, kuriose MMR sistemos baltymai nefunkcionuoja, mikrosatelitų sekose kaupiasi mutacijos. Dalis jų atsiranda koduojančiose ar reguliacinėse naviką slopinančių bei protoonkogenų sekose, o tai sukelia hipermutageninį fenotipą [125]. Tiriant SŽN, kuriems būdingas MSI, nustatyta teigiama koreliacija tarp rėmelio poslinkio mutacijų dažnio ir efektorinių CTL tankio. Didelė dalis šių navikų turi atviro skaitymo

rėmelio mutacijų ląstelių ciklo ir apoptozės genuose, tai lemia specifinių neopeptidų, smarkiai didinančių limfocitų infiltraciją į naviko IK, susidarymą [126, 127]. SŽN, kuriems būdingas MSI, palyginti su navikais, turinčiais MSS, pasižymi reikšmingai didesniais aktyvuotų CTL, atminties ir pagalbinių T ląstelių tankiais ir tam tikrų citokininų bei chemokininų sinteze [128]. Retrospektyvinių kohortinių tyrimų metaanalizių duomenimis, MSI siejamas su gera SŽV prognoze, nepriklausomai nuo vėžio stadijos [129, 130].

SŽN, kuriems būdingas MSI, pasižymi didesne sinteze imuninės patikros taškų baltymų, tokių kaip PD-1, PD-L1, 4-asis citotoksinių T limfocitų antigenas (CTLA-4) ir kt., kurie „atsveria“ antinavikinį Th1/CTL atsaką naviko mikroaplinkoje [131]. SŽN, skirtingai negu melanomose, inkstų ar plaučių navikuose, PD-L1 dažniausiai sintetina infiltruojančios mieloidinės ląstelės (navikinės ląstelės turi labai mažai PD-L1). Tai iš dalies paaiškina SŽN, kuriems būdingi MSS ir negausus imuninis infiltratas, silpną atsaką į anti-PD-1/PD-L1 terapiją. Priešingai, SŽN, kuriems būdingas MSI ir gausus imuninis infiltratas, nustatytas reikšmingas objektyvus ir ilgalaikis atsakas į anti-PD-1 ir anti-CTLA-4 terapijas [30, 132].

1.5.2. Imuninis atsakas ir imunoterapija

Idėja gydyti vėžį nukreipiant prieš jį paties paciento imuninę sistemą kilo dar XIX a., kai W. Coley išbandė gydymą taikant karščių paveiktų *S. pyogenes* ir *Serratia marcescens* bakterijų injekcijas, kurios skatino antinavikinį imuninį atsaką ir lėmė geresnę pacientų, sirgusių skirtingo tipo vėžiu, ligos eigą [133]. XX a. pr. iškelta imuninės priežiūros hipotezė. Naujos eksperimentinių tyrimų strategijos atskleidė navikui specifinio T ląstelių atsako svarbą ligos regresijai [134]. Pastaraisiais dešimtmečiais išsamūs vėžio imunomo tyrimai paskatino naujų terapijų, aktyvinančių antinavikinį imuninį atsaką, paiešką. Šiandien kuriamų imunoterapijų spektras platus – tai terapinės ir profilaktinės vėžio vakcinos, adaptyvių T ląstelių, imuninės patikros taškų slopiklių (angl. *immune checkpoint inhibitors*; ICI), prieš T ir navikines ląsteles nukreiptų bispecifinių slopiklių, taip pat mažos molekulinės masės moduliatorių, onkolitinių virusų terapijos [135].

Šiandien perspektyviausios yra monokloninių antikūnų imunoterapijos, nukreiptos prieš CTLA-4 ir PD-1 receptorių ar PD-L1 ligandą. CTLA-4 ir PD-1 yra T ląstelių paviršiaus receptoriai, kurie, sąveikaudami su ligandais, antigenus pristatančių ir navikinių ląstelių paviršiuose slopina T ląstelių atsaką ir taip apsaugo audinius nuo autoimuninės reakcijos. Vis dėlto tuo pat metu stabdomas ir antinavikinis imuninis atsakas. Klinikinių tyrimų

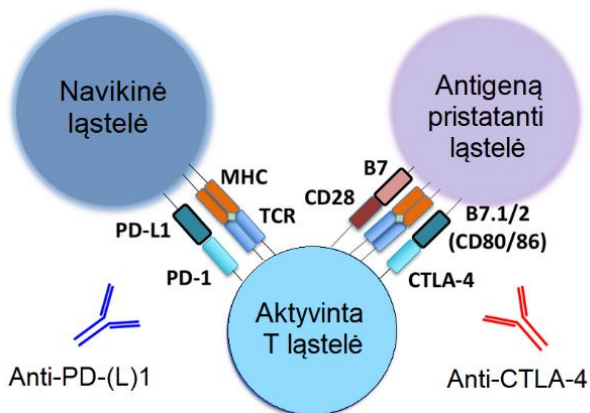
duomenimis, šių receptorių blokada suaktyvina citotoksišią T ląstelių atsaką ir reikšmingai pailgina išplitusiu vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumą [136, 137]. 2018 m. J. P. Allisonui ir T. Honjo, sukūrusiems anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 imunoterapijas, skirta Nobelio fiziologijos ir medicinos premija [138].

CTLA-4 sintetinamas naiviosiose ir reguliacinėse T ląstelėse. Šis receptorius jungiasi su B7 ligandu antigenus pristatančių ląstelių paviršiuje, taip blokuodamas T ląstelių CD28 koreceptorius ir antigenus pristatančių ląstelių B7 ligando sąveiką (1.3 pav.). Tai sumažina efektorines ląsteles aktyvinančių citokinių, tokių kaip IL-12, taip pat citotoksišnių fermentų, tokių kaip perforinas ir granzimas B, išskyrimą [138, 139]. Atliekant klinikinius anti-CTLA-4 monoterapijos (ipilimumabas) tyrimus, 22 proc. pacientų, sirgusių išplitusia melanoma, pastebėtas ilgalaikis atsakas, t. y. bendrasis išgyvenamumas siekė 3–10 m. (įprastai išplitusios melanomos atveju 5 m. išgyvena apie 10 proc. pacientų) [136]. 2011 m. FDA patvirtino ipilimumabą neoperuojamos III–IV stadijos melanomai gydyti. Kitų lokalizacijų vėžio atvejais anti-CTLA-4 terapija yra mažiau efektyvi [140, 141]. Atsaką į imuninės patikros taškų slopiklių terapijas sąlygoja įvairūs veiksniai, įskaitant naviko imunogeniškumą, imuninių ląstelių infiltravimą, taip pat audiniui specifinių reguliacinių T ląstelių ir kitų imunosupresyvių ląstelių naviko mikroaplinkoje populiacijos, jų proporcijos [142, 143].

PD-1 yra sintetinamas aktyvuotose ir išsekusiose T ląstelėse, taip pat B ląstelėse ir natūraliosiose žudikėse bei mieloidinės kilmės ląstelėse. Šiam receptoriumi susijungiant su PD-L1/PD-L2 ligandais antigenus pristatančių arba navikinių ląstelių paviršiuje, T ląstelių aktyvumas slopinamas, stabdoma citokino IL-2 sintezė. T ląstelių funkciją slopinti gali ir navikinių ląstelių paviršiaus PD-L1/PD-L2 ligandų sąveika su antigenus pristatančių ląstelių CD80 ligandu (CD28 receptoriaus ligandas) (1.3 pav.) [138, 139]. Klinikinių anti-PD-1 monoterapijų (nivolumabas, pembrolizumabas) tyrimų metu ilgalaikis atsakas nustatytas 30–40 proc. pacientų, sirgusių išplitusia melanoma [137].

2014 m. FDA patvirtino nivolumabo ir pembrolizumabo terapijas neoperuojamai išplitusiai melanomai gydyti. Vėliau anti-PD-1/PD-L1 terapijos patvirtintos ir esant nesmulkią ląsteliniam plaučių vėžiui, inkstų ląstelių, galvos ir kaklo plokščialąstelinės, urotelio karcinomoms, SŽV ir kitų lokalizacijų vėžiui (atsakas siekia 15–30 proc.) [139]. Pastarųjų metų tyrimų duomenimis, kombinuotos anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 terapijos yra efektyviausios gydant išplitusią melanomą, inkstų ląstelių karcinomą ir SŽV, kuriam būdingas MSI. Šiandien toliau tęsiamos tinkamiausių imunoterapijų

ir adjuvantinių terapijų kombinacijų paieškos skirtingiems vėžio tipams gydyti [139, 144].



1.3 pav. T ląstelės PD-1 ir CTLA-4 receptorių sąveikų schema (adaptuota pagal A. R. Arefą ir kt. [145]): aktyvinta T ląstelė kontaktuoja su antigeną pristatančia ląstele ir navikine ląstele per PD-1 ir PD-L1 bei CTLA-4 ir B7-1/2 sąveikas. Navikui specifiniai antigenai T ląstelės receptoriui (TCR) yra pristatomi per MHC kompleksus APL ar navikinės ląstelės paviršiuje. T ląstelės CD28 koreceptorius sąveikauja su APL B7 ligandu. Anti-PD-(L)1 ir anti-CTLA-4 antikūnai vaizduojami atitinkamai mėlyna ir raudona spalva.

2020 m. FDA patvirtino anti-PD-1 terapiją kaip pirmos eilės terapiją neoperuojamam metastazavusiam SŽV, turinčiam MSI požymių, gydyti. Vis dėlto apie 60 proc. pacientų terapinis atsakas nėra reikšmingas [32, 33]. Naujai atliktų tyrimų duomenimis, SŽN, kuriems būdingas MSI, gali labai skirtis NIL pasiskirstymu. Be to, 26–35 proc. šių navikų pasižymi negausiu imuniniu infiltratu, kuris įprastai siejamas su navikais, kuriems būdingi MSS [34]. SŽN, kuriems būdingi MSS, yra neimunogeniški ir turi silpną CTL atsaką, taip pat mažą imuninės patikros taškų receptorių sintezę, todėl net 95 proc. šių navikų imunoterapijos nėra veiksmingos [146]. Taigi anti-PD-1 imunoterapijos efektyvumas SŽV priklauso nuo naviko mikroaplinkos konteksto, o NIL tankio skirtumai SŽN, kuriems būdingas MSI, iš dalies paaiškina MSI kaip prognozinio / predikcinio žymens informatyvumo trūkumą ir orientuoja į NIL kiekybinius matavimus.

1.6. Imuninis atsakas audinio kontekste

Pastaraisiais dešimtmečiais daugėjant antinavikinio imuninio atsako, kaip vieno iš svarbiausių veiksnių naviko formavimosi ir progresavimo procesuose, įrodymų, suintensyvėjo *in situ* imuninio infiltrato tyrimai. Histologinius preparatus vertinant tiek vizualiai (mikroskopuojant), tiek remiantis skaitmeninės jų vaizdo analizės algoritmais, nustatyta, kad stiprus

prognozinis veiksnys yra ne tik NIL tankis – ne mažiau svarbūs ir erdviniai NIL pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje aspektai [37, 117].

1996 m. Y. Naito ir bendraautoriai pritaikė dvigubos IHC metodą ir įvertino proliferuojančių CTL (Ki67+ CD8+ T ląstelių) pasiskirstymą Epšteino–Baro viruso sukeltos žmogaus skrandžio karcinomos mikroaplinkoje: nustatė didesnę tarp navikinių ląstelių įsiterpusių, perforiną sintetinančių CTL kiekį, todėl susiejo šias ląsteles su antinavikiniu imuniniu atsaku ir geresne ligos eiga [147]. Tuomet tyrėjai atliko proliferuojančių CTL pasiskirstymo žmogaus SŽV mikroaplinkoje analizę [148]: CTL skaičiavo tarp navikinių ląstelių, jas supančioje stromoje, taip pat naviko IK ir nustatė, kad, nors navikiniame epitelyje CTL buvo daug mažiau negu stromoje ar naviko IK, tarp navikinių ląstelių besiskverbiančios, granzimą B sintetinančios CTL buvo nepriklausomas ilgesnio pacientų išgyvenamumo veiksnys, stiprumu prilygęs Dukes (arba TNM) stadijoms [148].

Išsamius imuninio infiltrato SŽV mikroaplinkoje sąsajų su mikrometastazių rizika tyrimus atliko ir F. Pages bei kt. [149]: taikant genų raiškos profiliavimą, tėkmės citometriją ir skaitmeninę *in situ* imuninių ląstelių pasiskirstymo analizę, nustatyta, kad efektorinės atminties (CD4RO+) T ląstelės buvo susijusios su mažesne navikinių ląstelių plitimo į limfovaskulines ir perineurines struktūras bei sritinius limfmazgius tikimybe.

Minėta tyrėjų grupė netrukus paskelbė vieną esminių publikacijų, atkreipusių mokslo bendruomenės dėmesį į adaptyvąs imuninio atsako komponentų prognozinę vertę [81]. Lygindami tris nepriklausomas SŽV pacientų imtis, tyrėjai atliko skaitmeninę audinių mikrogardelių vaizdų analizę, vertino imuninių ląstelių pasiskirstymą naviko IK ir šerdyje. Tiksliausias pacientų stratifikavimas į aukštos ir žemos rizikos grupes buvo pasiektas vertinant CD3+, CD8+ ar CD45RO+ T ląstelių tankių abiejuose regionuose santykius. CD3+ T ląstelių tankio naviko IK ir šerdyje kombinacija buvo statistiškai reikšmingiausia. Stipri imuninė reakcija koreliavo su ilgesniu pacientų bendruoju išgyvenamumu ir išgyvenamumu, nesant ligos progresavimo, nepriklausomai nuo pirminio naviko invazijos ar išplitimo į sritinius limfmazgius. Negausus imuninis infiltratas buvo blogos prognozės veiksnys net ir mažai išplitusių navikų atvejais. Prasčiausia prognozė, prilygstanti IV stadijos vėžio prognozei, pacientų grupei buvo išskirta sujungiant CD3+ ir CD45RO+ T ląstelių tankių naviko IK ir šerdyje rodiklius.

Šiuos stebėjimus J. Galonas ir bendraautoriai apibendrino nauja *imuninio konteksto* samprata [25]. Ja pabrėžiama, kad kompleksinis imuninių ląstelių tipo (funkcijos), tankio ir lokalizacijos naviko mikroaplinkoje vertinimas geriausiai išreiškia antinavikinio imuninio atsako potencialą ir gali suteikti

prognozinės informacijos, svaresnės už standartinius anatomicinio vėžio išplitimo kriterijus.

1.6.1. Imuninio konteksto vizualus vertinimas

Antinavikiniam imuniniam atsakui vertinti pasiūlytas „vėžio imunogramos“ modelis, kuris atsižvelgia į 7 parametrų klases. Tai: 1) naviko imunogeniškumas; 2) bendrasis imuninis atsakas; 3) efektorinių T ląstelių infiltravimas į naviką; 4) imuninės patikros taškų receptorių sintezė; 5) tirpūs imunosupresiniai mediatoriai; 6) imunosupresiniai metabolitai; 7) naviko rezistentiškumas efektorinių imuninių ląstelių atsakui. Siekiant įvertinti imuninį atsaką naviko mikroaplinkoje, tikslingiausia būtų atlikti kombinuotą charakteringiausių žymenų analizę. Minėtina, kad vienais atvejais imuninio atsako aktyvumą gali riboti naviko imunogeniškumo stoka, kitais atvejais – tam tikri imunosupresiniai veiksniai. Vis dėlto viena svarbiausių imuninio atsako aktyvumo sąlygų yra NIL polinkis infiltruoti naviką [150].

NIL pasiskirstymui vizualiai vertinti mikroskopuojant histologinius preparatus taikomos skirtingos kokybinės ir pusiau kiekybinės sistemos, atsižvelgiant į vėžio tipą [151–153]. Vizualus NIL pasiskirstymo vertinimas priklauso nuo tyrėjo interpretacijos. Vadinasi, kelių tyrėjų (ar to paties tyrėjo) skaičiavimo rezultatai tais pačiais atvejais gali skirtis, todėl tokie NIL matavimai nėra atkartojami ir taikomi klinikinėje praktikoje. 2017 m. Tarptautinė imunoonkologijos biožymenų darbo grupė (angl. *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*) [23, 24], siekdama standartizuoti vizualiu vertinimu pagrįstus NIL matavimus solidiniuose navikuose, parengė gaires (pateikta glaustai):

1) NIL laikomos visos mononuklearinės ląstelės naviko pjūvio hematoksilino-eozino preparate;

2) NIL kiekis vertinamas išreiškiant procentu audinio plotą, kuris yra tankiai infiltruotas NIL;

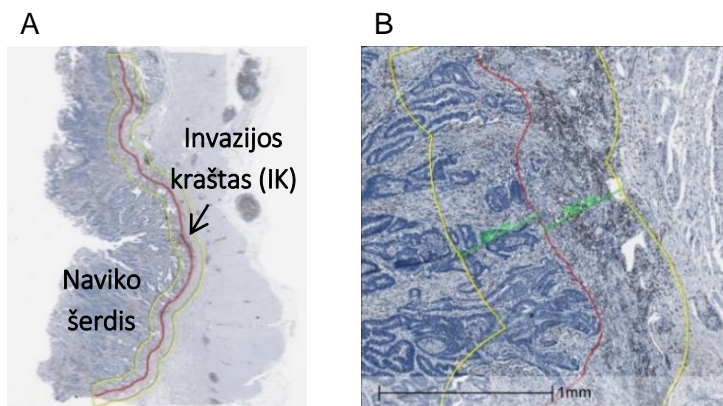
3) NIL turi būti vertinami atskirai stromoje ir navikiniame epitelyje;

4) NIL vertinami atskirai naviko šerdyje ir IK (1 mm pločio juosta aplink stromos audinio ir navikinio epitelio sąlyčio ribą) (1.4 pav.);

5) analizuojamas visas mėginys, neišskiriant „karštųjų taškų“;

6) naviko periferijoje esanti stroma, taip pat nekrozės, autolizės ar kiti audinio regionai su artefaktais nevertinami;

7) NIL vertinami navikuose, kuriems gydyti netaikyta neoadjuvantinė terapija.



1.4 pav. Naviko regionai: A – naviko šerdis, kuri apima navikinį audinį iki naviko invazijos krašto (IK); B – naviko invazijos kraštas (IK; 1 mm pločio); nubrėžta linija, skirianti navikinį epitelį ir stromos audinį naviko periferijoje (raudonos sp. linija) ir ribos, nutolusios 500 μm atstumu nuo šios linijos į naviko pusę ir stromos pusę naviko periferijoje (geltonos sp. linijos)

Vis dėlto, atsižvelgiant į visas rekomendacijas, vizualus NIL vertinimas išlieka subjektyvus – analizuojant vizualiai, neįmanoma NIL tankio išreikšti ištisiniu kintamuoju, sudėtinga atsižvelgti į NIL pasiskirstymo audinyje heterogeniškumą. Taip pat galimos suvokimo klaidos, pavyzdžiui, NIL tankis gali būti nepagrįstai laikomas didesniu, kai navike yra mažiau stromos. Minėtina, kad NIL skaičiavimai didesniuose navikų pjūviuose užima daug laiko, be to, vizualus / rankinis vertinamo regiono (naviko šerdies ir IK) parinkimas taip pat yra NIL matavimų variacijos šaltinis [154, 155]. Taigi vizualus NIL vertinimas mikroskopuojant hematoksilino-eozino preparatus (kuriuose negalima atpažinti skirtingų NIL populiacijų, kurios skiriasi savo funkcijomis ir įtaka navikui progresuoti), įprastas visuose patologijos centruose, nėra pakankamai tikslus ir informatyvus metodas NIL matuoti. Imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje analizę galima objektyvizuoti taikant skaitmeninę IHC ar imunofluorescenciją ir dirbtinio intelekto algoritmus, o duomenų analitikos metodais galima kiekybiškai išreikšti NIL erdvinio pasiskirstymo aspektus, kurie, vertinant vien žvilgsniu, neapskaičiuojami.

1.6.2. Imuninio konteksto vertinimas skaitmeninės patologijos metodais

Skaitmeninės patologijos ir dirbtinio intelekto algoritmais šiandien sprendžiamos įvairios audinio komponentų mikroskopiniame vaizde vertinimo užduotys: analizuojamos navikinių ląstelių mitozės [156], (mikro)metastazės limfmazgiuose [157], uždegiminių ląstelių infiltratai

[158], kolageno gijų formos ir išsidėstymas naviko mikroaplinkoje [159] ir kt. Palaipsniui dirbtinio intelekto klasifikatoriai pritaikomi įvairioms diagnostikos užduotims, pavyzdžiui, automatizuotam kepenų fibrozės stadijų nustatymui [160] arba prostatos vėžiui klasifikuoti, taikant Gleasono sistemą [161]. Pastaraisiais metais daugėja tyrimų, kai, taikant dirbtiniais neuroniniai tinklais pagrįstus klasifikatorius, nustatomi audinio „antspaudai“ (angl. *fingerprints*). Vizualiai tyrinėjant audinį, žmogaus akiai jie nematomi, tačiau koreliuoja su žinomais biologiniais žymenimis [162]. Šiuo metu vienas iš aktualių skaitmenine vaizdo analize pagrįstų vėžio tyrimų uždavinių yra imuninio konteksto matavimo sistemų, kurios leistų automatizuoti ir objektyvizuoti antinavikinio imuninio atsako vertinimą bei nustatyti tinkamiausius prognozinis ir predikcinius rodiklius, kūrimas.

Histologiškai navikai klasifikuojami pagal NIL erdvinį pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje. Skiriami: 1) navikai, kuriems būdingas uždegimas („karšti“ navikai): šie navikai pasižymi dideliu NIL, ypač CD8+ T ląstelių, tankiu, taip pat padidėjusia imuninės patikros taškų žymenų, įskaitant PD-L1, sinteze ir didele naviko mutacijų našta; 2) navikai, kuriems būdingas statiškas („sustabdytas“) imuninis atsakas („stromos T ląstelių fenotipo“ navikai): nepaisant didelės naviko mutacijų naštos, NIL susikaupia naviko IK ir (ar) intranavikinėje stromoje, tačiau į navikinį epitelį nesiskverbia – NIL infiltravimą ir (ar) aktyvumą slopina imunosupresinis stromos aktyvumas, mieloidinės kilmės supresinės ląstelės ir angiogenezės procesai; 3) navikai, kuriems nebūdingas uždegimas („šalti“ ar „imuninės dykumos“ navikai): pasižymi labai mažu NIL tankiu, genetiniu nestabilumu, stipriai proliferuoja. Taigi limfocitų polinkis infiltruoti naviką iš dalies išreiškia antinavikinio imuninio atsako potencialą. Minėtina, kad imunoterapijų, aktyvinančių T ląsteles, efektyvumas daug mažesnis „šaltuose“ ar „stromos T ląstelių fenotipo“ navikuose. Pabrėžtina, kad skirtingi vėžio tipai (histologiniai potipiai) gali skirtis šių NIL pasiskirstymo fenotipų santykiais [163, 164]. Dabar minėtiems fenotipams tirti kuriamos kompiuterinės, kiekybinės ir erdvinės analitikos principus integruojančios NIL matavimo sistemos [165, 166].

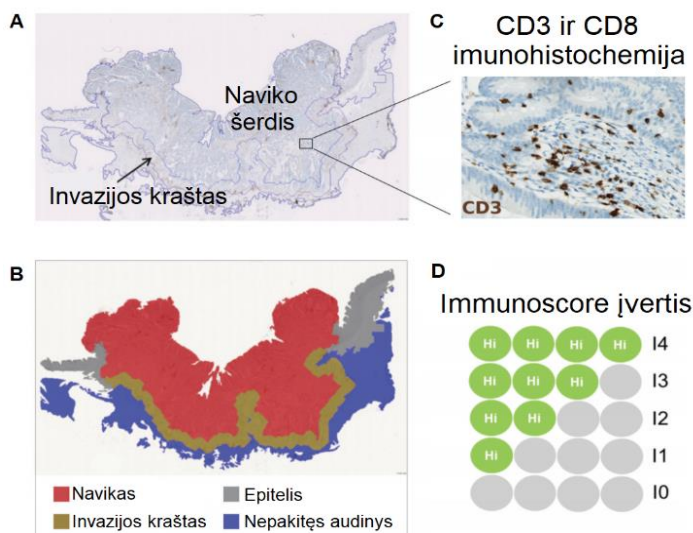
Skaitmeninės vaizdo analizės apima kelis etapus: 1) tiriamo regiono segmentavimą; 2) tikslinių ląstelių populiacijų (audinio) struktūrų nustatymą tiriamame regione; 3) šių ląstelių (struktūrų) pasiskirstymą (viena kitos atžvilgiu) tame pačiame ar skirtinguose tiriamuose regionuose. Navikinio audinio komponentams ir ląstelėms klasifikuoti taikomi mašininio mokymosi ar dirbtinių neuroninių tinklų algoritmai, kurie pagal pateiktus pavyzdžius arba savarankiškai geba nustatyti audinio struktūras ir ląstelių branduolius, taip pat atpažinti IHC žymenų raišką. Šiais algoritmais galima

atlikti tikslius NIL populiacijų matavimus skirtinguose naviko mikroaplinkos komponentuose: stromoje, navikiniame epitelyje, limfoidiniuose folikuluose ar *in situ* komponentuose [23, 24, 83]. Skirtingą prognozinę vertę turi ir imuniniai infiltratai naviko šerdyje ir IK. Remiantis Tarptautinės imunoonkologijos biožymenų darbo grupės gairėmis, SŽV atveju NIL matavimus rekomenduojama atlikti atskirai naviko šerdyje ir IK, tačiau kiaušidžių vėžio atveju NIL naviko šerdyje ir IK turi būti analizuojami kartu, o pirminio smegenų vėžio atveju reikėtų atsižvelgti į NIL tiek naviko šerdies, tiek IK bei perivaskuliniuose ir perinekrotiniuose regionuose [23, 24]. Vis dėlto dėl sudėtingos audinio morfologijos daugeliu skaitmeninės vaizdo analizės platformų naviko IK nustatymas nėra visiškai automatizuotas, t. y. tyrėjas rankiniu būdu nubrėžia jo vertinimu IK atitinkančią liniją, tada aplink šią liniją automatiškai išskiriama tam tikro pločio zona [167, 168]. Rankinis naviko IK nustatymas sąlygoja NIL matavimų variacijas, todėl ieškoma visiškai automatizuotų IK arba naviko ir stromos sąveikos regionų nustatymo visame navike alternatyvų, tačiau dažniausiai siūlomi metodai pagrįsti specifiniais bioinformaciniais algoritmais ir (ar) audinio paruošimo protokolais [169], kurie nėra tinkami rutininei diagnostikai.

Naviko viso pjūvio vaizde, išryškinant daugybine IHC, imunofluorescencija ar įvairiais mikroskopijos metodais [170], galima analizuoti skirtingas ląstelių populiacijas. Skaitmeninės vaizdo analizės algoritmais nustatomos tiriamų ląstelių koordinatės vaizde, toliau duomenys analizuojami erdvinės analitikos principais. Vaizduose nustatomi imuninių ląstelių tankių „karštieji taškai“, matuojami atstumai tarp imuninių ir navikinių ląstelių, sudaromi imuninių ląstelių klasterių žemėlapiai ir pan. [27, 165, 171]. Šie erdviniai NIL pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje aspektai išreiškiami kiekybiniais rodikliais, o jų koreliacijos su pacientų išgyvenamumu pagrindžia antinavikinio imuninio konteksto prognozinę vertę. Pavyzdžiui, Y. Yuan ir bendraautoriai [28] sukūrė automatizuotą, skaitmeninės vaizdo analizės duomenų statistiniu modeliavimu pagrįstą analizę NIL erdvinio pasiskirstymo heterogeniškumui įvertinti. Tyrėjų pasiūlytas parametras buvo nepriklausomas ligai specifinio išgyvenamumo prognozinis veiksnys dviejose nepriklausomose trigubai neigiamu (pagal estrogenų, progesteronų ir 2-ojo žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių) krūties vėžiu sergančių pacienčių imtyse. N. Harder ir bendraautoriai [172] pasiūlė *Tissue Phenomics* metodiką: sukūrė mašininio mokymosi algoritmą automatizuotai naviko morfologinių struktūrų analizei, kuria išskiriama naviko ir stromos sąveikos riba, taip pat kelios papildomos „naviko ir stromos perėjimo“ zonos. Šiose zonose skaičiuoti skirtingų NIL

populiacijų ir makrofagų tankių santykiai bei šių ląstelių tarpusavio atstumai. Nustatyti rodikliai koreliavo su prostatos vėžio atsikartojimu ir buvo stipresni už Gleasono kriterijus. J. Lazarusas ir bendraautorai [40] tyrė imuninius infiltratus SŽV, kuriems būdingas MSI, metastazių mikroaplinkoje ir nustatė, kad didelis CTL tankis 15 μm spinduliu aplink navikines ląsteles yra nepriklausomas ilgesnio paciento išgyvenamumo prognozinis veiksnys. Panašius rezultatus paskelbė ir T. N. Gide ir bendraautorai [41]. Nustatyta, kad melanomos navikuose dideli CTL ir PD-L1+ ląstelių tankiai 20 μm spinduliu aplink navikines ląsteles yra atsako į imunoterapiją predikciniai žymenys. S. Nagl ir bendraautorai [173] kėlė hipotezę, kad aktyvios imuninės ląstelės dėl sąveikų su navikinių ląstelių antigenais yra pasiskirsčiusios neatsitiktinai. Tyrėjai atliko atstumų tarp imuninių ir navikinių ląstelių analinės karcinomos mikroaplinkoje analizę ir nustatė, kad stromos CD20+ B ląstelės viena kitos ir navikinių ląstelių atžvilgiu buvo pasiskirsčiusios tam tikrais atstumais, intraepitelinės CD20+ B ląstelės buvo išsidėsčiusios atsitiktinai, tačiau maži atstumai tarp jų ir FoxP3+ ląstelių buvo reikšmingai susiję su trumpesniu pacientų išgyvenamumu.

2012 m. J. Galonas ir bendraautorai imuniniam atsakui SŽV mikroaplinkoje vertinti pasiūlė *Immunoscore*® metodiką, grindžiamą skaitmenine IHC ir vertinančią visų limfocitų (CD3+) bei CTL (CD8+) tankius naviko šerdies ir IK regionuose [35] (1.5 pav.). 2018 m. *Immunoscore*® įvertis validuotas kaip nepriklausomas SŽV progresavimo prognozinis rodiklis, pranokstantis klinikinėje praktikoje naudojamus vėžio žymenis, įskaitant TNM kriterijus ir MSI požymius [36, 37]. 2019 m. PSO Virškinimo trakto sistemos navikų klasifikavimo gairės papildytos rekomendacija prognozuojant SŽV klinikinę eigą įvertinti ir vietinį imuninį atsaką, o pamatiniu metodu nurodyta *Immunoscore*® metodika [59]. Vis dėlto šiam įverčiui įtraukti į TNM sistemą ir jo predikcinei atsako į imunoterapijas vertei patvirtinti dar trūksta duomenų – tyrimai tęsiami. Kita vertus, skaitmeninės patologijos įrankių galimybės nėra išsemtos, tyrėjai toliau kuria naujas, vis informatyvesnes imuninio konteksto vertinimo metodikas.



1.5 pav. *Immunoscore*[®] metodika (adaptuota pagal A. Kirilovsky ir kt. [174]): A – skaitmeninis storosios žarnos naviko viso pjūvio vaizdas; B – tame pačiame vaizde išskirta naviko šerdies (raudona sp.), invazijos krašto (ruda sp.), epitelio (pilka sp.) ir nepakitusio audinio (mėlyna sp.) zonos; C – IHC išryškintos CD3+ ir CD8+ T ląstelės; D – *Immunoscore*[®] įverčio vertės: I0–I4

Pastaraisiais metais I. P. Nearchou ir bendraautoriai kėlė klausimą, ar kombinuota NIL ir naviko pumpurų erdvių sąveikų II stadijos SŽV mikroaplinkoje analizė yra prognoziškai informatyvesnė. Tyrėjai atliko automatizuotą navikų mėginių daugybinės imunofluorescencijos preparatų analizę, įvertino CD3+ CD8+ T ląstelių ir naviko pumpurų skaičių, tankį, jų santykius ir tarpusavio atstumus skirtinguose naviko regionuose. Didelis navikų pumpurų skaičius naviko periferijoje, mažas CD3+ T ląstelių tankis visame navike (naviko šerdyje ir IK) ir mažas CD3+ CD8+ T ląstelių, esančių 50 μm spinduliu nuo navikų pumpurų, skaičius buvo susiję su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Šiuos rodiklius derinant, gautas stiprus prognoziniškas modelis, atsikartojęs trijose nepriklausomose II stadijos SŽV imtyse [39]. Netrukus tyrėjai pakartojo šį tyrimą, įtraukdami CD68+ ir CD163+ makrofagų analizę, ir nustatė tris nepriklausomus prognozinis veiksnis. Tai: CD3+ T ląstelių tankis visame navike, limfocitų, išsidėsčiusių 50 μm spinduliu aplink naviko pumpurus, skaičius bei CD68+ ir CD163+ makrofagų santykis naviko šerdyje – rodikliai sujungti į erdvinį imunoekologijos įvertį, išskyrusį pacientus, kuriems būdingas 100 proc. 5 m. išgyvenamumas dviejose nepriklausomose imtyse [38]. Šie rezultatai patvirtina, kad kombinuojant histologinio ir imuninio konteksto rodiklius galima nustatyti informatyvius SŽV prognozinis modelius.

2. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

2.1. Tiriamųjų pacientų imtys

I tiriamųjų pacientų imtis (Vilniaus imtis). Į biomedicininį tyrimą buvo įtraukti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK, Vilnius, Lietuva) Pilvo chirurgijos centre gydyti 144 pacientai, kuriems diagnozuota pirminė storosios žarnos adenokarcinoma (Lietuvos bioetikos komiteto leidimai Nr. L-13-03/1 ir L-13-03/2). Įvertinus klinikinius ir patologinius ligos duomenis, į tiriamųjų pacientų imtį neįtraukti:

- pacientai, kuriems diagnozuota adenokarcinoma *in situ*, t. y. navikas neperaugo storosios žarnos gleivinės, todėl nebuvo navikinių ląstelių plitimo rizikos (n = 6);
- pacientas, kurio storosios žarnos audinio biopsijos mėginyje buvo nustatytas invazyvus naviko komponentas, tačiau operacinėje medžiagoje invazyvus naviko nebuvo (n = 1);
- II–III stadijos (pagal TNM sistemą) vėžiu sirgę pacientai, prieš operaciją gydyti chemoterapija ir (ar) radioterapija (n = 8), kurios gali pakeisti naviko mikroaplinkos savybes ir turėti įtakos nustatomų imuninio atsako rodiklių prognoziniam tikslumui;
- IV stadijos vėžiu sirgę pacientai, prieš operaciją gydyti chemoterapija ir (ar) radioterapija (n = 3), kurios gali pakeisti naviko mikroaplinkos savybes ir turėti įtakos nustatomų imuninio atsako rodiklių prognoziniam tikslumui;
- IV stadijos vėžiu sirgę pacientai, nesant duomenų apie visišką tolimųjų metastazių pašalinimą (n = 13), nes nebuvo galima tiksliai įvertinti naviko mikroaplinkos savybių sąsajos su ligos progresavimu po operacijos;
- pacientai, kurie mirė po operacijos, t. y. dėl dauginės organų disfunkcijos sindromo, septinio šoko ar kitų komplikacijų po operacijos išgyveno mažiau negu 1 mėn. (n = 6);
- pacientai, kurie tęsė gydymą užsienyje ir kurių ligos eigos duomenys nebuvo pasiekiami (n = 2).

Tiriamųjų pacientų formaline fiksuotų, parafine impregnuotų (FFPI) SŽN mėginių mikroskopiniai preparatai, anksčiau paruošti ir naudoti diagnostikai, surinkti iš Valstybinio patologijos centro archyvo. Gydytojas patologas peržiūrėjo preparatus ir atrinko reprezentatyviausius navikų mėginius, kurių pjūviuose: 1) buvo matyti daugiau navikinio epitelio, mažesnės nekrozės, autolizės zonos, nebuvo audinio ar kitų artefaktų; 2) buvo išskiriamas naviko invazijos kraštas; 3) buvo matyti gausesnis imuninių ląstelių infiltratas.

Tyrimui paruošti FFPI SŽN mėginių CD8 žymens IHC preparatai (žr. 2.2.1 skyrių). Atlikus šių preparatų skaitmeninių vaizdų analizę (žr. 2.3 skyrių), navikų viso pjūvio vaizdų klasifikavimo rezultatai patikrinti ir į tolesnes analizes neįtraukti atvejai, kai navikų pjūviuose buvo nepakankamas su stromos audiniu sąveikaujančio navikinio epitelio plotas, reikalingas reprezentatyviam naviko kraštui (NK) nustatyti, t. y. kai >50 proc. navikinio audinio ploto sudarė gleivės (mucinai) (n = 3) arba bendras navikinio epitelio plotas buvo <4,5 mm² (n = 1) (žr. 3.1.1 skyrių).

Galutinę tiriamųjų pacientų imtį sudarė 101 pacientas. Jų stebėsenos pradžia laikyta chirurginio gydymo data, baigtimi – mirtis dėl bet kokios priežasties. Išgyvenamumo analizei taikytas progresyvus cenzūravimas (bendrojo išgyvenamumo mediana – 66 mėn.). Pacientų pasiskirstymas pagal lytį, amžių, naviko diferenciacijos laipsnį ir TNM kriterijus pateiktas 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Pacientų pasiskirstymas pagal klininius ir patologinius rodiklius (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101)

Klinikiniai ir patologiniai rodikliai	Pacientai, n (%)
Iš viso	101 (100 %)
Bendrasis išgyvenamumas, mėnesiai	
Mediana	66
Intervalas	2–75
Baigtis	
Išgyveno	72 (71,3 %)
Mirė	29 (28,7 %)
Lytis	
Moteris	60 (59,0 %)
Vyras	41 (41,0 %)
Amžius, metai*	
45–70	51 (50,5 %)
71–89	50 (49,5 %)
Naviko diferenciacijos laipsnis (G)	
G1	5 (4,9 %)
G2	85 (84,2 %)
G3	11 (10,9 %)
Stadija pagal TNM sistemą	
I	19 (18,8 %)
II	38 (37,6 %)
III	44 (43,6 %)
Pirminio naviko išplitimas (pT)	
pT1	5 (4,9 %)
pT2	19 (18,8 %)
pT3	62 (61,4 %)
pT4	15 (14,9 %)
Metastazės sritiniuose limfmazgiuose (pN)	
pN0	57 (56,4 %)
pN1	24 (23,8 %)
pN2	19 (18,8 %)

Klinikiniai ir patologiniai rodikliai	Pacientai, n (%)
pN3	1 (1,0 %)
Tolimosios metastazės (M)	
M0	101 (100 %)

*Pacientai suskirstyti į dvi grupes pagal amžiaus diagnozės metu medianą (70 m.). G1 – geros diferenciacijos laipsnio navikas, G2 – vidutinės diferenciacijos laipsnio navikas, G3 – blogos diferenciacijos laipsnio navikas. Storosios žarnos vėžio I–III stadijos pagal TNM sistemą atitinka Dukes A–C stadijas [175]: Dukes A stadijai priskiriami navikai, kurie neperauga raumeninio sluoksnio, jų prognozė yra geriausia; Dukes B stadiją sudaro geresnės (esant pT3N0M0) ir blogesnės (esant pT4N0M0) prognozės grupės; Dukes C stadijos prognozė geresnė, esant bet kokiam pT ir pN1M0, ir blogesnė, esant bet kokiam pT ir pN2M0. pT1 – navikas, infiltravęs pogleivį, pT2 – navikas, infiltravęs *tunica muscularis propria*, pT3 – navikas, per *tunica muscularis propria* infiltravęs subserozą arba nepadengtus pilvaplėve perikolinius arba perirektinius audinius, pT4 – navikas, tiesiogiai pažeidęs kitus organus arba struktūras ir (ar) perforavęs visceralinę pilvaplėvę. pN0 – sritiniai limfmazgiai nepažeisti, pN1 – metastazės 1–3 sritiniuose limfmazgiuose, pN2 – metastazės 4–6 sritiniuose limfmazgiuose, pN3 – metastazės 7 ir daugiau sritinių limfmazgių. M0 – tolimųjų metastazių nėra.

II tiriamųjų pacientų imtis (Notingamo imtis). Į biomedicininį tyrimą įtraukti 2007–2017 m. laikotarpiu Notingamo universiteto lignoninėje, Karalienės medicinos centre (Nottingham University Hospitals NHS Trust, Queen’s Medical Centre, NUH QMC, Notingamas, Jungtinė Karalystė) gydyti 99 pacientai, kuriems diagnozuota pirminė storosios žarnos adenokarcinoma (Notingamo sveikatos mokslų biobanko leidimo Nr. 15/NW/0685). Įvertinus klinikinius ir patologinius ligos duomenis, į tiriamųjų pacientų imtį neįtraukti:

- IV stadijos vėžiu sirgę pacientai, prieš operaciją gydyti chemoterapija (n = 2), kuri gali pakeisti naviko mikroaplinkos savybes ir turėti įtakos nustatomų imuninio atsako rodiklių prognoziniam tikslumui;
- IV stadijos vėžiu sirgę pacientai, nesant duomenų apie visišką tolimųjų metastazių pašalinimą (n = 3), nes negalima tiksliai įvertinti naviko mikroaplinkos savybių sąsajos su ligos progresavimu po operacijos;
- pacientas, kuriam diagnozuotas kirmėlinės ataugos navikas (n = 1), nes šios lokalizacijos navikams taikoma atskira TNM klasifikacija.

Tyrimui naudoti FFPI SŽN mėginių CD8, CD20 ir CD68 žymenų IHC preparatai, paruošti NUH QMC Molekulinės patologijos skyriuje. Atlikus šių preparatų skaitmeninių vaizdų analizę (žr. 2.3 skyrių), navikų viso pjūvio vaizdų klasifikavimo rezultatai patikrinti ir į tolesnes analizes neįtraukti atvejai, kai navikų pjūviuose buvo nepakankamas su stromos audiniu sąveikaujančio navikinio epitelio plotas, reikalingas reprezentatyviam naviko kraštui (NK) nustatyti, t. y. kai >50 proc. navikinio audinio ploto sudarė gleivės (mucinai) (n = 4) arba bendras navikinio epitelio plotas buvo <4,5 mm² (n = 2) (žr. 3.1.1 skyrių).

Galutinę tiriamųjų pacientų imtį sudarė 87 pacientai. Jų stebėsenos pradžia laikyta chirurginio gydymo data, baigtimi – mirtis dėl bet kokios priežasties. Išgyvenamumo analizei taikytas progresyvus cenzūravimas (bendrojo išgyvenamumo mediana – 51 mėn.). Pacientų navikų mėginiai tirti dėl MSI požymių: nustatyti 48 navikai, kuriems būdingi MSS (toliau – MSS navikai), ir 39 navikai, kuriems būdingas MSI (toliau – MSI navikai) (žr. 2.2.2 skyrių). Pacientų pasiskirstymas pagal lytį, amžių, naviko diferenciacijos laipsnį, TNM kriterijus, limfovaskulinę ir perineurinę invaziją, genų (*BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA*) mutacijas ir kitus požymius MSS ir MSI navikų pogrupiuose pateiktas 2.2 lentelėje.

2.2. lentelė. Pacientų pasiskirstymas pagal klinikius, patologinius ir molekulinis rodiklius MSS ir MSI navikų pogrupiuose (II tiriamųjų pacientų imtis, n = 87)

Klinikiniai, pataloginiai ir molekuliniai rodikliai	Pacientai, n (%)		p vertė*
	MSS navikai	MSI navikai	
Iš viso	48 (100 %)	39 (100 %)	
Bendrasis išgyvenamumas, mėnesiai			
Mediana	52	46	–
Intervalas	2–97	1–117	
Baigtis			
Išgyveno	37 (87,4 %)	21 (79,3 %)	–
Mirė	11 (12,6 %)	18 (20,7 %)	
Lytis			
Moteris	23 (47,9 %)	26 (66,7 %)	0,0878
Vyras	25 (52,1 %)	13 (33,3 %)	
Amžius, metai**			
45–71	32 (66,7 %)	13 (33,3 %)	0,0026*
72–89	16 (33,3 %)	26 (66,7 %)	
Naviko diferenciacijos laipsnis (G)			
G2	44 (91,7 %)	20 (51,3 %)	<0,0001*
G3	4 (8,3 %)	19 (48,7 %)	
Stadija pagal TNM sistema			
I	0	1 (2,6 %)	0,9999
II	31 (64,5 %)	23 (58,9 %)	
III	16 (33,3 %)	13 (33,3 %)	
IV	1 (2,1 %)	2 (5,1 %)	
Pirminio naviko išplitimas (pT)			
pT2	1 (2,1 %)	1 (2,6 %)	0,8115
pT3	36 (75,0 %)	27 (69,2 %)	
pT4	11 (22,9 %)	11 (28,2 %)	
Metastazės sritiniuose limfmazgiuose (pN)			
pN0	32 (66,6 %)	25 (64,1 %)	0,9027
pN1	8 (16,7 %)	8 (20,5 %)	
pN2	8 (16,7 %)	6 (15,4 %)	
Tolimosios metastazės (M)			
M0	47 (97,9 %)	37 (94,9 %)	0,5850
M1	1 (2,1 %)	2 (5,1 %)	
Limfovaskulinė invazija (LVI)			
LVI0	28 (58,3 %)	24 (61,5 %)	0,8279
LVI1	20 (41,7 %)	15 (38,5 %)	

Klinikiniai, patologiniai ir molekuliniai rodikliai	Pacientai, n (%)		p vertė*
	MSS navikai	MSI navikai	
Perineurinė invazija (Pne)			
Pne0	42 (87,5 %)	32 (82,1 %)	0,5529
Pne1	6 (12,5 %)	7 (18,9 %)	
Naviko augimo pobūdis			
Ekspansyvus frontas	23 (47,9 %)	26 (66,7 %)	0,0878
Infiltruojantis frontas	25 (52,1 %)	13 (33,3 %)	
Naviko pumpuravimosi židiniai			
Negausūs (<10 pumpurų)	33 (68,8 %)	25 (64,1 %)	0,6557
Gausūs (≥10 pumpurų)	15 (31,2 %)	14 (35,9 %)	
Perinavikinė limfocitinė infiltracija			
Negausi	35 (72,9 %)	20 (52,6 %)	0,0707
Gausi	13 (27,1 %)	18 (47,4 %)	
Pirminio naviko lokalizacija			
Kairioji žarnos pusė	28 (58,3 %)	3 (7,7 %)	<0,0001*
Skersinė žarna	0	1 (2,6 %)	
Dešinioji žarnos pusė	19 (39,6 %)	33 (84,6 %)	
Daugybiniai židiniai	1 (2,1 %)	2 (5,1 %)	
<i>BRAF</i> genas[†]			
Laukinio tipo	44 (91,7 %)	18 (46,2 %)	<0,0001*
Mutavęs	4 (8,3 %)	21 (53,8 %)	
<i>KRAS</i> genas[†]			
Laukinio tipo	25 (52,1 %)	32 (82,2 %)	0,0060*
Mutavęs	23 (47,9 %)	7 (17,9 %)	
<i>PIK3CA</i> genas[†]			
Laukinio tipo	40 (83,3 %)	31 (79,5 %)	0,7822
Mutavęs	8 (16,7 %)	8 (20,5 %)	

*Tikslioji Fišerio kriterijaus testas, kai reikšmingumo lygmuo $\alpha < 0,05$.

**Pacientai suskirstyti į dvi grupes pagal amžiaus diagnozės metu medianą (71 m.). Naviko diferenciacijos laipsnio ir TNM kriterijai aprašyti 2.1 lentelėje. Storosios žarnos vėžio IV stadija pagal TNM sistemą atitinka Dukes D stadiją, kai metastazės nustatomos kituose organuose (M1) [175]. LV10 – limfovaskulinės invazijos nėra, LV11 – nustatyti limfovaskulinės invazijos požymiai. Pne0 – perineurinės invazijos nėra, Pne1 – nustatyti perineurinės invazijos požymiai. Naviko augimo pobūdis (augimo frontas) ir perinavikinė limfocitinė infiltracija įvertinti pagal J. R. Jasso ir bendraautorių kriterijus [74]. Naviko pumpurais laikytos ≤5 navikinių ląstelių grupės naviko invazijos krašto periferijoje, o gausūs pumpuravimosi židiniai navike nustatyti, kai nors viename vertinimo regione buvo matoma ≥10 pumpurų arba kai mažiausiai dviejuose vertinimo regionuose buvo matyti bent 5 pumpurai. [†]Tirtos taškinės mutacijos *BRAF* geno 11 ir 15 egzonuose, *KRAS* geno 2, 3 ir 4 egzonuose, *PIK3CA* geno 1, 9 ir 20 egzonuose [176, 177].

2.2. Mėginių paruošimas

2.2.1. Imunohistocheminis dažymas

I tiriamųjų pacientų imties 3 μm storio FFPI SŽN navikų mėginių pjūviai (atpjauti mikrotomu) uždėti ant *Superfrost Plus* mikroskopinių stiklų (*Thermo Scientific*, JAV). Prieš IHC dažymą stiklai 1 val. laikyti termostate, 56 °C temperatūroje. IHC dažymas atliktas automatizuota sistema *Roche Ventana BenchMark ULTRA* (*Ventana Medical Systems*, JAV). Naudotas

pelės monokloninis antikūnas prieš žmogaus T limfocitų CD8 antigeną (klonas C8/144 B; koncentratas skiestas santykiu 1:400; *Cell Marque*, JAV).

Histologinių pjūvių IHC dažymo etapai: 1) deparafinizavimas ir rehidratavimas (72 °C; *EZ Prep solution* tirpalas, *Ventana Medical Systems*, JAV); 2) antigeno atstatymas (36 min. 95 °C; *Cell Conditioning solution (CCI)* tirpalas (pH 8,5), *Ventana Medical Systems*, JAV); 3) inkubavimas pirminiu pelės antikūnu prieš antigeną (32 min. 37 °C); 4) antigeno išryškinimas antriniu antikūnu prieš pelės imunoglobulinus, atliekant fermentinę DAB chromogeno konversiją (8 min. 36 °C; *ultraView Universal DAB Detection kit* reagentų rinkinys, *Ventana Medical Systems*, JAV); 5) audinio kontrastavimas *Mejerio* hematoksilinu (10 min. 36 °C); 6) dehidratavimas etilo ir izopropilo alkoholiais, uždengimas dengiamuoju stikleliu, naudojant *Biomount* medžiagą (*Biognost*, Kroatija). IHC dažymo kokybės kontrolei naudotas diagnostikai skirtas daugiaorganis parafininis blokas su žmogaus kepenų, kasos, tonzilės ir aklosios žarnos audiniais be patologijos.

2.2.2. *MLH1* geno promotoriaus metilinimo tyrimas

Diagnostikos metu II tiriamųjų pacientų imties FFPI SŽN mėginuose buvo iširti su MSI požymiais siejami IHC žymenys: MMR sistemos baltymai MLH1, MSH2, MSH6 ir PMS2. 48 atvejais šių baltymų IHC raiškos praradimo nebuvo (MSS navikai), 36 atvejais nustatytas MLH1 ir PMS2 baltymų IHC raiškos praradimas, 3 atvejais nustatytas MLH1, PMS2 arba MSH6 baltymo IHC raiškos praradimas (MSI navikai). Šios imties navikų mėginiai buvo naudoti validuojant naują Linčo sindromo diagnostikai skirtą kiekybinę PGR testą (*N_LyST*), kuriuo tiriami: mononukleotidiniai žymenys *BAT25*, *BAT26*, *BCAT25*, *MYB* ir *EWSR1*, *BRAF* geno mutacijos ir *MLH1* geno promotoriaus metilinimas. *N_LyST* testo validavimo rezultatai išsamiai aprašyti S. Susanti ir bendraautorių [177].

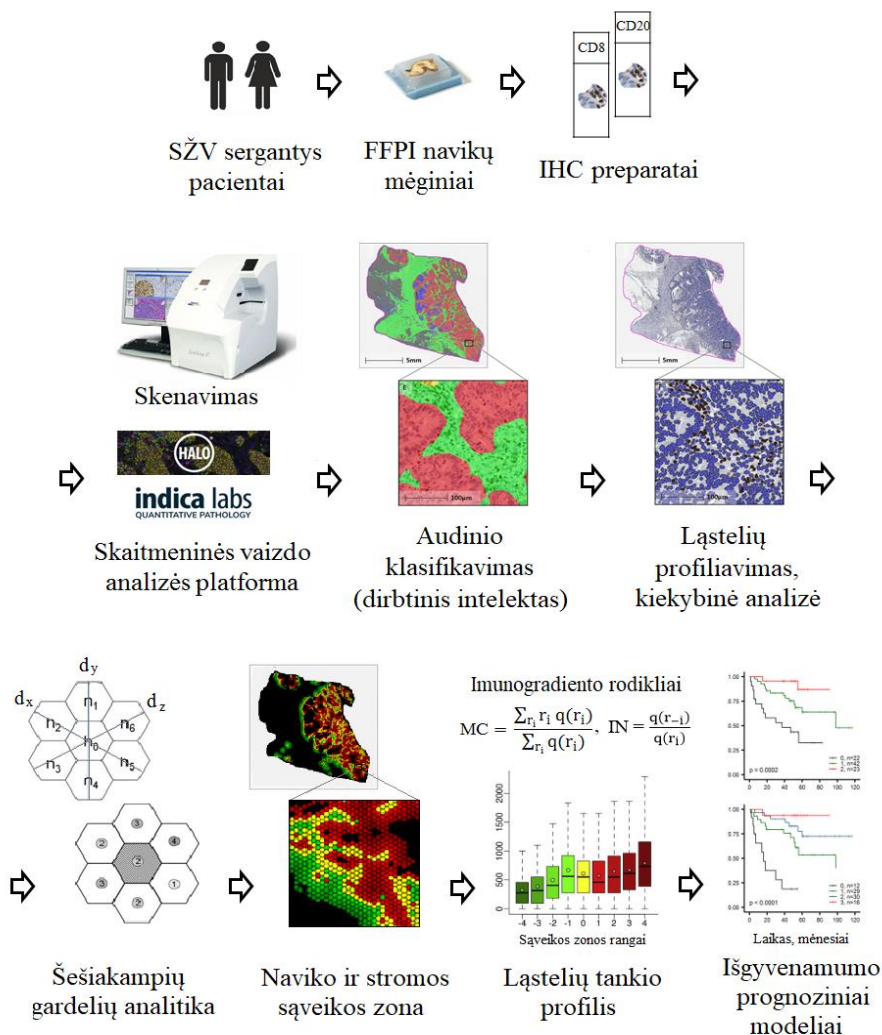
Stažuotės NUH QMC Molekulinės patologijos skyriuje metu (2 mėn. trukmė, 2017 m.) buvo atlikti *MLH1* geno promotoriaus metilinimo analizės optimizavimo darbai: 1) atlikta literatūros apžvalga ir parinktas tikslinis *MLH1* promotoriaus regionas C (genetinė sritis nuo –46 iki –111 nukleotido nuo transkripcijos pradžios vietos; NCBI sekos ID: NC_018914.2); 2) sukurti šiam regionui specifiniai pradmenys (naudotos internetinės programos: *MFEprimers* (<<http://mfepimer.igenetech.com>>), *UCSC in silico PCR* (<<http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr>>), pradmenų sekos nepateikiamos); 3) optimizuotas kiekybinės PGR ir DNR lydymosi kreivių analizės protokolas (naudotas ABI 7500 FAST PGR amplifikatorius

(Applied Biosystems, JAV)): PGR amplifikacijos programą sudarė 5 min. 95 °C ciklas, 45 ciklai po 10 s 95 °C, 30 s 55 °C ir 30 s 72 °C, vėliau 2 min. 72 °C ciklas; DNR lydymosi kreivių analizės programą sudarė 15 s 95 °C, staigus šaldymas iki 60 °C ir 1 min. 60 °C, vėliau temperatūra lėtai pakelta (0,03°C/s greičiu) iki 95 °C; PGR reakcijos mišinį (V = 10 µL) sudarė 5 µL 2 kartus skiesto *Hot Shot Diamond* PGR mišinio, 0,5 µL 20 kartų skiesto (25 µM) *EvaGreen* fluorescencinio dažo, 20 ng tiriamos DNR; kiekvieno pradmens galutinė koncentracija – 0,25 µM; 4) išskirta visų tiriamųjų pacientų FFPI navikų mėginių DNR (*QIAamp DNA FFPE tissue kit* reagentai, *Qiagen*, Jungtinė Karalystė) ir atlikta jos bisulfitinė konversija (*EZ-DNA Methylation-Lightning Kit* reagentai, *Zymo Research*, JAV); 5) bisulfitu modifikuotos DNR mėginiuose optimizuotu kiekybinės PGR ir DNR lydymosi kreivių analizės protokolu atliktas *MLH1* promotoriaus metilinimo tyrimas.

Tiriamųjų pacientų MSI navikų, esant *MLH1* IHC raiškos praradimui, DNR mėginiuose nustatytas *MLH1* promotoriaus metilinimas. Tai rodo, kad šie navikai daugiausia sporadinės kilmės – *MLH1* promotoriaus metilinimas yra retas reiškinys Linčo sindromo atveju [178], be to, daugiau negu pusės (57 %) MSI navikų, esant *MLH1* baltymo IHC raiškos praradimui, DNR mėginiuose buvo nustatytos *BRAF* mutacijos, kurios koreliuoja su *MLH1* promotoriaus metiliniu sporadiniuose navikuose [179].

2.3. Skaitmeninės patologijos analitikos metodai

Šiame darbe taikytos skaitmeninės patologijos analitikos etapai pateikti 2.1 pav. Pirmiausia atrenkami tiriamųjų pacientų FFPI navikų mėginiai ir paruošiami mikroskopiniai IHC preparatai; šie preparatai skaitmenizuojami skenuojant, navikų viso pjūvio vaizdai perkeliama į skaitmeninės vaizdo analizės platformą; dirbtinio intelekto algoritmu pagrįstu audinio klasifikatoriumi navikų vaizduose išskiriamas navikinis epitelis, stroma ir kitos audinio klasės, stiklas bei artefaktai; ląstelių profiliavimo algoritmu atliekama imuninių ląstelių populiacijų naviko mikroaplinkoje kokybinė ir kiekybinė analizė; skaitmeninės vaizdo analizės duomenys analizuojami šešiakampių gardelių analitikos principais: nustatoma naviko ir stromos sąveikos zona ir imuninių ląstelių pasiskirstymo (tankio) joje profiliai. Erdviniai imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko ir stromos sąveikos zonoje aspektai aprašomi imunogradiento rodikliais (pavyzdžiui, ląstelių tankio masės centro (MC) ir imunonuokryčio (IN) rodikliai); įvertinama imuninio atsako rodiklių prognozė, siejant su standartiniais klinikiniais ir patologiniais rodikliais, ir sudaromi kombinuoti prognoziniai modeliai.



2.1 pav. Skaitmeninės patologijos analitikos etapai

2.3.1. Mikroskopinių preparatų skaitmenizavimas

Mikroskopiniai IHC preparatai skenuoti *ScanScope XT Slide Scanner* (Leica Aperio Technologies, Kalifornija, JAV) arba *Aperio AT2 Slide Scanner* (Leica Microsystems, Veclaras, Vokietija), naudojant 20x didinimą (skiriamoji geba – 0,5 μm). Skaitmenuoti navikų viso pjūvio vaizdai suarchyvuoti *ImageScope* (11.1.2.752 versija, Leica Biosystems, Čikaga, JAV) patologijos vaizdų duomenų bazėje, vėliau perkelti į HALO™

skaitmeninės vaizdo analizės platformą (2.2.1870 versija, *Indica Labs*, Naujoji Meksika, JAV).

2.3.2. Navikinio audinio klasifikavimas

Navikiniam audiniui mikroskopinių IHC preparatų vaizduose klasifikuoti taikytas dirbtinio intelekto pagrindu veikiantis prižiūravimo mokymo HALO AI (angl. *artificial intelligence*) algoritmas. Atliekant analizę, sukurti 4 klasifikatoriai: navikų mėginių CD8 IHC preparatams (VUL SK) ir CD8, CD20, CD68 IHC preparatams (NUH QMC). Klasifikatoriai buvo mokomi atpažinti skirtingas SŽV audinio struktūras (klases): navikinį epitelį, stromą, audinio nekrozės / autolizės zonas, limfoidinius folikulus / agregatus ir foną, kuris apima stiklą bei artefaktus (audinio klostes, oro burbulus ar kt.) (2.2 pav. B, D, F).

Audinio klasifikatoriaus mokymo etapai:

1) tyrėjas parenka apie 20 (1/5 imties) skirtingos morfologijos ir diferenciacijos laipsnio navikų viso pjūvio vaizdus (toliau – navikų vaizdai);

2) navikų vaizduose tyrėjas pažymi audinio struktūras, atitinkančias tikslines klases: navikinį epitelį (≥ 400 anotacijų), stromą (≥ 400 anotacijų), audinio nekrozės / autolizės zonas (≥ 50 anotacijų), limfoidinius folikulus / agregatus (≥ 50 anotacijų), audinio ar kitus artefaktus ir stiklą (~ 50 anotacijų), sudaro mokymo anotacijų rinkinį (2.2 pav. A, C, E);

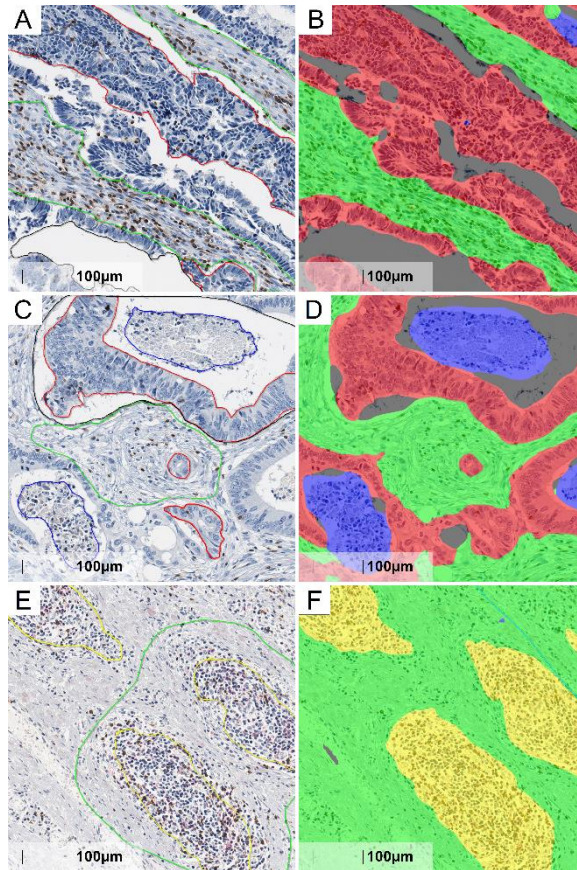
3) HALO™ skaitmeninės vaizdo analizės platformoje tyrėjas inicijuoja klasifikatoriaus mokymą, taikydamas 0,5–1 μm /pikseliui skiriamąją gebą ir 150–250 μm^2 mažiausio atpažįstamo objekto (~ 4 ląstelių grupė (pumpuras)) plotą; leidžiami $\geq 100\,000$ mokymo ciklai; tyrėjas stabdo mokymą, kai kryžminės entropijos (angl. *cross-entropy*) klaidos funkcija $E(w) < 0,2$;

4) apmokytas klasifikatorius išbandomas naudojant 10 mokymo anotacijų rinkiniui žymėtų navikų vaizdų ir 10 kitų, atsitiktinai iš imties parinktų navikų vaizdų;

5) ekspertas (gydytojas patologas, virškinamojo trakto patologijos specialistas) vertina navikų vaizdų klasifikavimo tikslumą;

6) nustačius nepakankamą klasifikavimo tikslumą, mokymo anotacijų rinkinys koreguojamas ir pildomas, klasifikatorius mokomas iš naujo, leidžiant $\geq 100\,000$ mokymo ciklų; mokymai stabdomi, kai kryžminės entropijos klaidos funkcija $E(w) < 0,2$;

7) 4–6 žingsniai kartojami, kol klasifikavimo tikslumas, eksperto vertinimu, yra pakankamas ($\geq 90\%$).



2.2 pav. Storiosios žarnos navikinio audinio struktūrų anotacijų, pažymėtų klasifikatoriaus mokymui, pavyzdžiai: A, C, E – CD8 IHC dažyto audinio vaizdo fragmentai su rankiniu būdu pažymėtomis skirtingų audinio struktūrų anotacijomis (linijų sp. atitinka skirtingas struktūras); B, D, F – atitinkami audinio vaizdo fragmentai, išanalizuoti pagal anotacijas apmokytu audinio klasifikatoriumi: išskiriami navikinis epitelis (raudona sp.), stroma (žalia sp.), audinio nekrozė (mėlyna sp.), limfoidiniai agregatai (geltona sp.) ir stiklas (juoda sp.)

2.3.3. Naviko mikroaplinkos ląstelių profiliavimas

Skaitmeninės vaizdo analizės algoritmais histologinių preparatų vaizduose galima nustatyti skirtingus ląstelių tipus ir analizuoti jų pasiskirstymą audinyje. Naviko mikroaplinkos ląstelių populiacijų kokybinei ir kiekybinei analizei buvo taikomas HALO™ Multiplex IHC modulis (1.2 versija). Atliekant analizę, sukurti 4 ląstelių profiliavimo algoritmai: navikų mėginių CD8 IHC preparatams (VUL SK) ir CD8, CD20, CD68 IHC preparatams (NUH QMC). Algoritmai sukalibruoti audinyje aptikti visas ląsteles, kurių branduoliai buvo išryškinti hematoksilinu, ir ląsteles, kurių citoplazmoje nustatyta IHC žymens raiška.

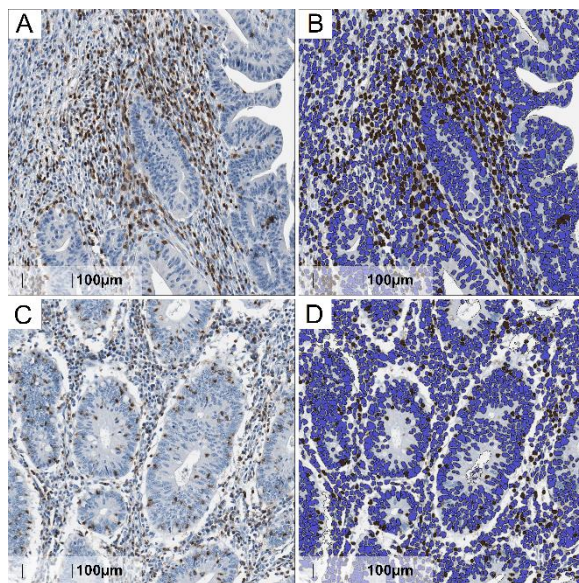
Ląstelių profiliavimo algoritmo kalibravimo etapai:

1) *Ląstelių atpažinimo kalibravimas.* Parenkami ląstelių branduolių aptikimo parametrai: nustatomos branduolių vaizdo kontrasto, optinio tankio, branduolių

aptikimo jautrumo slenkstinės vertės, taip pat parenkami branduolių dydžių intervalai (pavyzdžiui, limfocito branduolio plotas yra $\sim 10\text{--}15\ \mu\text{m}^2$, navikinės ląstelės – $\geq 25\text{--}45\ \mu\text{m}^2$), branduolių apvalumo, vientisumo ir atskyrimo vienas nuo kito sąlygos. Panašūs parametrai kalibruojami ląstelių citoplazmai ir membranai atpažinti. Parametrų parinkimas priklauso ne tik nuo tiriamų ląstelių morfologijos, bet ir nuo audinio nudažymo intensyvumo.

2) *Spalvų atpažinimo kalibravimas*. Parenkamas tam tikros spalvos ląstelės (branduolio / citoplazmos / membranos) vaizdo fragmentas, pagal kurį kalibruojamas tos spalvos aptikimas – parenkami skirtingų atspalvių vaizdo pikseliai (9–16 pikselių), kurių sudėtinė spalva išreiškiama RGB spalvų maišymo sistemos procentinėmis dalimis ir užfiksuojama algoritmo atmintyje. Algoritmas gali būti sukalibruotas 1–4 spalvoms atpažinti.

3) *Spalvų atpažinimo ląstelėse kalibravimas*. Parinktoms spalvoms (žr. 2-ąją etapą) nustatomos intensyvumo slenkstinės vertės, pagal kurias algoritmas atpažįsta šias spalvas ląstelėse, tada priskiria ląsteles tam tikroms populiacijoms. Pavyzdžiui, limfocitai su CD8 koreceptorius IHC raiška bus atskirti nuo kitų šio baltymo IHC raiškos neturinčių naviko mikroaplinkos ląstelių (2.3 pav.). Priklausomai nuo žymens raiškos savybių ir tyrimo tikslo, algoritmas gali būti sukalibruotas atpažinti spalvą ląstelės branduolyje, citoplazmoje ar membranoje.



2.3 pav. Storosios žarnos naviko mikroaplinkos ląstelių profiliavimo pavyzdžiai: A, C – CD8 IHC dažyto audinio vaizdo fragmentai; B, D – atitinkami audinio vaizdo fragmentai, išanalizuoti ląstelių profiliavimo algoritmu: nustatomos ląstelės su CD8 koreceptorius IHC raiška (pažymėtos ruda sp.) ir ląstelės, kurios neturi šio baltymo IHC raiškos (pažymėtos mėlyna sp.)

2.3.4. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas

Šiame darbe naudotas kartu su darbo grupės tyrėjais sukurtas nauja skaitmeninės patologijos analitikos metodika, skirta naviko ir stromos sąveikos zonai automatizuotai išskirti, imuninių ląstelių pasiskirstymo šioje zonoje profiliams analizuoti ir imunogradiento rodikliams nustatyti. Pateikta patentinė paraiška (Lietuvos paraiškos Nr. LT2019 509, tarptautinės paraiškos Nr. PCT/IB2020/053396 (Pasaulinės intelektinės nuosavybės organizacijos tarptautinis biuras)). Metodas pagrįstas skaitmeninės vaizdo analizės duomenų variacijos naviko vaizde analize šešiakampių gardelių analitikos principais [180].

Naviko ir stromos sąveikos zona naviko vaizde nustatoma analizuojant audinio klasifikatoriumi gautus duomenis (skirtingoms audinio klasėms priskirtų vaizdo pikselių koordinatas). Duomenys skirstomi į vienodo dydžio šešiakampes gardeles, t. y. gardelių tinklelis „padengiamas“ ant naviko vaizdo atsitiktine pozicija (minėtina, kad disertacijoje imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje analizei tinkamiausias šešiakampės gardelės plotas buvo 43 550 vaizdo pikselių, arba 0,011 mm², kai šoninė kraštinė – 0,065 mm) (2.4 pav. A–C). Vėliau gardelės klasifikuojamos jose analizuojant navikinio epitelio (toliau – naviko) ir stromos bei fono, kuriam priskiriamos visos kitos klasifikatoriaus atpažįstamos audinio klasės, stiklas bei artefaktai, santykinius plotus (2.4 pav., D). Sąveikos zonai automatizuotai nustatyti naudojama C++ (g++ 7.3.8) programavimo platforma, taikant *libtiff* 5.2.4. versiją (<<https://www.libtiff.org>>) ir *Boost* 1.67. versiją (<<https://www.boost.org>>).

Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo algoritmu gardelių klasifikavimas vyksta dviem etapais (išsamiau aprašyta A. Rasmussono ir bendraautorų [181]):

1-as etapas. Nustatomos gardelės, priskiriamos naviko kraštui (NK), t. y. kiekvienai gardelei apskaičiuojama tikimybė, ar ji yra naviko ir stromos audinių sąlyčio riboje. NK nustatymo žingsniai:

1) visose gardelėse (*g*) apskaičiuojami naviko, stromos ir fono santykiniai plotai (toliau – plotai):

$$n_g = \frac{N_g}{N_g+S_g+F_g}, \quad s_g = \frac{S_g}{N_g+S_g+F_g}, \quad f_g = \frac{F_g}{N_g+S_g+F_g},$$

kai n, s ir $f \in [0; 1]$, $n_g + s_g + f_g = 1$,

kur N – naviko plotas, S – stromos plotas, F – fono plotas, n – naviko santykinis plotas, s – stromos santykinis plotas, f – fono santykinis plotas;

2) naudojant tris išvestines šešiakampės gardelės geometrinės ašis, apskaičiuojami naviko ploto pokyčiai visame tinklelyje – kiekvienoje gardelėje šis pokytis aprašomas geometrinio gradiento norma (g praleidžiamas):

$$|\nabla_n| = \sqrt{(d_x^n)^2 + (d_y^n)^2 + (d_z^n)^2},$$

kur d – funkcijos išvestinė, n – naviko santykinis plotas, x, y, z – šešiakampės gardelės geometrinės ašys;

3) išskiriamos gardelės, kuriose nustatomi staigūs naviko ploto pokyčiai, t. y. kai $|\nabla_n| > 0,5$, taikant normalizuotą ploto gradientą $\nabla_n \in [0; 1]$ (2.4 pav., E);

4) įvertinama, ar staigūs naviko ploto pokyčiai gardelėse buvo sukelti stromos ar fono plotų pokyčių gretimose gardelėse, t. y. naviko ploto pokyčio išvestinės pasveriamos pagal stromos ir fono plotų pokyčius:

$$s d_x^n = d_x^n \frac{|d_x^s|}{|d_x^s| + |d_x^f|} \quad \text{ir} \quad f d_x^n = d_x^n \frac{|d_x^f|}{|d_x^s| + |d_x^f|},$$

$$\text{kai } s d_x^n + f d_x^n = d_x^n.$$

kur d – funkcijos išvestinė, n – naviko santykinis plotas, s – stromos santykinis plotas, f – fono santykinis plotas, x – šešiakampės gardelės geometrinė ašis; analogiškas svorių priskyrimas atliekamas y ir z ašyse.

5) naviko ploto pokyčių gradientas atskiriamas į dvi dalis: į naviko ir stromos $|\nabla_n^s|$, kai naviko ploto pokyčiai sukelti gretimai esančios stromos ploto pokyčių, ir naviko-fono $|\nabla_n^f|$, kai naviko ploto pokyčiai sukelti gretimai esančio fono ploto pokyčių. Jeigu gretimose gardelėse fono ploto pokytis yra labai mažas, laikoma, kad naviko ploto pokytis sukeltas stromos ploto pokyčio ir gardelė priskiriama naviko ir stromos kraštui, arba NK; jeigu naviko ploto pokytis sukeltas fono ploto pokyčio, gardelė priskiriama naviko ir fono kraštui (2.4 pav., F):

$$|\nabla_n| = |\nabla_n^s + \nabla_n^f|, \text{ kai}$$

$$|\nabla_n^s| = \sqrt{(s d_x^n)^2 + (s d_y^n)^2 + (s d_z^n)^2}, \quad |\nabla_n^f| = \sqrt{(f d_x^n)^2 + (f d_y^n)^2 + (f d_z^n)^2},$$

6) papildomai prie NK pridedamos naviko ar stromos klasėms priskirtos gardelės, kuriose naviko ir stromos plotai yra panašūs, t. y. kai $|n-s| < 0,25$, tai invazyvioji NK dalis;

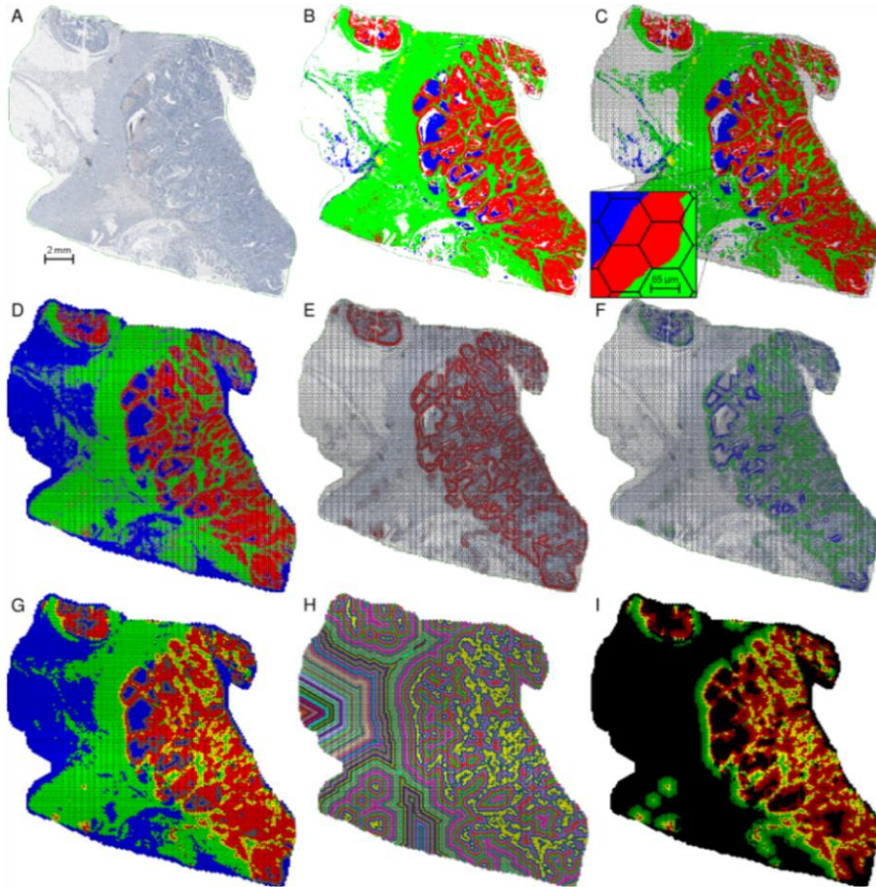
7) kitos gardelės, kuriose staigių naviko ploto pokyčių nenustatoma, pagal didžiausio ploto klasę jose suklasifikuojamos į naviko, stromos ar fono klases (2.4 pav., G).

2-as etapas. Išskiriama naviko ir stromos sąveikos zona, t. y. prie NK prijungiamos tam tikru atstumu nuo jo nutolusios naviko ir stromos klasių gardelės. Sąveikos zonos nustatymo žingsniai:

1) atliekant atstumų transformaciją (taikomas euklidinis atstumų tarp centro taškų principas) apskaičiuojami visų naviko ir stromos klasių gardelių trumpiausieji atstumai iki NK (2.4 pav., H);

2) siekiant išskirti stromos ir naviko sritis sąveikos zonoje, NK gardelėms priskiriamas rangas $r_i = 0$, t. y. atskaitos rangas, o stromos klasės gardelėms pagal atstumą nuo NK suteikiami neigiamo ženklo rangai ($r_i \in [-i; 0)$, kur i – atstumas nuo NK), naviko klasės gardelėms pagal atstumą nuo NK suteikiami teigiamo ženklo rangai ($r_i \in (0; +i]$, kur i – atstumas nuo NK), žr. rangų suteikimo gardelėms taisyklę:

$$rangas(g) \stackrel{\text{def}}{=} \begin{cases} \text{jei klasė}(g) = \text{navikas}, & rangas = \text{atstumas} \\ \text{jei klasė}(g) = \text{stroma}, & rangas = -\text{atstumas} \\ \text{jei klasė}(g) = \text{NK}, & rangas = 0 \\ \text{kitu atveju}, & \text{ignoruoti } g \end{cases}$$

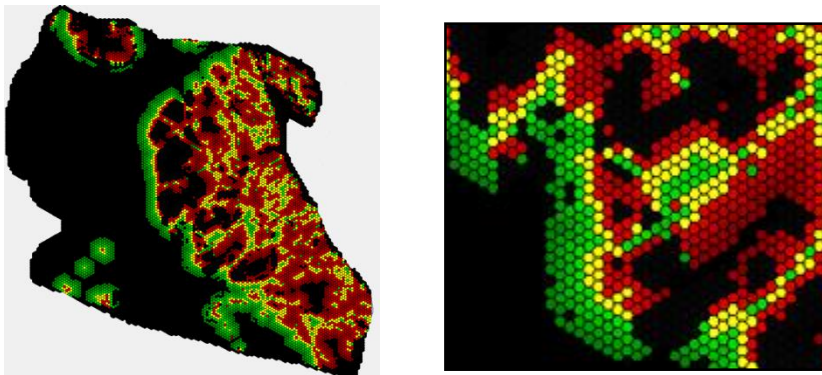


2.4 pav. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo etapai (paveikslas iš A. Rasmussono ir kt. [181]): A – CD8 IHC dažyto storosios žarnos naviko viso pjūvio vaizdas; B – vaizdo pikseliai, suklasifikuoti audinio klasifikatoriumi: navikinis epitelis (raudona sp.), stroma (žalia sp.), audinio nekrozė (mėlyna sp.), limfoidiniai agregatai (geltona sp.), stiklas (balta sp.); C – suklasifikuotų vaizdo pikselių duomenys skirstomi šešiakampių gardelių tinkleliu; D – santykinių naviko (raudona sp.), stromos (žalia sp.) ir fono (mėlyna sp.) plotų gradientų visame gardelių tinklelyje analizė; E – gardelės, kuriose pastebimi staigūs naviko ploto pokyčiai (raudona sp.); F – gardelės, priskirtos naviko ir stromos kraštui, arba NK (žalia sp.), taip pat naviko ir fono kraštui (mėlyna sp.); G – gardelės, suskirstytos į NK (geltona sp.), naviko ir fono krašto (pilka sp.), stromos (žalia sp.), naviko (raudona sp.) ir fono (mėlyna sp.) klases; H – gardelės, išryškintos pagal atstumą nuo NK atsitiktinai parinkta spalva; I – 9 rangų pločio naviko ir stromos sąveikos zona (SZ₉) (stromos sritis (r_i ∈ [-4; -1]) pažymėta žalia sp., NK₁ (r_i = 0) – geltona sp., naviko sritis (r_i ∈ [1; 4]) – raudona sp.)

3) pasirenkama tam tikro rangų pločio (gardelių rangų skaičiaus) sąveikos zona, kuri apima NK ir gretimai esančių stromos ir naviko klasių gardelių rangus (2.4 pav., I), t. y. SZ_q (SZ – sąveikos zona, q – įtraukiamų rangų skaičius) apims gardelių rangų intervalą $[-\frac{q}{2}; \frac{q}{2}]$, kur $\frac{q}{2}$ apvalinamas iki sveikąjį skaičių ir mažesnę pusę;

4) gali būti pasirenkamas tam tikro rangų pločio (rangų skaičiaus) NK, t. y. NK_p (NK – naviko kraštas, p – įtraukiamų rangų skaičius) apims gardelių rangų intervalą $[-\frac{p}{2}; \frac{p}{2}]$, kur $\frac{p}{2}$ apvalinamas iki sveikąjo skaičiaus į mažesnę pusę.

2.5 pav. pateiktas SŽN nustatytos 9 rangų pločio sąveikos zonos fragmentas. Matyti, kad sąveikos zona nėra fiksuoto pločio – šios zonos plotį skirtinguose naviko regionuose lemia erdvinės navikinio epitelio ir stromos audinio tarpusavio pasiskirstymo ypatybės.



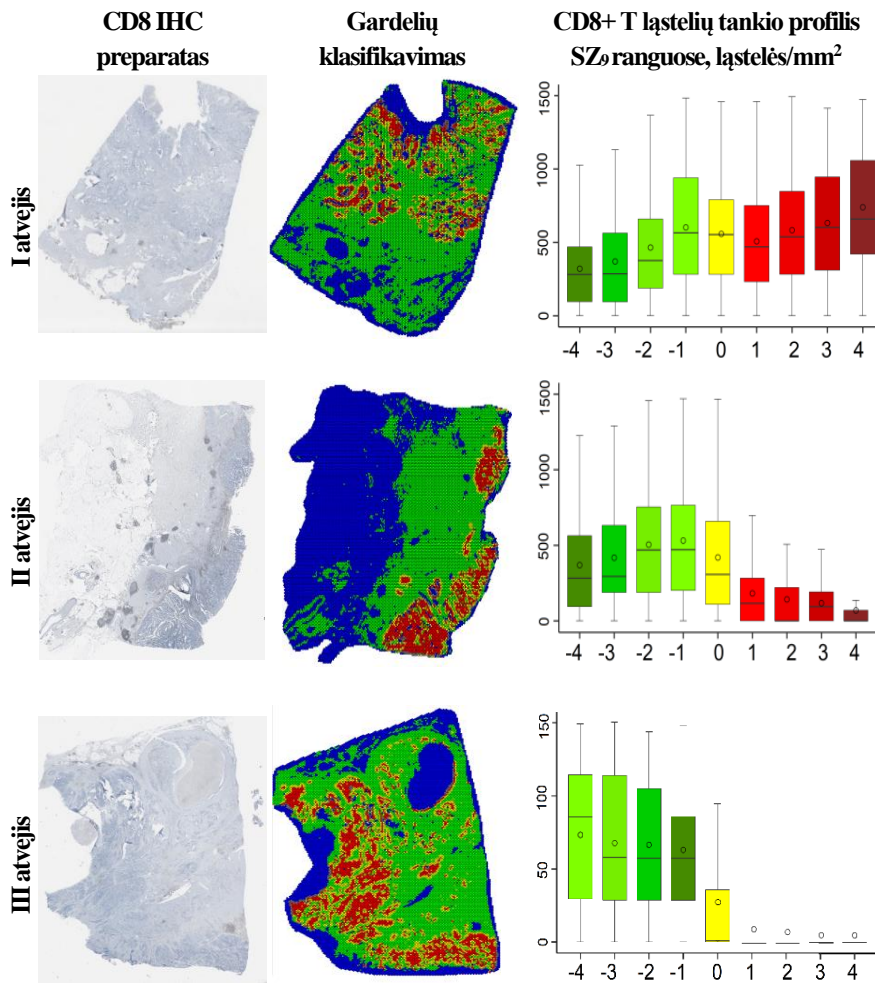
2.5 pav. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zonos (SZ_9) pavyzdys: kairėje – viso pjūvio naviko vaizdas, dešinėje – šio vaizdo padidintas fragmentas (stromos sritis ($r_i \in [-4; -1]$) pažymėta žalia sp., NK_1 ($r_i = 0$) – geltona sp., naviko sritis ($r_i \in [1; 4]$) – raudona sp.)

2.3.5. Imuninių ląstelių pasiskirstymo profilių sudarymas

Naviko mikroaplinkos ląstelių profiliavimo algoritmai nustato skirtingų ląstelių populiacijų koordinates naviko vaizde. Šie duomenys kartu su audinio klasifikatoriaus duomenimis skirstomi tuo pačiu naviko ir stromos sąveikos zonos nustatytai naudojamu šešiakampių gardelių tinkleliu (2.4 pav., C), todėl visose gardelėse gali būti apskaičiuojami tiriamų ląstelių tankiai. Vėliau sąveikos zonos ranguose, t. y. NK ir stromos bei naviko klasių (sričių) gardelių ranguose, apskaičiuojami tiriamų ląstelių tankių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai ar kiti parametrai. Šie duomenys toliau naudojami tiriamų ląstelių pasiskirstymo sąveikos zonoje profiliams sudaryti.

Šiame darbe buvo vertinamas imuninių ląstelių pasiskirstymas naviko ir stromos sąveikos zonoje. 2.6 pav. pateikti kelių SŽN atvejų $CD8^+$ T ląstelių tankio 9 rangų pločio sąveikos zonoje (SZ_9) profiliai. Matyti, kad skirtinguose navikuose imuninių ląstelių tankiai sąveikos zonoje gali smarkiai skirtis: pirmajame SŽN $CD8^+$ T ląstelių tankis yra mažesnis

stamos srityje, palyginti su jų tankiu naviko srityje, antrajame SŽN CD8+ T ląstelių tankis yra mažesnis naviko srityje, o trečiajame SŽN CD8+ T ląstelių naviko srityje beveik nėra.



2.6 pav. Skirtingų storosios žarnos navikų (I-III atvejai) CD8+ T ląstelių tankio naviko ir stamos sąveikos zonoje (SZ_o) profiliai: kairėje – CD8 IHC preparatų vaizdai; viduryje – atitinkamų vaizdai, suklasifikavus gardeles į NK (geltona sp.), naviko (raudona sp.), stamos (žalia sp.), fono (mėlyna sp.) klases; dešinėje – CD8+ T ląstelių tankio profiliai (stamos sritis ($r_i \in [-4; -1]$), žalia sp., NK₁ ($r_i = 0$) – geltona sp., naviko sritis ($r_i \in [1; 4]$) – raudona sp.

2.3.6. Imunogradiento rodiklių apskaičiavimas

Imuniniam atsakui naviko ir stamos sąveikos zonoje vertinti apskaičiuoti įvairūs rodikliai: ląstelių tankiai, gauti grupuojant skirtingus sąveikos zonos rangus, šių tankių santykiai, dispersijos, gradientai ir kt. Rodikliai atrinkti

lyginant jų statistinę galią pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti (žr. 2.4 skyrių). Nustatyti stipriausi prognoziniai rodikliai – imuninių ląstelių tankio sąveikos zonoje profilio rodikliai, išreiškiantys ląstelių tankio pokytį kryptimi iš stromos į naviką – imunogradiiento rodikliai:

- **Masės centras (MC)**

MC rodiklis atitinka fizikoje taikomą masės centro, kaip masės pasiskirstymo erdvėje centrinio taško, kuris lemia kūno pusiausvyrą, sampratą. Sąveikos zoną infiltruojančių imuninių ląstelių, pavyzdžiui, CD8+ T ląstelių, tankio MC rodikliui apskaičiuoti taikyta formulė:

$$MC(q) = \frac{\sum_{r_i} r_i q(r_i)}{\sum_{r_i} q(r_i)},$$

kur r_i – sąveikos zonos rangai, kai $r_i \in [-i; i]$, $q(r_i)$ – atitinkamame sąveikos zonos range apskaičiuotas kintamasis, pavyzdžiui, CD8+ T ląstelių tankio vidurkis.

CD8+ T ląstelių tankio MC rodiklis išreiškia ląstelių tankio kitimą (gradientą) kryptimi iš stromos į naviką, t. y. parodo, kaip stipriai ląstelės yra linkusios skverbtis sąveikos zonos naviko srities link, arba – infiltruoti naviką.

- **Imunonuokrytis (IN)**

Sąveikos zoną infiltruojančių imuninių ląstelių, pavyzdžiui, CD8+ T ląstelių, tankio profiliuose, lyginant stromos ir naviko sričių rangus šalia NK, dažnai pastebėtas reikšmingas ląstelių tankio sumažėjimas („kritimas“) naviko srityje, todėl šiam pokyčiui įvertinti buvo pasiūlytas IN rodiklis:

$$IN(q) = \frac{q(r_{-i})}{q(r_i)},$$

kur $q(r_{-i})$ ir $q(r_i)$ – atitinkamuose sąveikos zonos stromos ir naviko sričių ranguose apskaičiuotas kintamasis, pavyzdžiui, CD8+ T ląstelių tankio vidurkis.

MC rodiklis įvertina ląstelių pasiskirstymą visoje sąveikos zonoje. IN rodiklis nepriklauso nuo sąveikos zonos pločio – jis visada atitinka siauriausią galimą sąveikos zoną ir gali būti informatyvus, kai analizuojamas nedidelis navikinio audinio mėginys, pavyzdžiui, biopsijos medžiaga.

2.4. Statistinė analizė

Imuninio atsako rodikliai apskaičiuoti naudojant imuninių ląstelių tankio (ląstelių skaičius / naviko ir stromos audinių plotas, mm²) vidurkius ir

standartinius nuokrypius naviko ir stromos sąveikos zonos ranguose. Prognoziškai stipriausi rodikliai atrinkti logrankiniu kriterijumi, Kokso regresijos ir vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros metodais (angl. *leave-one-out cross-validation*) [182]. Rodiklių aprašomojoje statistikoje pateikiami vidurkiai \pm standartiniai nuokrypiai (SN) ir medianos (Mdn).

Kolmogorovo–Smirnov kriterijumi nustatyta kintamųjų skirstinių asimetrija į dešinę ($g_1 > 0$), todėl kintamieji logaritmuoti parametrinei statistikai. Kintamųjų variacijoms skirtingose sąveikos zonos srityse bei pagal klinikinius ir patologinius rodiklius įvertinti taikyta vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *one-way ANOVA*), pritaikant *Bonferroni* kriterijų poriniams palyginimams. Kintamųjų tarpusavio sąsajoms nustatyti taikyta Pirsono koreliacijų matrica. Klinikinių ir patologinių rodiklių (kokybiniai kintamieji) tarpusavio sąsajos analizuotos porinėmis dažnių lentelėmis, taikant tikslųjį Fišerio kriterijų.

Statistiniam ryšiui tarp imuninio atsako rodiklių nustatyti atlikta faktorinė analizė. Duomenų tinkamumas faktorinei analizei vertintas Kaizerio–Mejerio–Olkinio matu (tinkamas $KMO > 0,8$). Latentinių faktorių skaičius parinktas pagal koreliacijos tikrinių reikšmių (angl. *eigenvalue*), viršijančių 1, skaičių. Pradiniam faktorių svoriui vertinti naudotas pagrindinių komponenčių metodas, o interpretacijai tinkamiausias faktorių svorių variantas parinktas taikant koordinačių ašių pasukimą *varimax* metodu.

Pacientų išgyvenamumo analizei naudota neparimetrinė Kaplano–Mejerio funkcija. Pacientų, išskirtų į prognozes grupes, išgyvenamumo funkcijų skirtumų statistinis reikšmingumas vertintas logrankiniu kriterijumi. Siekiant nustatyti nepriklausomus prognozinis veiksnis, taikyta Kokso regresijos analizė. Daugiaveiksniai Kokso modeliai sudaryti įtraukiant visus vienaveiksne analize nustatytus statistiškai reikšmingus prognozinis rodiklius, kai jų tarpusavio koreliacijos koeficientai buvo $r < 0,9$, taip išvengiant rodiklių daugialypiškumo (angl. *multicollinearity*) ar išskirtinumo (angl. *singularity*) efektų. Rodiklių vertės skirstytos į „aukštų“ ir „žemų“ verčių kategorijas pagal slenkstines vertes, nustatytas taikant *Cutoff Finder* įrankį (2.1 versija; *Charité* universitetas, Berlynas, Vokietija) [183]. Kokso modeliams validuoti naudota vienos dalies atidėjimo kryžminė patikra [182].

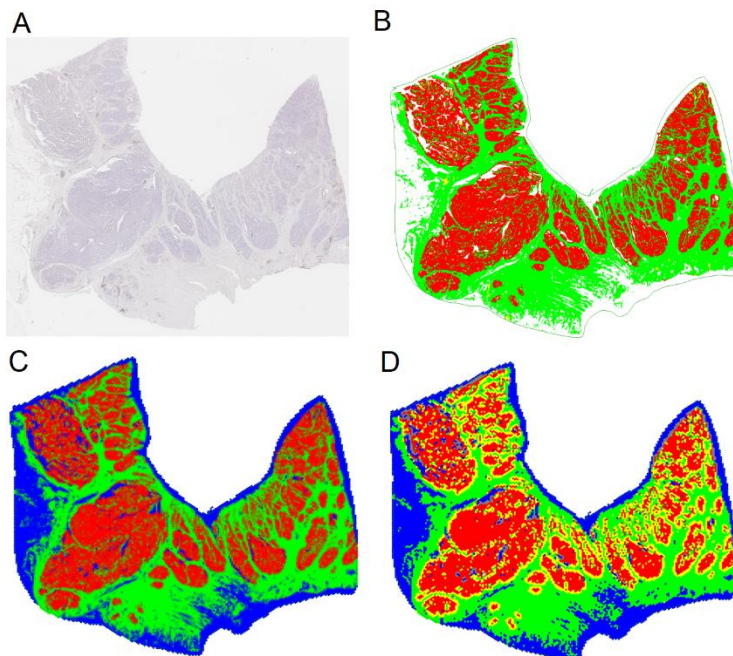
Visiems statistiniams kriterijams taikytas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$ ir dvišpusės p reikšmės. Statistinė analizė atlikta SAS programiniu paketu (9.4 versija; *SAS Institute Inc.*, Keris, JAV). Iliustracijoms ruošti naudotas SAS ir R programinis paketas (3.4.4 versija; *R Development Core Team*).

3. REZULTATAI

3.1. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zona (I tiriamųjų pacientų imtis)

3.1.1. Naviko krašto nustatymas

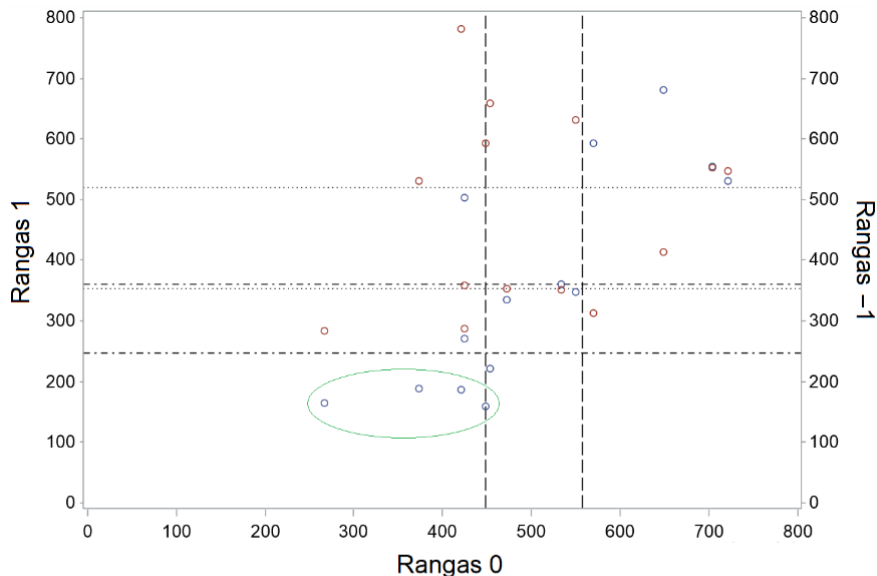
Skaitmeninės SŽN mėginių CD8 IHC preparatų (n = 105) vaizdo analizės duomenys (skirtingų audinio klasių plotai, tiriamų imuninių ląstelių koordinatės) suskirstyti ir analizuoti šešiakampių gardelių analitikos principais. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo metodu navikų vaizduose išskirtos naviko krašto (NK), naviko, stromos ir fono klasių gardelės (3.1 pav.).



3.1 pav. Naviko krašto nustatymas: A – SŽN mėginio CD8 IHC preparato vaizdas; B – tas pats vaizdas, išanalizuotas audinio klasifikatoriumi: išskirtos navikinio epitelio (raudona sp.), stromos (žalia sp.), fono (balta sp.) klasės; C – to paties vaizdo (klasifikatoriaus duomenų) suskirstymas šešiakampių gardelių tinkleliu: gardelėse išskirtos navikinio epitelio (raudona sp.), stromos (žalia sp.), fono (mėlyna sp.) klasės; D – šių audinio klasių plotų variacijos visame tinklelyje analizė ir gardelių suklasifikavimas: išskirtos NK (geltona sp.), naviko (raudona sp.), stromos (žalia sp.) ir fono (mėlyna sp.) klasių gardelės

Siekiant įvertinti, kokie mažiausi navikinio epitelio ir stromos audinio plotai reikalingi reprezentatyviam NK nustatyti, atlikta visos imties navikų vaizdų pasiskirstymo pagal gardelių skaičiaus sąveikos zonos NK (rangas 0) ir jam gretimose naviko (rangas 1) bei stromos (rangas –1) srityse procentilių

analizė. Vizualiai įvertinti navikų vaizdai, kurie priklausė 5-ai ir 10-ai procentilėms pagal gardelių skaičių NK ir gretimoje naviko srityje arba NK ir gretimoje stromos srityje. Nereprezentatyvus NK nustatytas 4 navikų vaizduose, priskirtuose 5-ai procentilei pagal gardelių skaičių NK ir gretimoje naviko srityje (3.2 pav.).



Legenda:

- Atvejų pasiskirstymas pagal gardelių skaičių ranguose 0 ir 1
- Atvejų pasiskirstymas pagal gardelių skaičių ranguose 0 ir -1

5-oji ir 10-oji procentilės, atitinkamai:

----- Rangas 1 : 247 ir 360 gardelės

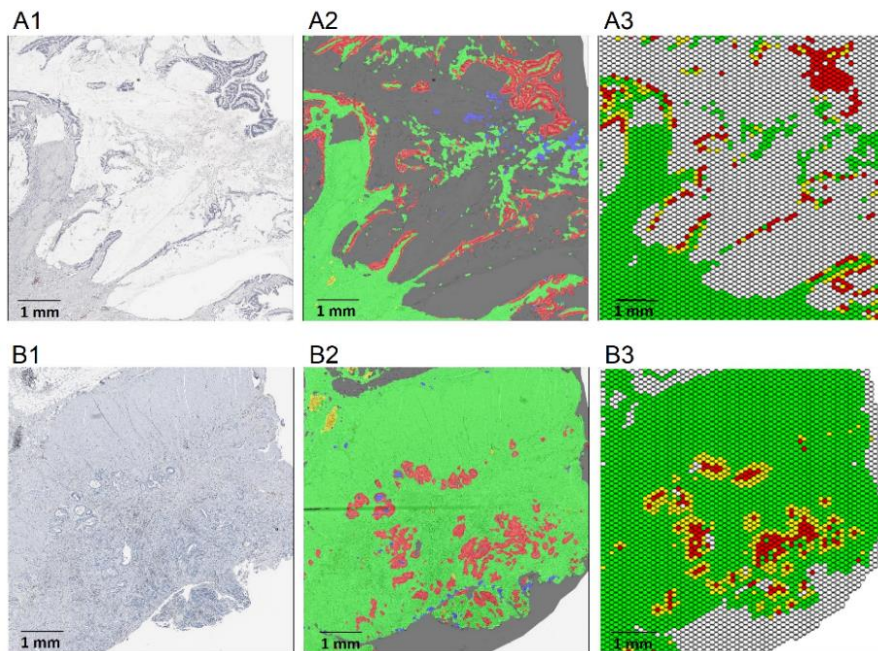
----- Rangas 0 : 448 ir 558 gardelės

----- Rangas -1 : 353 ir 520 gardelės

3.2 pav. Navikų vaizdų (atvejų) sklaidos diagrama pagal gardelių skaičių: sąveikos zonos NK (rangas 0; mediana 1439, intervalas 267–6939) ir gretimose sąveikos zonos naviko (rangas 1; mediana 1228, intervalas 160–7682) bei stromos (rangas -1; mediana 1098, intervalas 284–4023) srityse. Diagramoje atidėtos ašys apima gardelių skaičiaus intervalą nuo 0 iki 800. Elipse pažymėti atvejai, priskirti 5-ai procentilei pagal gardelių skaičių NK ir gretimoje naviko srityje.

3 iš 4 atrinktų atvejų buvo mucininio tipo navikų vaizdai su 6–8,5 mm² navikinio epitelio plotu (imties mėginių navikinio epitelio ploto aprašomoji statistika pateikta 1 priede). Šio tipo navikuose >50 proc. audinio ploto sudaro gleivės (mucinai), o jų supami navikinio epitelio fragmentai neturi sąlyčio su pagrindine naviko mase, todėl nėra įtraukiami išskiriant NK, kaip matyti 3.3 pav. (A1-3) pateiktame naviko vaizdo fragmente. Mucininio tipo navikams turėtų būti taikomas atskiras audinio klasifikatorius, galintis atskirti gleives nuo stiklo ir nekrozinio audinio fragmentų. Taip pat tarp

atrinktų atvejų buvo 1 infiltruojančio augimo pobūdžio naviko vaizdas, kuriame bendras navikinio epitelio plotas siekė 4,2 mm² (3.3 pav., B1-3), todėl laikyta, kad NK nustatyti reikia ne mažesnio kaip 4,5 mm² bendro navikinio epitelio ploto. Atrinktuose navikų vaizduose stromos audinio plotas siekė 57–88 mm² (imties mėginių stromos audinio ploto mediana – 75,3 mm², žr. 1 priedą), todėl laikyta, kad jis neturėjo įtakos nustatomo NK reprezentatyvumui. Minėti 4 atvejai buvo pašalinti iš tolesnės sąveikos zonos analizės; galutinę tiriamų SŽN imtį sudarė 101 atvejis.



3.3 pav. Nereprezentatyvaus naviko krašto pavyzdžiai: A – mucininio tipo storosios žarnos navikas, B – infiltruojančio augimo pobūdžio storosios žarnos navikas (bendras navikinio epitelio plotas – 4,2 mm²), kur atitinkamai A1 ir B1 – CD8 IHC preparato vaizdo fragmentas, A2 ir B2 – tas pats vaizdo fragmentas, išanalizuotas audinio klasifikatoriumi (išskirtos navikinio epitelio (raudona sp.), stromos (žalia sp.), nekrozinio audinio (mėlyna sp.), fono (juoda sp.), kuris apima stiklą ir gleives, klasės; A3 ir B3 – tas pats vaizdo fragmentas, išanalizuotas naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo metodu (išskirtos gardelės, atitinkančios NK (geltona sp.), naviko (raudona sp.), stromos (žalia sp.), fono (pilka sp.) klases)

3.1.2. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas

Imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje analizei galima taikyti skirtingo pločio naviko ir stromos sąveikos zonas. Šios zonos sudaromos iš NK ir tam tikru atstumu nuo jo nutolusių naviko ir stromos klasių gardelių, kurioms suteikti erdviniai rangai. Pasirenkant sąveikos zonos plotį, pirmiausia turi būti įvertinami galimi didžiausi naviko ir stromos klasių

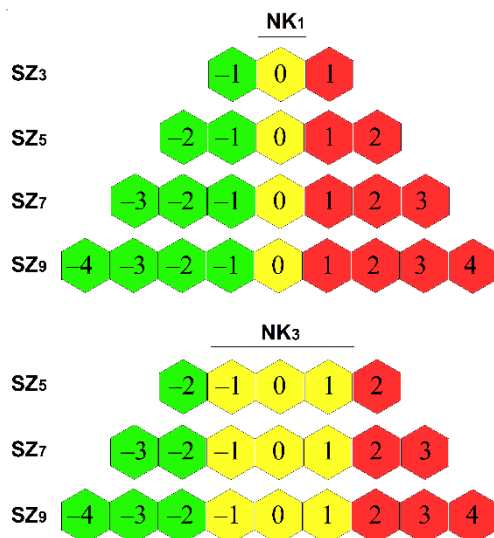
gardelių rangai, tada NK išplečiamas pasirinktu vienodu naviko ir stromos klasių gardelių rangų skaičiumi – taip sudaromos sąveikos zonos naviko ir stromos sritys.

Šioje darbo dalyje tiriamuose SŽN vaizduose išskirtos naviko klasės gardelės nuo NK buvo nutolusios mažiausiai 3-ų rangų atstumu. Aukštesnio rango naviko klasės gardeles buvo galima išskirti mažiau atvejų, pavyzdžiui, 4-o rango gardelės buvo nustatytos 96 atvejais, 5-o rango gardelės – 76 atvejais, 6-o rango gardelės – 69 atvejais ir t. t. Minėtina, kad 5-o ir aukštesnio rango naviko klasės gardelių ≥ 25 proc. atvejų nefiksuota, todėl laikyta, kad, pasirenkant sąveikos zonos plotį, gardelės nuo NK gali būti nutolusios daugiausia 4-ių rangų atstumu. 96 proc. atvejų stromos klasės gardelės turėjo mažiausiai – 15-ą rangą (stromos audinio plotas naviko periferijoje dažniausiai yra didesnis), todėl nebuvo reikšmingos renkant sąveikos zonos plotį (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Naviko ir stromos klasių gardelių rangai, nustatyti navikų vaizduose (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101)

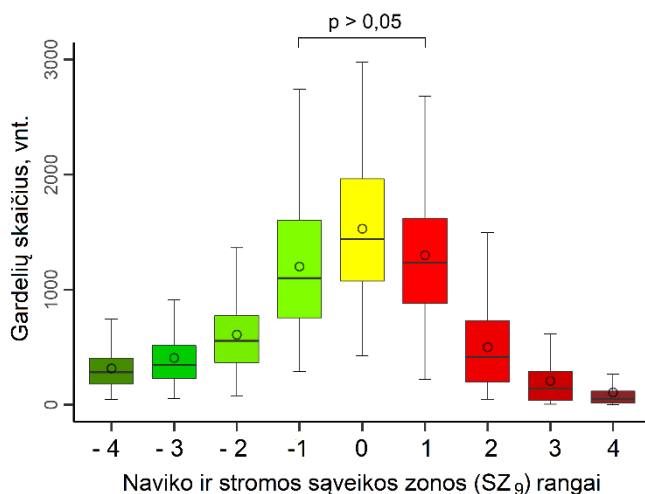
Naviko klasės gardelių rangai	Atvejų skaičius	Stromos klasės gardelių rangai	Atvejų skaičius
1	101	-1	101
2	101	-2	101
3	101	-3	101
4	96	-4	101
5	76	-5	101
6	69	-6	101
7	47	-7	101
8	29	-8	101
9	24	-9	101
10	13	-10	100
11	15	-11	100
12	15	-12	100
13	9	-13	100
14	6	-14	99
≥ 15	≤ 4	≤ -15	≤ 97

Įtraukiant 1–4 rangų gardeles abipus NK (rangas 0), iš viso buvo galima sudaryti 3, 5, 7 ir 9 rangų pločio sąveikos zonas – atitinkamai SZ_3 , SZ_5 , SZ_7 ir SZ_9 . Imuninio atsako rodiklių vertės priklauso ne tik nuo sąveikos zonos pločio, bet ir nuo jos suskirstymo, todėl išbandyti keli sąveikos zonos suskirstymo variantai, t. y. sąveikos zona su 1 rango pločio NK (NK_1 , kai $r_i = 0$) arba 3 rangų pločio NK (NK_3 , kai $r_i \in [-1; 1]$). Iš viso analizei sudarytos 7 skirtingos sąveikos zonos (3.4 pav.).



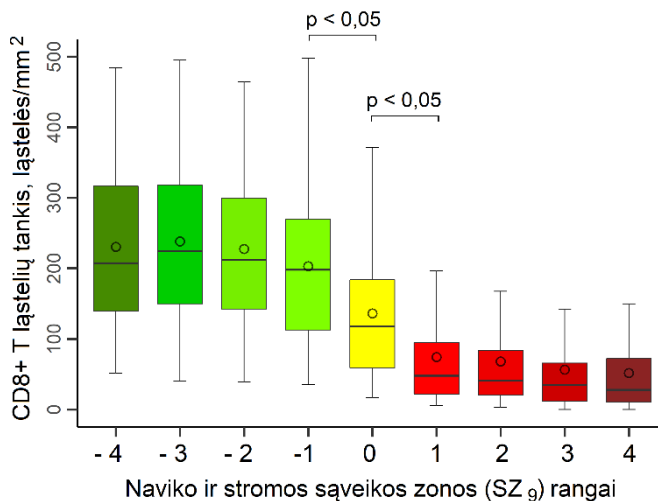
3.4 pav. Naviko ir stromos sąveikos zonų variantai: SZ₃, SZ₅, SZ₇ ir SZ₉ atitinka 3, 5, 7 ir 9 rangų pločio sąveikos zonas; NK₁ ir NK₃ atitinka 1 ir 3 rangų pločio NK (sąveikos zonos stromos srities rangai pažymėti žalia sp., NK rangai – geltona sp., naviko srities rangai – raudona sp.)

Imties SŽN vaizduose, lyginant gardelių skaičius 9 sąveikos zonos ranguose, nustatyta, kad, tolstant nuo NK (rangas 0), gardelių skaičiaus vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai ranguose mažėjo ($p < 0,05$, duomenys nepateikti). Gardelių skaičius didžiausias buvo rangų intervale $r_i \in [-1; 1]$; gardelių skaičius buvo vienodas tarp rangų -1 ir 1 ($p > 0,05$) (3.5 pav.).



3.5 pav. Gardelių skaičius naviko ir stromos sąveikos zonos (SZ₉) ranguose (I tiriamųjų pacientų imtis, $n = 101$) Sąveikos zonos stromos srities rangai pažymėti žalia sp., NK rangas – geltona sp., naviko srities rangai – raudona sp.

Imties SŽN vaizduose, lyginant CD8+ T ląstelių tankius 9 sąveikos zonos ranguose, nustatyta, kad ląstelių tankio vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai stromos srities ranguose buvo didesni, palyginti su jų tankio vidurkiais ir standartiniais nuokrypiais naviko srities ranguose ($p < 0,05$, duomenys nepateikti). Tarp stromos srities rangų ir tarp naviko srities rangų CD8+ T ląstelių tankis nesiskyrė, tačiau nustatyti reikšmingi jo skirtumai lyginant NK (rangas 0) ir gretimus -1 ir 1 rangus ($p < 0,05$) (3.6 pav.).



3.6 pav. CD8+ T ląstelių tankis naviko ir stromos sąveikos (SZ_9) ranguose (I tiriamųjų pacientų imtis, $n = 101$). Sąveikos zonos stromos srities rangai pažymėti žalia sp., NK rangas – geltona sp., naviko srities rangai – raudona sp.

Visuose sąveikos zonos variantuose (SZ_3 , SZ_5 , SZ_7 ir SZ_9 , kai NK_1 arba NK_3) apskaičiuoti CD8+ T ląstelių tankio vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai NK, stromos ir naviko srityse bei imunogradiento rodikliai, t. y. ląstelių tankio vidurkio ir standartinio nuokrypio masės centro (MC) ir imunonuokryčio (IN) rodikliai (2 priedas). Stipriausi prognoziniai rodikliai atrinkti Kokso regresijos analize, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros testą. Kokso modelių pasikartojimo rezultatai pateikti 3.2 lentelėje: iš visų absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje rodiklių 65 kartus pasikartėjo ląstelių tankio vidurkis 3 rangų pločio sąveikos zonos naviko srityje (rangas 1); analizuojant skirtingus MC rodiklius, 65 kartus pasikartėjo CD8+ T ląstelių tankio vidurkio MC rodiklis 3 rangų pločio sąveikos zonoje; analizuojant skirtingus IN rodiklius, CD8+ T ląstelių tankio vidurkio tarp rangų -1 ir 1 bei tankio standartinio nuokrypio tarp rangų 0 ir 1 IN rodiklių modelis pasikartėjo 96 kartus. Šie rezultatai rodo, kad SŽN stipriausi

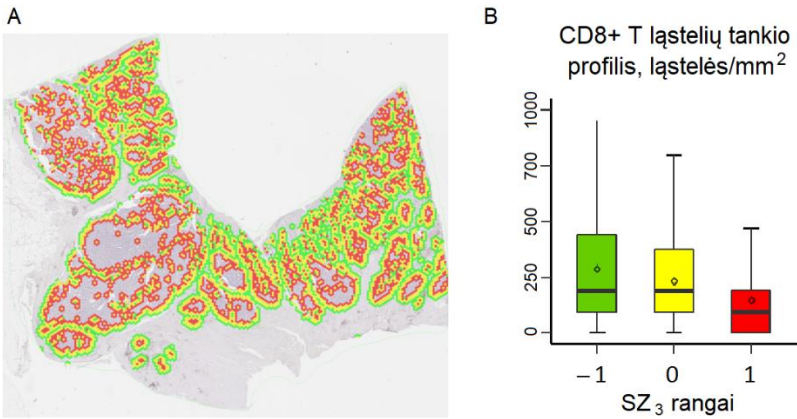
prognoziniai imuninio atsako rodikliai yra nustatomi 3 rangų pločio sąveikos zonoje.

3.2 lentelė. Kokso regresijos modelių pasikartojimas, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminę patikrą (I tiriamųjų pacientų imtis, $n = 101$)

Modelio rodikliai (absoliutaus ląstelių tankio rodikliai)	Modelio pasikartojimai	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
SZ ₃ , kai NK ₁ : CD8 _t _N	65	9,26	0,0024	0,35	0,18–0,69
SZ ₅ , kai NK ₁ : CD8 _t _N	21	9,11	0,0028	0,35	0,17–0,69
SZ ₇ , kai NK ₃ : CD8 _{sn} _N	15	9,73	0,0019	0,32	0,16–0,66
Modelio rodikliai (MC rodikliai)	Modelio pasikartojimai	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
SZ ₃ : CD8 _{MC} _t	65	10,22	0,0014	0,33	0,16–0,65
SZ ₇ : CD8 _{MC} _t	36	10,24	0,0015	0,32	0,16–0,64
Modelio rodikliai (IN rodikliai)	Modelio pasikartojimai	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
CD8 _{IN} _t, kai r_{-1}/r_1 CD8 _{IN} _sn, kai r_0/r_1	96	4,48	0,0347	3,29	1,09–9,92
CD8 _{IN} _t, kai r_{-1}/r_0 CD8 _{IN} _sn, kai r_0/r_1	5	4,78	0,0031	2,18	1,08–4,40

SZ₃, SZ₅, SZ₇ – atitinkamai 3, 5 ar 7 rangų pločio naviko ir stromos sąveikos zona; NK₁, NK₃ – atitinkamai 1 ar 3 rangų pločio naviko kraštas; CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD8_{sn} – CD8+ T ląstelių tankio standartinis nuokrypis (ląstelės/mm²); N – sąveikos zonos naviko sritis; MC_t – ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonoje masės centras; IN_t – ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonoje atitinkamai tarp rangų –1 ir 1 (r_{-1}/r_1) arba tarp rangų –1 ir 0 (r_{-1}/r_0) imunonuokryčiai; IN_{sn} – ląstelių tankio standartinio nuokrypio sąveikos zonoje tarp rangų 0 ir 1 (r_0/r_1) imunonuokrytis.

Kaip minėta, daugiausia gardelių buvo sąveikos zonos rangų intervale $r_i \in [-1; 1]$ (3.5 pav.). Tai sietina su storosios žarnos liaukinio epitelio morfologija, t. y. geros ar vidutinės diferenciacijos laipsnio SŽN formuojasi pakitusios liaukinės struktūros, kurios viena nuo kitos atskiriamos įsiterpiančio stromos audinio (89 proc. tirtų navikų buvo G1/G2 diferenciacijos laipsnio). Be to, infiltruojančio augimo pobūdžio SŽN būdingas pumpuravimasis, t. y. 1–5 ląstelių grupių atitrūkimas nuo pagrindinės naviko masės ir skverbimasis į audinį naviko periferijoje [184]. Lyginant gretimus sąveikos zonos rangus, reikšmingi CD8+ T ląstelių tankio skirtumai tarp rangų nustatyti jų intervale $r_i \in [-1; 1]$ (3.6 pav.) Taigi 3 rangų pločio sąveikos zona (SZ₃) buvo informatyviausia imuniniam atsakui SŽV mikroaplinkoje vertinti (3.7 pav.).

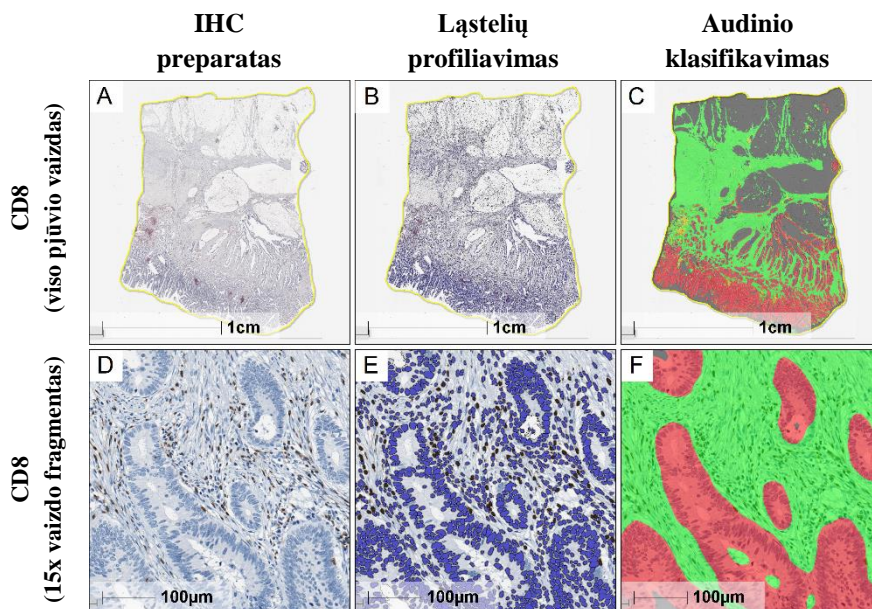


3.7 pav. Naviko ir stromos sąveikos zona (SZ₃): A – sąveikos zonos vizualizacija storosios žarnos naviko CD8 IHC preparato vaizde; B – šio naviko CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje profilis. Sąveikos zonos stromos srities rangas pažymėtas žalia sp., NK rangas – geltona sp., naviko srities rangas – raudona sp.

3.2. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (I tiriamųjų pacientų imtis)

3.2.1. Skaitmeninė storosios žarnos naviko vaizdo analizė

Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje analizei paruošti SŽN mėginių CD8 IHC preparatų vaizdai (3.8 pav., A ir D). Ląstelių profiliavimo algoritmas sukalibruotas ląstelėms su CD8 koreceptoriaus IHC raiška navikų vaizduose atpažinti (3.8 pav., B ir E). Audinio klasifikavimo algoritmas apmokytas navikų vaizduose atpažinti skirtingas histomorfologines struktūras ir suklasifikuoti audinį, išskiriant navikinio epitelio (naviko), stromos ir kitas klases (3.8 pav., C ir F).



3.8 pav. Skaitmeninės storosios žarnos naviko vaizdo analizės rezultatų pavyzdys: pateiktas naviko viso pjūvio vaizdas ir padidintas (15x) šio vaizdo fragmentas, atitinkamai A ir D – analizei naudotas CD8 IHC preparato vaizdas; B ir E – tas pats vaizdas, atlikus ląstelių populiacijų profiliavimą (nustatomos ląstelės su CD8 koreceptoriaus IHC raiška (pažymėtos ruda sp.) ir ląstelės, kurios neturi šio baltymo IHC raiškos (pažymėtos mėlyna sp.)); C ir F – tas pats vaizdas, atlikus audinio klasifikavimą (išskirtas navikinis epitelis (raudona sp.), stroma (žalia sp.), limfoidiniai agregatai (geltona sp.), stiklas (juoda sp.))

3.2.2. Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje rodikliai

Citotoksinių T (CD8+) ląstelių pasiskirstymo SŽN mikroaplinkoje analizei navikų vaizduose išskirta naviko ir stromos sąveikos zona (SZ₃) ir sudaryti ląstelių tankio šioje zonoje profiliai. Apskaičiuoti imuninio atsako rodikliai:

- ląstelių tankio vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai sąveikos zonos stromos (rangas –1), NK (rangas 0) ir naviko (rangas 1) srityse;
- ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis visame navike, t. y. visose naviko klasei priskirtose gardelėse;
- imunogradiento rodikliai: masės centro (MC) rodiklis, išreiškiantis ląstelių tankio gradientą link naviko srities sąveikos zonoje; imunonuokryčio (IN) rodiklis, išreiškiantis ląstelių tankio pokytį, palyginus sąveikos zonos stromos ir naviko sritis abipus NK.

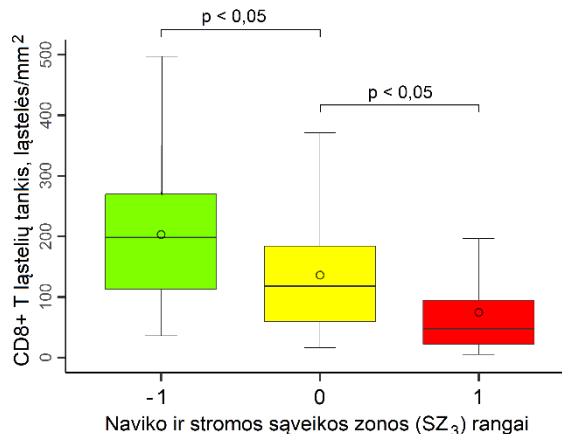
Imties SŽN apskaičiuotų imuninio atsako rodiklių aprašomoji statistika pateikta 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Imuninio atsako naviko ir stromos sąveikos zonoje rodiklių aprašomoji statistika (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101)

Imuninio atsako rodikliai	Vidurkis	Mdn	SN
CD8_t_S	251,45	210,81	216,44
CD8_sn_S	313,07	283,19	174,77
CD8_t_NK	177,94	121,05	194,68
CD8_sn_NK	245,00	213,62	166,56
CD8_t_N	93,88	49,11	137,10
CD8_sn_N	122,91	106,47	91,00
CD8_t_VN	90,62	49,64	138,11
CD8_sn_VN	119,51	98,65	92,01
CD8_MC_t	-0,38	-0,37	0,15
CD8_MC_sn	-0,30	-0,29	0,12
CD8_IN_t	4,93	3,61	3,69
CD8_IN_sn	3,12	2,67	1,53
CD8_IN*_t	2,70	2,39	1,33
CD8_IN*_sn	2,21	2,04	0,86

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD8_sn – CD8+ T ląstelių tankio standartinis nuokrypis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t ar MC_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio sąveikos zonoje masės centras; IN_t ar IN_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio tarp sąveikos zonos rangų -1 ir 1 imunonuokrytis; IN*_t ar IN*_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio tarp sąveikos zonos rangų 0 ir 1 imunonuokrytis.

Imties SŽN bendrasis CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje profilis pateiktas 3.9 pav.: CD8+ T ląstelių daugiausia stromos srityje, mažiau jų NK, mažiausia – naviko srityje. CD8+ T ląstelių tankiai sąveikos zonos naviko srityje ir visame navike buvo panašūs ($p > 0,05$, duomenys nepateikti).



3.9 pav. CD8+ T ląstelių tankio profilis naviko ir stromos sąveikos zonoje (SZ₃) (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101). Sąveikos zonos stromos srities rangas pažymėtas žalia sp., NK rangas – geltona sp., naviko srities rangas – raudona sp.

3.2.3. Imuninio atsako rodiklių ir patologinių pokyčių sąsajos

Imuninio atsako rodiklių ir patologinių pokyčių sąsajų analize nustatyta (3.4 lentelė): CD8+ T ląstelių tankis sąveikos zonos stromos, NK ir naviko srityse bei visame navike buvo reikšmingai didesnis, kai pirminio naviko išplitimo kategorija buvo žemesnė (pT1-2) ir nebuvo metastazių sritiniuose limfmazgiuose (pN0). pT1–2 kategorijos navikuose nustatytas reikšmingai didesnis CD8+ T ląstelių tankio gradientas naviko link, išreikštas aukštesnėmis MC ir žemesnėmis IN rodiklių vertėmis. Statistiškai reikšmingų sąsajų tarp imuninio atsako rodiklių ir naviko diferenciacijos laipsnio (3.4 lentelė), pacientų lyties ir amžiaus (duomenys nepateikti) nenustatyta.

3.4 lentelė. Imuninio atsako rodiklių ir patologinių pokyčių sąsajos (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101) (*p vertė <0,05)

Imuninio atsako rodikliai	Patologinių pokyčių kriterijai					
	pT1–2	pT3–4	pN0	pN1–2	G1-2	G3
CD8_t_S	377,3	212,2	297,5	191,8	247,6	282,9
	p = 0,0018*		p = 0,0215*		p = 0,8632	
CD8_sn_S	405,2	284,4	348,0	267,9	311,1	329,0
	p = 0,0069*		p = 0,0471*		p = 0,8597	
CD8_t_NK	284,8	144,6	219,2	124,5	174,3	207,3
	p = 0,0022*		p = 0,0145*		p = 0,8501	
CD8_sn_NK	331,9	217,9	282,2	196,8	244,7	247,2
	p = 0,0050*		p = 0,0277*		p = 0,9188	
CD8_t_N	168,5	70,6	120,3	59,7	89,4	130,9
	p = 0,0008*		p = 0,0133*		p = 0,7523	
CD8_sn_N	172,9	107,3	141,6	98,7	121,2	136,7
	p = 0,0013*		p = 0,0217*		p = 0,7942	
CD8_t_VN	162,2	68,3	115,5	58,4	86,1	127,9
	p = 0,0013*		p = 0,0151*		p = 0,7540	
CD8_sn_VN	167,1	104,7	137,0	96,8	117,8	133,4
	p = 0,0025*		p = 0,0305*		p = 0,8158	
CD8_MC_t	-0,32	-0,40	-0,36	-0,41	-0,38	-0,36
	p = 0,0338*		p = 0,0847		p = 0,6820	
CD8_MC_sn	-0,26	-0,31	-0,29	-0,32	-0,30	-0,29
	p = 0,0809		p = 0,2450		p = 0,8185	
CD8_IN_t	3,46	5,39	4,49	5,50	4,92	4,95
	p = 0,0210*		p = 0,0819		p = 0,7231	
CD8_IN_sn	2,75	3,23	2,97	3,30	3,11	3,13
	p = 0,0849		p = 0,2325		p = 0,8491	
CD8_IN*_t	2,14	2,87	2,55	2,89	2,72	2,56
	p = 0,0145*		p = 0,1363		p = 0,6633	
CD8_IN*_sn	2,07	2,25	2,17	2,26	2,21	2,13
	p = 0,3048		p = 0,6620		p = 0,7667	

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD8_sn – CD8+ T ląstelių tankio standartinis nuokrypis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t ar MC_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio sąveikos zonoje masės centras; IN_t ar IN_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio

tarp sąveikos zonos rangų -1 ir 1 imunonuokrytis; IN*_t ar IN*_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio tarp sąveikos zonos rangų 0 ir 1 imunonuokrytis.

Taigi CD8+ T ląstelės labiau infiltravo neišplitusius (pT1–2, pN0 kategorijų) navikus. Tai atitinka stebėjimus, rodančius, kad ligai progresuojant ir plintant atsirandantys navikinių ląstelių rezistentiškumo ir imunosupresiniai naviko mikroaplinkos mechanizmai slopina NIL infiltravimą ir citotoksinį atsaką [185].

3.2.4. Imuninio atsako rodiklių tarpusavio sąsajos

Imuninio atsako rodiklių koreliacijų matrica (4 priedas) parodė, kad tarp CD8+ T ląstelių tankio vidurkių ir standartinių nuokrypių tiek sąveikos zonos srityse, tiek visame navike buvo stiprus teigiamas ryšys ($r > 0,9$, $p < 0,0001$). Stiprus teigiamas ryšys nustatytas tarp CD8+ T ląstelių tankio vidurkių sąveikos zonos stromos srityje ir NK bei naviko srityje ir NK, taip pat tarp CD8+ T ląstelių tankio vidurkių sąveikos zonos naviko srityje ir visame navike ($r > 0,9$, $p < 0,0001$). CD8+ T ląstelių tankio IN rodikliai, apskaičiuoti įtraukiant ląstelių tankio vidurkio ir standartinio nuokrypio vertes sąveikos zonos ranguose -1 ir 1 arba 0 ir 1, taip pat stipriai koreliavo tarpusavyje ($r > 0,9$, $p < 0,0001$); tarp CD8+ T ląstelių tankio MC ir IN rodiklių buvo stiprus neigiamas ryšys ($r > -0,9$, $p < 0,0001$). Remiantis šiais rezultatais, Kokso regresijos modeliams sudaryti atrinkti rodikliai, kurie neturėjo tiesinės priklausomybės ($r < 0,9$), o CD8+ T ląstelių tankio MC ir IN rodikliai analizuoti atskirai (žr. 3.2.5 skyrių).

3.2.5. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė

Pacientų bendrojo išgyvenamumo pagal klinikinius, patologinius kriterijus ir imuninio atsako rodiklius analizės duomenys pateikti 3.5 lentelėje. Nustatyti reikšmingai su pacientų bendruoju išgyvenamumu susiję rodikliai: pacientų amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorijos bei TNM stadijos ($p < 0,05$); visi atrinkti imuninio atsako rodikliai buvo stiprūs prognoziniai veiksniai ($p < 0,01$). Imuninio atsako rodiklių vertės suskirstytos į didelių (aukštų) ir mažų (žemų) verčių kategorijas pagal nustatytas slenkstines vertes (3.5 lentelė). Rodiklių nepriklausoma vertė nustatyta daugiaveiksne Kokso regresijos analize (3.6 lentelė).

3.5 lentelė. Vienaveiksnių pacientų bendrojo išgyvenamumo analizės pagal klinikinius, patologinius ir imuninio atsako rodiklius (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101) (sv – rodiklio slenkstinė vertė, nustatyta taikant logrankinį kriterijų (*Cutoff Finder* [183])) (p vertė* <0,05)

Rodikliai	Kategorija	p vertė	PR	95 % PI
Lytis	vyras	0,1974	1,56	0,79–3,05
Amžius	>70 m.	0,0441*	2,06	1,02–4,17
G	G3 (prieš G1–2)	0,3379	1,59	0,62–4,12
pT	pT3–4 (prieš pT1–2)	0,0106*	6,47	1,55–27,1
pN	pN1–3 (prieš pN0)	0,0214*	2,23	1,13–4,42
TNM stadija	III (prieš I–II)	0,0214*	2,23	1,13–4,42
CD8_t_S	aukštas, kai sv = 5,85	0,0080*	0,11	0,02–0,80
CD8_t_N	aukštas, kai sv = 3,36	0,0014*	0,35	0,18–0,69
CD8_t_VN	aukštas, kai sv = 4,23	0,0011*	0,23	0,09–0,61
CD8_MC_t	aukštas, kai sv = –0,52	0,0008*	0,33	0,17–0,65
CD8_MC_sn	aukštas, kai sv = –0,31	0,0054*	0,39	0,19–0,77
CD8_IN_t	aukštas, kai sv = 2,03	0,0005*	3,20	1,60–6,41
CD8_IN*_sn	aukštas, kai sv = 1,04	0,0028*	2,69	1,37–5,28

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t ar MC_sn – atitinkamai ląstelių tankio vidurkio ar standartinio nuokrypio sąveikos zonoje masės centras; IN_t – ląstelių tankio vidurkio tarp sąveikos zonos rangų –1 ir 1 imunonuokrytis; IN*_sn – ląstelių tankio standartinio nuokrypio tarp sąveikos zonos rangų 0 ir 1 imunonuokrytis.

Daugiaveiksnei Kokso regresijos analizei naudoti keli rodiklių rinkiniai:

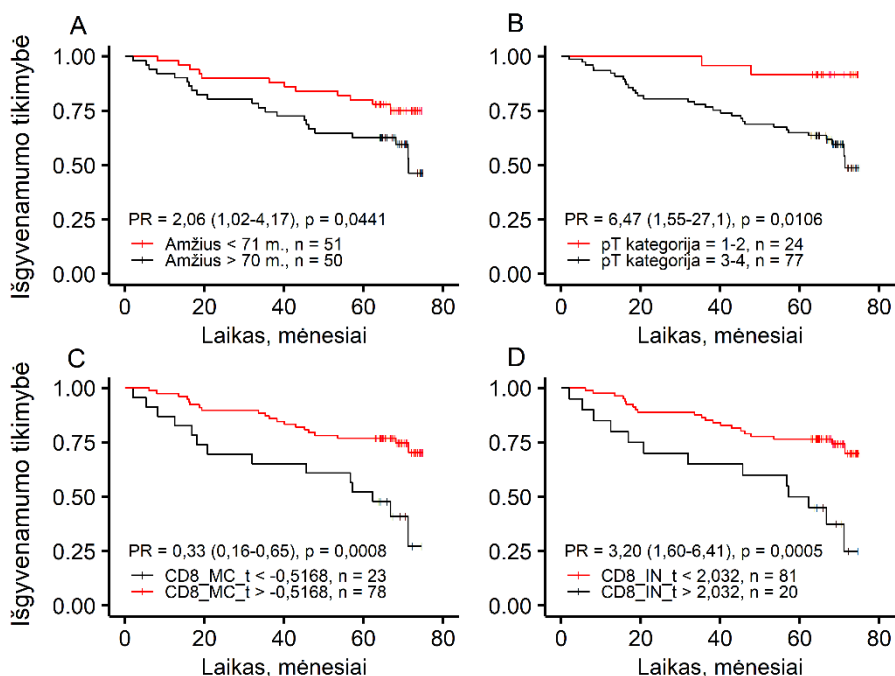
1) paciento amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorijos, CD8+ T ląstelių tankiai sąveikos zonos stromos ir naviko srityse (arba visame navike), CD8+ T ląstelių tankio ir standartinio nuokrypio MC rodikliai; 2) paciento amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorijos, CD8+ T ląstelių tankiai sąveikos zonos stromos ir naviko srityse (arba visame navike), CD8+ T ląstelių tankio ir standartinio nuokrypio IN rodikliai.

Sudarytais Kokso regresijos modeliais (TS: 22,54 ir 21,56, p < 0,0001) nustatyti keturi nepriklausomi bendrojo išgyvenamumo prognoziniai veiksniai (3.6 lentelė): pacientų amžius daugiau kaip 70 m. (p ≤ 0,0453) ir aukštesnė pirminio naviko išplitimo kategorija (pT3–4; p ≤ 0,0177) buvo trumpesnio pacientų išgyvenamumo veiksniai; aukštas CD8+ T ląstelių tankio MC rodiklis buvo stiprus ilgesnio pacientų išgyvenamumo veiksnys (p = 0,0071, 1 modelis). Minėtina, kad aukštas CD8+ T ląstelių tankio IN rodiklis, priešingai, sietas su trumpesniu pacientų išgyvenamumu (p = 0,0126, 2 modelis). Šie modeliai parodė, kad CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje MC ir IN rodikliai buvo stipresni prognoziniai veiksniai negu absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje rodikliai. Palyginti su CD8+ T ląstelių tankio IN rodikliu ($\chi^2 = 6,22$, 2 modelis), CD8+ T ląstelių tankio MC rodiklis (toliau – CD8 imunogradientas) ($\chi^2 = 7,25$, 1 modelis) buvo statistiškai stipresnis prognozinis veiksnys.

3.6 lentelė. Daugiaveiksniai Kokso regresijos modeliai pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101) (vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros rezultatai pateikti 3 priede)

1 modelis TS: 22,54, p < 0,0001	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
Amžius (>70 m.)	4,01	0,0453	2,04	1,02–4,09
pT kategorija (pT3–4)	6,19	0,0128	6,22	1,48–26,21
CD8_MC_t (aukštas)	7,25	0,0071	0,39	0,20–0,77
2 modelis TS: 21,56, p < 0,0001	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
Amžius (>70 m.)	4,13	0,0432	2,06	1,03–4,13
pT kategorija (pT3–4)	5,62	0,0177	5,78	1,36–24,63
CD8_IN_t (aukštas)	6,22	0,0126	2,44	1,21–4,92

Kaplano–Mejerio bendrojo išgyvenamumo kreivės pagal nustatytus nepriklausomus veiksnius pateiktos 3.10 pav.: pacientų iki 70 m. amžiaus 5 m. išgyvenamumo tikimybė siekė 80 proc., vyresnių pacientų – 63 proc.; esant žemesnei pirminio naviko išplitimo kategorijai, pacientams prognozuota 92 proc., esant aukštesnei kategorijai – 65 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybė. CD8 imunogradientas suskirstė pacientus į prognozinės grupes pagal 77 proc. ir 52 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes, CD8+ T ląstelių tankio IN rodiklis – pagal 76 proc. ir 50 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes.

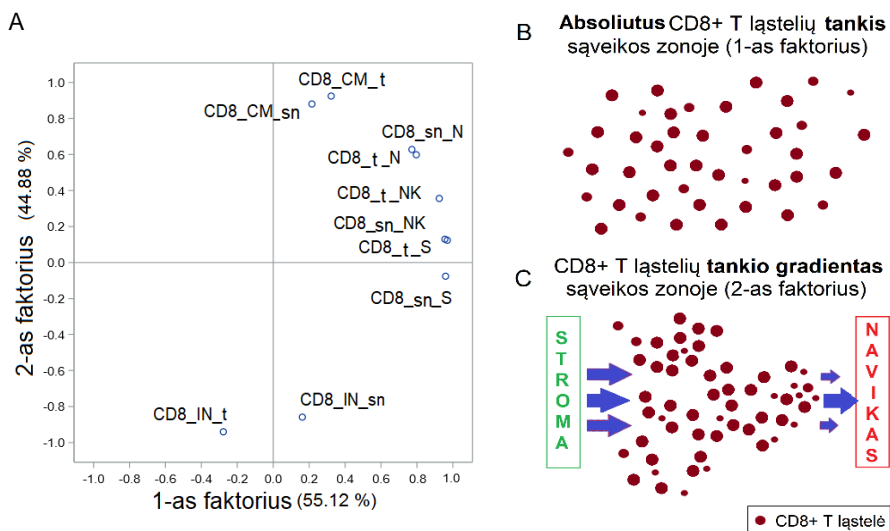


3.10 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplano–Mejerio kreivės pagal nepriklausomus klinikiškus, patologiškus ir imunogradiento rodiklius: A – paciento amžius; B – pirminio naviko išplitimo kategorija (pT); C – CD8 imunogradientas (CD8_MC_t); D – CD8+ T ląstelių tankio IN rodiklis (CD8_IN_t)

Rezultatai rodo, kad CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje imunogradiento rodikliai savo statistine galia buvo stipriausi prognoziniai veiksniai. Pabrėžtina, kad jie pranoko absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje ir visame navike rodiklius.

3.2.6. Imuninio atsako rodiklių faktorinė analizė

Imuninio atsako rodiklių (3.3 lentelė) faktorine analize nustatyti du nepriklausomi veiksniai, kurie kartu paaiškino 95,6 proc. bendrosios duomenų dispersijos (3.11 pav.): 1-ą faktorių aprašė CD8+ T ląstelių tankio vidurkio ir standartinio nuokrypio visose sąveikos zonos srityse rodikliai, išreiškiantys absoliutų CD8+ T ląstelių tankį sąveikos zonoje (3.11 pav., B); 2-ą faktorių aprašė CD8+ T ląstelių tankio ir standartinio nuokrypio MC ir IN rodikliai (imunogradiento rodikliai), išreiškiantys CD8+ T ląstelių tankio gradientą sąveikos zonoje (3.11 pav., C), t. y. ląstelių tankio pokytį kryptimi iš stromos srities į naviko sritį (aukštesnės faktoriaus vertės atitinka didesnę CD8+ T ląstelių polinkį judėti sąveikos zonos naviko srities link). Šie rezultatai rodo, kad CD8+ T ląstelių pasiskirstymo sąveikos zonoje kiekybinės ir erdvinės (gradientinės) charakteristikos yra linijiniu būdu nepriklausomos. Siekiant integruoti abiejų faktorių prognozinę galią, jų vertės buvo sudėtos, apskaičiuotas agreguotas CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius.



3.11 pav. Imuninio atsako rodiklių faktorinė analizė: A – 1-as faktorius, t. y. absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje faktorius (B); 2-as faktorius, t. y. CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius (C). Rudos sp. apskritimais vaizduojamos CD8+ T ląstelės.

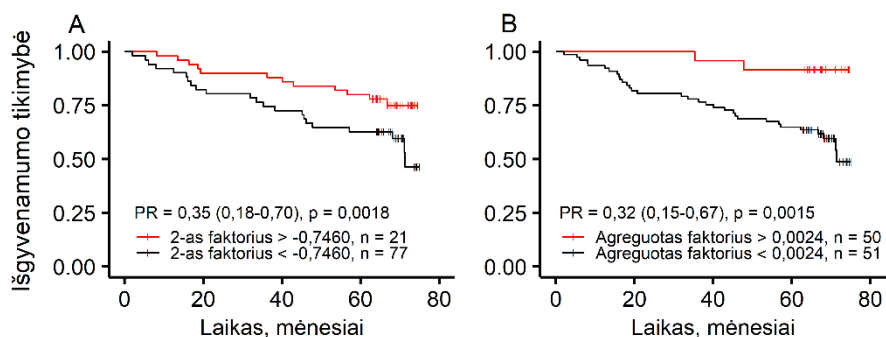
Daugiaveiksnei Kokso regresijos analizei naudoti keli rodiklių rinkiniai: 1) paciento amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorijos, absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje faktorius (1-as faktorius) ir CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius (2-as faktorius); 2) paciento amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose kategorijos bei CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius (agreguotas faktorius). Imuninio atsako faktorių vertės suskirstytos į aukštų ir žemų verčių kategorijas pagal nustatytas slenkstines vertes (2 priedas).

Sudaryti Kokso regresijos modeliai buvo panašios statistinės galios (TS: 21,8, $p < 0,0001$) ir išskyrė keturis nepriklausomus bendrojo išgyvenamumo prognozuojamus veiksniai (3.7 lentelė): pacientų amžius daugiau kaip 70 m. ($p \leq 0,0375$) ir aukštesnė pirminio naviko išplitimo kategorija (pT3–4; $p \leq 0,0260$) buvo trumpesnio pacientų išgyvenamumo veiksniai; CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius ($p = 0,0112$, 3 modelis) ir agreguoto CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius ($p = 0,0196$, 4 modelis) buvo stiprūs ilgesnio pacientų išgyvenamumo veiksniai.

3.7 lentelė. Daugiaveiksniai Kokso regresijos modeliai pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti (I tiriamųjų pacientų imtis, $n = 101$) (vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros rezultatai pateikti 3 priede)

3 modelis TS: 21,82, $p < 0,0001$	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
Amžius (>70 m.)	4,33	0,0375	2,09	1,04–4,20
pT kategorija (pT3–4)	6,23	0,0126	6,25	1,48–26,38
2-as faktorius: CD8+ T ląstelių tankio gradientas sąveikos zonoje (aukštas)	6,43	0,0112	0,41	0,21–0,82
4 modelis TS: 21,85, $p < 0,0001$	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
Amžius (>70 m.)	5,13	0,0235	2,24	1,12–4,50
pT kategorija (pT3–4)	4,96	0,0260	5,25	1,22–22,61
Agreguotas faktorius: CD8+ T ląstelių atsakas sąveikos zonoje (aukštas)	5,45	0,0196	0,41	0,19–0,87

Kaplano–Mejerio bendrojo išgyvenamumo kreivės pagal nustatytus nepriklausomus faktorius pateiktos 3.12 pav.: CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius suskirstė pacientus į grupes pagal 77 proc. ir 54 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes; agreguotas CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius dichotomizavo pacientų imtį į grupes pagal 84 proc. ir 58 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes.



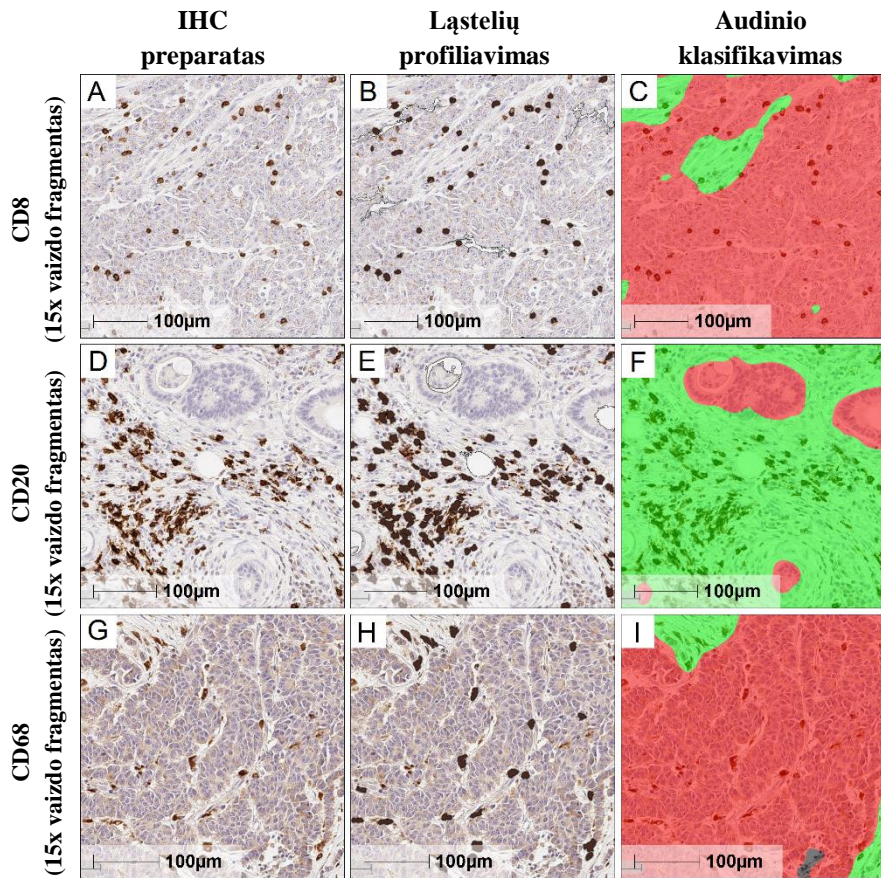
3.12 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplano–Mejerio kreivės pagal nepriklausomus faktorius: A – 2-as faktorius, t. y. CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius; B – agreguotas faktorius, t. y. CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius

Rezultatai patvirtina, kad CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje imunogradiento rodikliai yra statistiškai stipresni prognoziniai veiksniai lyginant su absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje rodikliais.

3.3. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (II tiriamųjų pacientų imtis)

3.3.1. Skaitmeninė storosios žarnos naviko vaizdo analizė

Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje analizei naudoti SŽN mėginių CD8, CD20 ir CD68 IHC preparatų vaizdai (3.13 pav., A, D, G). Ląstelių profiliavimo algoritmas sukalibruotas ląstelėms su CD8, CD20 arba CD68 antigeno IHC raiška navikų vaizduose atpažinti (3.13 pav., B, E, H). Audinio klasifikavimo algoritmas apmokytas navikų vaizduose atpažinti skirtingas histomorfologines struktūras ir suklasifikuoti audinį, išskiriant navikinio epitelio (naviko), stromos ir kitas klases (3.13 pav., C, F, I).



3.13 pav. Skaitmeninės storosios žarnos naviko vaizdo analizės rezultatų pavyzdžiai – pateikti padidinti (15x) navikų viso pjūvio vaizdų fragmentai: A, D, G – analizei naudoti atitinkamai CD8, CD20, CD68 IHC preparatų vaizdai; B, E, H – tie patys vaizdai, atlikus ląstelių populiacijų profilavimą (nustatomos atitinkamai ląstelės su CD8, CD20 ir CD68 antigenų IHC raiška (pažymėtos ruda sp.)); C, F, I – tie patys vaizdai, atlikus audinio klasifikavimą (išskirtas navikinis epitelis (raudona sp.), stroma (žalia sp.), stiklas (juoda sp.))

3.3.2. Imuninio atsako naviko mikroaplinkoje rodikliai

Citotoksinių T (CD8+) ląstelių, B (CD20+) ląstelių ir (CD68+) makrofagų pasiskirstymo SŽN mikroaplinkoje analizei navikų vaizduose išskirta naviko ir stromos sąveikos zona (SZ₃) ir sudaryti ląstelių tankio šioje zonoje profiliai. Apskaičiuoti imuninio atsako rodikliai:

- ląstelių tankio vidurkiai sąveikos zonos stromos (rangas –1), NK (rangas 0) ir naviko (rangas 1) srityse;

- ląstelių tankio vidurkis visame navike, t. y. visose naviko klasei priskirtose gardelėse;

– imunogradiento rodikliai: masės centro (MC) rodikliai, išreiškiantys ląstelių tankio gradientą link naviko srities sąveikos zonoje.

Imties SŽN apskaičiuotų imuninio atsako rodiklių aprašomoji statistika pateikta 3.8 lentelėje.

3.8 lentelė. Imuninio atsako naviko ir stromos sąveikos zonoje rodiklių aprašomoji statistika (II tiriamųjų pacientų imtis (n = 87), suskirstyta į MSS navikų (n = 48) ir MSI navikų (n = 39) pogrupius) (p vertė* < 0,05)

Imuninio atsako rodikliai	MSS navikai, n = 48			MSI navikai, n = 39			p vertė*
	Vidurkis	Mdn	SN	Vidurkis	Mdn	SN	
CD8_t_S	193,8	147,1	147,7	370,8	294,9	404,6	0,0024*
CD8_t_NK	141,8	90,0	128,4	339,9	208,2	400,5	0,0004*
CD8_t_N	76,5	49,2	92,4	262,4	140,2	342,6	0,0001*
CD8_t_VN	65,4	37,5	81,9	238,9	133,4	311,2	<0,0001*
CD8_MC_t	-0,35	-0,35	0,17	-0,20	-0,18	0,21	0,0006*
CD20_t_S	54,3	32,8	68,4	71,3	36,7	83,3	0,3650
CD20_t_NK	31,6	14,0	59,3	30,5	18,9	33,4	0,7857
CD20_t_N	12,2	4,6	30,6	5,4	3,8	6,1	0,0899
CD20_t_VN	13,8	4,1	31,2	9,7	5,8	12,9	0,6003
CD20_MC_t	-0,49	-0,54	0,23	-0,59	-0,63	0,14	0,0141*
CD68_t_S	173,9	158,1	118,2	182,4	173,8	104,3	0,5616
CD68_t_NK	145,1	120,2	99,7	190,1	175,1	106,0	0,0281*
CD68_t_N	72,4	55,2	73,4	126,5	100,3	82,4	<0,0001*
CD68_t_VN	60,1	48,9	55,8	112,1	95,3	71,4	<0,0001*
CD68_MC_t	-0,20	-0,28	0,14	-0,11	-0,08	0,14	<0,0001*

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD20_t – CD20+ B ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD68_t – CD68+ makrofagų tankio vidurkis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t – ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonoje masės centras.

Palyginus imuninių ląstelių tankius MSS ir MSI navikuose, matyti, kad CD8+ T ląstelių ir CD68+ makrofagų tankiai sąveikos zonoje ir visame navike yra didesni MSI navikuose (p < 0,05), o CD20+ B ląstelių tankiai sąveikos zonoje ir visame navike gana panašūs. Palyginus MC rodiklius, nustatyta, kad aukštesni CD8+ T ląstelių ir CD68+ makrofagų tankio gradientai link naviko srities sąveikos zonoje yra MSI navikuose (p < 0,05), o CD20+ B ląstelių tankio gradientas link naviko srities sąveikos zonoje MSI navikuose yra žemesnis negu MSS navikuose (p < 0,05). Tai galima sieti su MSI navikams būdingu didesniu B ląstelių infiltratu naviko periferijoje.

CD8+ T ląstelių tankiai tiek sąveikos zonoje, tiek visame navike buvo didesni negu CD68+ makrofagų tankiai atitinkamuose MSI navikų regionuose (p < 0,05), tačiau šių ląstelių tankiai MSS navikuose nesiskyrė; CD20+ B ląstelių tankiai buvo mažiausi tiek MSI, tiek MSS navikuose (p < 0,05) (duomenys nepateikti).

Palyginus imuninių ląstelių pasiskirstymą skirtingose sąveikos zonos srityse, matyti, kad mažiausi CD8+ T ir CD20+ B ląstelių, taip pat CD68+ makrofagų tankiai buvo naviko srityje, daugiau jų buvo NK (p < 0,05) tiek MSS, tiek MSI navikuose; CD8+ T ląstelių ir CD68+ makrofagų tankiai

stromos ir NK srityse buvo panašūs, o CD20+ B ląstelių stromos srityje buvo daugiau negu NK ($p < 0,05$) MSS ir MSI navikuose (duomenys nepateikti). Tarp CD8+, CD20+ ir CD68+ ląstelių tankių sąveikos zonos naviko srityje ir visame navike statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (duomenys nepateikti).

3.3.3. Imuninio atsako rodiklių ir patologinių pokyčių sąsajos

Patologinių pokyčių sąsajos su navikų MSI požymiais įvertintos porinių dažnių lentelių metodu, taikant tikslųjį Fišerio kriterijų (žr. 2.1 skyrius, 2.2 lentelė). MSI navikai dažniau nustatyti vyresniems pacientams ($p = 0,0026$) – tai sutampa su kitų tyrėjų stebėjimų rezultatais ir išvada, kad sporadiniai MSI navikai, kuriems būdingas metilintas *MLH1* geno promotorius, atsiranda dėl genomo metilinimo pokyčių, siejamų su vyresniu amžiumi [52, 186]. Kaip matyti ir iš atliktų ankstesnių tyrimų [187, 188], šiame tyrime MSI navikai dažniau buvo blogos diferenciacijos ($p < 0,0001$) ir dešinėsios lokalizacijos ($p < 0,0001$), šiems navikams buvo būdingos mutacijos *BRAF* gene (53,8 % atvejų). Minėtina, kad MSS navikuose fiksuotas didesnis *KRAS* geno mutacijų dažnis (47,9 % atvejų). Statistiškai reikšmingų sąsajų tarp navikų MSI požymių ir pacientų lyties, TNM kriterijų, limfovaskulinės ir perineurinės invazijos, naviko augimo pobūdžio, pumpuravimosi bei perinavikinės limfocitinės infiltracijos nenustatyta.

Imuninio atsako rodiklių ir patologinių pokyčių sąsajų analize nustatyta (3.9 lentelė):

– MSI navikuose: CD8+ T ląstelių tankis nepriklausė nuo pirminio naviko išplitimo, limfmazgių būklės, diferenciacijos laipsnio bei limfovaskulinės invazijos, tačiau navikuose, kuriems būdinga perineurinė invazija (Pne1), nustatytas žemesnis CD8+ T ląstelių tankio gradientas naviko link ir mažesnis tankis sąveikos zonos naviko srityje bei visame navike; mažesni CD20+ B ląstelių tankiai sąveikos zonoje ar visame navike nustatyti navikuose, kuriems būdinga aukštesnė naviko išplitimo kategorija (pT4) ar perineurinė invazija; žemesnis CD20+ B ląstelių tankio gradientas buvo navikuose, kuriems būdingos metastazės sritiniuose limfmazgiuose (pN1–2) ar limfovaskulinė invazija (duomenys nepateikti); mažesnis CD20+ B ląstelių tankis sąveikos zonos stromos srityje buvo susijęs su navikų pumpuravimusi (duomenys nepateikti); CD68+ makrofagų tankis sąveikos zonos naviko ir NK srityse bei visame navike buvo mažesnis navikuose, kuriems būdinga aukštesnė naviko išplitimo kategorija ar perineurinė invazija;

– MSS navikuose: CD8+ T ląstelių tankiai sąveikos zonos NK, naviko srityse ir visame navike, taip pat CD20+ B ląstelių tankis sąveikos zonos stromos srityje buvo mažesnis vidutinės diferenciacijos (G2) navikuose; žemesnis CD8+ T ląstelių tankio gradientas naviko link ir mažesnis CD20+ B ląstelių tankis sąveikos zonos stromos srityje buvo susieti su infiltruojančiu augimo frontu (duomenys nepateikti); CD68+ makrofagų tankis visame navike buvo didesnis navikuose, kuriems būdingas išplitimas į sritinius limfmazgius, tankio gradientas naviko link buvo didesnis navikuose, kurių išplitimo kategorija yra aukštesnė, ir navikuose, kuriems būdingas išplitimas į sritinius limfmazgius ar bloga diferenciacija (G3).

3.9 lentelė. Imuninio atsako naviko ir stromos sąveikos zonoje rodiklių ir patologiinių pokyčių sąsajos (II tiriamųjų pacientų imtis (n = 87), suskirstyta į MSI navikų (n = 39) ir MSS navikų (n = 48) pogrupius) (*p vertė < 0,05)

Imuninio atsako rodikliai	MSI navikai, n = 39							
	Patologiinių pokyčių kriterijai							
	pT2-3	pT4	pN0	pN1-2	G2	G3	Pne0	Pne1
CD8_t_S	409,6	271,8	374,7	363,8	282,2	463,9	396,6	252,3
	p = 0,4229		p = 0,4871		p = 0,2293		p = 0,3647	
CD8_t_NK	381,6	233,8	358,4	306,9	249,6	435,0	379,5	159,2
	p = 0,1740		p = 0,8463		p = 0,2347		p = 0,855	
CD8_t_N	297,0	174,3	281,3	228,5	183,5	345,4	301,4	84,1
	p = 0,1381		p = 0,9159		p = 0,1943		p = 0,0332*	
CD8_t_VN	271,6	155,8	257,9	205,0	163,7	318,1	274,2	77,4
	p = 0,1210		p = 0,8971		p = 0,2014		p = 0,0257*	
CD8_MC_t	-0,17	-0,29	-0,18	-0,24	-0,23	-0,17	-0,16	-0,39
	p = 0,1083		p = 0,4223		p = 0,4103		p = 0,0079*	
CD20_t_S	88,0	29,1	68,3	76,8	65,0	78,1	81,6	24,8
	p = 0,0014*		p = 0,8034		p = 0,9871		p = 0,0684	
CD20_t_NK	37,3	13,5	31,5	28,9	28,4	32,8	34,9	10,5
	p = 0,0011*		p = 0,3335		p = 0,6662		p = 0,0661	
CD20_t_N	6,3	3,2	6,1	4,1	4,6	6,3	6,2	1,8
	p = 0,0098*		p = 0,0676		p = 0,3514		p = 0,0499*	
CD20_t_VN	11,0	6,4	9,7	9,6	8,7	10,8	11,1	3,5
	p = 0,2297		p = 0,1487		p = 0,7195		p = 0,0148*	
CD20_MC_t	-0,60	-0,59	-0,56	-0,66	-0,57	-0,62	-0,59	-0,62
	p = 0,8050		p = 0,0399*		p = 0,2206		p = 0,5616	
CD68_t_S	196,3	147,1	184,1	179,4	158,6	207,6	191,1	143,2
	p = 0,0794		p = 0,2799		p = 0,2043		p = 0,1765	
CD68_t_NK	210,0	139,3	205,8	162,0	166,8	214,5	202,6	133,0
	p = 0,0160*		p = 0,3269		p = 0,4060		p = 0,0491*	
CD68_t_N	140,9	90,0	140,7	101,3	104,5	149,7	136,8	79,5
	p = 0,0350*		p = 0,8153		p = 0,3712		p = 0,0240*	
CD68_t_VN	124,9	79,6	123,2	92,3	93,0	132,3	120,7	72,6
	p = 0,0358*		p = 0,3836		p = 0,1817		p = 0,0308*	
CD68_MC_t	-0,10	-0,12	-0,09	-0,14	-0,12	-0,10	-0,10	-0,16
	p = 0,7494		p = 0,4223		p = 0,4103		p = 0,3207	

Imuninio atsako rodikliai	MSS navikai, n = 48							
	Patologinių pokyčių kriterijai							
	pT2-3	pT4	pN0	pN1-2	G2	G3	Pne0	Pne1
CD8_t_S	181,4	235,4	203,1	175,2	178,7	359,4	192,7	201,3
	p = 0,2741		p = 0,5618		p = 0,0637		p = 0,5023	
CD8_t_NK	122,8	205,8	141,2	143,1	122,5	354,8	139,5	157,9
	p = 0,2020		p = 0,5595		p = 0,0283*		p = 0,3889	
CD8_t_N	61,2	127,8	71,1	87,3	61,0	247,0	76,9	73,2
	p = 0,3382		p = 0,5694		p = 0,0423*		p = 0,4930	
CD8_t_VN	52,2	109,7	60,2	75,8	51,6	216,7	65,9	61,3
	p = 0,3259		p = 0,6517		p = 0,0339*		p = 0,5413	
CD8_MC_t	-0,36	-0,31	-0,35	-0,35	-0,36	-0,21	-0,35	-0,32
	p = 0,4924		p = 0,9653		p = 0,0963		p = 0,6916	
CD20_t_S	47,9	75,8	45,2	72,4	44,8	158,1	56,3	40,2
	p = 0,6270		p = 0,1516		p = 0,0326*		p = 0,9308	
CD20_t_NK	25,3	52,9	24,0	46,8	24,3	111,9	33,1	21,7
	p = 0,9606		p = 0,3255		p = 0,1052		p = 0,8656	
CD20_t_N	9,1	22,7	7,9	20,8	8,5	52,9	13,0	6,4
	p = 0,7323		p = 0,2143		p = 0,5217		p = 0,5665	
CD20_t_VN	11,3	21,9	9,0	23,1	10,4	50,6	15,0	4,9
	p = 0,8636		p = 0,0553		p = 0,4335		p = 0,5591	
CD20_MC_t	-0,49	-0,50	-0,49	-0,50	-0,48	-0,61	-0,49	-0,47
	p = 0,8995		p = 0,8573		p = 0,2950		p = 0,8239	
CD68_t_S	173,4	175,8	171,0	179,8	164,7	275,5	172,8	182,1
	p = 0,0627		p = 0,0710		p = 0,0777		p = 0,7864	
CD68_t_NK	136,4	174,4	135,2	165,0	133,5	273,4	145,5	142,3
	p = 0,5694		p = 0,5550		p = 0,2648		p = 0,6483	
CD68_t_N	59,4	116,6	57,5	102,5	60,8	201,0	75,1	54,1
	p = 0,7381		p = 0,7918		p = 0,7335		p = 0,6344	
CD68_t_VN	50,3	92,9	48,3	83,4	51,4	155,5	61,8	47,1
	p = 0,0553		p = 0,0478*		p = 0,0801		p = 0,6656	
CD68_MC_t	-0,29	-0,13	-0,30	-0,17	-0,27	-0,11	-0,25	-0,30
	p = 0,0006*		p = 0,0017*		p = 0,0310*		p = 0,3600	

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD20_t – CD20+ B ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD68_t – CD68+ makrofagų tankio vidurkis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t – ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonoje masės centras.

Apibendrinant galima teigti, kad MSI navikų pogrupyje mažesnis imuninių ląstelių tankis ir (ar) infiltravimas buvo progresuojančiuose navikuose, t. y. esant aukštesnei pirminio naviko išplitimo kategorijai, metastazėms limfmazgiuose ar perineurinei, limfovaskulinei invazijai, pumpuravimuisi. MSS navikų pogrupyje imuninių ląstelių buvo mažiau vidutinės diferenciacijos navikuose ar navikuose, kuriems būdingas infiltruojantis augimo frontas. Vis dėlto, skirtingai negu MSI navikų atveju, MSS navikuose CD68+ makrofagai labiau infiltravo aukštesnės pirminio naviko išplitimo kategorijos ir į limfmazgius metastazavusius navikus. Tai iš dalies paaiškinama M1 tipo (uždegimą skatinančių) makrofagų proporcijų MSI ir MSS navikuose skirtumais [189]. Statistiškai reikšmingų sąsajų tarp

imuninio atsako rodiklių ir pacientų lyties, amžiaus, naviko lokalizacijos ir molekulinųjų žymenų nenustatyta (duomenys nepateikti).

3.3.4. Imuninio atsako rodiklių tarpusavio sąsajos

Imuninio atsako rodiklių koreliacijų matrica (5 priedas) parodė, kad tarp CD8+ T ląstelių tankių sąveikos zonos NK ir stromos srityse, taip pat NK ir naviko srityse ar visame navike buvo stiprus teigiamas ryšys ($r > 0,9$, $p < 0,0001$); stiprus teigiamas ryšys nustatytas tarp CD68+ makrofagų tankių sąveikos zonos NK ir stromos srityse bei NK ir naviko srityse ($r > 0,9$, $p < 0,0001$). CD8+ T ląstelių tankio rodikliai su CD20+ B ląstelių ar CD68+ makrofagų tankio rodikliais, taip pat CD20+ B ląstelių tankio rodikliai su CD68+ makrofagų tankio rodikliais nekoreliavo ar koreliavo silpnai (vidutiniškai) ($r < 0,6$, $p < 0,05$).

3.3.5. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė

Pacientų bendrojo išgyvenamumo pagal klinikinius ir patologinius kriterijus bei imuninio atsako rodiklius analizės duomenys pateikti 3.10 lentelėje. Nustatyti reikšmingai su pacientų bendroju išgyvenamumu susiję rodikliai: histologinis naviko augimo pobūdžio kriterijus (vizualiu patologo vertinimu), CD8+ T ir CD20+ B ląstelių tankių MC rodikliai, CD20+ B ląstelių tankis sąveikos zonos stromos ir naviko srityse bei visame navike ($p < 0,05$). CD68+ makrofagų atsako rodiklių ir pacientų išgyvenamumo sąsajos nebuvo statistiškai reikšmingos, todėl toliau neanalizuotos. Atrinktų veiksnių nepriklausoma vertė, prognozuojant pacientų bendrąjį išgyvenamumą, įvertinta daugiaveiksne Kokso regresijos analize. Imuninio atsako rodiklių vertės suskirstytos į didelių (aukštų) ir mažų (žemų) verčių kategorijas pagal nustatytas slenkstines vertes (3.10 lentelė).

3.10 lentelė. Vienaveiksnių pacientų bendrojo išgyvenamumo analizės pagal klinikinius, patologinius kriterijus ir imuninio atsako rodiklius (II tiriamųjų pacientų imtis, $n = 87$; sv – rodiklio slenkstinė vertė, nustatyta taikant logrankinį kriterijų (*Cutoff Finder* [183])) (p vertė* $< 0,05$)

Rodikliai	Kategorija	p vertė	PR	95 % PI
Lytis	Vyras	0,6481	0,84	0,40–1,77
Amžius	>70 m.	0,4480	1,33	0,64–2,77
G	G3 (prieš G2)	0,2312	1,60	0,74–3,46
pT	pT4 (prieš pT2–3)	0,9151	1,05	0,45–2,46
pN	pN1–2 (prieš pN0)	0,9683	0,98	0,45–2,18
M	M1 (prieš M0)	0,0978	3,41	0,80–14,60
TNM stadija	III–IV (prieš I–II)	0,8825	1,06	0,49–2,30

Limfovaskulinė invazija	LV11 (prieš LV10)	0,6737	1,77	0,56–2,43
Perineurinė invazija	Pne1 (prieš Pne0)	0,2648	1,67	0,68–4,12
Naviko augimo pobūdis (augimo frontas)	Infiltruojantis	0,0075*	2,81	1,32–5,98
Naviko pumpuravimosi židiniai	Gausūs	0,0556	2,05	0,98–4,29
Perinavikinė limfocitinė infiltracija	Gausi	0,5234	1,28	0,61–2,69
Pirminio naviko lokalizacija	Dešinioji žarnos pusė, skersinė žarna arba daugybiniai židiniai	0,1128	2,00	0,85–4,68
MSI požymiai	MSI	0,0614	2,07	0,97–4,43
<i>BRAF</i> genas	Mutavęs	0,9501	0,98	0,44–2,18
<i>KRAS</i> genas	Mutavęs	0,5369	0,78	0,36–1,72
<i>PIK3CA</i> genas	Mutavęs	0,3264	0,59	0,21–1,70
CD8_t_S	aukštas, kai sv = 5,914	0,3600	1,46	0,64–3,31
CD8_t_NK	aukštas, kai sv = 4,963	0,2400	0,64	0,31–1,35
CD8_t_N	aukštas, kai sv = 4,059	0,0850	0,53	0,25–1,10
CD8_t_VN	aukštas, kai sv = 5,615	0,0670	2,13	0,93–4,88
CD8_MC_t	aukštas, kai sv = -0,354	0,0013*	0,31	0,15–0,66
CD20_t_S	aukštas, kai sv = 2,358	0,0061*	0,30	0,12–0,75
CD20_t_NK	aukštas, kai sv = 3,684	0,0530	0,33	0,10–1,08
CD20_t_N	aukštas, kai sv = 1,219	0,0210*	0,43	0,20–0,90
CD20_t_VN	aukštas, kai sv = 1,791	0,0230*	0,41	0,18–0,90
CD20_MC_t	aukštas, kai sv = -0,552	0,0230*	0,39	0,16–0,91
CD68_t_S	aukštas, kai sv = 5,137	0,1500	0,59	0,28–1,23
CD68_t_NK	aukštas, kai sv = 4,524	0,2800	0,65	0,30–1,43
CD68_t_N	aukštas, kai sv = 4,018	0,1600	1,82	0,77–4,26
CD68_t_VN	aukštas, kai sv = 4,015	0,1700	1,73	0,79–3,81
CD68_MC_t	aukštas, kai sv = -0,173	0,1300	1,77	0,84–3,74

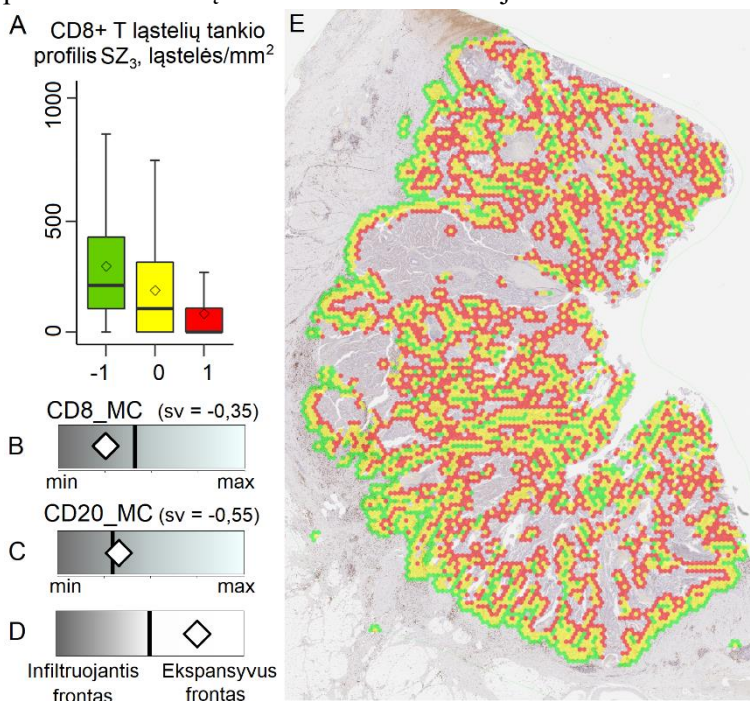
CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD20_t – CD20+ B ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²); CD68_t – CD68+ makrofagų tankio vidurkis (ląstelės/mm²); NK – naviko kraštas; S – sąveikos zonos stromos sritis; N – sąveikos zonos naviko sritis; VN – visas navikas; MC_t – ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonoje masės centras.

Sudarytas Kokso regresijos modelis nustatė tris nepriklausomus bendrojo išgyvenamumo prognozinis veiksniai (3.11 lentelė): aukštos CD8+ T ląstelių tankio MC rodiklio (toliau – CD8 imunogradientas) ($p = 0,0029$) ir CD20+ B ląstelių tankio MC rodiklio (toliau – CD20 imunogradientas) ($p = 0,0113$) vertės prognozavo 3–3,2 karto ilgesnį pacientų išgyvenamumą, o infiltruojantis naviko augimo frontas susietas su beveik 3 kartus didesne mirties rizika (5 modelis, TS: 23,03, $p < 0,0001$). Papildomai sudarytas Kokso regresijos modelis tik su CD8 ir CD20 imunogradientais (6 modelis, TS: 15,50, $p < 0,0001$).

3.11 lentelė. Daugiaveiksniai Kokso regresijos modeliai pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti (II tiriamųjų pacientų imtis, n = 87) (vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros rezultatai pateikti 3 priede)

5 modelis TS: 23,03, p < 0,0001	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
CD8_MC t (aukštas)	8,87	0,0029	0,31	0,14–0,67
CD20_MC t (aukštas)	6,42	0,0113	0,33	0,14–0,78
Naviko augimo pobūdis (infiltruojantis frontas)	7,24	0,0071	2,90	1,34–6,29
6 modelis TS: 15,50, p = 0,0004	χ^2	p vertė	PR	95 % PI
CD8_MC t (aukštas)	9,61	0,0019	0,30	0,14–0,64
CD20_MC_t (aukštas)	5,18	0,0228	0,37	0,16–0,87

3.14 pav. pateiktas naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo rezultatų pavyzdys ir nustatytų nepriklausomų imuninio atsako ir histologinio naviko augimo pobūdžio veiksnių vertės individualiu atveju.

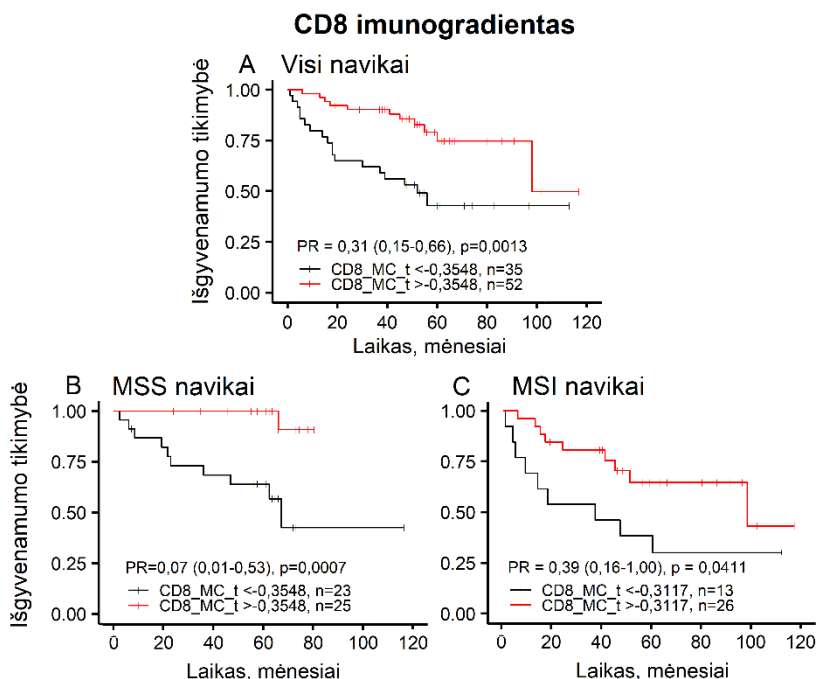


3.14 pav. Storosios žarnos naviko mėginio pavyzdys su nustatyta naviko ir stromos sąveikos zona, nepriklausomų imuninio atsako rodiklių vertėmis ir naviko augimo pobūdžio kriterijumi (adaptuota pagal A. Nestarenkaite ir kt. [190]): A – CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje profilis, kurio spalvos atitinka E paveiksle vaizduojamų gardelių spalvas; B ir C – atitinkamai CD8 imunogradientas (CD8_MC) ir CD20 imunogradientas (CD20_MC); rodiklių vertės atidėtos skalėse (nuo mažiausios (min) iki didžiausios (max) vertės) ir pažymėtos rombu, sv – rodiklio slenkstinė vertė, pažymėta vertikalia linija skalėje; D – naviko augimo pobūdis, pažymėtas rombu dviejų kategorijų (infiltruojantis ir ekspansyvus frontai) skalėje; E – išskirta sąveikos zona (SZ₃), vizualizuota „padengiant“ ant naviko mėginio CD8 IHC preparato vaizdo (sąveikos zonos stromos pažymėtas žalia sp., NK rangas – geltona sp., naviko srities rangas – raudona sp.)

3.15 pav. pateikiamos nustatytų nepriklausomų veiksnių Kaplano–Mejerio bendrojo išgyvenamumo kreivės visoje tiriamųjų pacientų imtyje bei pacientų, kuriems nustatyti MSS ir MSI navikai, pogrupiuose. CD8 imunogradientas visos tiriamųjų imties pacientus suskirstė į prognozes grupes pagal 75 proc. ir 43 proc., MSS navikų pogrupyje – pagal 94 proc. ir 43 proc., MSI navikų pogrupyje – pagal 65 proc. ir 31 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes (3.15 pav., A, B, C).

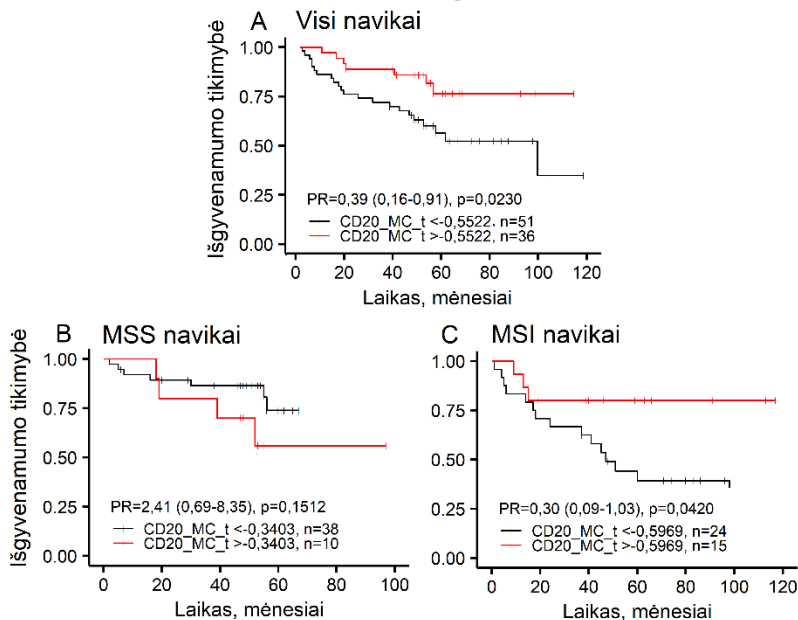
CD20 imunogradientas visos tiriamųjų imties pacientus išskyrė į prognozes grupes pagal 76 proc. ir 56 proc., MSI navikų pogrupyje – pagal 80 proc. ir 40 proc. 5 m. išgyvenamumo tikimybes (3.16 pav., A ir C). Minėtina, kad navikų, kuriems būdingas MSS, atveju aukštas CD20 imunogradientas buvo susietas su blogesne prognoze, tačiau gautas rezultatas statistiškai nepatikimas (3.16 pav., B).

Pagal naviko augimo pobūdį išskirti ekspansyvaus arba infiltruojančio augimo fronto navikai, kurie visoje tiriamųjų pacientų imtyje susieti su 73 proc. ir 47 proc., o MSS navikų pogrupyje – su 89 proc. ir 50 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybėmis (3.17 pav., A ir B). Navikų, kuriems būdingas MSI, atveju pacientų stratifikavimo pagal naviko augimo frontą tendencija buvo panaši, tačiau statistiškai nereikšminga (3.17 pav., C).



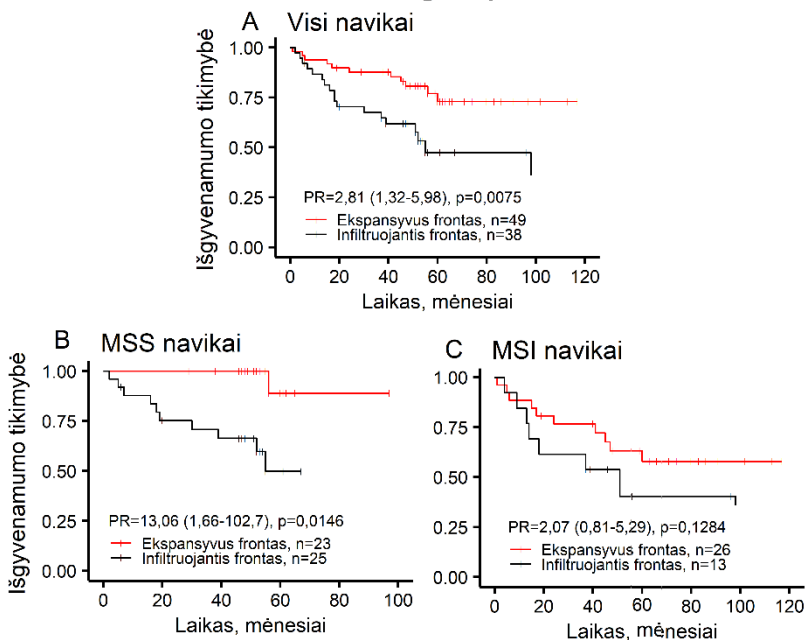
3.15 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplano–Mejerio kreivės pagal CD8 imunogradientą (CD8_MC_t) visoje tiriamųjų imtyje (A), MSS navikų (B) ir MSI navikų (C) pogrupiuose.

CD20 imunogradientas



3.16 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplan-Mejerio kreivės pagal CD20 imunogradientą (CD20_MC_t) visoje tiriamųjų imtyje (A), MSS navikų (B) ir MSI navikų (C) pogrupiuose.

Naviko augimo pobūdis



3.17 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplan-Mejerio kreivės pagal naviko augimo pobūdį (ekspansyvus / infiltruojantis frontas) visoje tiriamųjų imtyje (A), MSS navikų (B) ir MSI navikų (C) pogrupiuose.

3.3.6. Kombinuoti prognoziniai modeliai

Nustatytų nepriklausomų veiksnių prognozinė galia buvo kombinuojama. Sudaryti du įverčiai:

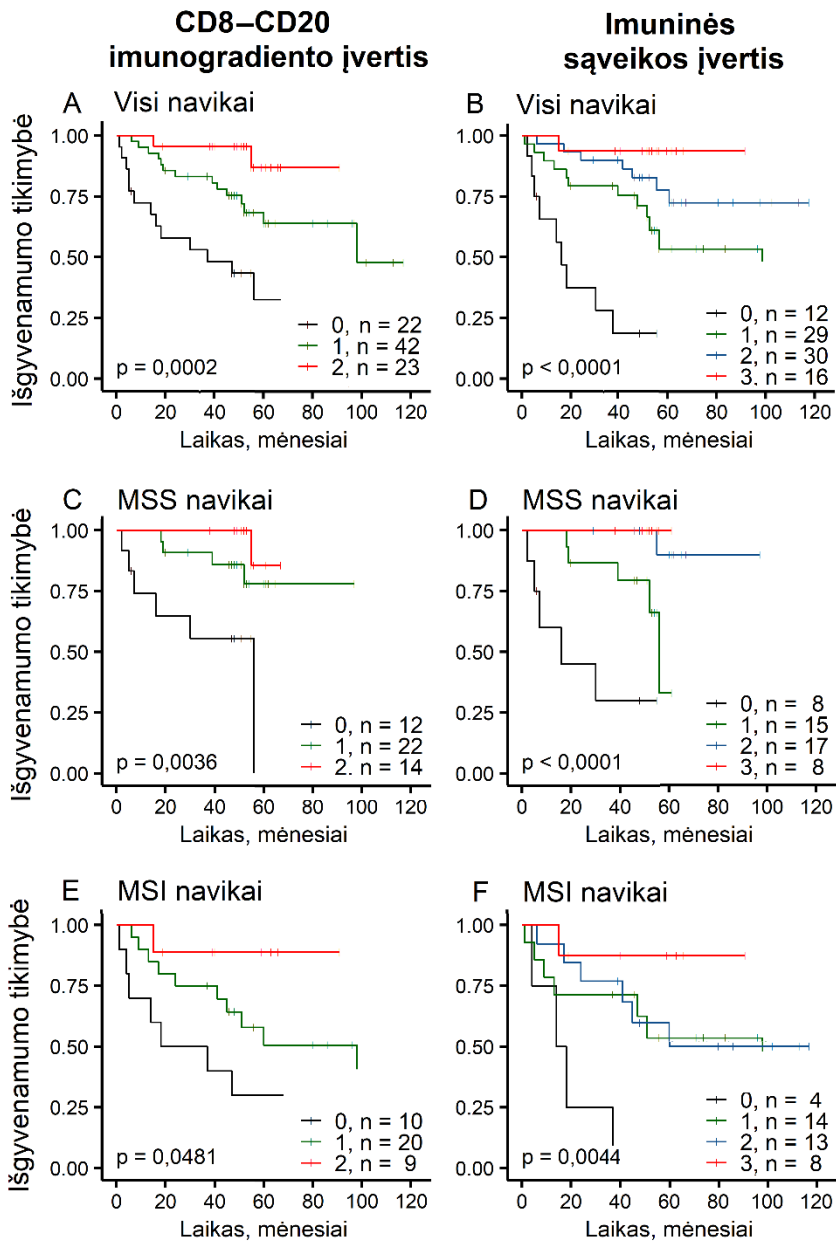
1) CD8–CD20 imunogradiento įvertis, derinantis IHC žymenimis pagrįstus CD8 ir CD20 imunogradientus;

2) imuninės sąveikos įvertis, derinantis IHC žymenimis pagrįstus CD8 ir CD20 imunogradientus bei histologinį naviko augimo pobūdžio kriterijų.

Šie įverčiai sudaryti sudedant rodiklių verčių kategorijoms suteiktus taškus: aukštų CD8 ir CD20 imunogradientų verčių kategorijoms suteiktas 1 taškas, žemų šių rodiklių verčių kategorijoms – 0 taškų; navikų, kuriems būdingas ekspansyvus augimo frontas, kategorijai suteiktas 1 taškas, navikų, kuriems būdingas infiltruojantis augimo frontas, kategorijai – 0 taškų.

CD8–CD20 imunogradiento įvertis stratifikavo pacientus į 3 grupes: 2 taškų įverčiu nustatyta 87 proc., 1 taško įverčiu – 64 proc., 0 taškų įverčiu – 33 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybė (3.18 A). Įvertis stratifikavo pacientus nepriklausomai nuo navikų MSI požymių: MSS navikų pogrupyje išskirtos prognozinės grupės pagal 86 proc., 78 proc. ir ~50 proc., MSI navikų pogrupyje – pagal 89 proc., 51 proc. ir 30 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.18 C ir E).

Imuninės sąveikos įvertis stratifikavo pacientus į 4 prognozinės grupes: 3 taškų įverčiu nustatyta 94 proc., 2 taškų įverčiu – 73 proc., 1 taško įverčiu – 53 proc., 0 taškų įverčiu – 19 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybė (3.18 B). Šis įvertis išskyrė pacientų grupę pagal 0–30 proc. 3 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes MSS ir MSI navikų pogrupiuose (3.18 D ir F). Tai rodo, kad histologinis naviko augimo pobūdžio kriterijaus įtraukimas į kombinuotą prognozinį įvertį, nepriklausomai nuo navikų MSI požymių, padeda identifikuoti pacientus, kuriems kyla didžiausia mirties rizika.



3.18 pav. Pacientų bendrojo išgyvenamumo Kaplano-Mejerio kreivės pagal kombinuotus įverčius visoje tiriamųjų imtyje, MSS ir MSI navikų pogrupiuose, atitinkamai: A, C, E – CD8-CD20 imunogradiento įvertis; B, D, F – imuninės sąveikos įvertis.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zona (I tiriamųjų pacientų imtis)

4.1.1. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo metodas

Šiame darbe, analizuojant skaitmeninį naviko viso pjūvio vaizdą, imuniniam atsakui SŽV mikroaplinkoje vertinti pritaikyta naviko ir stromos sąveikos zonos samprata. Kaip ir naviko invazijos kraštas (IK), naviko ir stromos sąveikos zona apima navikinių ląstelių sąlyčio su aplinkine stroma regionus, tačiau įtraukia ne tik naviko periferijoje, bet ir jo šerdyje esančius navikinių ląstelių ir stromos audinio sąveikos regionus. Naviko pjūvis yra mėginio (trimačio objekto) projekcija dvimatėje erdvėje, todėl tikėtina, kad, matuojant NIL naviko ir stromos sąveikos zonoje, galima išsamiau apibūdinti limfocitų infiltravimo į naviko mikroaplinką mastą ir antinavikinį potencialą. Palyginti su atskirais audinio komponentais ar regionais, naviko ir stromos sąveikos zona pagrįsti imuninio atsako rodikliai gali būti prognoziškai informatyvesni.

Imuninio infiltrato vertinimas naviko IK negali būti atliekamas, kai naviko pjūvyje perinavikinio audinio nepakanka reprezentatyviam IK išskirti [191, 192]. Dar vienas analizę naviko IK ribojantis veiksnys yra rankinis, subjektyviu vizualiu vertinimu grindžiamas šio regiono nustatymas. Dėl navikinio audinio struktūrų morfologijos įvairovės daugelis kompiuterinių IK nustatymo įrankių dar nėra iki galo automatizuoti, pavyzdžiui, naudodamasis skaitmeninės vaizdo analizės platformų HALO™ ir QuPath siūlomais įrankiais, tyrėjas iš pradžių ranka nubrėžia, jo vertinimu, naviko IK atitinkančią liniją, tik tada aplink šią liniją automatiškai išskiriama tam tikro pločio juosta [167, 168]. Minėtu būdu nustatomas IK gali skirtis net ir tame pačiame naviko vaizde, priklausomai nuo tyrėjo interpretavimo ir laiko, skiriamo šiai užduočiai atlikti. Rankinio IK žymėjimo variacijos ypač pastebimos infiltruojančio augimo pobūdžio navikų atvejais, pavyzdžiui, kai naviko vaizde matyti atskiri navikinio epitelio židiniai toliau nuo pagrindinės naviko masės arba gausus pumpuravimasis naviko periferijoje [184, 193]. Vadinasi, rankiniam naviko IK žymėjimui trūksta atkartojamumo, o tai gali turėti įtakos prognoziinių modelių tikslumui. Vis dėlto didelė dalis iki šiol atliktų imuninio atsako naviko mikroaplinkoje profiliavimo tyrimų naudojo rankinį arba tik iš dalies automatizuotą naviko IK ir šerdies regionų atskyrimą [194–196]. Naujai kuriami automatiniai, nuo tyrėjo vizualaus vertinimo nepriklausomi, naviko IK nustatymo metodai dažniausiai pagrįsti

sudėtingais bioinformaciniais įrankiais ir (ar) reikalauja tam tikro audinio dažymo (pavyzdžiui, pancitokeratino imunofluorescencinio dažymo [169]), todėl yra sąlygiškai brangūs, sunkiai pritaikomi daugelyje diagnostikos laboratorijų. Be to, net ir automatiškai išskiriamas naviko IK lieka tam tikro fiksuoto pločio juosta, o disertacijoje naudojama automatiškai nustatoma naviko ir stromos sąveikos zona yra kintančio pločio parametras, kuris labiau atitinka naviko erdvinę įvairovę.

Pastaraisiais metais kelios tyrėjų grupės besiribojantiems navikinio epitelio ir stromos audiniams automatiškai atskirti pritaikė skaitmeninės vaizdo analizės įrankius, pagrįstus morfologinėmis operacijomis. N. Harder ir bendraautorai [172] vertino imuninio infiltrato naviko ir stromos sąveikos regione sąsajas su prostatos vėžio progresavimu. Naudotas mašininio mokymo algoritmas atliko skirtingų audinio struktūrų morfologijos analizę ir išskyrė navikinio epitelio ir aplinkinės stromos sąlyčio ribą bei 112,5 μm pločio regionus šalia jos, taip pat kelias papildomas „naviko ir stromos perėjimo“ zonas. Skirtingų NIL populiacijų tankių santykiai, pavyzdžiui, CD8+ ir CD34+ ląstelių santykis, šiose zonose buvo reikšmingai susiję su pacientų išgyvenamumu ligai neprogresuojant. Vis dėlto imuninių ląstelių infiltravimo į naviką analizei audinio regionai turi būti analizuojami išlaikant erdvinį naviko ir stromos komponentų kaitos kontekstą. X. Li ir kt. [197] detaliau ištyrė CD8+ T ląstelių infiltravimo aspektus trigubai neigiamo (pagal estrogenų, progesteronų ir 2-ojo žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių (HER2)) krūties vėžio mikroaplinkoje. Tyrėjai analizavo CD8+ T ląstelių atstumus nuo naviko IK (nustatytas rankiniu būdu) ir naviko sąlyčio su stroma ribos (atskirta epitelio ląstelių pancitokeratino dažymu) ir sudarė jų tankio profilius. Juos modeliuojant matematiškai, nustatyta, kad CD8+ T ląstelėms migruoti naviko mikroaplinkoje ir skverbtis į navikinių ląstelių klasterius daugiau įtakos turi biocheminiai slopikliai, o ne tarpląstelinio kolageno formuojamas fizinis barjeras. Minėtos tyrėjų grupės akcentavo imuninio atsako tyrimus visuose navikinio epitelio ir aplinkinės stromos sąveikos paviršiuose ir tam taikė automatizuotus skaitmeninės vaizdo analizės algoritmus. Disertacijoje, siekiant išsamiai ir tiksliai įvertinti imuninį atsaką vėžio mikroaplinkoje, tiriamuoju regionu pasirinkta naviko ir stromos sąveikos zona ir NIL profilių joje analizė.

Naviko ir stromos sąveikos zonai nustatyti ir imuniniam atsakui profiliuoti naudotas skaitmeninės vaizdo analizės duomenų (skirtingų audinio klasių plotų, tiriamų imuninių ląstelių koordinatų) variacijos naviko vaizde tyrimas erdvinės šešiakampių gardelių analitikos principais [180]. Gardelių analitikos metodai imuniniam infiltratui naviko mikroaplinkoje matuoti taikyti ir anksčiau [198–200]. Imuniniam atsakui SŽN vertinti

validuota *Immunoscore*® metodika taip pat pagrįsta NIL kiekybine analize gardelėmis suskirstytuose naviko IK ir šerdies regionuose [201]. Vis dėlto automatizuotai erdvinei NIL pasiskirstymo naviko ir stromos sąveikos zonoje analizei gardelių analitika nebuvo taikyta.

Disertacijoje pristatomą naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo algoritmą sudaro du etapai: pirmiausia gretimų šešiakampių gardelių analizės principais įvertinami skirtingų audinio klasių (naviko, stromos ir fono) plotų pokyčiai visame tinklelyje ir išskiriamos gardelės, kuriose nustatomi didžiausi naviko ploto pokyčiai – jei šiuos pokyčius sąlygoja stromos komponentas, gardelės priskiriamos naviko kraštui (NK) (žr. 2.3.4 skyrius, 1-as etapas); vėliau pagal atstumą nuo NK naviko ir stromos klasių gardelėms suteikiami erdviniai rangai, todėl NK galima išplėsti į abi puses pasirinktu rangų skaičiumi (žr. 2.3.4 skyrius, 2-as etapas). Sistemingas sąveikos zonos suskirstymas erdviniais rangais leidžia išskirti platesnes ar siauresnes naviko, NK, stromos sritis ir apskaičiuoti jose imuninių ląstelių tankio vidurkį, standartinę nuokrypį ir sudaryti ląstelių pasiskirstymo kryptimi iš stromos į naviką profilius. Sąveikos zonos nustatymo algoritmas remiasi skaitmeninės vaizdo analizės duomenimis ir vienareikšmiškai apibrėžtų matematinių taisyklių seka, todėl nepriklauso nuo tyrėjo vizualaus vertinimo ir išskiria šią zoną vienodai tiksliai tiek ekspansyvaus, tiek infiltruojančio augimo pobūdžio navikuose. Vienas pagrindinių veiksnių, galinčių turėti įtakos sąveikos zonai nustatyti yra audinio klasifikavimo klaidos, tačiau nuolat tobulinamais dirbtinio intelekto algoritmais pasiekama tikslesnių audinio klasifikavimo rezultatų, be to, jie mažiau priklauso nuo IHC dažymo variacijų [202]. Kita vertus, disertacijoje aptariamu metodu NK yra nustatomas pagal naviko ploto pokyčius gretimų šešiakampių gardelių kontekste, todėl tikslus naviko ar stromos struktūrų atpažinimas, skirtingai negu morfologinėmis operacijomis pagrįstų metodų atveju, nėra būtinas.

4.1.2. Storosios žarnos naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas

Prognoziškai reikšmingi imuninio atsako rodikliai gaunami tiriant skirtingo pločio naviko IK regionus. Tarptautinė imunoonkologijos biožymenų darbo grupė solidiniams navikams pasiūlė bendrąjį naviko IK apibrėžimą. Nurodyta, kad šis regionas turi apimti 1 mm pločio juostą, t. y. 500 μ m pločio navikinio ir tokio paties pločio aplinkinio nenavikinio (sveiko) audinio regionus ties jų sąlyčio riba (šiuos parametrus, tirdami SŽN, apibrėžė B. Mlecnikas ir kt. [23, 203]). Kiti tyrėjai NIL tankį vertino siauresniuose naviko IK regionuose, pavyzdžiui, N. Bordry ir bendraautorai [204] melanomos navikuose limfagyslių ir infiltruojančių CTL tankį vertino

400 µm pločio IK; J. Galonas ir bendraautorai [35, 191] SŽN išskyrė ir *Immunoscore*® metodikai pritaikė 720 µm pločio IK; A. Lechneris ir kt. [193] imuninio infiltrato galvos ir kaklo plokščialąstelinėse karcinomose analizei naudojo IK, kuris apėmė 50 µm pločio navikinio ir 300 µm pločio perinavikinio audinio regionus. Kita vertus, ląstelių tarpusavio erdviųjų sąveikų naviko mikroaplinkoje tyrimai rodo, kad antinavikinio imuninio atsako efektyvumui įtakos turi NIL, kurie yra arti navikinių ląstelių ir tiesiogiai dalyvauja citotoksiniame atsake. A. Berthel ir kt. [205] nustatė, kad dideli CD8+ T ląstelių tankiai 0–10 µm atstumu aplink SŽV metastazes kepenyse yra susiję su daug ilgesniu pacientų bendruoju išgyvenamumu. T. N. Gide ir bendraautorai lygino imuninių ląstelių pasiskirstymą tam tikrais atstumu nuo navikinių ląstelių intervalais anti-PD-1 terapijai jautriuose ir nejautriuose melanomos navikuose ir nustatė, kad dideli CD8+ ir PD-L1+ ląstelių, esančių 0–20 µm spinduliu aplink navikines ląsteles ir infiltruojančių į navikinį epitelį, tankiai buvo stiprūs atsako į terapiją predikciniai žymenys [41]. Taigi NIL matavimai siauresniuose IK ar atskiruose naviko regionuose gali būti prognoziškai tikslesni negu platesniame IK ar visame navike / stromoje. Šie stebėjimai rodo, kad, tiriant imuninį infiltratą skirtinguose vėžio tipuose, informatyvios gali būti įvairios erdvinės ląstelių pasiskirstymo audinyje analizės strategijos.

Siekiant gauti prognoziškai tiksliausius imuninio atsako rodiklius, sąveikos zonos plotis ir skirstymas turi būti parinktas atsižvelgiant į tiriamąjį audinį. Naviko ir stromos sąveikos zonos metodo pritaikomumą skirtingų audinių analizei lemia galimybė kontroliuoti šios zonos plotį ir suskirstyti ją erdviniais rangais. Disertacijoje imuninio atsako SŽV mikroaplinkoje tyrimams buvo išbandytos 3–9 rangų pločio ir įvairaus suskirstymo į naviko, NK bei stromos sritis sąveikos zonos. Stipriausi prognoziniai modeliai gauti naudojant 3 rangų pločio sąveikos zoną. Šios zonos ranguose buvo panašus gardelių skaičius ir didžiausias, palyginti su toliau nuo NK esančiais rangais. Siauresnės sąveikos zonos dominavimą SŽN galima paaiškinti šio tipo navikų morfologija: geros ar vidutinės diferenciacijos epitelis formuoja liaukines struktūras, kurios viena nuo kitos atskiriamos įsiterpiančio stromos audinio fragmentų; taip pat šiuose navikuose dažnai gausu pumpuravimosi židinių [184]. Vadinasi, daugelyje SŽN regionų gali būti išskiriama tik siaura sąveikos zona. Be to, SŽN statistiškai reikšmingi CD8+ T ląstelių tankio pokyčiai tarp gretimų rangų buvo nustatyti 3 rangų pločio sąveikos zonoje. Tai galima sieti su SŽN imunogenišku: šiuose navikuose įprastai gausu NIL, kurie susitelkia IK ar intranavikinės stromos regionuose, pirmiausia dėl navikinių ląstelių morfologijos ir tarpląstelinio kolageno gijų sukuriama fizinio barjero, taip pat dėl tam tikrų chemokinių ar

kitų biocheminių veiksnių imunosupresinio poveikio [197]. Taigi minėtoje sąveikos zonoje nustatomi didžiausi NIL tankio pokyčiai [206]. Apibendrinant galima teigti, kad SŽN 3 rangų pločio sąveikos zonos prognozinį pranašumą, palyginti su didesnio pločio sąveikos zonomis, lėmė šių navikų morfologinių ir imunogeniško savybių visuma.

Kaip minėta, naviko ir stromos sąveikos zona yra kintančio pločio parametras, t. y. sąveikos zona visame naviko vaizde nėra vienoda (žr. 2.3.4 skyrius, 2.5 pav.). Tai lemia keletas priežasčių: visų pirma, galimas sąveikos zonos rangų skaičius tam tikrame navikinio audinio regione priklauso nuo navikinių ląstelių ir aplinkinės stromos erdvinio išsidėstymo (dvimatėje plokštumoje) aspektų; gardelės NK klasei priskiriamos, kai jose nustatoma staigių naviko ploto pokyčių arba kai jose naviko ir stromos plotai yra panašūs, todėl NK iš tikrųjų gali apimti daugiau negu 1 gardelę (vidutiniškai 1,2–1,3 gardeles, lyginant gardelių skaičių rangų intervale $r_i \in [-1; 1]$, žr. 3.1.2 skyrius). Šešiakampė gardelė greta ribojasi su šešiomis gardelėmis, taigi jos išsidėsto įvairiau viena kitos atžvilgiu negu išsidėstytų kvadratinės gardelės. Minėtina, kad 3 rangų pločio sąveikos zona SŽN vaizde apima ~320–520 μm pločio „juostą“ (kai šešiakampio šoninė kraštinė yra 65 μm).

Kuriant naviko ir stromos sąveikos zonos metodą, įvairaus pločio ir suskirstymo sąveikos zonos išbandytos vertinant imuninių atsaką ir ankstyvosios stadijos hormonų receptorių teigiamos duktalinės krūties karcinomos ($n = 102$) mikroaplinkoje [181]. Prognoziškai informatyviausia buvo 9 rangų pločio sąveikos zona (~850–1050 μm pločio zona). Rezultatas tikėtinas, nes, palyginti su SŽV, minėto potipio krūties vėžys yra kitokios morfologijos, mažiau imunogeniškas ir dažniausiai turi mažiau NIL [207]. Platesnė sąveikos zona leido į analizę įtraukti daugiau duomenų ir gauti geresnius prognozinis rodiklius.

4.2. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (I tiriamųjų pacientų imtis)

4.2.1. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė

Skaitmeninės patologijos metodai atskleidė imuninių ląstelių pasiskirstymo vėžio mikroaplinkoje svarbą – antinavikiniam imuniniam atsakui įtakos turi ne tik NIL tipai, kiekis, bet ir jų išsidėstymas navikinių ir kitų stromos uždegiminių ląstelių atžvilgiu. Erdviniams NIL pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje aspektams įvertinti dažniausiai matuojami absoliutūs jų tankiai (tankių santykiai) skirtinguose naviko regionuose ir (arba) atstumai tarp imuninių ir navikinių ląstelių [37–42, 165, 172]. Disertacijoje

pabrėžiamas gradientinis imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko ir stromos sąveikos zonoje aspektas. Taikant erdviniais rangais suskirstytą sąveikos zoną, sudaromi NIL tankio profiliai, kurie leidžia pamatuoti ląstelių „polinkį“ infiltruoti į naviką naujo tipo rodikliais.

I tiriamųjų pacientų imtis (Vilniaus imtis, $n = 101$) naudota kaip mokomoji imtis citotoksinių T ląstelių (CD8+) tankio sąveikos zonoje profiliams analizuoti. Remiantis pacientų bendrojo išgyvenamumo analize atrinkti stipriausi imuninio atsako rodikliai: absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonos stromos, NK, naviko srityse bei visame navike rodikliai, taip pat kryptingą CD8+ T ląstelių tankio pokytį sąveikos zonoje išreiškiantys rodikliai (imunogradianto rodikliai), t. y. masės centro (MC) rodiklis, kuris išreiškia ląstelių tankio gradientą kryptimi iš stromos į naviko sritį, ir imunonuokryčio (IN) rodiklis, išreiškiantis ląstelių tankio pokytį, palyginus stromos ir naviko sritis šalia NK. Minėtina, kad šioje imtyje tarp klinikinių ir pataloginių kriterijų reikšmingai su pacientų bendroju išgyvenamumu buvo susijęs jų amžius, pirminio naviko išplitimo ir metastazių limfagziuose kategorijos.

Nepriklausoma imuninio atsako rodiklių ir klinikinių, pataloginių kriterijų vertė analizuota daugiaveiksne Kokso regresija, nustatyti nepriklausomi veiksniai (3.6 lentelė): CD8+ T ląstelių tankio MC rodiklis (CD8 imunogradiantas) ir CD8+ T ląstelių tankio IN rodiklis, taip pat pacientų amžius ir pirminio naviko išplitimo kategorija. Tai rodo, kad CD8+ T ląstelių tankio imunogradianto rodikliai yra informatyvesni negu absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje ar visame navike rodikliai. Stipriausias nepriklausomas pacientų bendrojo išgyvenamumo prognozinis veiksnys buvo CD8 imunogradiantas (PR: 0,39, $p = 0,0071$), stratifikavęs pacientus į prognozes grupes pagal 77 proc. ir 52 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.10 pav. C).

Imuninio atsako rodiklių faktorinė analizė išskyrė du linijiniu būdu nepriklausomus veiksnius: absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje faktorių, kurį atspindėjo absoliutaus ląstelių tankio skirtingose sąveikos zonos srityse rodikliai, ir CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorių, kurį atspindėjo ląstelių tankio imunogradianto rodikliai. Kombinuojant šiuos faktorius, sudarytas agreguotas CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius. Daugiaveiksne Kokso regresija nustatyta (3.7 lentelė), kad CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius buvo nepriklausomas veiksnys ir stratifikavo pacientus į prognozes grupes pagal 77 proc. ir 54 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.12 pav. A). Agreguotas CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius taip pat buvo nepriklausomas prognozinis veiksnys, jis dichotomizavo tiriamųjų imtį

į grupes pagal 84 proc. ir 58 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.12 pav. B). Šie rezultatai patvirtina, kad CD8+ T ląstelių tankio gradientas yra prognoziškai reikšmingesnis negu absoliutus jų tankis sąveikos zonoje, o kombinuotas imuninių ląstelių pasiskirstymo kiekybinių ir erdviųjų (gradientinių) aspektų vertinimas gali turėti pridėtinės prognozinės vertės.

Apibendrinant galima konstatuoti, kad pasiūlyti CD8+ T ląstelių atsako SŽV mikroaplinkoje rodikliai buvo reikšmingi pacientų bendrojo išgyvenamumo prognoziniai veiksniai. Pabrėžtina, kad CD8+ T ląstelių tankio pokytį sąveikos zonoje kryptimi iš stromos į naviką aprašantys rodikliai buvo nepriklausomi veiksniai ir pranoko absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio naviko mikroaplinkoje rodiklius. Minėtina, kad pristatoma metodika papildomai buvo atliktas CD8+ T ląstelių atsako ankstyvosios stadijos hormonų receptorių teigiamos duktalinės krūties karcinomos navikuose ir nustatyta, kad CD8 imunogradientas turėjo nepriklausomą prognozinę vertę numatant pacienčių bendrąjį išgyvenamumą [181].

4.3. Imuninis atsakas storosios žarnos vėžio mikroaplinkoje (II tiriamųjų pacientų imtis)

4.3.1. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė

Šiame etape imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė analizuota nepriklausomoje II tiriamųjų pacientų imtyje (Notingamo imtis, n = 87), kuri sudaryta kitoje populiacijoje, vertinta vietos ligoninės gydytojų ir charakterizuota ten pat atliktais IHC ir molekuliniais tyrimais (navikų mėginiuose tirti MSI požymiai: 39 navikuose nustatytas MSI, 48 navikai buvo su MSS, taip pat tirtos *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* genų mutacijos). Notingamo imtyje, taikant pirmame darbo etape optimizuotus naviko ir stromos sąveikos zonos analizės parametrus ir imunogradiento rodiklius, vertinti citotoksinių T (CD8+) ląstelių, B (CD20+) ląstelių ir (CD68+) makrofagų tankių profiliai. Pacientų vienaveiksne bendrojo išgyvenamumo analize nustatyta (3.10 lentelė), kad reikšmingai su pacientų išgyvenamumu buvo susiję CD8+ T ląstelių bei CD20+ B ląstelių tankio MC rodikliai ir absoliutaus CD20+ B ląstelių tankio sąveikos zonos stromos, naviko srityse ir visame navike rodikliai. Šioje imtyje iš visų tirtų klinikinių, pataloginių ir molekulinų rodiklių reikšmingai su pacientų išgyvenamumu buvo susijęs histologinis naviko augimo pobūdis (įvertinamas vizualiai). Nepriklausoma rodiklių vertė analizuota daugiaveiksne Kokso regresija, nustatyti trys nepriklausomi prognoziniai veiksniai (3.11 lentelė): CD8+ T ląstelių tankio

MC rodiklis (CD8 imunogradientas), CD20+ B ląstelių tankio MC rodiklis (CD20 imunogradientas) ir histologinis naviko augimo pobūdžio kriterijus.

Nustatomiems antinavikinio imuninio atsako rodikliams Notingamo imtyje (kaip ir Vilniaus imtyje) įtakos gali turėti populiacijai specifiniai faktoriai, naviko mėginio paruošimo, IHC dažymo protokolų skirtumai, tačiau CD8 imunogradientas buvo stipriausias nepriklausomas pacientų bendrojo išgyvenamumo veiksnys (PR: 0,31, $p = 0,0029$; 3.11 lentelė). CD8 imunogradientas suskirstė pacientus į prognozinės grupes pagal 75 proc. ir 43 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.15 pav., A), taip pat reikšmingai suskirstė pacientus tiek MSS, tiek MSI navikų pogrupiuose (3.15 pav., B ir C). Taigi CD8 imunogradiento kaip stipraus imuninio atsako rodiklio prognozinė vertė buvo patvirtinta dviejose nepriklausomose imtyse. Galima teigti, kad, palyginti su absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje ar visame navike rodikliais, CD8 imunogradientas geriau išreiškė citotoksinių T ląstelių atsaką, t. y. tikėtina, kad CD8 imunogradientu įvertinama naviką infiltruojančių, aktyvių (neišsekusių) T ląstelių populiacija, sąlygojanti citotoksinio imuninio atsako naviko mikroaplinkoje dinamiką ir efektyvumą.

Palyginti su CD8+ T ląstelių ir CD68+ makrofagų tankiais, tirtuose navikuose CD20+ B ląstelių buvo mažiausia, tačiau didesni jų tankiai reikšmingai koreliavo su ilgesniu pacientų bendrojo išgyvenamumu. Pabrėžtina, kad CD20 imunogradientas buvo nepriklausomas prognozinis veiksnys (PR: 0,33, $p = 0,0113$; 3.11 lentelė) ir stratifikavo pacientus į prognozinės grupes pagal 76 proc. ir 56 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.16 pav., A). Tai rodo, kad gradientinis CD20+ B ląstelių pasiskirstymo sąveikos zonoje aspektas, kaip ir CD8+ T ląstelių atveju, buvo prognoziškai informatyviausias.

M. C. A. Wouters ir bendraautorių metaanalizės duomenimis, teigiama *in situ* B ląstelių, plazmos ląstelių ir imunoglobulino kappa C infiltratų įtaka pacientų išgyvenamumui pastebima įvairiose vėžio atmainose [208], įskaitant pirminį ir metastazavusį SŽV – tankesnis CD20+ B ląstelių infiltratas turi nepriklausomą vertę prognozuojant ilgesnį pacientų bendrąjį išgyvenamumą ir išgyvenamumą ligai neprogresuojant [122, 209, 210]. Vis dėlto B ląstelių stromos ar naviko komponentuose įtaka pacientų išgyvenamumui nebuvo aiškiai apibendrinta dėl skirtingo tretinėse limfoidinėse struktūrose reziduojančių ir difuziškai į naviką infiltruojančių B ląstelių pasiskirstymo, funkcijų, taip pat dėl reguliacinių B ląstelių imunosupresinių savybių [208]. Išsami G. Bindeos ir bendraautorių atlikta imuninio infiltrato SŽN analizė parodė, kad B ląstelės vyravo naviko IK ir koreliavo su T ląstelių, ypač su atminties T ląstelių (CD45RO+) infiltratu.

Minėtina, kad naviko šerdyje B ląstelių buvo daug mažiau, tačiau ir čia jų tankiai stipriai koreliavo su T ląstelių, įskaitant citotoksines T ląsteles, tankiais [211]. Apskritai, B ląstelės yra ne tik atsakingos už humoralinį imuninį atsaką, bet, atlikdamos profesionalių antigenų pristatančių ir kostimuliuojančių ląstelių funkcijas, skatina T ląstelių infiltravimą ir citotoksinį aktyvumą navike [212]. J. S. Nielsen ir bendraautoriai, tyrę kiaušidžių vėžio mikrogardeles, parodė, kad navikus infiltruojančios CD20+ B ląstelės sintetina antigenų pristatymo žymenis (MHC I, MHC II, CD40, CD80, CD86) ir kolokalizuojasi su CD8+ T ląstelėmis [213]. M. Garnelo ir kt. hepatoceliulinės karcinomos mikroaplinkoje nustatė, kad navikus infiltruojančios T ir B ląstelės yra arti viena kitos ir telkiasi į klasterius, kiek rečiau – į limfoidinio tipo struktūras naviko IK. Nurodoma, kad naviko šerdyje aktyvių CD27+CD20+ B ląstelių tankis koreliavo su aktyvių CD27+/GZB+ CD8+ T ląstelių ir CD56+ natūraliųjų žudikių, taip pat su apoptotinių navikinių ląstelių tankiu [214]. Taigi disertacijoje, analizuojant SŽN, nustatytas CD20 imunogrado prognoziniis pranašumas, palyginti su absoliučiais šių ląstelių tankiais naviko mikroaplinkoje, gali būti siejamas su naviką infiltruojančių, aktyvių CD20+ B ląstelių, kurios kolokalizuojasi ir sąveikauja su T ląstelėmis naviko ir stromos sąveikos zonoje, populiacija.

Tiriamųjų pacientų imties MSI ir MSS navikų pogrupiuose CD20+ B ląstelių tankiai buvo panašūs. MSI navikų atveju CD20 imunogrado rodiklis reikšmingai koreliavo su pacientų bendruoju išgyvenamumu; MSS navikų atveju reikšmingų sąsajų tarp CD20 imunogrado ir pacientų, išgyvenamumo nebuvo. Pacientų, kuriems nustatyti MSI navikai, pogrupyje CD20 imunogradas išskyrė prognozes grupes pagal 80 proc. ir 40 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.16 pav. C) ir savo prognoze galia prilygo CD8 imunogrado, kuris MSI navikų pogrupyje suskirstė pacientus į grupes pagal 65 proc. ir 31 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.15 pav. C). Tai rodo, kad MSI navikuose, kuriems būdingas didelis rémelio poslinkio mutacijų dažnis ir neoantigenų įvairovė [126], antinavikinį imuninį atsaką skatina ne tik T ląstelių atsakas, bet ir antigenams specifinis B ląstelių atsakas. Šias įžvalgas paremia B. Mlecniko ir bendraautorių atlikti imuninio atsako MSS ir MSI SŽN matavimai: *in situ* analize nustatyta, kad MSI navikuose buvo reikšmingai didesnis į navikinių epitelį infiltruojančių citotoksinių T ląstelių ir makrofagų tankis, taip pat daug gausesnis B ląstelių infiltratas (ypač IK). Genų raiškos analizė parodė, kad, palyginti su MSS navikais, MSI navikuose buvo reikšmingai padidėjusi su atminties ir citotoksinėmis T bei B ląstelėmis susijusių genų raiška [36].

Viena iš gausiausiai SŽN infiltruojančių imuninių ląstelių populiacijų yra CD68+ makrofagai. Tyrimų duomenimis, CD68+ makrofagų tankiai naviko

mikroaplinkoje koreliuoja su SŽV sergančių pacientų išgyvenamumu [36, 211, 215]. Disertacijos Notingamo imtyje reikšmingų sąsajų tarp CD68+ makrofagų tankio ir pacientų išgyvenamumo nenustatyta, tačiau pastebėtos su CD68+ makrofagų lokalizacija naviko mikroaplinkoje susijusios prognozinės tendencijos: didelis CD68+ makrofagų tankis sąveikos zonos naviko srityje ir visame navike, taip pat aukštas CD68+ makrofagų tankio MC rodiklis (CD68 imunogradientas) buvo siejami su blogesne prognoze (PR: 1,73–1,82, $p \geq 0,1300$; 3.10 lentelė), o didelis CD68+ makrofagų tankis sąveikos zonos stromos ir NK srityse – su geresne prognoze (PR: 0,59–0,65, $p \geq 1500$; 3.10 lentelė). Tai sutampa su kitų tyrimų SŽN įžvalgomis: į navikinį epitelį infiltruojantys CD68+ makrofagai siejami su blogesne prognoze [216], o tankus CD68+ makrofagų infiltratas naviko IK koreliuoja su geresne ligos eiga [217]. Vis dėlto CD68, kaip bendrojo makrofagų linijos ląstelių žymens, prognozinė vertė gali priklausyti nuo naviko mikroaplinkos konteksto, t. y. priklausomai nuo makrofagus supančių ląstelių populiacijų ir juos aktyvinančių citokinų, jie gali poliarizuotis į M1 tipo (CD80+) ląsteles, kurioms būdingas antinavikinis aktyvumas, arba į M2 tipo (CD163+) ląsteles, kurios slopina uždegimą ir skatina naviko progresavimą [218]. Daugėja tyrimų, kurie rodo, kad skirtingo tipo vėžio atmainose makrofagų sąlygoti prognoziniai efektai priklauso nuo jų populiacijų santykių ir lokalizacijos naviko mikroaplinkoje [158, 219, 220], todėl ateityje vertėtų imuninio atsako naviko ir stromos sąveikos zonoje tyrimus papildyti CD80+/CD163+ ląstelių atsako rodikliais.

4.3.2. Kombinuoti prognoziniai modeliai

Dažnai antinavikinio imuninio atsako prognoziniai modeliai akcentuoja CD3+/CD8+ T ląstelių infiltratą naviko mikroaplinkoje, tačiau yra modelių, kurie derina įvairiais naviką infiltruojančių imuninių ląstelių populiacijas, naviko histopatologines savybes, taip pat jų tarpusavio erdvines sąveikas pridėtinei prognozinėi vertei nustatyti [38, 39]. Panašiai, Notingamo imtyje sudarytas prognozinis modelis išskyrė du nepriklausomus imuninio atsako veiksnius – citotoksinų T ląstelių ir B ląstelių tankio imunogradientus naviko ir stromos sąveikos zonoje, ir nepriklausomą histologinį naviko augimo pobūdžio kriterijų. Kombinuojant šiuos rodiklius, sudaryti keli prognoziniai įverčiai: 1) CD8–CD20 imunogradiento įvertis (angl. *CD8-CD20 Immunogradient score*), derinantis CD8 ir CD20 imunogradientus; 2) imuninės sąveikos įvertis (angl. *Immuno-interface score*), derinantis CD8 ir CD20 imunogradientus ir histologinį naviko augimo pobūdį.

Anksčiau kombinuotos navikus infiltruojančių T ir B ląstelių analizės vertė buvo nustatyta tiriant skirtingos lokalizacijos vėžius, įskaitant kiaušidžių, kepenų, kasos, taip pat ir SŽV [122, 213, 214, 221]: CD20+ B ląstelių infiltratas sustiprino CD8+ T ląstelių atsaką, t. y. didelių CD20+ B ir CD8+ T ląstelių tankių naviko mikroaplinkoje kombinacija koreliavo su geriausia pacientų išgyvenamumo prognoze. B. Mlecnikas ir bendraautorai genų raiškos ir baltyminių žymenų *in situ* analize nustatė, kad didelių atminties ir citotoksinių T ląstelių bei B ląstelių tankių naviko mikroaplinkoje kombinacija koreliavo su ilgesniu I–IV stadijos SŽV sergančių pacientų išgyvenamumu, nepriklausomai navikų MSI požymių [36]. Tirdami imuninį infiltratą SŽV metastazėse (kepenyse), tyrėjai pritaikė TB įvertį – *Immunoscore*® atitikmenį, paremtą CD8+ T ir CD20+ B ląstelių tankiais naviko IK ir šerdies regionuose. TB įvertis, kaip ir *Immunoscore*® įvertis, buvo statistiškai stipresnis už standartinius klinikinius, patologinius bei molekulinis žymenis. Minėtina, kad žemas TB įvertis (lyginant su žemu *Immunoscore*®) išskyrė pacientų grupę, kuriai būdingas trumpiausias bendrasis išgyvenamumas ir išgyvenamumas ligai neprogresuojant [222]. Disertacijoje pristatomu tyrimu taip pat buvo patvirtina pridėtinė kombinuoto adaptavo T ir B ląstelių atsako SŽN mikroaplinkoje vertinimo prognozinė vertė: CD8–CD20 imunogradiento įvertis stratifikavo pacientus į 3 prognozinės grupes pagal 87 proc., 64 proc. ir 33 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.18 pav. A). Panašios prognozinės grupės nustatytos ir MSS bei MSI navikų pogrupiuose. Svarbu tai, kad abiejuose pogrupiuose aukštų / žemų CD8 ir CD20 imunogradientų kombinacija atitiko pacientų grupes, išsiskiriančias geriausia / blogiausia prognoze (3.18 pav. C ir E). Taigi vien IHC žymenimis pagrįstas CD8–CD20 imunogradiento įvertis buvo stiprus antinavikinio imuninio atsako rodiklis, statistiškai informatyvesnis už navikų TNM kriterijus ar MSI požymius.

Notingamo imtyje iš visų tirtų klinikinių, patologinių ir molekulinų rodiklių vienintelis kriterijus, turėjęs nepriklausomą vertę ir sustiprinęs imunogradientais pagrįsto prognozinio modelio galią, buvo histologinis naviko augimo pobūdžio kriterijus. Ši kriterijų pirmieji apibrėžė J. R. Jassas ir bendraautorai [74]: jie išskyrė SŽN, kuriems būdingi ekspansyvus (tolygus, „stumiantis“ aplinkinius audinius) ir infiltruojantis (netolygus, „židininis“, sunkiai atskiriamas vizualiai) naviko augimo frontai. Infiltruojančio augimo pobūdžio navikai sieti su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Vėlesni SŽV tyrimai patvirtino nepriklausomą infiltruojančio augimo fronto, taip pat ir pumpuravimosi židinių sąsają su naviko progresavimu ir metastazavimu į kepenis [6, 75, 76, 223]. Šiame tyrime SŽN infiltruojantis augimo frontas buvo blogos prognozės veiksnys

MSS navikų pogrupyje (3.17 pav. B). Tokia pati tendencija pastebėta ir MSI navikų pogrupyje, kuriame dominavo navikai, išsiskiriantys ekspansyviu augimo frontu (3.17 pav. C). Taigi naviko augimo pobūdžio kriterijų derinant su CD8–CD20 imunogradientu, sudarytas imuninės sąveikos įvertis, kuris tiriamųjų pacientų imtyje išskyrė keturias prognozinės grupes pagal 94 proc., 73 proc., 53 proc. ir 19 proc. 5 m. bendrojo išgyvenamumo tikimybes (3.18 pav., B). Pacientai, kurių navikai pagal šį įvertį buvo priskirti 0 taškų kategorijai (žemi CD8 ir CD20 imunogradientai ir infiltruojantis naviko augimo frontas), buvo blogiausios prognozės grupėje tiek MSS, tiek MSI navikų atveju, t. y. išskirtos atitinkamai 30 proc. ir 0 proc. 3 m. išgyvenamumo tikimybės (3.18 pav., D ir F). Esama duomenų, kad tarp infiltruojančio naviko augimo fronto ir imuninių ląstelių infiltrato naviko mikroaplinkoje gali būti pastebima atvirkštinė koreliacija SŽV ir kitų vėžio atmainų atvejais [224, 225], tačiau mūsų atliktas tyrimas rodo, kad naviko augimo pobūdžio kriterijus imuninio atsako kontekste išlaiko nepriklausomą prognozinę vertę. Tikėtina, kad standartizuotos kiekybinės naviko augimo fronto netolygumo vertinimo metodikos galėtų suteikti vertingos pridėtinės prognozinės informacijos.

Apskritai daugėja tyrimų, kuriais antinavikinis imuninis atsakas vertinamas derinant ne tik skirtingus imunologinius, bet ir histopatologinius naviko žymenis. Vieni pirmųjų tokios kombinacijos SŽV prognozinis modelius, tirdami navikų mikrogardeles, pasiūlė I. Zlobec ir bendraautoriai [226, 227]: CD8+ T ląstelių nebuvimas, infiltruojantis naviko augimo frontas ir navikinių ląstelių išplitimas į sritinius limfmazgius susieti su didžiausia ligos atsinaujinimo rizika. Minėtina, kad CD8+ limfocitų–naviko pumpuravimosi indeksas buvo stiprus nepriklausomas prognozinis veiksnys. Vis dėlto pasiūlyti prognoziniai modeliai nebuvo pritaikyti MSI navikams. Neseniai kiti tyrėjai pristatė *Bayrueth* įvertį, paremtą SŽN hematoksilino-eozino preparatų analize ir sujungusį NIL tankio, naviko diferenciacijos laipsnio ir pumpuravimosi kriterijus [228].

Aptartieji prognoziniai modeliai sudaryti naudojant pusiau kiekybinius, vizualių vertinimų pagrįstus metodus. Vis dėlto skaitmeninės vaizdo analizės metodai yra tikslesni ir leidžia kombinuoti ne tik kiekybinius, bet ir erdvinius naviko mikroaplinkos aspektus. I. P. Nearchou ir bendraautoriai analizavo II stadijos SŽV sergančių pacientų navikų mėginių imunofluorescencinius preparatus ir nustatė tris nepriklausomus prognozinis veiksnis (vidutinį CD3+ T ląstelių tankį visame navike (naviko IK ir šerdyje), vidutinį limfocitų, išsidėsčiusių 50 μm spinduliu aplink naviko pumpurus, skaičių bei CD68+ ir CD163+ ląstelių tankių santykį naviko šerdyje), kuriuos sujungė į erdvinį imunoonkologijos indeksą;

šis rodiklis patikimai stratifikavo pacientus trijose nepriklausomose II stadijos SŽV pacientų imtyse [38, 39]. Disertacijoje pristatomi kombinuoti prognoziniai modeliai taip pat integruoja kelių imuninių ląstelių tipų pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje ir naviko histopatologines ypatybes, bet remiasi kita erdvinės skaitmeninės vaizdo analizės metodika. CD8–CD20 imunogrado ir imuninės sąveikos modeliai savo prognozinė galia pranoko TNM kriterijus ir MSI požymius, todėl galima teigti, kad tai stiprūs prognoziniai (predikciniai) žymenys-kandidatai.

4.4. Tyrimo tęstinumas

Tiesiogiai palyginti imuniniam atsakui SŽV mikroaplinkoje vertinti validuotos *Immunoscore*® ir disertacijoje pasiūlytos naviko ir stromos sąveikos zonos imunogrado metodikos šiandien negalime dėl keleto priežasčių: *Immunoscore*® įvertis yra paremtas kitais IHC žymenų (CD3 ir CD8) deriniu, be to, visi šios metodikos etapai – nuo IHC dažymo iki mikroskopinių stiklų skenavimo ir skaitmeninės vaizdo analizės – atliekami pagal optimizuotus protokolus, kurie nėra viešai prieinami. *Immunoscore*® įverčiai remiasi slenkstinėmis vertėmis, tiriant dideles pacientų imtis, taigi, siekiant kalbamąsias metodikas palyginti, reikėtų tirti tas pačias pacientų imtis [192]. Minėtina, kad atskirų tyrėjų rankiniu būdu išskirtas naviko IK gali skirtis ir, tai svarbiausia, gali neatitikti *Immunoscore*® metodikos kriterijų IK nustatyti. Tai taip pat gali būti reikšminga lyginamosios analizės rezultatams. Apskritai, bet kurioms skaitmeninės vaizdo analizės metodikoms lyginti geriausiai tinka „atvirojo iššūkio“ (angl. *open challenge*) programos, kurių metu tyrėjai nepriklausomai vieni nuo kitų skirtingais metodais gali ištirti tas pačias pacientų imtis ir palyginti rezultatus pagal tiksliai apibrėžtus sutartinius kriterijus. Nepaisant minėtų aspektų, netiesioginis *Immunoscore*® ir sąveikos zonos imunogrado prognozinės galios palyginimas pagal publikuotus rezultatus rodo ne mažiau negu lygiavertį abiejų metodikų potencialą.

Techniškai naviko ir stromos sąveikos zonos imunogrado metodas gali būti diegiamas kaip analitinė duomenų apdorojimo priemonė visose laboratorijose, kuriose prieinamos skaitmeninės vaizdo analizės platformos. Vis dėlto, siekiant metodo pritaikymo kasdienėje praktikoje, būtini tolesni klinikiniai tyrimai didesnėse SŽV sergančių pacientų imtyse. Disertacijoje pristatyta histologinio naviko augimo pobūdžio kriterijaus pridėtinė prognozinė vertė turėtų būti tikslinama, įvedant standartizuotas kiekybines naviko augimo fronto netolygumo vertinimo metodikas, kurios dar tik kuriamos.

IŠVADOS

1. Imuniniam atsakui vėžio mikroaplinkoje vertinti sukurta skaitmeninės patologijos metodika, pagrįsta vaizdo analizės duomenų apdorojimu erdvinės šešiakampių gardelių analitikos principais. Šia metodika automatizuotai nustatoma naviko ir stromos sąveikos zona ir joje kiekybiškai įvertinamas imuninių ląstelių absoliutus tankis bei tankio gradientas (imunogradientas) link naviko, matuojamas masės centro ir imunonuokryčio rodikliais.
2. Imuninio atsako rodiklių prognozinė vertė įvertinta dviejose nepriklausomose SŽV sergančių pacientų imtyse:
 - 2.1. Vilniaus pacientų imtyje, prognozuojant bendrąjį išgyvenamumą, CD8 imunogradientas turėjo stipriausią nepriklausomą vertę pacientų amžiaus bei pirminio naviko išplitimo kontekste ir pranoko absoliutaus NIL tankio naviko mikroaplinkoje rodiklius.
 - 2.2. Notingamo pacientų imtyje, prognozuojant bendrąjį išgyvenamumą, CD8 imunogradientas ir CD20 imunogradientas buvo nepriklausomi veiksniai. Iš visų tirtų klinikinių, patologinių ir molekulinų rodiklių histologinis naviko augimo pobūdis buvo vienintelis kriterijus, kuris turėjo nepriklausomą vertę ir sustiprino prognozinį modelį. Minėti veiksniai pranoko absoliutaus NIL tankio ir CD68 imunogradiento naviko mikroaplinkoje rodiklius.
3. Notingamo pacientų imtyje sudaryti kombinuoti nepriklausomi įverčiai:
 - 1) CD8–CD20 imunogradiento įvertis, pagrįstas tik CD8 ir CD20 IHC žymenimis, leidžia patikimai stratifikuoti SŽV sergančius pacientus į 3 prognozes grupes, nepriklausomai nuo naviko MSI požymių;
 - 2) imuninės sąveikos įvertis, pagrįstas trimis rodikliais (CD8 ir CD20 imunogradientais ir histologiniu naviko augimo pobūdžiu), leidžia patikimai stratifikuoti SŽV sergančius pacientus į 4 prognozes grupes ir, nepriklausomai nuo naviko MSI požymių, išskirti pacientus, kuriems kyla didžiausia mirties rizika.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Į klinikinę praktiką siekiant įdiegti naviko ir stromos sąveikos zonos imunogradientu pagrįstus prognozinis modelius, jų vertė turi būti patvirtinta didesnėse SŽV sergančių pacientų imtyse.
2. Naviko ir stromos sąveikos zonos imunogradiento rodiklius rekomenduojama įtraukti į naviko mikroaplinkos tyrimus kaip galimus prognozinis (predikcinius) imuninio atsako rodiklius esant ir kitoms vėžio atmainoms.

PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

Darbo rezultatai paskelbti recenzuojamuose mokslo leidiniuose, turinčiuose citavimo indeksą (IF) *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje.

Publikacijos disertacijos tema:

1. Rasmusson A, Žilėnaitė D, **Nestarenkaitė A**, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection. *Am J Pathol*, 2020; 190(6): 1309–1322. [IF₂₀₁₉ 3.49, Q1]
2. **Nestarenkaitė A**, Fadhil W, Rasmusson A, Susanti S, Hadjimichael E, Laurinavičienė A, Ilyas M, Laurinavičius A. Immuno-Interface Score to Predict Outcome in Colorectal Cancer Independent of Microsatellite Instability Status. *Cancers (Basel)*, 2020; 12(10): 2902. [IF₂₀₁₉ 6.13, Q1]

Kitos su moksliniu darbu susijusios publikacijos:

1. Susanti S, Fadhil W, Ebili HO, Asiri A, **Nestarenkaitė A**, Hadjimichael E, Ham-Karim HA, Field J, Stafford K, Matharoo-Ball B, Hassall JC, Sharif A, Oniscu A, Ilyas M. N_LyST: a simple and rapid screening test for Lynch syndrome. *J Clin Pathol*, 2018; 71(8): 713–720. [IF₂₀₁₇ 2.89, Q2]

Žodinis ir standinis pranešimas konferencijoje:

1. **Nestarenkaitė A**, Rasmusson A, Žilėnaitė D, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Prognostic value of CD8 Immunogradient indicators in tumour-stroma interface zone of colorectal cancer. 31-asis Europos patologų kongresas, 2019, Nica, Prancūzija. *Virchows Archiv* 475(1). Heidelberg: Springer, 2019, p. 206–207. ISSN 0945-6317. eISSN 1432-2307.

Kiti standiniai pranešimai konferencijose:

1. **Nestarenkaitė A**, Rasmusson A, Žilėnaitė D, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Prognostic value of CD8 Immunogradient indicators in tumour-stroma interface

zone of colorectal cancer. 25-asis tarptautinis vėžio tyrimų ir onkologijos susitikimas, 2019, Roma, Italija.

2. Žilėnaitė D, Rasmusson A, **Nestarenkaitė A**, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. The Immunogradient of CD8+ cell density in the tumour-stroma interface zone predicts overall survival of patients with hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. 25-asis tarptautinis vėžio tyrimų ir onkologijos susitikimas, 2019, Roma, Italija.
3. Žilėnaitė D, Rasmusson A, **Nestarenkaitė A**, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. The Immunogradient of CD8+ cell density in the tumour-stroma interface zone predicts overall survival of patients with hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. 31-asis Europos patologų kongresas, 2019, Nica, Prancūzija. Virchows Archiv 475(1). Heidelberg: Springer, 2019, p. 80–81. ISSN 0945-6317. eISSN 1432-2307.

Patentinė paraiška:

Vilniaus universiteto pateiktos Lietuvos (Nr. LT2019509) ir tarptautinė (Nr. PCT/IB2020/053396, Pasaulinės intelektinės nuosavybės organizacijos tarptautinis biuras) patentinės paraiškos: Laurinavičius A, Rasmusson A, Žilėnaitė D, **Nestarenkaitė A**, Augulis R. Automatizuotas naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas, skirtas antinavikinio atsako įvertinimui naudojant Imunogradiento rodiklius (angl. Automated Tumour-Stroma Interface Zone Detection for Anti-Tumour Response Assessment by Immunogradient Indicators).

Stažuotė:

2 mėn. stažuotė (2017 m.) NUH QMC Molekulinės patologijos skyriuje (Notingamas, Jungtinė Karalystė), įgyvendinant veiklas pagal „Marijos Sklodovskos-Kiuri veiksmų“ programą (IAPP Marie Curie Action EU Framework programme “AIDPATH: Academia and Industry Collaboration for Digital Pathology”).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Xie YH, Chen YX, Fang JY. 2020. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther* 5(1): 22.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394–424.
3. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. 2018. Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int J Mol Sci* 19(12): 3733.
4. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. 2017. *International Union Against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th edition. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell. ISBN-13: 978-1-119-26357-9
5. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. 2018. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res* 11(4): 264–273.
6. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, et al. 2017. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 30(9): 1299–1311.
7. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. 2015. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol* 30(9): 1059–1067.
8. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. 2017. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 17(4): 268.
9. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, Phipps AI, Tejpar S, et al. 2017. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol* 28(5): 1023–1031.
10. Park JH, McMillan DC, Powell AG, Richards CH, Horgan PG, et al. 2015. Evaluation of a tumor microenvironment-based prognostic score in primary operable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 21(4): 882–888.
11. Zhai Z, Yu X, Yang B, Zhang Y, Zhang L, et al. 2017. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: Clinical implications, challenges and solutions for treatment resistance. *Semin Cell Dev Biol* 64: 107–115.

12. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Markowitz AJ, Chung DC, et al. 2018. NCCN Guidelines Insights: Colorectal Cancer Screening, Version 1.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 16(8): 939–949.
13. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. 2014. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 109(8): 1159–1179.
14. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, et al. 2016. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 27(8): 1386–1422.
15. Kopetz S, Grothey A, Tabernero J. 2020. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. Reply. *N Engl J Med* 382(9): 877–878.
16. Sharif S, O’Connell MJ. 2012. Gene Signatures in Stage II Colon Cancer: A Clinical Review. *Curr Colorectal Cancer Rep* 8(3): 225–231.
17. Hanahan D, Coussens LM. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3): 309–322.
18. Labani-Motlagh A, Ashja-Mahdavi M, Loskog A. 2020. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* 11: 940.
19. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. 2015. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 15(11): 669–682.
20. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, et al. 2009. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(35): 5944–5951.
21. Plesca I, Tunger A, Muller L, Wehner R, Lai X, et al. 2020. Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Immunol* 11: 364.
22. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Lustberg M, et al. 2018. PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *Breast J* 24(6): 911–919.
23. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, et al. 2017. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group. Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ,

- Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol* 24(5): 235–251.
24. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, et al. 2017. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol* 24(5): 311–335.
 25. Galon J, Fridman WH, Pages F. 2007. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res* 67(5): 1883–1886.
 26. Bosisio FM, Antoranz A, van Herck Y, Bolognesi MM, Marcelis L, et al. 2020. Functional heterogeneity of lymphocytic patterns in primary melanoma dissected through single-cell multiplexing. *eLife* 9: e53008.
 27. Corredor G, Wang X, Zhou Y, Lu C, Fu P, et al. 2019. Spatial Architecture and Arrangement of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Predicting Likelihood of Recurrence in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 25(5): 1526–1534.
 28. Yuan Y. 2015. Modelling the spatial heterogeneity and molecular correlates of lymphocytic infiltration in triple-negative breast cancer. *J R Soc Interface* 12.
 29. Kloor M, von Knebel Doeberitz M. 2016. The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. *Trends Cancer* 2(3): 121–133.
 30. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. 2019. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 25(13): 3753–3758.
 31. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, et al. 2019. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 30(8): 1232–1243.
 32. Andre T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, et al. 2020. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 383(23): 2207–2218.
 33. Asaoka Y, Ijichi H, Koike K. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 373(20): 1979.
 34. Yoon HH, Shi Q, Heying EN, Muranyi A, Bredno J, et al. 2019. Intertumoral Heterogeneity of CD3(+) and CD8(+) T-Cell Densities in the Microenvironment of DNA Mismatch-Repair-Deficient Colon Cancers: Implications for Prognosis. *Clin Cancer Res* 25(1): 125–133.

35. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, et al. 2012. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10: 205.
36. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, et al. 2016. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44(3): 698–711.
37. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, et al. 2018. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391: 2128–2139.
38. Nearchou IP, Gwyther BM, Georgiakakis ECT, Gavriel CG, Lillard K, et al. 2020. Spatial immune profiling of the colorectal tumor microenvironment predicts good outcome in stage II patients. *NPJ Digit Med* 3: 71.
39. Nearchou IP, Lillard K, Gavriel CG, Ueno H, Harrison DJ, Caie PD. 2019. Automated Analysis of Lymphocytic Infiltration, Tumor Budding, and Their Spatial Relationship Improves Prognostic Accuracy in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res* 7(4): 609–620.
40. Lazarus J, Maj T, Smith JJ, Perusina Lanfranca M, Rao A, et al. 2018. Spatial and phenotypic immune profiling of metastatic colon cancer. *JCI Insight* 3(22): e121932.
41. Gide TN, Silva IP, Quek C, Ahmed T, Menzies AM, et al. 2020. Close proximity of immune and tumor cells underlies response to anti-PD-1 based therapies in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* 9(1): 1659093.
42. Enfield KSS, Martin SD, Marshall EA, Kung SHY, Gallagher P, et al. 2019. Hyperspectral cell sociology reveals spatial tumor-immune cell interactions associated with lung cancer recurrence. *J Immunother Cancer* 7(1): 13.
43. Wang H, Jiang Y, Li B, Cui Y, Li D, Li R. 2020. Single-Cell Spatial Analysis of Tumor and Immune Microenvironment on Whole-Slide Image Reveals Hepatocellular Carcinoma Subtypes. *Cancers (Basel)* 12(12): 3562.
44. Pang SW, Awi NJ, Armon S, Lim WW, Low JS, et al. 2019. Current Update of Laboratory Molecular Diagnostics Advancement in Management of Colorectal Cancer (CRC). *Diagnostics (Basel)* 10(1): 9.
45. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66(4): 683–691.
46. Magalhaes B, Peleteiro B, Lunet N. 2012. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 21(1): 15–23.

47. Wiseman M. 2008. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc* 67(3): 253–256.
48. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi RE, Corcione F. 2016. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates Surg* 68(1): 7–11.
49. Dulskas A, Gaizauskas V, Kildusiene I, Samalavicius NE, Smailyte G. 2020. Improvement of Survival over Time for Colorectal Cancer Patients: A Population-Based Study. *J Clin Med* 9(12): 4038.
50. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. 2016. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer* 35: 4.
51. Tariq K, Ghias K. 2016. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* 13(1): 120–135.
52. Boland CR, Goel A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2073–2087.e3.
53. Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–767.
54. Nguyen HT, Duong HQ. 2018. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett* 16(1): 9–18.
55. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10(7): 721–733.
56. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. 2002. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 89(7): 845–860.
57. Galiatsatos P, Foulkes WD. 2006. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101(2): 385–398.
58. Mills SE. 2006. *Histology for Pathologists*. 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-1-4511-1303-7.
59. Bosman FC, Carneiro F, Hruban R, Theise N. 2019. *Digestive System Tumours. WHO Classification of Tumours*. 5th ed. World Health Organization: Geneva, Switzerland, vol. 1. ISBN 13-978-92-832-4499-8. (Print Book)
60. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. 2010. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med* 134(6): 837–852.
61. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, et al. 2016. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 27(2): 225–232.
62. Liu Q, Luo D, Cai S, Li Q, Li X. 2018. P-TNM staging system for colon cancer: combination of P-stage and AJCC TNM staging system for improving prognostic prediction and clinical management. *Cancer Manag Res* 10: 2303–2314.

63. Brierley J, Gospodarowicz M, O'Sullivan B. 2016. The principles of cancer staging. *Ecancermedicalscience* 10: ed61.
64. Boeckx N, Koukakis R, Op de Beeck K, Rolfo C, Van Camp G, et al. 2017. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Ann Oncol* 28(8): 1862–1868.
65. Gallois C, Pernet S, Zaanan A, Taieb J. 2018. Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs* 78(8): 789–798.
66. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, et al. 2012. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut* 61(6): 847–854.
67. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 3(3): 153–173.
68. Derwinger K, Kodeda K, Bexe-Lindskog E, Taflin H. 2010. Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol* 49(1): 57–62.
69. Compton CC. 1999. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis* 17(2): 67–79.
70. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Domati F, Tuccari G. 2015. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum Pathol* 46(11): 1722–1729.
71. Yuan H, Dong Q, Zheng B, Hu X, Xu JB, Tu S. 2017. Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8(28): 46565–46579.
72. Jiang HH, Zhang ZY, Wang XY, Tang X, Liu HL, et al. 2019. Prognostic significance of lymphovascular invasion in colorectal cancer and its association with genomic alterations. *World J Gastroenterol* 25(20): 2489–2502.
73. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, Wang Y. 2015. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 211(11): 839–844.
74. Jass JR, Love SB, Northover JM. 1987. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1(8545): 1303–1306.
75. Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, Mino-Kenudson M, Hornick JL, et al. 2012. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 19(6): 1944–1953.
76. Pinheiro RS, Herman P, Lupinacci RM, Lai Q, Mello ES, et al. 2014. Tumor growth pattern as predictor of colorectal liver metastasis recurrence. *Am J Surg* 207(4): 493–498.

77. Koelzer VH, Lugli A. 2014. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol* 4: 29.
78. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. 2016. Tumor budding in colorectal cancer – ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 47(1): 4–19.
79. Jass JR. 1986. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 39(6): 585–589.
80. Park CK, Kim SK. 2017. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 8(9): 14759–14769.
81. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795): 1960–1964.
82. Castaneda CA, Castillo M, Aliaga K, Bernabe LA, Casavilca S, et al. 2019. Level of tumor-infiltrating lymphocytes and density of infiltrating immune cells in different malignancies. *Biomark Med* 13(17): 1481–1491.
83. Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, et al. 2016. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol* 7: 407.
84. Kim JH, Kim KJ, Bae JM, Rhee YY, Cho NY, et al. 2015. Comparative validation of assessment criteria for Crohn-like lymphoid reaction in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 68(1): 22–28.
85. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. 2009. The cancer genome. *Nature* 458: 719–724.
86. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339(6127): 1546–1558.
87. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, et al. 2015. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med* 21(8): 846–853.
88. Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330–337.
89. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. 2016. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch* 469(2): 125–134.
90. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, et al. 2015. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21: 1350–1356.
91. Mooi JK, Wirapati P, Asher R, Lee CK, Savas P, et al. 2018. The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its

- predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol* 29(11): 2240–2246.
92. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. 2017. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 17(2): 79–92.
 93. Kannarkatt J, Joseph J, Kurniali PC, Al-Janadi A, Hrinczenko B. 2017. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer: A Clinical Dilemma. *J Oncol Pract* 13(4): 233–241.
 94. Hammond WA, Swaika A, Mody K. 2016. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 8(1): 57–84.
 95. Xu Z, Becerra AZ, Fleming FJ, Aquina CT, Dolan JG, et al. 2019. Treatments for Stage IV Colon Cancer and Overall Survival. *J Surg Res* 242: 47–54.
 96. Auclin E, Zaanan A, Vernerey D, Douard R, Gallois C, et al. 2017. Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy. *Ann Oncol* 28(5): 958–968.
 97. Brenner H, Kloor M, Pox CP. 2014. Colorectal cancer. *Lancet* 383(9927): 1490–1502.
 98. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, et al. 2019. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci* 9: 97.
 99. Wang Y, Loree JM, Yu C, Tschautscher M, Briggler AM, et al. 2018. Distinct impacts of KRAS, NRAS and BRAF mutations on survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 36(15): 3513–3513.
 100. Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. 2020. BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. *Cancers (Basel)* 12(11): 3236.
 101. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, et al. 2016. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *J Clin Oncol* 34(2): 179–185.
 102. Wang Q, Shi YL, Zhou K, Wang LL, Yan ZX, et al. 2018. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 9: 739–749.
 103. Jin J, Shi Y, Zhang S, Yang S. 2020. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-Analysis. *Acta Oncol* 59: 66–74.
 104. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70.

105. Falcone I, Conciatori F, Bazzichetto C, Ferretti G, Cognetti F, et al. 2020. Tumor Microenvironment: Implications in Melanoma Resistance to Targeted Therapy and Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 12(10): 2870.
106. Sabnis AJ, Bivona TG. 2019. Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. *Trends Mol Med* 25(3): 185–197.
107. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646–674.
108. Eble JA, Niland S. 2019. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 36(3): 171–198.
109. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12(4): 298–306.
110. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 18(1): 84.
111. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, et al. 2019. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 12: 86.
112. Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel Medina M. 2004. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61(17): 2224–2243.
113. Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ, Werb Z. 2020. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* 11(1): 5120.
114. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, et al. 2018. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 24(5): 541–550.
115. Henke E, Nandigama R, Ergun S. 2019. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci* 6: 160.
116. Zhou ZH, Ji CD, Xiao HL, Zhao HB, Cui YH, Bian XW. 2017. Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. *J Cancer* 8(8): 1466–1476.
117. Idos GE, Kwok J, Bonthala N, Kysh L, Gruber SB, Qu C. 2020. The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep* 10: 3360.
118. Shalapour S, Karin M. 2015. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* 125(9): 3347–3355.
119. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. 2011. T cell subsets and T cell-mediated immunity. F. P. Nijkamp and

- M. J. Parnham (eds.) *Principles of Immunopharmacology*. 3rd revised and extended edition. DOI: 10.1007/978-3-0346-0136-8_2, Springer Basel AG.
120. Guo FF, Cui JW. 2019. The Role of Tumor-Infiltrating B Cells in Tumor Immunity. *J Oncol* 2019: 2592419.
 121. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. 2020. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 19(1): 120.
 122. Edin S, Kaprio T, Hagstrom J, Larsson P, Mustonen H, et al. 2019. The Prognostic Importance of CD20(+) B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets. *Sci Rep-Uk* 9(1): 19997.
 123. Schumacher TN, Schreiber RD. 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348(6230): 69–74.
 124. Yarchoan M, Johnson BA, 3rd, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. 2017. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nature reviews. Cancer* 17(9): 569.
 125. Tian S, Roepman P, Popovici V, Michaut M, Majewski I, et al. 2012. A robust genomic signature for the detection of colorectal cancer patients with microsatellite instability phenotype and high mutation frequency. *J Pathol* 228(4): 586–595.
 126. Tougeron D, Fauquemberg E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesboue R, et al. 2009. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol* 22: 1186–1195.
 127. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, et al. 2015. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res* 75(17): 3446–3455.
 128. Boissiere-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, et al. 2014. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-instable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 3: e29256.
 129. Popat S, Hubner R, Houlston RS. 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23(3): 609–618.
 130. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. 2010. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 46(15): 2788–2798.
 131. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, et al. 2015. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 5(1): 43–51.

132. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, et al. 2018. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 36(8): 773–779.
133. Decker WK, Safdar A. 2009. Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley’s legacy revisited. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(4): 271–281.
134. Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, Tefany FJ, Barnetson RS. 1995. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World J Surg* 19(3): 352–358.
135. Lohmueller J, Finn OJ. 2017. Current modalities in cancer immunotherapy: Immunomodulatory antibodies, CARs and vaccines. *Pharmacol Ther* 178: 31–47.
136. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, et al. 2015. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 33(17): 1889–1894.
137. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, et al. 2019. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann Oncol* 30(4): 582–588.
138. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20(11): 651–668.
139. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. 2020. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)* 12(3): 738.
140. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, et al. 2007. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 30(8): 825–830.
141. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, et al. 2012. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 30(17): 2046–2054.
142. Fares CM, Van Allen EM, Drake CG, Allison JP, Hu-Lieskovan S. 2019. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 39: 147–164.
143. Liu D, Jenkins RW, Sullivan RJ. 2019. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Am J Clin Dermatol* 20(1): 41–54.
144. Rotte A. 2019. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 255.

145. Aref AR, Campisi M, Ivanova E, Portell A, Larios D, et al. 2018. 3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab Chip* 18(20): 3129–3143.
146. Marmorino F, Boccaccino A, Germani MM, Falcone A, Cremolini C. 2020. Immune Checkpoint Inhibitors in pMMR Metastatic Colorectal Cancer: A Tough Challenge. *Cancers (Basel)* 12(8): 2317.
147. Saiki Y, Ohtani H, Naito Y, Miyazawa M, Nagura H. 1996. Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. *Lab Invest* 75(1): 67–76.
148. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, et al. 1998. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58(16): 3491–3494.
149. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, et al. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353(25): 2654–2666.
150. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. 2016. CANCER IMMUNOLOGY. The “cancer immunogram”. *Science* 352(6286): 658–660.
151. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, et al. 2015. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 26(2): 259–271.
152. Schatton T, Scolyer RA, Thompson JF, Mihm MC, Jr. 2014. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol* 1102: 287–324.
153. Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, Vare PO, Melkko J, et al. 2005. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 41(17): 2645–2654.
154. Brunye TT, Mercan E, Weaver DL, Elmore JG. 2017. Accuracy is in the eyes of the pathologist: The visual interpretive process and diagnostic accuracy with digital whole slide images. *J Biomed Inform* 66: 171–179.
155. Tramm T, Di Caterino T, Jylling AB, Lelkaitis G, Laenkholm AV, et al. 2018. Standardized assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: an evaluation of inter-observer agreement between pathologists. *Acta Oncol* 57(1): 90–94.
156. Tellez D, Balkenhol M, Otte-Holler I, van de Loo R, Vogels R, et al. 2018. Whole-Slide Mitosis Detection in H&E Breast Histology Using PHH3 as a Reference to Train Distilled Stain-Invariant Convolutional Networks. *IEEE Trans Med Imaging* 12.
157. Pham HHN, Futakuchi M, Bychkov A, Furukawa T, Kuroda K, Fukuoka J. 2019. Detection of Lung Cancer Lymph Node

- Metastases from Whole-Slide Histopathologic Images Using a Two-Step Deep Learning Approach. *Am J Pathol* 189(12): 2428–2439.
158. Pinto ML, Rios E, Duraes C, Ribeiro R, Machado JC, et al. 2019. The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front Immunol* 10: 1875.
159. Keikhosravi A, Li B, Liu Y, Conklin MW, Loeffler AG, Eliceiri KW. 2020. Non-disruptive collagen characterization in clinical histopathology using cross-modality image synthesis. *Commun Biol* 3(1): 414.
160. Yu Y, Wang J, Ng CW, Ma Y, Mo S, et al. 2018. Deep learning enables automated scoring of liver fibrosis stages. *Sci Rep* 8: 16016.
161. Bulten W, Pinckaers H, van Boven H, Vink R, de Bel T, et al. 2020. Automated deep-learning system for Gleason grading of prostate cancer using biopsies: a diagnostic study. *Lancet Oncol* 21(2): 233–241.
162. Rawat RR, Ortega I, Roy P, Sha F, Shibata D, et al. 2020. Deep learned tissue “fingerprints” classify breast cancers by ER/PR/Her2 status from H&E images. *Sci Rep* 10: 7275.
163. Hegde PS, Chen DS. 2020. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* 52(1): 17–35.
164. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. 2016. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res* 22(8): 1865–1874.
165. Saltz J, Gupta R, Hou L, Kurc T, Singh P, et al. 2018. Spatial Organization and Molecular Correlation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Using Deep Learning on Pathology Images. *Cell Rep* 23: 181–193.e7.
166. Bull JA, Macklin PS, Quaiser T, Braun F, Waters SL, et al. 2020. Combining multiple spatial statistics enhances the description of immune cell localisation within tumours. *Sci Rep* 10(1): 18624.
167. Tunstall K. 2016. Quantifying immune cells in the tumor microenvironment using HALO® spatial analysis tools. *Indica Labs*.
168. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, et al. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7: 16878.
169. Brieu N, Gavriel CG, Nearchou IP, Harrison DJ, Schmidt G, Caie PD. 2019. Automated tumour budding quantification by machine learning augments TNM staging in muscle-invasive bladder cancer prognosis. *Sci Rep* 9(1): 5174.
170. Parra ER, Francisco-Cruz A, Wistuba II. 2019. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers (Basel)* 11(2): 247.
171. Tahkola K, Leppanen J, Ahtiainen M, Vayrynen J, Haapasaari KM, et al. 2019. Immune cell score in pancreatic cancer-comparison of

- hotspot and whole-section techniques. *Virchows Arch* 474(6): 691–699.
172. Harder N, Athelougou M, Hessel H, Brieu N, Yigitsoy M, et al. 2018. Tissue Phenomics for prognostic biomarker discovery in low- and intermediate-risk prostate cancer. *Sci Rep* 8(1): 4470.
173. Nagl S, Haas M, Lahmer G, Buttner-Herold M, Grabenbauer GG, et al. 2016. Cell-to-cell distances between tumor-infiltrating inflammatory cells have the potential to distinguish functionally active from suppressed inflammatory cells. *Oncoimmunology* 5(5): e1127494.
174. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pages F. 2016. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol* 28(8): 373–382.
175. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, et al. 2014. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 7(9): 2828–2835.
176. Susanti S, Fadhil W, Murtaza S, Hassall JC, Ebili HO, et al. 2019. Positive association of PIK3CA mutation with KRAS mutation but not BRAF mutation in colorectal cancer suggests co-selection is gene specific but not pathway specific. *J Clin Pathol* 72(3): 263–264.
177. Susanti S, Fadhil W, Ebili HO, Asiri A, Nestarenkaite A, et al. 2018. N_LyST: a simple and rapid screening test for Lynch syndrome. *J Clin Pathol* 71(8): 713–720.
178. Ward RL, Dobbins T, Lindor NM, Rapkins RW, Hitchins MP. 2013. Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry. *Genet Med* 15(1): 25–35.
179. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, et al. 2017. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod Pathol* 30(3): 440–447.
180. Plancoulaine B, Laurinaviciene A, Herlin P, Besusparis J, Meskauskas R, et al. 2015. A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Arch* 467: 711–722.
181. Rasmusson A, Zilenaite D, Nestarenkaite A, Augulis R, Laurinaviciene A, et al. 2020. Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection. *Am J Pathol* 190(6): 1309–1322.

182. Rushing C, Bulusu A, Hurwitz HI, Nixon AB, Pang H. 2015. A leave-one-out cross-validation SAS macro for the identification of markers associated with survival. *Comput Biol Med* 57: 123–129.
183. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, et al. 2012. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. *PLoS One* 7(12): e51862.
184. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. 2012. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 106: 1713–1717.
185. Lanitis E, Dangaj D, Irving M, Coukos G. 2017. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. *Ann Oncol* 28(suppl_12): xii18–xii32.
186. Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, et al. 2003. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 97(6): 1421–1427.
187. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, et al. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38(7): 787–793.
188. Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, et al. 2007. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 133(1): 48–56.
189. Narayanan S, Kawaguchi T, Peng X, Qi Q, Liu S, et al. 2019. Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. *Sci Rep* 9(1): 13455.
190. Nestarenkaite A, Fadhil W, Rasmusson A, Susanti S, Hadjimichael E, et al. 2020. Immuno-Interface Score to Predict Outcome in Colorectal Cancer Independent of Microsatellite Instability Status. *Cancers (Basel)* 12(10): 2902.
191. Hermitte F. 2016. Biomarkers immune monitoring technology primer: Immunoscore(R) Colon. *J Immunother Cancer* 4: 57.
192. Angell HK, Bruni D, Barrett JC, Herbst R, Galon J. 2020. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin Cancer Res* 26(2): 332–339.
193. Weis CA, Kather JN, Melchers S, Al-Ahmdi H, Pollheimer MJ, et al. 2018. Automatic evaluation of tumor budding in immunohistochemically stained colorectal carcinomas and correlation to clinical outcome. *Diagn Pathol* 13(1): 64.
194. Lechner A, Schlosser H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, et al. 2017. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8(27): 44418–44433.

195. Massi D, Rulli E, Cossa M, Valeri B, Rodolfo M, et al. 2019. The density and spatial tissue distribution of CD8(+) and CD163(+) immune cells predict response and outcome in melanoma patients receiving MAPK inhibitors. *J Immunother Cancer* 7: 308.
196. Kather JN, Suarez-Carmona M, Charoentong P, Weis CA, Hirsch D, et al. 2018. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* 7: e36967.
197. Li X, Grusso T, Zuo D, Omeroglu A, Meterissian S, et al. 2019. Infiltration of CD8(+) T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(9): 3678–3687.
198. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y. 2015. Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol* 28(12): 1621.
199. Shaban M, Khurram SA, Fraz MM, Alsubaie N, Masood I, et al. 2019. A Novel Digital Score for Abundance of Tumour Infiltrating Lymphocytes Predicts Disease Free Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep* 9: 13341.
200. Schwen LO, Andersson E, Korski K, Weiss N, Haase S, et al. 2018. Data-Driven Discovery of Immune Contexture Biomarkers. *Front Oncol* 8: 627.
201. Marliot F, Chen X, Kirilovsky A, Sbarrato T, El Sissy C, et al. 2020. Analytical validation of the Immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. *J Immunother Cancer* 8(1): e000272.
202. Sharma S, Mehra R. 2020. Conventional Machine Learning and Deep Learning Approach for Multi-Classification of Breast Cancer Histopathology Images-a Comparative Insight. *J Digit Imaging* 33(3): 632–654.
203. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, et al. 2016. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* 8(327): 327ra26.
204. Bordry N, Broggi MAS, de Jonge K, Schaeuble K, Gannon PO, et al. 2018. Lymphatic vessel density is associated with CD8(+) T cell infiltration and immunosuppressive factors in human melanoma. *Oncoimmunology* 7(8): e1462878.
205. Berthel A, Zoernig I, Valous NA, Kahlert C, Klupp F, et al. 2017. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncoimmunology* 6(3): e1286436.
206. Allard MA, Bachet JB, Beauchet A, Julie C, Malafosse R, et al. 2012. Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: a reproducible method, developed with colorectal cancer

- tissues, for assessing a highly variable prognostic factor. *Diagn Pathol* 7: 156.
207. Luen S, Virassamy B, Savas P, Salgado R, Loi S. 2016. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast* 29: 241–250.
 208. Wouters MCA, Nelson BH. 2018. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res* 24(24): 6125–6135.
 209. Berntsson J, Nodin B, Eberhard J, Micke P, Jirstrom K. 2016. Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int J Cancer* 139(5): 1129–1139.
 210. Meshcheryakova A, Tamandl D, Bajna E, Stift J, Mittlboeck M, et al. 2014. B Cells and Ectopic Follicular Structures: Novel Players in Anti-Tumor Programming with Prognostic Power for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS One* 9(6): e99008.
 211. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, et al. 2013. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39(4): 782–795.
 212. Rossetti RAM, Lorenzi NPC, Yokochi K, Rosa M, Benevides L, et al. 2018. B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. *PLoS One* 13(7): e0199034.
 213. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, et al. 2012. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27– memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 18(12): 3281–3292.
 214. Garnelo M, Tan A, Her Z, Yeong J, Lim CJ, et al. 2017. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma. *Gut* 66(2): 342–351.
 215. Meshcheryakova A, Tamandl D, Bajna E, Stift J, Mittlboeck M, et al. 2014. B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 9(6): e99008.
 216. Kim Y, Wen X, Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kang GH. 2018. The distribution of intratumoral macrophages correlates with molecular phenotypes and impacts prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 73(4): 663–671.
 217. Li S, Xu F, Zhang J, Wang L, Zheng Y, et al. 2018. Tumor-associated macrophages remodeling EMT and predicting survival in colorectal carcinoma. *Oncoimmunology* 7(2): e1380765.
 218. Yang L, Zhang Y. 2017. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* 10: 58.
 219. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, et al. 2018. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and

- stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* 19(1): 3.
220. Zhang H, Wang X, Shen Z, Xu J, Qin J, Sun Y. 2015. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer* 18(4): 740–750.
221. Castino GF, Cortese N, Capretti G, Serio S, Di Caro G, et al. 2016. Spatial distribution of B cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 5(4): e1085147.
222. Mlecnik B, Van den Eynde M, Bindea G, Church SE, Vasaturo A, et al. 2018. Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on Survival. *J Natl Cancer Inst* 110(1): 97–108.
223. Zlobec I, Baker K, Mino P, Hayashi S, Terracciano L, Lugli A. 2009. Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups. *Cancer* 115(17): 4021–4029.
224. Zlobec I, Lugli A. 2009. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol* 15(47): 5898–5906.
225. Halvorsen TB, Seim E. 1989. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 42(2): 162–166.
226. Zlobec I, Terracciano LM, Lugli A. 2008. Local recurrence in mismatch repair-proficient colon cancer predicted by an infiltrative tumor border and lack of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* 14(12): 3792–3797.
227. Lugli A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, Karakitsos P, Rallis G, et al. 2009. CD8+ lymphocytes/tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a “pro-/anti-tumour” approach to tumour host interaction in colorectal cancer. *Br J Cancer* 101: 1382–1392.
228. Lang-Schwarz C, Melcher B, Haumaier F, Schneider-Fuchs A, Lang-Schwarz K, et al. 2019. Budding, tumor-infiltrating lymphocytes, gland formation: scoring leads to new prognostic groups in World Health Organization low-grade colorectal cancer with impact on survival. *Hum Pathol* 89: 81–89.

PRIEDAI

1 priedas. Navikinio epitelio ir stromos audinio plotai (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 105)

Rodikliai	Navikinio epitelio plotas, mm ²	Stromos audinio plotas, mm ²
Vidurkis	33,3	76,0
Standartinis nuokrypis	19,8	26,2
Mžiausia reikšmė	4,2	19,7
5-oji procentilė	6,9	38,9
25-oji procentilė	20,5	54,6
Mediana	28,8	75,3
75-oji procentilė	47,0	93,5
95-oji procentilė	63,1	118,3
Didžiausia reikšmė	131,4	151,3

2 priedas. Imuninio atsako rodiklių vienaveiksnių analizės pacientų bendrajam išgyvenamumui prognozuoti (I tiriamųjų pacientų imtis, n = 101; sv – rodiklio slenkstinė vertė, nustatyta taikant logrankinį kriterijų (*Cutoff Finder* [183]))

Imuninio atsako rodikliai	sv	p vertė	PR	95 % PI
SZ ₃ : CD8_MC_t	-0,52	0,0008	0,33	0,17–0,65
SZ ₃ : CD8_MC_sn	-0,31	0,0054	0,39	0,19–0,77
SZ ₅ : CD8_MC_t	-0,95	0,0045	0,39	0,20–0,77
SZ ₅ : CD8_MC_sn	-0,66	0,0068	0,40	0,20–0,80
SZ ₇ : CD8_MC_t	-1,32	0,0008	0,32	0,16–0,65
SZ ₇ : CD8_MC_sn	-1,00	0,0049	0,38	0,19–0,76
SZ ₉ : CD8_MC_t	-1,81	0,0042	0,41	0,21–0,80
SZ ₉ : CD8_MC_sn	-1,44	0,0290	0,48	0,24–0,94
SZ ₃₋₉ , kai NK ₁ : CD8_t_NK	5,24	0,0076	0,27	0,09–0,76
SZ ₃₋₉ , kai NK ₁ : CD8_sn_NK	5,45	0,0260	0,44	0,21–0,92
SZ ₅₋₉ , kai NK ₃ : CD8_t_NK	5,12	0,0080	0,30	0,12–0,77
SZ ₅₋₉ , kai NK ₃ : CD8_sn_NK	5,46	0,0360	0,46	0,22–0,97
SZ ₃ : CD8_t_N, kai NK ₁	3,36	0,0014	0,35	0,18–0,69
SZ ₃ : CD8_sn_N, kai NK ₁	4,70	0,0039	0,34	0,16–0,73
SZ ₃ : CD8_t_S, kai NK ₁	5,85	0,0080	0,11	0,02–0,80
SZ ₃ : CD8_sn_S, kai NK ₁	5,67	0,0014	0,41	0,19–0,86
SZ ₅ , kai NK ₁ : CD8_t_S	5,92	0,0022	0,14	0,02–1,00
SZ ₅ , kai NK ₁ : CD8_sn_S	6,03	0,0570	0,33	0,10–1,09
SZ ₅ , kai NK ₁ : CD8_t_N	3,46	0,0014	0,35	0,18–0,69
SZ ₅ , kai NK ₁ : CD8_sn_N	4,54	0,0049	0,38	0,19–0,76
SZ ₅ , kai NK ₃ : CD8_t_S	5,32	0,0110	0,42	0,21–0,84
SZ ₅ , kai NK ₃ : CD8_sn_S	5,55	0,0250	0,47	0,24–0,93
SZ ₅ , kai NK ₃ : CD8_t_N	3,16	0,0054	0,39	0,20–0,78
SZ ₅ , kai NK ₃ : CD8_sn_N	3,99	0,0027	0,37	0,18–0,73
SZ ₇ , kai NK ₁ : CD8_t_S	5,47	0,0220	0,42	0,20–0,96
SZ ₇ , kai NK ₁ : CD8_sn_S	6,09	0,0630	0,34	0,11–1,12
SZ ₇ , kai NK ₁ : CD8_t_N	3,45	0,0014	0,35	0,18–0,69
SZ ₇ , kai NK ₁ : CD8_sn_N	4,54	0,0049	0,38	0,19–0,76
SZ ₇ , kai NK ₃ : CD8_t_S	5,15	0,0280	0,48	0,24–0,94
SZ ₇ , kai NK ₃ : CD8_sn_S	5,50	0,0130	0,43	0,22–0,85
SZ ₇ , kai NK ₃ : CD8_t_N	3,59	0,0360	0,37	0,18–0,74
SZ ₇ , kai NK ₃ : CD8_sn_N	3,92	0,0019	0,34	0,17–0,70

SZ ₉ , kai NK ₁ : CD8_t_S	6,09	0,0260	0	0
SZ ₉ , kai NK ₁ : CD8_sn_S	6,17	0,0660	0,28	0,07–1,19
SZ ₉ , kai NK ₁ : CD8_t_N	3,42	0,0014	0,35	0,18–0,69
SZ ₉ , kai NK ₁ : CD8_sn_N	4,54	0,0049	0,38	0,19–0,76
SZ ₉ , kai NK ₃ : CD8_t_S	5,08	0,0390	0,49	0,25–0,97
SZ ₉ , kai NK ₃ : CD8_sn_S	5,45	0,0410	0,48	0,23–0,99
SZ ₉ , kai NK ₃ : CD8_t_N	3,31	0,0037	0,38	0,19–0,75
SZ ₉ , kai NK ₃ : CD8_sn_N	3,91	0,0073	0,39	0,19–0,78
CD8_t_VN	4,30	0,0011	0,23	0,09–0,61
CD8_sn_VN	5,16	0,0310	0,44	0,21–0,95
CD8_IN_t, kai t ₋₁ /t ₁	2,03	0,0005	3,20	1,60–6,41
CD8_IN_sn, kai sn ₋₁ /sn ₁	1,12	0,0029	2,88	1,44–5,79
CD8_IN_t, kai t ₋₁ /t ₀	0,65	0,0021	2,90	1,47–5,71
CD8_IN_sn, kai sn ₋₁ /sn ₀	0,25	0,0304	2,41	1,09–5,32
CD8_IN_t, kai t ₀ /t ₁	1,04	0,0041	2,69	1,37–5,28
CD8_IN_sn, kai sn ₀ /sn ₁	0,49	0,0062	4,32	1,52–12,34
CD8_IN_t, kai t ₋₂ /t ₂	2,16	0,0122	2,40	1,21–4,78
CD8_IN_sn, kai sn ₋₂ /sn ₂	1,16	0,7287	1,23	0,38–4,04
CD8_IN_t, kai t _[-2; -1]/t₁; 2]	1,87	0,0031	2,78	1,41–5,47
CD8_IN_sn, kai sn _[-2; -1]/sn₁; 2]	1,41	0,0164	2,30	1,17–4,55
CD8_IN_t, kai t _[-1; 0]/t₁; 2]	1,09	0,0047	3,01	1,40–6,47
CD8_IN_sn, kai sn _[-1; 0]/sn₁; 2]	0,89	0,0037	3,11	1,45–6,71
1-as faktorius: Absoliutaus CD8+ T ląstelių tankio sąveikos zonoje faktorius	0,32	0,0330	0,43	0,20–0,96
2-as faktorius: CD8+ T ląstelių tankio gradiento sąveikos zonoje faktorius	0,35	0,0018	0,35	0,18–0,71
Agreguotas faktorius: CD8+ T ląstelių atsako sąveikos zonoje faktorius	0,32	0,0015	0,32	0,15–0,67

CD8_t – CD8+ T ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm²), CD8_sn – CD8+ T ląstelių tankio standartinis nuokrypis (ląstelės/mm²), S – sąveikos zonos stromos sritis, NK – naviko kraštas, N – sąveikos zonos naviko sritis, MC – masės centro rodiklis, IN – imunonuokryčio, kai r₋₁/r₁, rodiklis, IN* – imunonuokryčio, kai r₀/r₁, rodiklis.

3 priedas. Daugiaveiknių Kokso regresijos modelių validavimas, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros testą [182]

Modelis	Modelio pasikartojimai	χ^2	p vertė	PR	PI 95 %
Modelis 1					
Amžius pT kategorija CD8_MC_t	50	7,22	0,0075	0,39	0,19–0,77
Amžius CD8_MC_t	40	7,58	0,0064	0,38	0,19–0,76
Amžius pT kategorija CD8_t_N	10	7,28	0,0067	0,38	0,19–0,77
CD8_MC_t	1	10,75	0,0010	0,31	0,16–0,62
Modelis 1[▼]					
Amžius pT kategorija CD8_t_VN	7	6,70	0,0099	0,40	0,20–0,80

Modelis 2					
Amžius pT kategorija CD8_IN_t	65	6,13	0,0138	2,43	1,20–4,91
pT kategorija CD8_IN_t	22	6,68	0,0108	2,54	1,25–5,16
pT kategorija CD8_IN*_sn	8	5,69	0,0171	3,68	1,26–10,74
Amžius pT kategorija CD8_IN*_sn	2	5,69	0,0172	3,95	1,28–12,28
Amžius pT kategorija pN kategorija CD8_IN*_sn	1	5,94	0,0148	3,68	1,29–10,48
Amžius pT kategorija CD8_t_N CD8_IN*_sn	1	4,09	0,0432	3,53	1,04–11,99
CD8_t_N CD8_IN*_sn	1	5,25	0,0219	3,46	1,20–10,02
CD8_IN_t	1	11,37	0,0007	3,34	1,66–6,72
Modelis 2▼					
Amžius pT kategorija CD8_t_VN	1	6,87	0,0088	0,39	0,19–0,79
Modelis 3					
Amžius pT kategorija 2-as faktorius	81	6,30	0,0124	0,41	0,21–0,82
Amžius 1-as faktorius 2-as faktorius	17	6,82	0,0101	0,40	0,20–0,80
pT kategorija 2-as faktorius	3	3,98	0,0462	0,43	0,19–0,98
Modelis 4					
Amžius pT kategorija Agreguotas faktorius	99	5,40	0,0207	0,41	0,19–0,87
Agreguotas faktorius	2	9,58	0,0020	0,30	0,14–0,65
Modelis 5					
CD8_MC_t CD20_MC_t Naviko augimo pobūdis	84	6,36	0,0120	0,33	0,14–0,78

CD8_MC_t CD20_MC_t CD20_t_VN Naviko augimo pobūdis	1	5,78	0,0162	0,27	0,09–0,79
CD8_MC_t CD20_t_VN	2	5,71	0,0170	0,36	0,16–0,83
Modelis 6					
CD8_MC_t CD20_MC_t	87	5,14	0,0241	0,37	0,15–0,88

▼Modeliai, nustatyti įtraukiant CD8_t_VN (CD8+ T ląstelių tankis visame navike) rodiklį.

4 priedas. Imuninio atsako rodiklių koreliacijų matrica: Pirsono koreliacijos koeficientai r ir p vertės (I tiriamųjų pacientų imtis, $n = 101$)

Imuninio atsako rodikliai	CD8_MC_t	CD8_MC_sn	CD8_IN_t	CD8_IN_sn	CD8_IN_t*	CD8_IN_sn*	CD8_t_S	CD8_sn_S	CD8_t_NK	CD8_sn_NK	CD8_t_N	CD8_sn_N	CD8_t_VN	CD8_sn_VN
CD8_MC_t	1													
CD8_MC_sn	0,89 <0,0001	1											$r > 0,9$	
CD8_IN_t	-0,98 <0,0001	-0,86 <0,0001	1										$r = 0,8-0,89$	
CD8_IN_sn	-0,91 <0,0001	-0,97 <0,0001	0,91 <0,0001	1									$r = 0,7-0,79$	
CD8_IN*_t	-0,88 <0,0001	-0,73 <0,0001	0,94 <0,0001	0,82 <0,0001	1									
CD8_IN*_sn	-0,67 <0,0001	-0,56 <0,0001	0,73 <0,0001	0,71 <0,0001	0,81 <0,0001	1								
CD8_t_S	0,39 <0,0001	0,29 0,0032	-0,36 0,0003	-0,24 0,0158	-0,26 0,0089	-0,03 0,7826	1							
CD8_sn_S	0,23 0,0192	0,03 0,7449	-0,21 0,0348	0,01 0,8898	-0,14 0,1534	0,12 0,2345	0,93 <0,0001	1						
CD8_t_NK	0,62 <0,0001	0,52 <0,0001	-0,57 <0,0001	-0,47 <0,0001	-0,42 <0,0001	-0,16 0,1054	0,95 <0,0001	0,84 <0,0001	1					
CD8_sn_NK	0,45 <0,0001	0,41 <0,0001	-0,40 <0,0001	-0,30 0,0025	-0,23 0,0224	0,17 0,0903	0,90 <0,0001	0,85 <0,0001	0,92 <0,0001	1				
CD8_t_N	0,82 <0,0001	0,69 <0,0001	-0,81 <0,0001	-0,68 <0,0001	-0,71 <0,0001	-0,44 <0,0001	0,84 <0,0001	0,71 <0,0001	0,94 <0,0001	0,80 <0,0001	1			
CD8_sn_N	0,80 <0,0001	0,69 <0,0001	-0,78 <0,0001	-0,68 <0,0001	-0,67 <0,0001	-0,40 <0,0001	0,85 <0,0001	0,73 <0,0001	0,94 <0,0001	0,83 <0,0001	0,99 <0,0001	1		
CD8_t_VN	0,83 <0,0001	0,69 <0,0001	-0,82 <0,0001	-0,69 <0,0001	-0,72 <0,0001	-0,45 <0,0001	0,83 <0,0001	0,69 <0,0001	0,93 <0,0001	0,79 <0,0001	1,00 <0,0001	0,98 <0,0001	1	
CD8_sn_VN	0,81 <0,0001	0,70 <0,0001	-0,79 <0,0001	-0,68 <0,0001	-0,68 <0,0001	-0,42 <0,0001	0,84 <0,0001	0,71 <0,0001	0,94 <0,0001	0,82 <0,0001	0,99 <0,0001	0,99 <0,0001	0,99 <0,0001	1

5 priedas. Imuninio atsako rodiklių koreliacijų matrica: Pirsono koreliacijos koeficientai r ir p vertės (II tiriamųjų pacientų imtis, $n = 87$)

Imuninio atsako rodikliai	CD8_MC_t	CD8_t_S	CD8_t_NK	CD8_t_N	CD8_t_VN	CD20_MC_t	CD20_t_S	CD20_t_NK	CD20_t_N	CD20_t_VN	CD68_MC_t	CD68_t_S	CD68_t_NK	CD68_t_N	CD68_t_VN
CD8_MC_t	1														
CD8_t_S	0,35 0,0008	1													$r > 0,9$
CD8_t_NK	0,62 <0,0001	0,95 <0,0001	1												$r = 0,8-0,89$
CD8_t_N	0,78 <0,0001	0,86 <0,0001	0,97 <0,0001	1											$r = 0,7-0,79$
CD8_t_VN	0,78 <0,0001	0,85 <0,0001	0,95 <0,0001	0,99 <0,0001	1										
CD20_MC_t	-0,05 0,6644	-0,22 0,0374	-0,19 0,0835	-0,19 0,0761	-0,17 0,1079	1									
CD20_t_S	0,20 0,0673	0,50 <0,0001	0,49 <0,0001	0,44 <0,0001	0,44 <0,0001	-0,28 0,0076	1								
CD20_t_NK	0,24 0,0225	0,46 <0,0001	0,48 <0,0001	0,43 <0,0001	0,42 <0,0001	0,11 0,3160	0,89 <0,0001	1							
CD20_t_N	0,10 0,3414	0,21 0,0519	0,23 0,0320	0,19 0,0878	0,19 0,0831	0,57 <0,0001	0,60 <0,0001	0,80 <0,0001	1						
CD20_t_VN	0,09 0,3962	0,13 0,2126	0,16 0,1417	0,12 0,2566	0,15 0,1719	0,44 <0,0001	0,52 <0,0001	0,72 <0,0001	0,81 <0,0001	1					
CD68_MC_t	0,36 0,0007	0,16 0,1491	0,25 0,0185	0,28 0,0076	0,29 0,0073	0,05 0,6732	0,15 0,1728	0,20 0,0641	0,10 0,3609	0,18 0,0883	1				
CD68_t_S	0,30 0,0049	0,40 0,0001	0,43 <0,0001	0,45 <0,0001	0,44 <0,0001	-0,12 0,2263	0,37 0,0005	0,27 0,0100	0,23 0,0330	0,17 0,1245	-0,32 0,0024	1			
CD68_t_NK	0,46 <0,0001	0,51 <0,0001	0,57 <0,0001	0,60 <0,0001	0,60 <0,0001	-0,13 0,2290	0,48 <0,0001	0,40 0,0001	0,30 0,0058	0,25 0,0214	0,04 0,7402	0,92 <0,0001	1		
CD68_t_N	0,53 <0,0001	0,49 <0,0001	0,58 <0,0001	0,62 <0,0001	0,62 <0,0001	-0,08 0,4673	0,45 <0,0001	0,40 0,0002	0,30 0,0056	0,29 0,0066	0,40 0,0001	0,74 <0,0001	0,91 <0,0001	1	
CD68_t_VN	0,51 <0,0001	0,48 <0,0001	0,57 <0,0001	0,61 <0,0001	0,61 0,4530	-0,08 <0,0001	0,43 0,0003	0,38 0,0099	0,28 0,0052	0,30 <0,0001	0,41 <0,0001	0,72 <0,0001	0,89 <0,0001	0,99 <0,0001	1

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovei doc. dr. Aidai Laurinavičienei ir VUL SK Valstybinio patologijos centro direktoriui prof. dr. Arvydui Laurinavičiui už galimybę atlikti doktorantūros studijas, už skatinimą, konsultacijas, vertingus patarimus ir pastabas, atliekant mokslinius tyrimus, už suteiktą galimybę prisijungti prie centro tyrėjų grupės ir tobulėti dalyvaujant mokslinėse diskusijose, plėtojant naujus skaitmeninės patologijos metodus. Dėkoju už galimybę stažuotis Notingamo universiteto ligoninės Karalienės medicinos centre (NUH QMC, Jungtinė Karalystė).

Dėkoju prof. dr. Mohammadui Ilyasui ir dr. Wakkui Fadhilui (NUH QMC) už draugišką priėmimą, vertingą darbo praktiką, suteiktą tyrimų medžiagą ir bendradarbiavimą.

Lietuvos mokslo tarybai ir Vilniaus universitetui dėkoju už suteiktą finansavimą moksliniams tyrimams bei rezultatams tarptautinėse konferencijose skelbti.

Ačiū visam Valstybinio patologijos centro kolektyvui, kolegoms už draugišką darbo aplinką, gerą nuotaiką, visokeriopą pagalbą. Ačiū Renaldui Auguliui, Mindaugui Morkūnui, Gedmantei Radžiuvienei, Allanui Rasmussonui, Dovilei Žilėnaitei.

Esu dėkinga savo Tėveliams ir Broliui už stiprų palaikymą. Iš visos širdies Jums dėkoju.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.