

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.365>

<https://orcid.org/0000-0001-7523-3819>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gedmantė  
RADŽIUVIENĖ

# *HER2* onkogeno amplifikacijos ir raiškos variacijos šaltinių nustatymas

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2012–2015; 2020–2021 metais Valstybiniame patologijos centre, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale, ir Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

**Mokslinis vadovas:**

**prof. dr. Arvydas Laurinavičius** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina, M 001)

**Mokslinis konsultantas:**

**prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.365>

<https://orcid.org/0000-0001-7523-3819>

VILNIUS UNIVERSITY

Gedmantė  
RADŽIUVIENĖ

Assessment of sources of variation in  
*HER2* oncogene amplification and  
expression

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biology (N 010)

VILNIUS 2022

This dissertation was written between 2012–2015 and 2020–2021 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:**

**Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine, M 001)

Academic consultant:

**Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology, N 010).

## SANTRUMPOS

- ASCO – Amerikos klinikinių onkologų draugija (angl. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*)
- AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis (angl. *Ashman's D*)
- BI – bimodališkumo indeksas
- CAP – Amerikos patologų draugija (angl. *College of American Pathologists*)
- CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas
- DAPI – fluorescencinis dažas (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate*)
- ER – estrogenų receptorius
- FDA – JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *U.S. Food and Drug Administration*)
- FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija
- FFPI – formaline fiksuotas, parafine impregnuotas
- G – naviko diferenciacijos laipsnis
- HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2 (HER2, angl. *the human epidermal growth factor receptor 2*)
- HR<sup>+</sup> – krūties navikai, kuriuose vyksta hormonų receptorių raiška
- IHC – imunohistochemija
- IN – imunonuokrytis
- Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo
- M – tolimosios metastazės
- MC – masės centras
- MV – membranos vientisumas
- N – sritinių limfmazgių būklė
- PD-L1 – 1-ojo programuotos ląstelės mirties baltymo ligandas (angl. *programmed death-ligand 1*)
- PI – pasikliautinis intervalas
- PR – progesteronų receptorius
- RS – (pavojaus) rizikos santykis (angl. *hazard ratio*)

T – pirminis naviko dydis

TN – trejopai neigiamas krūties vėžio tipas

TS – tikėtimumo santykis (angl. *likelihood ratio*)

## TURINYS

ĮVADAS .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	14
1.1. HER2 teigiamas krūties vėžys .....	14
1.2. HER2 žymens diagnostikos metodai .....	20
1.2.1. Imunohistochemija .....	20
1.2.2. <i>In situ</i> hibridizacija .....	21
1.2.3. Kiti HER2 tyrimo metodai .....	23
1.2.4. Automatinė ir skaitmeninė analizė .....	27
1.3. HER2 baltymo ir geno raiškos tyrimų variacija .....	30
1.3.1. HER2 tyrimo technologiniai variacijos šaltiniai .....	30
1.3.2. HER2 tyrimo biologiniai variacijos šaltiniai .....	35
1.3.3. Vertinimo kriterijų įtaka HER2 tyrimams .....	41
1.4. Naviko mikroaplinka sergant krūties vėžiu .....	47
1.4.1. Naviką infiltruojantys limfocitai naviko mikroaplinkoje ir jų vertinimas .....	48
1.4.2. Prognozinė ir predikcinė naviką infiltruojančių limfocitų reikšmė .....	50
2. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI .....	52
2.1. Tiriamieji ir tyrimo strategija .....	52
2.2. Tyrimo metodai .....	54
2.2.1. Fluorescencinės <i>in situ</i> hibridizacijos tyrimai .....	54
2.2.1.1. <i>HER2</i> FISH reakcija .....	54
2.2.1.2. <i>HER2</i> FISH vertinimas mikroskopu .....	55
2.2.1.3. Skaitmeninių <i>HER2</i> FISH vaizdų sukūrimas ir jų analizė .....	56
2.2.2. Imunohistocheminis tyrimas .....	60
2.2.3. Skaitmeninė vaizdo analizė .....	61
2.2.3.1. Tiriamojo audinio klasifikavimas .....	61
2.2.3.2. Skaitmeninė imunohistocheminių žymenų analizė .....	63
2.2.3.3. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas ir CD8+ limfocitų tankio rodiklių apskaičiavimas .....	65
2.2.4. Statistinė analizė .....	68

3. REZULTATAI.....	70
3.1. Skaitmeninė <i>HER2</i> FISH vaizdo analizė .....	70
3.1.1. Automatiniu būdu nustatytų, koreguotų ir vertintų mikroskopu <i>HER2</i> FISH rezultatų palyginimas.....	70
3.1.2. <i>HER2</i> FISH analizės mikroskopu rezultatai .....	72
3.1.3. Automatiniu būdu vertintų <i>HER2</i> FISH duomenų heterogeniškumo analizė.. .....	73
3.1.4. <i>HER2</i> FISH rodiklių faktorinė analizė .....	77
3.1.5. Klasterinė analizė.....	78
3.2. Išsami krūties vėžio imunohistocheminių (ER, PR, <i>HER2</i> , Ki67) ir CD8 žymenų skaitmeninė vaizdo analizė .....	84
3.2.1. IHC, FISH ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių analizė .....	84
3.2.2. CD8+ limfocitų tankio rodiklių analizė .....	86
3.2.3. IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo ir CD8+ ląstelių tankio rodiklių faktorinė analizė .....	91
3.2.4. IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, CD8+ ląstelių tankio, klinikos ir patologijos rodiklių prognozė reikšmė .....	97
3.2.5. Sudėtinis nepriklausomų SZ-os CD8+ tankio rodiklių prognozė įvertis pacienčių, kurioms nenustatyta <i>HER2</i> geno amplifikacija, grupėje .....	103
3.2.6. PR ir <i>HER2</i> biožymenų raiškos sąsajų tyrimai .....	104
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	107
4.1. Skaitmeninė <i>HER2</i> FISH vaizdo analizė .....	107
4.2. Išsami krūties vėžio imunohistocheminių (ER, PR, <i>HER2</i> , Ki67) ir CD8 žymenų skaitmeninė vaizdo analizė .....	110
4.3. Tyrimo tęstinumas .....	117
IŠVADOS .....	119
PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS.....	120
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	122
PRIEDAI.....	163
PADĖKA .....	190



# ĮVADAS

## Darbo aktualumas

Krūties vėžys yra dažniausia onkologinė moterų liga Lietuvoje ir daugelyje pasaulio šalių (1, 2).

Šiuolaikinės medicinos ir mokslo pažanga, vykdoma patikros ir prevencijos programa gerina krūties vėžio diagnostiką ir gydymą, tačiau sergamumas šia liga ir mirštamumas nuo jos tebėra didelis (3). Pastaraisiais dešimtmečiais atsiradę naujesni ir modernesni gydymo būdai – taikinių terapija, imunoterapija, atveria galimybę vis labiau tobulinti onkologinėmis ligomis sergančių ligonių gydymą.

Krūties vėžys yra sudėtinga ir įvairialypė liga, kuriai būdingos skirtingos klinikinės, patologinės ir molekulinės savybės. Daugialypis jos pobūdis lemia įvairias klininkines baigtis ir skirtingus terapinius atsakus. Kasdienėje klinikinėje praktikoje krūties vėžio prognozės nustatymas ir gydymo parinkimas jau daugelį metų remiasi klinikiniais ir patologiniais parametrais – naviko stadija (T), sritinių limfmazgių būkle (N), histologiniu diferenciacijos laipsniu (G) ir biožymenų – estrogenų receptorių (ER), progesterono receptorių (PR) raiška, žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2 (HER2, angl. *the human epidermal growth factor receptor 2*) būkle (4). Tačiau, siekiant parinkti tinkamą ir veiksmingą individualų gydymą pacientui, šių kriterijų nepakanka (5). Todėl aktyviai ieškoma naujų prognoziinių krūties vėžio biožymenų ir jie tyrinėjami (6).

Apie 15–20 % invazinio krūties vėžio atvejų sukelia *HER2* onkogeno amplifikacija ir (arba) padidėjusi baltymo raiška (7, 8). Tai itin agresyvi ir blogos prognozės liga, todėl patikimų biologinių žymenų, kurie pagerintų pacientų atranką esamoms ir būsimoms metastazavusio krūties vėžio gydymo strategijoms (9), taip pat prognozuotų ligos atkrytį (10) bei atsparumą anti-*HER2* terapijai (11), poreikis yra ypač aktualus. *HER2* yra ne tik prognozinis žymuo, bet ir svarbus biologinės terapijos taikinytis – jau daugiau kaip prieš du dešimtmečius *HER2* teigiamo krūties vėžio gydymui taikomas monokloninis antikūnas trastuzumabas (*Herceptin*; *Genentech, South San Francisco, JAV*) stabdo ligos progresavimą ir gerokai pailgina pacientų išgyvenamumą (12–14). Todėl tikslus *HER2* būklės įvertinimas, siekiant taikyti efektyvią individualizuotą terapiją, yra labai svarbus.

Tačiau net po kelis dešimtmečius trukusių plačių krūties vėžio *HER2* būklės tyrimų standartizuotomis metodikomis ir klinikiniais testų rezultatais pagrįstos pacientų atrankos *HER2* taikininei terapijai, *HER2* diagnostikoje yra likę svarbių neatsakytų klausimų. Dauguma *HER2* teigiamų ir neigiamų

atvejų yra lengvai įvertinami ASCO/CAP (angl. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*) gairėse rekomenduojamu imunohistochemijos (IHC), kuriuo nustatoma baltymo raiška, ir *in situ* hibridizacijos, kuriuo nustatoma geno amplifikacija, metodais (15), tačiau paribinių atvejų interpretacija yra sudėtingesnė. Pastarieji atvejai dažnai yra heterogeniški, juose būna padidėjęs 17 chromosomos centromeros kopijų (CEP17) skaičius, o tai sąlygoja tyrėjų atliekamo vertinimo neatitikimus ir, svarbiausia, kelia terapijos taikymo dilemą (16-20). Paribinių atvejų, sudarančių apie 18 % krūties vėžio atvejų, interpretacijos sunkumus atspindi vis besikeičiantys rekomenduojami jų vertinimo kriterijai (15, 21, 22).

Itin aktuali yra HER2 amplifikacijos ir raiškos naviko audinyje heterogeniškumo vertinimo problema. Heterogeniškų navikų IHC ir fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) tyrimų rezultatai yra priešaringi, nulemiantys netikslią HER2 būklės interpretaciją bei netinkamą gydymo parinkimą ir atsaką į jį (16, 23, 24). Gairėse nurodytas *HER2* genetinio heterogeniškumo apibrėžimas (25) sulaukė nemažai diskusijų, kritikos ir siūlymų jį modifikuoti (23, 26-28). Dabartinis genetinio heterogeniškumo vertinimo būdas, kuris remiasi vizualia riboto ląstelių skaičiaus analize, nesuteikia informacijos apie tikrąją *HER2* raiškos variaciją. Gairėse taip pat nėra pateikta HER2 IHC raiškos heterogeniškumo vertinimo rekomendacijų. Pusiaus kiekybinis HER2 IHC tyrimo metodas riboja galimybę išmatuoti atskirų naviko ląstelių ar sričių įvairovę, nors viena vertė įvertinti navikai gali būti sudaryti iš heterogeniškų sričių. Dėl šių priežasčių yra labai reikalingas objektyvus ir patikimas heterogeniškumo reiškinio vertinimo tiek baltymo, tiek geno lygmeniu metodas. Heterogeniškumas riboja terapijų efektyvumą (29-31), todėl svarbu įvertinti ne tik HER2, bet ir hormonų receptorių raiškos įvairovę.

Dar vienas reikšmingas HER2 būklės tyrimo variacijos šaltinis yra CEP17 kopijų skaičiaus pokyčiai (padidėjimas arba sumažėjimas) (19, 32). Jie gali nulemti klaidingus analizės rezultatus, ypač paribiniais atvejais, todėl tikslus ir objektyvus CEP17 kopijų skaičiaus variacijos įvertinimas taip pat yra būtinas.

Pastarųjų metų intensyvūs naviko mikroaplinkos tyrimai atskleidė prognozinę imuninio atsako svarbą sergant krūties vėžiu (33, 34). Vieni iš pagrindinių jos komponentų – naviką infiltruojantys limfocitai – yra siejami su geresne prognoze – didesnis jų kiekis lemia stipresnį imuninį atsaką į vėžines ląsteles ir paskirtą gydymą, tačiau skirtingų krūties vėžio potipių duomenys yra priešaringi (35, 36). Siekiant atrasti reikšmingą papildomą naviką infiltruojančių limfocitų prognozinę informaciją pacienčių, kurioms

nustatyta paribinė HER2 baltymo raiška, grupėje, reikalingi išsamesni, ne tik naviką infiltruojančių limfocitų tankio, bet ir jų erdvinio pasiskirstymo navikiniame audinyje tyrimai moderniais, skaitmenine vaizdo analize pagrįstais metodais.

### Darbo tikslas

Skaitmeninės vaizdo analizės metodais nustatyti *HER2* onkogeno amplifikacijos ir raiškos variacijos šaltinius ir ištirti prognozinis rodiklius pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kai nustatyta HER2 paribinė baltymo raiška, imtyje.

### Darbo uždaviniai

1. Automatizuoti *HER2* geno būklės vertinimą FISH metodu, pritaikant skaitmeninės vaizdo analizės algoritmus, ir palyginti tyrėjų vertinimus su automatizuotais *HER2* amplifikacijos matavimais.
2. Naudojantis FISH skaitmeninės vaizdo analizės duomenimis nustatyti *HER2* kopijų skaičiaus variaciją navikiniame audinyje ir įvertinti šio heterogeniškumo ir padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus įtaką *HER2* FISH testo rezultatams.
3. Skaitmeninės vaizdo analizės metodais išmatuoti *HER2*, ER, PR ir Ki67 žymenų raiškos heterogeniškumą krūties vėžio audinyje ir nustatyti jo prognozinę vertę esant paribinei *HER2* raiškai.
4. Įvertinti CD8+ limfocitų pasiskirstymo krūties vėžio mikroaplinkoje rodiklius ir jų prognozinę vertę kitų prognozinų krūties vėžio požymių kontekste.

### Ginamieji teiginiai

1. Skaitmeninė didelės apimties *HER2* FISH vaizdo analizė atveria naujas galimybes kiekybiškai įvertinti *HER2* geno raiškos heterogeniškumą krūties vėžio audinyje.
2. IHC biožymenų vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai krūties vėžio audinyje leidžia prognozuoti pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kurioms nustatyta paribinė *HER2* baltymo raiška, bendrąjį išgyvenamumą.
3. Krūties vėžio audinyje naviko ir stromos sąveikos zonoje nustatyti CD8+ ląstelių tankio rodikliai yra nepriklausomi prognoziniai pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kurioms nustatyta paribinė *HER2* baltymo raiška, bendrojo išgyvenamumo veiksniai.

## Darbo naujumas

Šiame darbe taikyti skaitmeninės mikroskopinių vaizdų analizės metodai padėjo atskleisti HER2 amplifikacijos ir raiškos ypatumus, leidžiančius optimizuoti krūties vėžio diagnostikos metodus ir nustatyti reikšmingus prognozinis veiksnis pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kurioms diagnozuota HER2 baltymo paribinė raiška (IHC 2+), imtyje.

Pirmą kartą *HER2* geno raiškos vidunavikiniam heterogeniškumui įvertinti pritaikyti automatizuoti FISH analizės algoritmai. Darbe pristatyti nauji kiekybiniai heterogeniškumo (bimodalumo) matavimo rodikliai, įvertinantys *HER2* signalų variaciją krūties vėžio ląstelėse. Ši matematinis būdu gaunama informacija apie *HER2* vidunavikinį heterogeniškumą gali papildyti dabartinę *HER2* genetinio heterogeniškumo koncepciją, kuri remiasi riboto ląstelių skaičiaus vertinimu ir yra priklausoma nuo amplifikacijos laipsnio.

Taikydami skaitmeninę vaizdo analizę ir šešiakampių gardelių metodiką kiekybiškai išmatavome HER2 baltymo ir kitų standartinių krūties vėžio IHC biožymenų – ER, PR ir Ki67 – raiškos heterogeniškumą navikiniame audinyje. Iki šiol išsami šių žymenų heterogeniškumo analizė esant paribinei HER2 raiškai nebuvo atlikta. Nustatyti nepriklausomi prognoziniai HER2 ir ER biožymenų vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai, kurie papildo krūties vėžio klinikos ir patologijos parametrus ir pranoksta kitus kiekybinius IHC žymenų vertinimo rodiklius.

Šiame tyrime įvertinome vieną pagrindinių imuninio atsako komponentų – CD8+ limfocitų prognozinę reikšmę krūties navikuose, kai nustatyta paribinė HER2 baltymo raiška. Ankstesnių tyrimų duomenys vertinant CD8+ prognozinę reikšmę ir *HER2* neamplifikuotuose (HR<sup>+</sup>), ir amplifikuotuose navikuose yra priešaringi (36, 37). Nustatėme naujus nepriklausomus prognozinis bendrojo išgyvenamumo veiksnis, paremtus CD8+ limfocitų pasiskirstymo krūties vėžio mikroaplinkoje rodikliais: *HER2* amplifikuotoje grupėje CD8+ ląstelių tankį naviko srityje, *HER2* neamplifikuotoje grupėje – CD8+ ląstelių tankį naviko srityje, CD8+ ląstelių tankio gradientą į naviką ir CD8+ ląstelių tankio standartinį nuokrypį naviko krašte. Pastarojoje grupėje šie trys rodikliai (ir jų derinys) leido nepriklausomai nuo kitų klinikos ir patologijos parametrų prognozuoti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą.

Mūsų taikyti analizės metodai atskleidė naujus hormonų receptorių ir HER2 raiškos sąveikos aspektus naviko mikroaplinkos regioniniu lygmeniu. Dvigubas PR ir HER2 žymenų IHC dažymas (dPR-HER2 IHC), jų skaitmeninė vaizdo analizė ir šešiakampių gardelių analitika leido įvertinti lokalias PR ir HER2 biožymenų raiškos sąsajas. Nustatytas lokalias transformacijos iš PR vyraujančios raiškos ląstelėse į HER2 dominuojančias

ląstelių populiacijas reiškinys yra susijęs su lokaliai padidėjusiu navikinių ląstelių tankiu. Manome, kad šis reiškinys gali būti specifinis krūties vėžio progresijos požymis, paaiškinantis paribinės ir erdviškai heterogeniškos HER2 raiškos veiksnius HR<sup>+</sup> navikuose. Lokalios transformacijos reiškinys gali turėti ir praktinės reikšmės, tikslingai atrenkant mėginius FISH tyrimams. Šie radiniai reikalauja tolesnių tyrimų.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. HER2 teigiamas krūties vėžys

Krūties vėžys yra dažniausia piktybinė moterų liga didžiojoje daugumoje pasaulio šalių – 2020 m. nustatyta 2,26 mln. naujų susirgimų, kurie sudarė 25,8 % visų moterų piktybinių navikų (38). Lietuvoje kasmet diagnozuojama daugiau nei 1 600 naujų krūties vėžio atvejų (1), o paskutiniaus GLOBOCAN (angl. *Global Cancer Observatory*) duomenimis, 2020 m. nustatyti 1 769 nauji susirgimai krūties vėžiu, kurie sudarė 21 % visų moterų piktybinių navikų (39).

Didžiausi sergamumo krūties vėžiu rodikliai nustatyti ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse (Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje, Šiaurės Amerikoje, Šiaurės ir Vakarų Europoje), mažiausi – skurdesnėse (Rytų ir Vidurio Afrikos, Pietų, Centrinės Azijos bei Centrinės Amerikos) šalyse (2). Lietuva, palyginti su kitomis Europos šalimis, dideliais sergamumo krūties vėžiu rodikliais neišsiskiria – 2020 m. nustatyti 106,5 atv./100 000 gyv.

Krūties vėžys taip pat yra dažniausia moterų mirties nuo onkologinės ligos priežastis Lietuvoje ir dar 109 pasaulio šalyse (1, 38). Pasaulyje 2020 m. nuo šios ligos mirė 685 tūkst. moterų, Lietuvoje – 490 moterų (atitinkamai sudarė 15,6 % ir 13,4 % visų moterų mirčių nuo vėžio) (38). Mirtingumą nuo krūties vėžio gali sumažinti vykdomos atrakinės mamografinės patikros (3, 40).

HER2, literatūroje dar vadinamą HER-2, Her-2/neu, c-erbB2 ir kitais pavadinimais, koduoja *ERBB2* genas, esantis 17-os chromosomos ilgajame petyje (17q21-21.32) (21, 41). Nors *ERBB2* yra oficialus HGNC genų nomenklatūros komiteto (angl. HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee*) suteiktas pavadinimas (42), dažniausiai vartojamas terminas *HER2* (21).

HER2 yra 1 255 aminorūgščių ir 185 kDa transmembraninis baltymas, turintis tirozino kinazės aktyvumą (43, 44). Šis receptorius kartu su dar trimis nariais – HER1, HER3 ir HER4 – priklauso epidermio augimo veiksmų receptorių (EGFR) šeimai, dalyvaujančiai aktyvinant tarpląstelinius signalų perdavimo kelius. EGFR šeimos, dar vadinamos HER šeima, receptoriai yra sudaryti iš išorinio, ligandus prisijungiančio ląstelės domeno, transmembraninio domeno ir viduląstelinio tirozino kinazės domeno (pastarojo domeno HER3 neturi). Receptoriai aktyvinami įvykus sąveikai su ligandu – susidaro dimerai, vyksta tolesnis baltymų tirozino liekanų fosforilinimas ir tarpląstelinis signalų perdavimas. Sergant krūties vėžiu HER2 protoonkogenas ima veikti kaip onkogenas, kurio padidėjusi raiška nulemia nuolatinę receptoriaus aktyvaciją. Taip sužadinta nekontroliuojama

viduląstelinių pokyčių grandinė aktyvina signalo perdavimo tarpininkus ir, galiausiai, transkripcijos veiksmus, turinčius įtakos ląstelės augimo, diferenciacijos, išgyvenimo, angiogenezės bei metastazių susidarymo procesams (45-47). HER2 gali aktyvuoti skirtingus signalo plitimo kelius: mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (MAPK) kaskadą (Ras/Raf/MEK/ERK), fosfatidilinozitolio-3-kinazės (PI3K) / baltymų kinazės B (Akt), JAK/STAT (*Janus* kinazės / signalo perdavėjo ir transkripcijos aktyvatoriaus) ar fosfolipazės C (PLC $\gamma$ ) (46, 48). HER2 receptorius vienintelis neturi žinomo jį aktyvinančio ligando, tačiau jo aktyvaciją sąlygoja homodimerizacija (HER2/HER2 poros susidarymas) ir heterodimerizacija (HER2 porų su HER1, HER3 ar HER4 susidarymas). HER2 erdvinė struktūra yra atvira, todėl jis nuolat gali jungtis su kitais HER šeimos receptoriais ir yra pagrindinis šios šeimos receptorių dimerizacijos partneris (47, 49). HER2 pasižymi stipriausiu katalitiniu kinazės aktyvumu HER šeimoje, o heterodimerai, savo sudėtyje turintys HER2, stabiliau ir stipriau perduoda signalą nei receptorių kombinacijos be HER2 (48, 49).

*HER2* geno amplifikacija ir (ar) padidėjusi baltymo raiška yra nustatoma apie 15–20 % krūties vėžio atvejų (7, 8, 22). Padidėjusios raiškos atveju receptorių kiekis ląstelės paviršiuje gali siekti net 2 milijonus (normos atveju randama 20 000–50 000 receptorių), o *HER2* geno kopijų gali pagausėti iki 25–50 (50). Tai siejama su agresyviu naviko augimu, bloga ligos prognoze (polinkiu formuotis metastazėms, padidėjusia rizika, kad liga atsinaujins), blogu atsaku taikant hormonų terapiją ir galimu atsparumu gydymui (7, 44, 51). Pagrindinė padidėjusios baltymo raiškos priežastis yra *HER2* geno amplifikacija (7, 52). Tačiau nuo 3 % iki 15 % krūties karcinomos atvejų randama padidėjusi HER2 baltymo raiška, kai nenustatyta geno amplifikacija; nedidelė dalis atvejų, kai nustatyta *HER2* geno amplifikacija, nepasižymi padidėjusia HER2 baltymo raiška (44, 52, 53). Šiuos neatitikimus aiškina keletas teorijų. Manoma, kad apie 10 % atvejų padidėjusią, bet be genetinių pokyčių baltymo raišką gali sukelti sutrikdyta transkripcija (54, 55) arba potranskripcinė HER2 raiškos reguliacija (46, 56). Kiti paaiškinimai grindžiami ypač jautriu, galinčiu sudaryti artefaktus imunohistocheminiu metodu, klaidingai neigiamu geno amplifikacijos tyrimu, 17 chromosomos polisomija (57, 58), padidėjusia vienos *HER2* geno kopijos raiška iRNR (informacinė RNR) transkripcijos lygmeniu (44, 53) ir somatinėmis mutacijomis (59, 60). *HER2* geno amplifikacija, kai nepadidėjusi HER2 baltymo raiška, taip pat gali būti dėl IHC metodo netikslumų, IHC ir FISH tyrimų rezultatų vertinimo klaidų, nustatytos ankstyvos geno amplifikacijos ar transkripcijos stadijos, įvykstančios prieš iRNR transliaciją (61) ir

sutrikdytų geno transkripcinių, potranskripcinių ar potransliacinių įvykių, nulemiančių žemą baltymo raiškos lygį (62).

HER2 teigiamam krūties vėžiui būdingos unikalios biologinės ir klinikinės charakteristikos: didelis histologinio piktybiškumo ir branduolių anaplazijos laipsnis, padidėjęs proliferacijos dažnis, neigiamas arba žemesnis ER ir PR raiškos lygis, dažnesni chromosomų skaičiaus pokyčiai, p53 mutacijos, padidėjęs jautrumas tam tikroms citotoksinėms medžiagoms (doksorubicinui), santykinis atsparumas hormoniniams preparatams, atsakas į HER2 taikininę terapiją, polinkis metastazuoti į smegenis ir vidaus organus (63-65).

Tikslus HER2 būklės įvertinimas labai svarbus paskiriant pacientams biologinės taikinių terapijos preparatus: trastuzumabą (*Herceptin*; *Roche/Genentech*), trastuzumabo emtanziną (*T-DM1*) (*Kadcyla*; *Roche/Genentech*), pertuzumabą (*Perjeta*; *Roche/Genentech*), lapatinibą (*Tykerb/Tyverb*; *Novartis*) ir kitus (66, 67). Trastuzumabas yra pirmasis prieš HER2 nukreiptas, Maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration*, toliau *FDA*) patvirtintas biologinis vaistas, sukėlęs tikrą perversmą HER2 teigiamo krūties vėžio gydyme. Tai humanizuotas IgG<sub>1</sub> monokloninis antikūnas, kuris specifiskai atpažįsta išorinį HER2 domeną, prie jo jungiasi ir užblokuoja jo veikimą (68, 69). Nors herceptino veikimo mechanizmas nėra visiškai aiškus, manoma, kad jis slopina signalo perdavimo kelius, ląstelių ciklo progresavimą, blokuoja proteolitinį išorinio HER2 domeno nuskėlimą, sukelia antiangiogeninį poveikį ir nuo antikūno priklausomą ląstelinį citotoksiškumą (66). Gydymas šiuo vaistu padidina atsako į gydymą dažnį, pailgina išgyvenamumą ligai neprogresuojant ir bendrą išgyvenamumą (70, 71). Pertuzumabas – dar vienas humanizuotas monokloninis antikūnas, kuris jungiasi prie kitos nei trastuzumabas HER2 receptoriaus dalies ir blokuoja nuo ligando priklausomą HER2 heterodimerizaciją su kitais HER šeimos receptoriais (72). Tokiu būdu yra slopinamas signalo perdavimas pagrindiniais MAPK ir PI3K keliais. Į standartinio gydymo schemą chemoterapija ir trastuzumabu įtraukus dar ir pertuzumabą, gauti ypač efektyvūs metastazavusio HER2 teigiamo krūties vėžio gydymo rezultatai (73). TDM1 yra antikūno (trastuzumabo) ir citotoksinio vaisto (emtanzino) junginys. Citotoksinis vaistas šio junginio yra nukreipiamas tik navikinėms ląstelėms, kuriuose HER2 raiška yra padidėjusi (74). Lapatinibas yra HER2 (taip pat EGFR) viduląstelinio tirozino kinazės domeno inhibitorius, indukuojantis navikinių ląstelių proliferacijos sustabdymą ir (ar) apoptozę (75).



Kartu su HER2 pagrindiniai predikciniai ir prognoziniai krūties vėžio biožymenys yra hormonų receptoriai (76). Jie yra svarbūs parenkant krūties vėžio gydymo strategiją ir diagnostinėje klasifikacijoje (77-79).

### **Hormonų receptoriai (ER ir PR)**

Maždaug dviejų trečdalių piktybinių krūties navikų augimą ir vystymąsi paskatina pasikeitęs moteriškų lytinių hormonų – estrogeno ir progesterono – kiekis ir jų sąveika su receptoriais (80). ER ir PR priskiriami branduolio receptorių šeimai ir yra nuo ligando priklausomi transkripcijos veiksniai, galintys ląstelėse aktyvuoti proliferacijos, apoptozės stabdymo, invazijos ir angiogenezės procesus (81, 82). Pagal klasikinį modelį, prisijungus ligandui, receptoriai konformuojasi ir sudaro dimerus – toks kompleksas, patekęs į branduolį, jungiasi prie DNR ir, sąveikaudamas su specifinėmis genų – taikinių sekomis, keičia jų transkripciją (83). Veikiant kitu – negenominiu keliu, su membrana susijungę ER sąveikauja su augimo veiksmų receptorių tirozino kinazėmis ir kitomis signalus pernešančiomis molekulėmis (G baltymu, Ras, Src ir kt.) (84).

Estrogenai ir jų receptoriai dalyvauja krūties audinio vystymosi ir karcinogenezės procesuose. Estrogenų receptoriai yra dviejų tipų – ER $\alpha$  ir ER $\beta$ , juos koduoja skirtingose chromosomose esantys skirtingi – atitinkamai *ESR1* ir *ESR2* – genai (85, 86). Abiejų izoformų struktūrinė organizacija yra panaši, tačiau pagrindinis krūties vėžio ląstelėse ekspresuojamas receptoriaus tipas yra ER $\alpha$  (87). Vėžiui progresuojant, jo raiška stipriai padidėja ir skatina tolesnį naviko augimą. Klinikinė ER $\beta$  raiškos svarba vis dar tebėra neaiški dėl skirtingų ER $\beta$  variantų ir potransliacinių modifikacijų (87, 88). Įvairūs tyrimai parodė, kad ER $\beta$  pasižymi antiproliferacinėmis savybėmis (89, 90), padidėjusi jo raiška siejama su geresnėmis klinikinėmis baigtimis (91, 92), o sumažėjusi – su atsparumu endokrininei terapijai (93).

Įvairūs tyrimai (94-96) rodo progesteronų ir jų receptorių svarbą reguliuojant krūties vėžio augimą ir vystymąsi. PR raišką reguliuoja estrogenai, kurie kartu su ER yra būtini PR sintezei (97). Todėl aptinkama PR raiška yra traktuojama kaip gerai funkcionuojančių ER signalo perdavimo kelių rodiklis (98, 99). Dalyvaujant progesteronui, PR sąveikauja su ER ir keičia jo jungimosi su chromatinu vietą. Tai sąlygoja įvairių reguliacinių genų veiklos pokyčius (100, 101). PR koduoja vienas PGR genas, tačiau išskiriamos dvi PR formos – A ir B, besiskiriančios molekulinio svoriu (97, 102). *In vitro* tyrimai parodė, kad PRB pasižymi didesniu transkripciniu aktyvumu nei PRA (103). PRA gali veikti kaip PRB ir ER aktyvumo inhibitorius (104). Nepakitusiame krūties audinyje abiejų PR formų kiekis

daugmaž vienodas, tačiau vėžiniame jų pusiausvyra pasikeičia – PRA ima dominuoti (105).

Apie 70–80 % krūties vėžio atvejų yra būdinga ER raiška (ER teigiami navikai; ER+), iš jų apie 50–60 % pasireiškia ir PR raiška (PR teigiami navikai; PR+) (99, 106). Padidėjusi ER ir PR raiška atvirkščiai koreliuoja su navikų histologiniu piktybiškumo laipsniu, proliferacijos indeksu, HER2 viršekspresija. Apie 15–20 % invazinio krūties vėžio atvejų yra būdinga mišri hormonų receptorių būklė – ER+/PR– arba ER–/PR+ (107, 108). Nors teigiama hormonų receptorių raiška pasižymintys navikai yra siejami su geresne prognoze, tačiau skirtingi ER ir PR raiškos deriniai lemia skirtingą navikų elgseną. ER ekspresuojantys navikai dažniausiai yra gerai diferencijuoti, mažiau agresyvūs ir geresnės prognozės (109). Teigiama ER raiška pasižymintys, tačiau PR neekspresuojantys navikai yra labiau proliferuojantys, agresyvesni ir siejami su blogesne prognoze ir sumažėjusiu atsaku į gydymą tamoksifenu (99, 106, 110). PR raiška retai nustatoma ER–navikuose – sudaro apie 1,5 % visų krūties vėžio atvejų (110–112), o kai kurių tyrėjų nuomone, ER–/PR+ navikai diagnozuojami dėl technologinių procesų artefaktų (nepakankamos audinio fiksacijos, neoptimizuoto IHC testo) (112, 113). Jų prognozė panaši į ER+/PR– navikų (110).

Hormonų receptorių būklė įprastai nustatoma IHC tyrimo metodu. Vadovaujantis ASCO/CAP rekomendacijomis, teigiama ER ir PR raiška konstatuojama, jei nustatomas bent 1 % teigiamai nusidažiusių branduolių (114).

### **Ląstelių proliferacijos žymuo Ki67**

Ląstelių proliferacija, kurią galima įvertinti Ki67 baltymo raiškos tyrimu, yra progresuojančių piktybinių navikų požymis. Ki67 baltymo, kaip ląstelių proliferacijos žymens, naudojimą kasdieniauose patologijos diagnostikos tyrimuose nulėmė jo raiškos ypatumai skirtingose ląstelės dalijimosi ciklo fazėse: baltymas aptinkamas visose aktyviose – G1, S, G2 ir M – fazėse, tačiau jo nebūna ląstelės ramybės laikotarpiu – G0 fazėje (115, 116). Sveikam krūties audiniui taip pat yra būdinga silpna Ki67 raiška, sudaranti mažiau nei 3 % (117). Įdomu, kad šio baltymo ekspresija aptinkama tik ER neigiamose sveiko krūties audinio ląstelių populiacijose (118).

Ki67 žymuo dažniausiai nustatomas greitu ir nebrangiu IHC tyrimo metodu naudojant MIB-1 antikūną formaline fiksuotuose, parafine impregnuotuose (FFPI) audiniuose (119). Proliferacijos aktyvumas yra išreiškiamas proliferacijos indeksu, apskaičiavus teigiamai nusidažiusių ląstelių procentą visoje ląstelių populiacijoje.

Padidėjusi Ki67 raiška yra siejama su bloga ankstyvojo krūties vėžio prognoze – dažnu ligos recidyvu ir blogu pacientų bendruoju išgyvenamumu (120, 121). Į Ki67 žymens ekspresijos lygį yra atsižvelgiama diferencijuojant liuminalinius A ir B krūties vėžio potipius – pastarajame jis yra didesnis (79, 122). Tačiau rekomenduojama optimali slenkstinė Ki67 reikšmė, leidžianti atskirti mažo ir didelio proliferacijos aktyvumo navikus, varijuoja (79, 123, 124). 2013 m. *St. Gallen* suvažiavime (angl. *Saint Gallen Consensus Meeting*) vietoj anksčiau buvusios  $\leq 14$  % ribos buvo priimta  $\leq 20$  % riba, kuri tebegalioja ir šiuo metu (79). Be to, rekomenduojama atsižvelgti ir į laboratorijoje nustatytas Ki67 indekso slenkstines vertes (125). Nors didesnio proliferacinio aktyvumo navikai yra blogesnės prognozės, tačiau pasižymi geresniu atsaku į chemoterapinius vaistus (126).

Padidėjęs Ki67 ekspresijos lygis koreliuoja su aukštu histologiniu naviko diferenciacijos laipsniu, didesniu naviko dydžiu, metastazių pažeistais limfmazgiais, didesne HER2 raiška bei ER ir PR raiškos nebuvimu (127, 128).

Ki67 proliferacijos indeksas yra įvardijamas ne tik kaip prognozinis žymuo, bet ir kaip potencialus predikcinis atsako į gydymą neoadjuvantine chemoterapija žymuo (129, 130). Didesnė proliferacijos indekso vertė yra siejama su dažnesniu pilnu patologiniu atsaku (131, 132). Tačiau šio žymens naudojimą klinikinėje praktikoje riboja slenkstinės vertės variacija ir prastas tyrimų rezultatų atsikartojamumas laboratorijose, daugiausia dėl skirtingų vertinimo metodikų taikymo (123, 124, 133).

Atsižvelgiant į ER, PR, HER2 ir Ki67 žymenų raišką, yra skiriami keturi pagrindiniai biologiniai krūties vėžio potipiai, besiskiriantys prognoze ir numatomu terapiniu efektu: liuminalinis A, liuminalinis B, HER2 teigiamas ir trejopai neigiamas (TN) (1.1 lentelė) (79, 134). Ši klasifikacija pirmiausia buvo priimta 2011 m. XII tarptautinėje *St Gallen* krūties vėžio konferencijoje (122), o 2013 m. suvažiavime ji modifikuota – pakeista Ki67 slenkstinė vertė ir įtraukta 20 % PR riba liuminalinių A ir B potipių diferenciacijai (79). Dažniausiai pasitaikančiam liuminaliniam A potipui yra būdinga teigiama ER ir (arba) PR raiška, neigiama HER2 raiška ir maža ( $< 20$  %) Ki67 raiška. Tai geriausios prognozės potipis (135, 136). Liuminaliniame B potipyje išskiriamos dar dvi grupės: pirmoji – HER2 teigiama, kurioje HER2, ER ir (arba) PR raiška yra teigiama (PR  $< 20$  %), tačiau Ki67 raiška gali būti bet kokia, ir antroji – HER2 neigiama, pasižyminti HER2 raiškos nebuvimu, teigiama ER ir (arba) PR raiška bei didele ( $\geq 20$  %) Ki67 raiška (79, 122). Dar vienam – HER2 teigiamam potipiui yra būdinga teigiama HER2 raiška, tačiau ER ir PR raiška yra neigiama. TN potipiui priklauso neigiamos ER, PR bei HER2 raiškos navikai. Šis, kartu su HER2 teigiamu potipiu, yra blogiausios

prognozės potipiai (135, 137, 138). Kiekvienam krūties vėžio potipiui gydyti taikomi skirtingi sisteminio gydymo metodai (139). Pacientėms, nustačius teigiamą ER ir PR raišką, skiriama hormonų terapija (liuminalinio A ir iš dalies liuminalinio B tipų navikams). Chemoterapija ir (arba) spidulinė terapija taikoma TN vėžiu sergančioms pacientėms. Chemoterapija taip pat papildomai taikoma daugumai pacienčių, kurioms diagnozuoti liuminalinis B ir HER2 teigiamas potipiai. HER2 teigiamo potipio navikus turinčios pacientės papildomai gydomos biologine terapija.

### 1.1 lentelė. Krūties vėžio potipiai pagal IHC biožymenų raiškos rezultatus

Krūties vėžio potipis	ER	PR	HER2	Ki67	Taikytina terapija
Liuminalinis A	+	≥ 20 %	–	< 20 %	Hormonų terapija
Liuminalinis B (HER2 neigiamas)	+	< 20 %	–	≥ 20 %	Hormonų terapija; chemoterapija
Liuminalinis B (HER2 teigiamas)	+	bet koks	+	bet koks	Hormonų terapija; chemoterapija; biologinė terapija
HER2 teigiamas	–	–	+	bet koks	Chemoterapija; biologinė terapija
Trejopai neigiamas	–	–	–	bet koks	Chemoterapija; spidulinė terapija

ER – estrogenų receptoriai; PR – progesteronų receptoriai; HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo.

### 1.2. HER2 žymens diagnostikos metodai

HER2 tyrimo rezultatai turi prognozinę ir predikcinę vertę ir nulemia gydymo taktikos parinkimą, todėl tiksli šio žymens diagnostika yra ypač svarbi. HER2 būklės nustatymui gali būti taikomi įvairūs metodai baltymo, RNR ir DNR lygmenimis, tačiau šiuo metu klinikinėje praktikoje dažniausiai yra taikomi IHC ir *in situ* hibridizacijos metodai (8, 140).

#### 1.2.1. Imunohistochemija

Šis metodas dažniausiai yra taikomas kaip pirminis testas HER2 būklei nustatyti FFPI audinių pjūviuose (22, 141). IHC reakcijos metu antikūnai reaguoja su komplementariu antigenu – HER2 baltymu. Jų sąveikai išryškinti naudojamas enzimui specifinis substratas 3'3'-diaminobenzidino tetrachloridas (DAB). Veikiant enzimui, DAB paverčiamas rudu reakcijos

produktu, kuris ir nudažo membraną. Spalvos intensyvumas yra proporcingas ekspresuojamo baltymo kiekiui (57).

HER2 IHC raiška pagal nusidažiusių navikinių ląstelių kiekį, ląstelių membranos nusidažymo pobūdį bei intensyvumą vertinama pagal skalę nuo 0 iki 3 (0, 1+, 2+, 3+).

IHC tyrimas yra santykinai greitas ir nebrangus – tai ir sąlygojo platų šio metodo taikymą laboratorijose. Rezultatai vertinami šviesaus lauko mikroskopu, todėl kartu gali būti įvertinami ir morfolginiai naviko požymiai. Nudažyti stiklai neišblunka ilgą laiką (keletą metų) (142). Tačiau šis metodas yra pusiau kiekybinis, jo tikslumas priklauso nuo daugybės preanalitinių ir analitinių veiksnių ir yra subjektyviai interpretuojamas (8, 143, 144).

Šiuo metu FDA yra patvirtinusi 4 IHC HER2 baltymo ekspresijos nustatymo rinkinius: *HercepTest* rinkinį (*Agilent Technologies/DAKO Denmark*); *PATHWAY* rinkinį (*Ventana Medical Systems*); *InSite HER2/neu* rinkinį (*Biogenex Laboratories*); *Bond Oracle HER2 IHC* sistemą (*Leica Biosystems*) (145).

### 1.2.2. *In situ* hibridizacija

*HER2* geno kopijų skaičiaus nustatymui yra pasitelkiami *in situ* hibridizacijos metodai: fluorescencinė *in situ* hibridizacija, chromogeninė *in situ* hibridizacija (CISH) ir sidabru sustiprinta *in situ* hibridizacija (SISH).

FISH metodas, palyginti su IHC, yra įvardijamas kaip tikslesnis, objektyvesnis ir labiau atsikartojantis metodas, kurio rezultatai yra įvertinami kiekybiškai (142, 146). Daugumoje laboratorijų FISH metodas yra taikomas po to, kai IHC metodu yra nustatoma paribinė *HER2* vertė (IHC 2+) (147, 148).

FISH reakcijos metu vyksta hibridizacija tarp fluorescenciniais dažais pažymėtų zondų ir atitinkamų taikinių – *HER2* geno ir 17 chromosomos centromeros sekų tiriamajame mėginyje. Fluorescenciniu mikroskopu ląstelių branduoliuose skaičiuojami fluorescenciniai signalai – *HER2* geno ir 17 chromosomos kopijų skaičius (8, 140, 147).

Šiuo metodu gali būti tiriama tiek audinių blokuose esanti medžiaga, tiek citologiniai mėginiai. FISH yra jautrus ir specifiškas, ne toks jautrus preanalitiniams veiksniams kaip IHC (DNR yra stabilesnė nei baltymai) tyrimo metodas. Tačiau tai techniškai sudėtingesnis ir daugiau laiko nei IHC reikalaujantis metodas, o rezultatai vertinami brangiu fluorescenciniu mikroskopu. Pabrėžtini metodo trūkumai yra gana greitas signalų blukimas ir tikimybė neaptikti invazinių karcinomos sričių. Be to, FISH rezultatų analizė reikalauja tyrėjo patirties (8, 142, 149).

FDA yra patvirtinusi *PathVysion HER-2 DNA Probe Kit* (Abbott Molecular) ir *HER2 FISH Pharmdx™* (Agilent Technologies/DAKO Denmark) FISH rinkinius (145).

CISH, SISH ir GOLDFISH (auksu sustiprinta autometalografinė *in situ* hibridizacija) yra vėliau atsiradę HER2 tyrimo metodai. Pirmuoju atveju vykdoma *HER2* geno hibridizacija su digoksigeninu pažymėtu zondų. Aptikimui naudojamas antikūnas prieš digoksigeniną ir krienų peroksidazės-polimero konjugatas, o reakcijos vizualizacijai – DAB substratas (150, 151). Kitais dviem atvejais naudojamos sidabru ir auksu pagrįstos detekcijos sistemos, kai, įvykus enziminei reakcijai, metalas „nusėda“ taikinio vietoje (152-154). Šiose visose reakcijose nenaudojami fluorescenciniai dažai, todėl gali būti taikoma standartinė šviesaus lauko mikroskopija, taigi kartu gali būti įvertinama ir audinio morfologija bei išvengiama FISH reakcijos nepatogumų.

CISH metodas, palyginti su FISH, yra pigesnis ir greitesnis, o chromogeniniai signalai išlieka ilgą laiką (140, 142, 143, 151). CISH testai yra dviejų tipų: pirmasis – standartinis CISH, turintis vieną HER2 zondą (*SPOT-Light HER2 CISH* rinkinys; *Life Technologies Corporation*) ir antrasis – dviejų spalvų CISH (*HER2 CISH PharmDx* rinkinys; *Agilent Technologies/DAKO Denmark*), kuriame yra du – HER2 ir CEP17 – zondai, leidžiantys įvertinti ir *HER2/CEP17* santykį (140, 145).

Taikant GOLDFISH technologiją, autometalografijos proceso metu aukso dalelės padidinamos, todėl jas lengva aptikti šviesiniu mikroskopu (154). Nors matomi susilieję masyvūs juodi signalai leidžia greitai atpažinti amplifikuotus atvejus, tačiau dėl sudėtingo diskrečių signalų vertinimo šis metodas neišpopuliarėjo (140).

SISH metodas (*INFORM HER2/neu; Ventana Medical Systems*) yra visiškai automatizuotas, sąlyginai greitai atliekamas (šešis kartus greičiau nei FISH) (155), o palyginti su CISH, yra jautresnis, pasižymi didesne amplifikuotų ir neamplifikuotų genų skiriamąja geba ir geresne audinio morfologijos vizualizacija. Tačiau šis metodas nepatogus tuo, kad *HER2* ir CEP17 kopijų nustatymui naudojami du atskiri objektiniai stikleliai (156).

Šio nepatogumo išvengiama taikant DISH metodą (*INFORM HER2 Dual ISH DNA probe cocktail assay; Ventana Medical Systems*) – dviejų spalvų, dviejų haptelių, šviesaus lauko *in situ* hibridizaciją, kai abu – HER2 ir CEP17 – žymenys nustatomi ant vieno objekcinio stiklelio. *HER2* geno kopijos nustatomos SISH metodu, o CEP17 – naudojant *fast red* sistemą (157). DISH turi visus SISH pranašumus (automatizuotas, greitai atliekamas, taikoma šviesaus lauko mikroskopija), tačiau yra ir silpnųjų šio metodo vietų: susiduriama su sunkumais atskiriant navikines ląsteles nuo jas supančių

stromos ląstelių ar limfocitų, kurie atrodo didesni nei įprastai; interpretaciją gali apsunkinti sidabro dulkių nuosėdos, sąlygojančios foninį dažymąsi; esant didesniai signalų kiekiui, šie gali iš dalies sutapti (158, 159). Nustatytas atitikties tarp FISH ir DISH dažnis yra nuo 83 % iki 97 % (156, 158-160).

Tyrimai parodė didelį atitikimo tarp CISH, SISH ir FISH metodų dažnį; 96 % tarp CISH ir SISH, nuo 81 % iki 100 % tarp CISH ir FISH bei nuo 94 % iki 98 % tarp SISH ir FISH (142, 143, 161).

Literatūroje nurodomas atitikimo tarp IHC ir FISH metodų vertinant HER2 būklę dažnis varijuoja nuo 73 % iki 98 % (148, 161-165). Didžiausias neatitikimas nustatytas IHC 2+ grupėje (164, 166-168).

### 1.2.3. Kiti HER2 tyrimo metodai

**Imunofermenčiu** (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) tyrimo metodu yra matuojamas išorinio HER2 receptoriaus domeno (angl. ECD), kurį gali nuskelti matrikso metaloproteinazės, kiekis serume (149, 169, 170). ECD aptinkamas dviem monokloniniais antikūnais, atpažįstančiais du skirtingus antigeno epitopus. Jei tyrimas atliekamas rankiniu būdu, antriniai antikūnai yra žymėti krienų peroksidaze, o vizualizacijai naudojamas fermento substratas. Susidaręs spalvinis reakcijos produktas, kuris matuojamas spektrofotometriškai, koreliuoja su HER2 ECD koncentracija tiriamajame mėginyje. Jei tyrimas atliekamas automatinio būdu, HER2 ECD vizualizuojamas taikant chemiliuminescencinę technologiją (antriniai antikūnai žymėti chemiliuminescenciniais junginiais). Išmatuota chemiliuminescencija yra tiesiogiai proporcinga HER2 ECD koncentracijai tiriamajame mėginyje (140).

ELISA yra kiekybinis, santykinai greitas ir paprastas tyrimo metodas. Kadangi tyrimui užtenka tik kraujo mėginio, metodas gali būti taikomas dinaminiam HER2 būklės pokyčiams stebėti ligos progresavimo metu arba po gydymo (171, 172). Šiuo metu FDA yra patvirtinusi HER2 ECD matavimo serume rinkinius, skirtus stebėti pacientų, sergančių metastazavusiu krūties vėžiu, HER2 ECD lygio pokyčius (173). Buvo manoma, kad HER2 ECD matavimas serume galėtų būti alternatyvi technika nustatant HER2 būklę, tačiau ne visiems pacientams, sergantiems teigiamu HER2 vėžiu, ECD reikšmės padidėja, o pacientai, kuriems yra neamplifikuoti HER2 navikai, EDC reikšmės gali būti padidėjusios (174). Be to, tyrimo rezultatai gali būti nepatikimi, jei pacientas gydomas trastuzumabu, nes šis, vis dar būdamas serume, gali konkuruoti su teste naudojamais antikūnais (175). Taigi serumo HER2 testas negali pakeisti IHC ir FISH testų, tačiau jis gali papildyti audinių tyrimo metodus – suteikti papildomos informacijos (172, 176).

**HERmark** (angl. *HERmark® Breast Cancer Assay; Monogram Bioscience*) tyrimo metodas pagrįstas patentuota *VeraTag* technologija, leidžiančia tiksliai kiekybiškai išmatuoti viso HER2 baltymo (angl. *total HER2*) raišką ir HER2 homodimerus FFPI audinių pjūviuose. Naudojami du monokloniniai antikūnai atpažįsta unikalius HER2 receptoriaus epitopus ir prisijungia prie jų greta vienas kito. Fluorescencinis *VeraTag* reporteris yra sujungtas su pirmuoju HER2 specifiniu antikūnu. Antrasis HER2 specifinis antikūnas yra konjuguotas su biotinu, o šis – su fotojautria molekule (FM). Atlikus mėginio fotoaktyvaciją sužadinama FM ir atpalaiduojami laisvieji deguonies radikalai, galintys nuskelti šalia esantį *VeraTag* reporterį. Atpalaiduotas reporteris kiekybiškai įvertinamas kapiliarine elektroforeze ir yra proporcingas HER2 koncentracijai mėginyje (177, 178).

Šis metodas, kuriuo galima aptikti nuo 2 500 iki daugiau kaip 1 milijono HER2 receptorių vienoje ląstelėje, yra 7–10 kartų jautresnis nei IHC (179). Viename iš tyrimų buvo parodyta, kad HERmark metodas gerai koreliavo su rutiniu HER2 tyrimu IHC ir FISH metodais, o esant skirtingiems HER2 tyrimo rezultatams, HERmark tiksliau prognozavo pacientų išgyvenamumą. Teigiama, kad tikslesnis HER2 būklės nustatymas šiuo metodu galėtų pakeisti taikinių terapijos skyrimą ~ 20 % pacientų (180); tačiau šiuos radinius reikėtų patvirtinti tolesnėse klinikinėse studijose.

**Polimerazine grandinine reakcija (PGR) grįsti metodai** – tai kiekybiniai realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos (RL-PGR; angl. *quantitative real-time PCR, Q-PCR*) metodai, taikomi nustatyti *HER2* geno kopijų skaičiaus pokyčius, o atvirkštinės transkripcijos PGR (AT-PGR; angl. *RT-PCR – reverse transcription PCR*) – raiškos pokyčius (181, 182).

RL-PGR metu gausinamam DNR fragmentui aptikti naudojamos su DNR besijungiančios fluorescuojančios žymės. Fluorescencijos signalo didėjimas, kurį galima stebėti kompiuterio ekrane realiu laiku, yra tiesiogiai proporcingas kiekvieno PGR ciklo metu gausinamam produkto kiekiui. Taigi, matuojant fluorescencijos intensyvumą, kartu matuojamas ir produkto kiekis.

AT-PGR metu nustatomas iRNR kiekis tiriamajame mėginyje. Iš audinių išskirta RNR atvirkštinės transkripcijos būdu paverčiama į kopijinę DNR (kDNR), o ši išmatuojama kiekybiniu PGR. Nustatytas pagausintos kDNR kiekis yra santykinai proporcingas *HER2* geno raiškai tiriamojame medžiagoje. Tiriamojo *HER2* geno raiškos fluorescencijos intensyvumas lyginamas su kontrolinių genų raiška. AT-PGR technologija yra pagrįstas *Oncotype Dx* (*Genomic Health Inc*) testas, kuriuo įvertinama su krūties vėžio biologija susijusio 21 geno raiška (tarp jų HER2, ER bei PR) naviko audinyje. Šiuo



testu galima numatyti ligos atsinaujinimo riziką ir prognozuoti chemoterapijos efektyvumą pacientėms, kurių ER+, o liga dar neišplitusi į limfmazgius (183).

Realaus laiko PGR yra santykinai greitas, nesudėtingas ir nebrangus *HER2* geno amplifikacijos tyrimo metodas. Tyrimui reikia nedidelio iš FFPI audinių išskirto DNR kiekio, be to, kiekybiniai rezultatai leidžia išvengti subjektyvaus vertinimo (140, 184). Nepaisant šių pranašumų, PGR nebuvo patvirtintas kaip *HER2* amplifikacijos diagnostikos metodas. Pagrindinė priežastis – PGR rezultatai dažnai siejami su klaidingai neigiamais rezultatais, nes DNR gali būti išskirta ne tik iš naviko, bet ir iš aplinkui esančių stromos ląstelių ar sveiko audinio. Tiksliai atrinkti tiriamąsias navikines ląsteles galėtų padėti lazerinės mikrodisekcijos metodas (181, 185).

AT-PGR metodas yra sudėtingesnis ir problemiškesnis: RNR vientisumą gali pažeisti audinių fiksacija, apdorojimas, FFPI audinių laikymo trukmė, be to, iš FFPI audinių išskirtai RNR yra būdinga fragmentacija (185).

**Sudėtinės liguojamų zondu amplifikacijos** (angl. *multiplex ligatable probe amplification*; MLPA) metodas yra pagrįstas zondu porų, turinčių specifines taikiniui sekas ir universalias PGR pradmens jungimosi sekas, pagausinimu. Pirmiausia, denatūruota tiriamoji DNR hibridizuojama su zondu mišiniu. Tik tada, kai zondai prisijungia prie tiriamosios DNR vienas šalia kito, jie yra suliguojami fermentu ligaze. Toks iš dviejų atskirų zondo dalių susidaręs vientisas zondas yra pagausinamas PGR. Kiekvienam zondui yra būdingas unikalus ilgis, todėl gautus PGR produktus galima atskirti kapiliarine elektroforeze. Pagausintų zondu kiekis yra proporcingas taikinio kopijų skaičiui, todėl santykinis smailių aukštis atitiks pradinį tiriamųjų sekų kiekį ir leis nustatyti jų kopijų skaičiaus pokyčius (amplifikacijas, delecijas) (140, 174). Vienoje PGR reakcijoje gali būti pagausinta iki 45 zondu porų (specifinių skirtingiems genams ar skirtingoms geno dalims) (186).

MLPA yra santykinai greitas ir nebrangus, tikslus, didelio našumo ir lengvai interpretuojamas metodas. Tyrimui užtenka nedidelio iš FFPI audinių išskirtos DNR kiekio (140). Šis metodas galėtų būti alternatyvus ar papildantis IHC ir *in situ* hibridizacijos metodus. Studijos parodė gerą metodo atitiktį IHC, FISH ir CISH metodams (186, 187), tačiau MLPA nėra kliniškai validuotas. Šiuo metodu gautų rezultatų tikslumui gali turėti įtakos mėginio grynumas ir nedideli eksperimento sąlygų pokyčiai, todėl tyrimo rezultatus būtina patvirtinti kitu metodu. Be to, nėra išsaugoma audinio morfologija, gali likti nepastebėtas heterogeniškumas, klaidinančius rezultatus gali sąlygoti į analizę patekęs DCIS komponentas. Šiame tyrime navikas turi sudaryti didelę procentinę dalį (> 30 %), todėl yra būtina nepriekaištinga navikinės medžiagos atranka (140, 174, 186).

**Geno ir baltymo tyrimo** metodas leidžia vienu metu tame pačiame FFPI pjūvyje nustatyti ir HER2 baltymo, ir *HER2* geno raiškas. Literatūroje aprašomi keletas tokio tyrimo būdo variantų.

Viename jų yra sujungiami IHC ir vienos spalvos SISH (*EnzMet GenePro, Ventana Medical Systems*). *HER2* geno amplifikacija aptinkama naudojant sidabro išsodinimo metodą, o HER2 baltymas – šarminę fosfatazę ir *fast red* substratą. Lyginant rezultatus, gautus šiuo metodu ir vien tik IHC, nustatytas puikus atitikimas (188). Metodas gali padėti interpretuoti paribinius atvejus, nustatyti *HER2* amplifikuotus, kai nepadidėjusi baltymo raiška, atvejus ir atvirkščiai (189).

Kiti tyrėjai kartu taikė HER2 IHC ir vienos spalvos CISH metodus. Baltymui aptikti taip pat naudojama šarminės fosfatazės ir *fast red* substrato sistema. Paskui vykdoma CISH reakcija digoksigeninu žymėtu HER2 zonu, kurio aptikimui ir vizualizacijai naudojami antikūnas prieš digoksigeniną, krienų peroksidazės ir polimero konjugatas ir DAB chromogenas. Palyginus *HER2* geno būklės vertinimo rezultatus šiuo ir FISH metodais, nustatyta 90 % atitiktis analizuojant visus pjūvius ir 92 % audinių mikrogardelių atveju (190).

Dar viename geno ir baltymo tyrime buvo bandyta pirmiausia atlikti vienos spalvos CISH tuo pačiu būdu kaip aprašyta pirmiau, o paskui HER2 baltymo ekspresiją įvertinti krienų peroksidazės / DAB sistema. Nustatyta 100 % atitiktis tarp rezultatų, gautų šiuo jungtiniu protokolu ir atskirai CISH reakcija. Tačiau lyginant su atskiru IHC dažymu, gauta 78 % atitiktis (191).

Puikūs rezultatai buvo gauti automatiniu trijų spalvų geno ir baltymo tyrimu. Tai metodas, apimantis HER2 IHC dažymą ir paskui vykstantį geno amplifikacijos tyrimą *FDA* patvirtintu dviejų spalvų *in situ* hibridizacijos metodu (*INFORM HER2 Dual ISH DNA probe cocktail assay, Ventana Medical Systems*). Šiame protokole HER2 baltymas vizualizuojamas DAB sistema, *HER2* geno aptikimui taikomas krienų peroksidazės ir sidabro išsodinimo metodas, o CEP17 – šarminė fosfatazė ir *fast red* sistema. Atitikties dažnis tarp šio geno ir baltymo metodo ir atskirų IHC bei dviejų spalvų *in situ* hibridizacijos metodų buvo atitinkamai nuo 97,8 % iki 99,5 % ir nuo 96 % iki 97,7 % (192). Tačiau palyginus jungtinio geno ir baltymo ir FISH tyrimų rezultatus tik HER2 paribinių atvejų (2+) grupėje, gauta mažesnė – 82 % atitiktis (193).

Esminis šio metodo pranašumas – galimybė vienu tyrimu interpretuoti HER2 būklę įvertinant ir baltymo raišką, ir geno kopijų skaičių atskiros ląstelės lygmeniu. Todėl šis metodas gali būti ypač naudingas analizuojant paribinius ir heterogeniškus atvejus. Be to, metodas yra greitesnis negu FISH (trumpesnis nei 24 val.), analizė atliekama šviesaus lauko mikroskopu, todėl

kartu įvertinama audinio morfologija ir lengviau aptinkamos heterogeniškos sritys (192-194). Tačiau metodas yra brangus, reikalinga brangi automatinė stiklų dažymo mašina.

HER2 geno ir baltymo tyrimai taip pat galimi taikant fluorescencinę mikroskopiją, kai atliekamos imunofluorescencijos ir FISH procedūros (195, 196). Tačiau tai yra ilgai trunkanti ir problemiška, optimizuojant abiejų (imunofluorescencijos ir FISH) reakcijų sąlygas, procedūra (197, 198).

**iRNR *in situ* hibridizacijos** metodas, kuriuo įvertinama genų raiška FFPI audiniuose, yra pagrįstas hibridizacija tarp viengrandinių DNR zondų ir taikininio geno iRNR. Tai chromogeninė technika: žymėtą zondą atpažįsta su krienų peroksidaze konjuguoti antikūnai, reakcija vizualizuojama naudojant DAB chromogeną. HER2 raiška teigiama, jei ląstelės citoplazma nusidažo rusva spalva (199).

iRNR *in situ* hibridizacija yra greitas (trunka apie 4 val.), santykinai nebrangus, pusiau automatinis metodas. Vertinimas atliekamas šviesaus lauko mikroskopu. Tačiau iRNR fiksuotuose audiniuose yra daug mažiau stabilesnė nei DNR, o tai gali turėti įtakos tyrimo rezultatų patikimumui (140).

#### 1.2.4. Automatinė ir skaitmeninė analizė

Nepaisant HER2 tyrimo metodų gausos, tiksli šio biožymens diagnostika tebėra aktuali problema. Griežta tyrimo procedūrų standartizacija yra būtina siekiant tikslesnių, atkartojamų ir patikimų rezultatų. ASCO/CAP gairėse pateikiamos rekomendacijos standartizuoti HER2 tyrimą automatizuojant IHC ir *in situ* hibridizacijos procedūras (22, 141). Automatizuoti IHC, fluorescencinio ir šviesaus lauko *in situ* hibridizacijos tyrimo metodai leidžia ne tik sumažinti procesų variabilumą bei žmogiškojo faktoriaus įtaką tyrimo eigai, bet ir padidinti tyrimų apimtį ir sutaupyti tyrėjų darbo laiko (153, 157, 174, 200, 201). Daugumoje laboratorijų yra naudojami automatiniai audinių procesoriai, automatinės IHC dažymo sistemos, kurie leidžia tą pačią dieną toje pačioje laboratorijoje paruošti analizei šimtus tiriamųjų atvejų ir gauti atsikartojančius rezultatus.

Į patologijos diagnostiką įžengus automatizuotoms skaitmeninėms vaizdo analizės technologijoms, atsirado papildomų galimybių visapusiškai (t. y. tyrimus atlikti naudojant ir automatizuotą paruošimo procedūrą, ir automatizuotą vaizdo analizę) standartizuoti HER2 tyrimus ir objektyvizuoti HER2 būklės vertinimą. Skaitmeninė vaizdo analizė jau yra tapusi svarbiu įrankiu IHC tyrimuose, leidžiančiu „kompensuoti“ IHC metodo trūkumus – pusiau kiekybinę analizę bei subjektyvų ir variabilų tyrėjų vertinimą. Naudojantis skaitmeninės vaizdo analizės priemonėmis sumažėja tyrėjų,

interpretuojančių IHC tyrimų rezultatus, neatitikimai ir pagerėja rezultatų atkartojamumas (202-205). Šiuo tyrimo būdu galima nustatyti itin subtilius biožymens raiškos pokyčius, kurių nepastebi žmogaus akis. Atliktos studijos parodė geresnę skaitmeninės vaizdo analizės atitiktį su FISH nustatant amplifikuotus atvejus nei taikant tradicinį IHC metodą (206). Be to, taikant skaitmeninę vaizdo analizę, galima tiksliau suskirstyti paribinius HER2 (IHC 2+) atvejus į neigiamą (IHC 1+) ir teigiamą (IHC 3+) kategorijas, vadinasi, kartu sumažinti ir FISH tyrimų skaičių (205, 207, 208).

Itin svarbus automatizuotos vaizdo analizės pranašumas yra galimybė įvertinti HER2 raišką kiekybiniais parametrais. Tai suteikia ypač vertingos informacijos apie ląstelių populiacijų įvairovę navikiniame audinyje. O analizuojant rezultatus įprastu IHC metodu, visas tiriamasis navikas įvertinamas viena verte (0, 1+, 2+ ar 3+), neatsižvelgiant į heterogenišką sritį; tai gali nulemti netinkamą gydymo parinkimą ir atsaką į jį. Todėl, siekiant individualizuoti krūties vėžio gydymą, yra aktualu sukurti patikimus HER2 raiškos heterogeniškumo matavimo metodus (209, 210).

Skaitmeninėje vaizdo analizėje taip pat yra galimos klaidos dėl netikslaus audinių bei ląstelių atpažinimo klasifikatoriaus ir technologinės IHC variacijos. Susiduriama su ląstelių membranų segmentavimo problema, ypač tais atvejais, kai membrana nevisiškai ir silpnai nusidažo (211).

Yra įvairių sistemų, siūlančių automatinę HER2 baltymo analizę: *Automated cellular imaging system (ACIS; ChromaVision Medical Systems Inc)* (212), *Aperio Technologies (Vista)* (203, 206), *Ariol image analysis system (Leica Microsystems)* (213), *Halo (Indica Labs)* (214), *QuPath (Queen's University Belfast)* (215), *Ventana Image Analysis System (VIAS; Ventana Medical Systems)* (216) ir kitų.

Imunofluorescencija kartu su vaizdo analize yra dar vienas būdas atlikti automatinę ir kiekybinę HER2 baltymo raiškos analizę. Tokius tyrimus galima atlikti *AQUA (HistoRx/Genoptix)*, *Tissue Studio (Definiens)*, *inForm (Caliper/Perkin-Elmer)*, *MultiOmyx (Clariant)*, *StrataQuest/TissueQuest (TissueGnostics)*, *BIOtopix/ONCotopix (Visopharm)* platformomis. Imunofluorescencija pagrįsto baltymų raiškos vizualizavimo FFPI metodo pranašumai yra didesnis dinaminis signalo diapazonas ir galimybė nustatyti daugybinius žymenis. Didesnis imunofluorescencinių signalų jautrumas leidžia aptikti biožymenis naudojant mažesnes antikūnų koncentracijas arba sutrumpinti inkubavimo laiką ir taip sumažinti nespecifinį dažymąsi (217, 218).

Daug žadanti krūties vėžio biožymenų tyrimuose yra *AQUA* technologija, leidžianti gauti kiekybinius, tolydžius ir atsikartojančius rezultatus (219-221).

*AQUA* sistemoje, kuri yra sujungta su fluorescencinio mikroskopo sistema, naudojami pažangūs vaizdo analizės algoritmai, o baltymas aptinkamas išmatuojant su antikūnais konjuguotų fluoroforų intensyvumą specifinėje ląstelės dalyje (220). Ši technologija buvo taikyta ir matuojant heterogeniškumą (222).

Nemažai pastangų dedama siekiant pritaikyti automatizuotas skaitmeninės vaizdo analizės priemones *HER2* FISH diagnostikoje. Įprastinė *HER2* FISH analizė mikroskopu yra kiek varginanti, subjektyvi ir santykinai ilgai trunkanti, ypač esant paribiniams ir (ar) heterogeniškiems atvejams (223, 224). Be to, įvertinamas tik ribotas ląstelių skaičius. Pasitelkus automatizuotą vaizdo analizę galima ne tik palengvinti tyrėjo darbą, išsaugoti FISH vaizdus ir analizės rezultatus skaitmeninėje erdvėje, bet ir ištirti dideles ląstelių populiacijas bei identifikuoti heterogeniškas navikinio audinio sritis. Skaitmeninė vaizdo analizė įvertina visas automatiškai nustatytas ląsteles, todėl vertinimas nebūna subjektyvus. Įvairūs gamintojai (*Leica Microsystems*, *MetaSystems*, *TissueGnostics*, *BioView*, *3DHISTECH*, *Applied Spectral Imaging*) siūlo automatinės FISH analizės algoritmus, tačiau tik vienintelis *Leica* siūlo visapusiškai automatizuotą *HER2* FISH analizę, apimančią pačią procedūrą ir vaizdo analizę (225).

Automatinės FISH vaizdų analizės algoritmai susideda iš dviejų pagrindinių etapų: branduolių segmentavimo bei *HER2* ir CEP17 signalų nustatymo. Segmentavimo uždavinys yra sudėtingas, nes branduoliai skiriasi tiek savo morfologija: dyžiu, forma, tekstūra, tiek išsidėstymu: yra atskiri, susitelkę į grupes, besiliečiantys kraštais arba iš dalies vienas kitą uždengiantysys. Dėl didžiulės fluorescencinių vaizdų variacijos (fono intensyvumo skirtumai, morfologinė branduolių įvairovė, autofluorescencija ir kt.) segmentavimo klaidų neįmanoma išvengti, todėl automatizuotose programose yra galimybė papildomai rankiniu būdu atlikti tinkamų analizei branduolių atranką. Tačiau, įsiterpus tyrėjui, analizė nebus visiškai automatinė. *HER2* ir CEP17 signalų nustatymo tikslumui įtakos turi įvairūs foniniai dariniai bei signalų intensyvumo skirtumai, trukdantys juos tinkamai sufokusuoti. Patikimų sprendimų trūksta automatiškai vertinti amplifikuotus atvejus, kuriuose *HER2* signalai yra susispietę į telkinius (homogeniškai besidažančias sritis). Kai kurios programos siūlo tokius atvejus vertinti pritaikius specialų signalo plotą išmatuojantį algoritmą (226, 227).

Literatūroje aprašomi sėkmingi *HER2* teigiamų ir neigiamų atvejų vertinimai automatizuotomis programomis, tačiau paribinių atvejų analizė vis dar nėra patikima (223, 227). Vis dėlto viename naujesnių tyrimų buvo gauti pakankamai tikslūs rezultatai neišskiriant paribinių atvejų grupės (225). Tai

rodo, kad automatizuoti skaitmeninės vaizdo analizės algoritmai yra nuolat tobulinami ir ateityje jie gali padėti rutininei *HER2* geno amplifikacijos diagnostikai.

### 1.3. *HER2* baltymo ir geno raiškos tyrimų variacija

Nustačius, kad net iki 20 % atliekamų *HER2* tyrimų rezultatai tiek IHC, tiek FISH metodais įvairiose laboratorijose nesutampa (228, 229), 2007 m. ASCO/CAP paskelbė rekomendacijas tyrimų variabilumui sumažinti (21). Nuo to laiko buvo įdėta nemažai pastangų siekiant standartizuoti ir kuo tiksliau atlikti *HER2* tyrimus. Neseniai atliktoje studijoje parodyta, kad Vokietijos vietinėse ir centrinėse laboratorijose per 12 metų pasiekta didesnė nei 90 % *HER2* tyrimų rezultatų atitiktis (230).

*HER2* tyrimo neatitikimai galimi dėl technologinių ir biologinės kilmės – navikinio audinio heterogeniškumo bei CEP17 kopijų skaičiaus variacijos, priežasčių. Didžiausių nesutapimų randama paribinių, artimų teigiamai reikšmei atvejų grupėje (19, 164, 168).

#### 1.3.1. *HER2* tyrimo technologiniai variacijos šaltiniai

*HER2* tyrimo procese galima išskirti preanalitines, analitines ir postanalitines fazes, apimančias skirtingus technologinius etapus: audinių fiksaciją ir apdorojimą, antigeno atkūrimo ir testo procedūras, rezultatų interpretavimą ir kt. (143, 231). Visi sudėtiniai etapai turi įtakos tiksliam *HER2* būklės nustatymui, todėl, siekiant standartizuoto tyrimo, jie turi būti kontroliuojami (232).

Preanalitiniai veiksniai yra kritiniai siekiant gauti atsikartojančius ir patikimus *HER2* IHC tyrimo rezultatus (228, 233). Manoma, kad jie turi mažiau įtakos geno amplifikacijos nustatymu pagrįstiems metodams, nes DNR yra stabilesnė nei baltymas (143). Preanalitiniai veiksniai yra susiję su tiriamo audinio paruošimo ir apdorojimo procedūromis. Remiantis ASCO/CAP gairių *HER2* tyrimo rekomendacijomis, mėginiai turi būti pradėti fiksuoti kuo skubiau – greičiau nei per 1 val. (22). Vėluojanti fiksacijos pradžia lemia baltymų ir kitų ląstelės struktūrų degradaciją (234). Vis dėlto nuomonės dėl tikslaus uždelstos fiksacijos pradžios poveikio *HER2* IHC ir *in situ* hibridizacijos tyrimams yra prieštaringos. Atidėjus audinių fiksaciją 3 val. ir atlikus *HER2* tyrimą IHC, FISH ir DISH metodais, jokio neigiamo poveikio *HER2* raiškos vertinimui nenustatyta (235). Dar viename tyrime buvo parodyta, kad atidėjus fiksaciją 4 val., antigeninės *HER2* baltymo savybės nebuvo prarastos (236). Tačiau kitu tyrimu buvo nustatytas sumažėjęs *HER2*

IHC dažymosi intensyvumas, kai fiksacija buvo atidėta mažiau nei 1 val. (237). Dar vienoje studijoje gautas reikšmingas HER2 IHC dažymosi intensyvumo sumažėjimas, kai tiriamieji mėginiai buvo laikomi šaltai, o fiksacija atidėta 4 val., ir kai tiriamieji mėginiai buvo laikomi kambario temperatūroje, o fiksacija atidėta 2 val. (238). Vienu autorių nuomone, uždelsta fiksacijos pradžia neturi didelę neigiamą įtaką HER2 FISH rezultatams (144, 239), kiti tam prieštarauja ir rekomenduoja neatidėti fiksacijos ilgiau nei 1 val. (233).

Audinių fiksavimui turi būti naudojamas 10 % neutralus buferinio formalino tirpalas. Rekomenduojama fiksacijos trukmė krūties vėžio mėginiams yra 6–72 val. (22). Buvo manoma, kad per ilgą fiksaciją gali būti susijusi su klaidingai neigiamais HER2 tyrimo rezultatais (141), tačiau atlikti išsamūs tyrimai parodė, kad daugiau nei 72 val. pailgintas fiksacijos laikas įtakos HER2 baltymo raiškai neturėjo (232, 240). HER2 biožymens imunoreaktyvumą gali sumažinti tik gerokai užtęsta fiksacija ( $\geq 20$  dienų), bet ji klinikiniams tyrimams nebūdinga (241). Viena iš tyrimų taip pat buvo analizuotas fiksacijos trukmės nuo 2 val. iki 1 savaitės poveikis HER2 FISH analizės rezultatams. Nustatyta, kad HER2 FISH signalai nebeaptinkami tik po 1 savaitės fiksacijos (242). Per ilgą fiksaciją gali lemti stiprių jungčių tarp baltymų susidarymą, o tai pareikalaus agresyvesnės audinio apdoravimo procedūros atliekant FISH reakciją, kuri gali lemti signalų praradimą ar pažeisti branduolių morfologiją (243). Per trumpą fiksaciją gali paveikti antigenų atkūrimo procedūrą (244), dėl per trumpos fiksacijos gali sumažėti HER2 IHC dažymosi intensyvumas ir nenusidažyti dalis ląstelių (245). Tačiau tyrimų, analizuojančių per trumpos fiksacijos poveikį HER2 rezultatams, yra nedaug (246). Todėl reikalinga išsamesnė per trumpos fiksacijos poveikio analizė, kuri apimtų stipriai, vidutiniškai ir silpnai ekspresuojančias HER2 baltymą navikų grupes.

Fiksavimo etape taip pat svarbu atsižvelgti į tiriamųjų mėginių matmenis siekiant užtikrinti fiksatoriaus skvarbą į visus audinių sluoksnius ir kontroliuoti pakankamą fiksatoriaus kiekį. HER2 raiškos tyrimui rekomenduojama mėginius supjaustyti 5–10 mm intervalu (22, 141).

HER2 IHC reakcijos kokybei įtakos turi laiko tarpas tarp pjūvių atpjovimo ir jų nudažymo. Šis terminas turėtų būti ne ilgesnis nei 6 savaitės (141). Viena tyrimo buvo parodyti HER2 IHC dažymo intensyvumo skirtumai tarp šviežiai atpjautų pjūvių ir 6 mėnesių senumo pjūvių, laikytų +4 °C temperatūroje (247). Kiti tyrėjai teigia, kad audinio antigeninių savybių mažėjimas prasideda dar anksčiau – jau po 2 savaičių nuo pjūvio atpjovimo (248).

Audinio pjūvio storis yra irgi svarbus interpretuojant HER2 IHC ir FISH reakcijų rezultatus. Standartinis pjūvių storis IHC yra 3–5  $\mu\text{m}$ , todėl pjūvyje gali būti matoma tik branduolio, kuris vidutiniškai yra 6  $\mu\text{m}$  dydžio, dalis (249). Tokių nupjautų branduolių dažymosi intensyvumas yra silpnas. Tai svarbu, nes šie branduoliai gali būti nevertinami kaip teigiami. Storesni audinių pjūviai dažosi intensyviau, nes juose yra daugiau audinio, daugiau antigeno, taigi ir daugiau galutinio reakcijos produkto (250, 251). Taip pat gali būti nevienodas pjūvio storis, tačiau tai galima nustatyti tik skaitmeninės vaizdo analizės priemonėmis. Todėl, atliekant šį darbą, labai svarbu dažna mikrotomų kalibracija ir technologų patirtis.

FISH procedūroje įprastai naudojami 4  $\mu\text{m}$  FFPI pjūviai. Esant ploniems pjūviams yra nupjaunami branduoliai (kartu su jais – *HER2* ir *CEP17* signalai), o tai gali sąlygoti didesnę klaidų skaičių vertinant monosominius atvejus. Kadangi *CEP17* signalai yra išsidėstę labiau branduolio periferijoje, jie yra dažniau nupjaunami nei *HER2* signalai (249, 252). Taip pat teigiama, kad ploni pjūviai gali turėti įtakos interpretuojant heterogeniškus ir (ar) paribinius atvejus (253). Per daug storuose pjūviuose branduoliai gali iš dalies uždengti vienas kitą, sunkiau gali vykti deparafinizacijos, apdorojimo proteaze bei zondo pasklidimo audinyje procesai (254).

Analitinės fazės veiksniai, kurie yra susiję su *HER2* tyrimo procedūromis, gali sąlygoti varijuojančius *HER2* tyrimų rezultatus toje pačioje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose (143). Todėl laboratorijose *HER2* tyrimams privaloma taikyti validuotus metodus bei remtis standartizuotomis metodikomis. ASCO/CAP gairėse yra rekomenduojama, kad, prieš pradėdant *HER2* diagnostikai taikyti metodą, šis turi būti validuotas analizuojant *HER2* teigiamų ir neigiamų atvejų grupes, o gauti rezultatai turi atitikti 95 % rezultatų, kurie buvo gauti validuotu *HER2* tyrimo metodu (141, 255).

IHC reakcijos kokybei gali turėti įtakos visi sudėtiniai procedūros etapai: antigeno atkūrimo technikos, antikūnų tipas, antikūnų koncentracija, naudojami reagentai, detekcijos sistemos (251). Nors daugumoje laboratorijų *HER2* IHC diagnostikai naudojami paruošti komerciniai rinkiniai, kuriuose yra *FDA* patvirtinti antikūnai, o testai atliekami pusiau automatinėse ar automatinėse sistemose, tačiau vis tiek yra būtina protokolų optimizacija (256).

Formalinas maskuoja antigeno epitopus, todėl, siekiant sėkmingos IHC reakcijos, yra būtina antigeno atkūrimo procedūra, kurios metu būtų pašalintos antigenus maskuojančios jungtys ir antigenus blokuojantys baltymai. Antigeno atkūrimo tipas, antigeno atkūrimo tirpalo cheminė sudėtis ir pH vertė, įvairūs temperatūros režimai gali turėti didelę įtaką audinio dažymuisi



(251). Yra žinoma, kad antigenų atkūrimas gali dirbtinai padidinti dažymosi intensyvumą, pažeisti ląstelių morfologiją, todėl rekomenduojama, kad antigeno atkūrimo procedūra ir pats dažymas būtų atliekami automatizuotu būdu (257). Taip pat labai svarbu į visus protokolus įtraukti standartines HER2 teigiamą ir neigiamą kontroles, kurios patvirtina sėkmingą testo atlikimą.

Rinkoje siūloma daugybė antikūnų prieš HER2, iš kurių dažniausiai naudojami A0485 (*Dako*), CB11 (*Novocastra*), SP3 (*Lab Vision*) bei 4B5 (*Ventana*) antikūnai. Tyrime, kuriame buvo palyginti išvardyti antikūnai, gauta labai gera atitiktis tarp IHC analizių (daugiau kaip 0,82). CB11 buvo specifiausias antikūnas, tačiau juo nustatyta daugiausia klaidingai neigiamų atvejų. Likusieji antikūnai buvo jautrūs ir specifiški, bet gautas didesnis klaidingai teigiamų atvejų dažnis. Naudojant A0485 antikūną, nustatyta daugiau paribinių IHC atvejų (258). Antikūnai skiriasi savo kloniškumu, jautrumu, specifiskumu, todėl studijose, lyginančiose skirtingus antikūnus, nustatoma didelė HER2 raiškos variacija (259-261). Viena iš tyrimų buvo palyginta 7 polikloninių ir 21 monokloninio anti-HER2 antikūnų jautrumas ir specifiskumas. Antikūnų jautrumas varijavo nuo 6 % iki 80 %, tačiau nė vienu antikūnu nepavyko nustatyti visų atvejų, kuriais jau buvo patvirtinta padidėjusi HER2 raiška (259).

Kiekviename FISH procedūros etape taip pat svarbu laikytis reakcijos sąlygų tikslumo ir naudoti kokybiškai paruoštus tirpalus. Be to, ši procedūra reikalauja, kad tyrėjas turėtų nemažą jos atlikimo patirtį. Technologija susideda iš keleto etapų, kuriuose temperatūros ir reakcijos trukmės režimai yra kritiniai. Jų nesilaikymas gali nulemti prastesnę tiriamojo mėginio kokybę, stiprų foną ar visišką audinio praradimą (147, 262).

Pirmas svarbus etapas yra tinkamas FFPI audinių apdorojimas (angl. *pretreatment*), kai pašalinamos fiksacijos formaline metu susidariusios cheminės jungtys. Šio etapo metu, audinių pjūvius veikiant druskos rūgštimi bei vėliau juos apdorojant proteaze, siekiama paveikti ląstelių membranų pralaidumą ir taip padėti fluorescenciniams zondams prasiskverbti į ląstelės vidų. Audinio apdorojimo proteaze sėkmė priklauso nuo proteazės koncentracijos, inkubacijos laiko ir inkubacijos temperatūros ( $37 \pm 1$  °C) (262). Esant net ir nedideliame temperatūros padidėjimui, fermento aktyvumas padidėja ir tai lemia per stiprų audinio apdorojimą ir vertinimui netinkamą jo kokybę. Esant nepakankamam audinio apdorojimui, ląstelės citozolyje bei išorinėje jos dalyje matyti žalios spalvos autofluorescuojančio fono perteklius, o nepašalinami baltymai bei peptidinės jungtys trukdo hibridizacijos procesui. Visa tai lemia fono triukšmingumą ir fluorescencinių signalų intensyvumo sumažėjimą ar praradimą (233, 243).

Laštelių branduolių vizualizacijai naudojamas fluorescencinis dažas DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate), kuris jungiasi su DNR. Per trumpas proteazės poveikis trukdo formuotis DNR ir DAPI kompleksui, todėl branduolių nusidažymas atrodo heterogeniškas. Per ilgai veikiant audinį proteaze, suardoma branduolių morfologija, branduoliai gali būti tuščiaviduriai ar pažeistomis membranomis. Tokie branduoliai būna praradę DNR, taigi ir tiriamuosius genus žyminčius fluorescencinius signalus.

Pohibridizaciniame etape netikslios plovimo buferio pH (turi būti nuo 7,0 iki 7,5) ir temperatūros (turi būti  $72 \pm 1^\circ$ ) reikšmės gali turėti įtakos nespecifiniam zondų jungimuisi, triukšmingo fono susidarymui ir fluorescencinių signalų intensyvumo sumažėjimui ar net praradimui (243).

Reguliari įrangos priežiūra bei kalibracija, standartinių laboratorijos procedūrų naudojimas, personalo kompetencija, nuolatinių personalo mokymų programų vykdymas yra būtinybė, siekiant sumažinti tyrimų variabilumą (141).

Postanalitiniai veiksniai yra susiję su tyrimo rezultatų interpretacija, vaizdo analize, protokolų ruošimu, kokybės užtikrinimo procedūromis (141, 244).

Subjektyvus HER2 IHC rezultatų vertinimas yra vienas iš pagrindinių variabilumo šaltinių, ypač paribinių atvejų grupėje (256, 263). Tai sąlygoja pusiau kiekybinis HER2 IHC vertinimo metodas, galintis suklaidinti net ir patyrusį specialistą. Be to, neužtikrintumą interpretuojant HER2 IHC tyrimų rezultatus sustiprina vis besikeičiantys vertinimo kriterijai (15, 21, 22). Skaitmeninių vaizdo analizės sistemų taikymas leistų objektyviau interpretuoti rezultatus ir sumažinti variabilumą tarp tyrėjų (212, 255). Tačiau skaitmeninė vaizdo analizė taip pat yra imli variabilumui, kurį gali sąlygoti tiek pati įranga, tiek metodika, ir reikalauja reguliaraus techninio aptarnavimo ir kalibracijos (143, 264).

HER2 FISH tyrimų mikroskopu rezultatai gali varijuoti dėl riboto vertinamų branduolių skaičiaus ir, kaip IHC atveju, subjektyvaus tyrėjo vertinimo (19, 23, 27). Žmogaus akis yra linkusi ieškoti ir analizuoti „įtartinus“, daugiau HER2 kopijų turinčius branduolius (227). Standartiškai, pagal ASCO/CAP gaires, turi būti išanalizuota 40 branduolių, o nustačius paribinę vertę – 60 branduolių (22). Tačiau, esant sudėtingiems paribiniams ir (ar) heterogeniškiems atvejams, objektyviam įvertinimui šio branduolių skaičiaus gali nepakakti, galimi klaidingi rezultatai. Viename iš tyrimų buvo parodyta, kad galutinis HER2 FISH tyrimo rezultatas yra priklausomas nuo tiriamojo audinio bloko, pasirinkto analizuoti ploto ir vertinamų branduolių skaičiaus (265). Atliktose studijose pabrėžiama, kad, siekiant tikslesnių

rezultatų, būtina standartizuoti *HER2* FISH vertinimo metodiką, kuri praktikoje gali būti varijuojanti (19).

Taikant automatines FISH analizės sistemas analizuojami visi algoritmo aptikti branduoliai, turintys bet kokius *HER2* ir CEP17 taškų derinius, todėl rezultatus galima įvertinti objektyviai ir sumažinti galimų klaidų riziką (227).

Siekiant kompetentingo *HER2* tyrimo, rekomenduojama, kad laboratorijose būtų ištiriama ne mažiau nei 250 atvejų per metus IHC metodu ir ne mažiau nei 100 atvejų (pageidautina 150) per metus *in situ* hibridizacijos metodu, o specialistai įvertintų po 50–100 atvejų per metus (266). *HER2* gairėse laboratorijoms yra rekomenduojama dalyvauti išorinėse tyrimų kokybės kontrolės užtikrinimo programose, kurios leidžia objektyviai įvertinti atliekamų tyrimų rezultatų patikimumą ir tikslumą (22, 141). Tokios programos yra įkurtos JAV (*College of American Pathologists Quality Improvement Program*), Didžiojoje Britanijoje (*UK-NEQAS*), Šiaurės šalyse (*Nordic QC*), Kanadoje (*Canadian Immunohistochemistry Quality Control*), Australijoje (*Royal College of Pathologists of Australasia*) (267-269).

### 1.3.2. *HER2* tyrimo biologiniai variacijos šaltiniai

Dalį netikslumų vertinant *HER2* būklę lemia heterogeniška *HER2* baltymo ir geno raiška bei 17 chromosomos kopijų skaičiaus pokyčiai.

#### **Heterogeniška *HER2* raiška**

Vėžį galima apibūdinti kaip įvairaus dydžio klonų populiacijų, turinčių skirtingas genetines ir fenotipines savybes, mozaiką (270). Vėžinių ląstelių heterogeniškumas yra glaudžiai susijęs su vėžio progresavimu, atsparumu gydymui ir ligos recidyvu (24). Heterogeniškumo reiškinyje buvo pastebėtas ne tik tarp skirtingų individų navikų ar tarp pirminio naviko ir jo metastazių (tarpnavikinis heterogeniškumas), bet ir tarp to paties individo naviko ląstelių vienoje ar skirtingose srityse (vidunavikinis heterogeniškumas) (19, 271). Vidunavikinis heterogeniškumas gali būti klasifikuojamas į genetinį heterogeniškumą, kai matomas naviko ląstelių mišinys – *HER2* geno būklė yra ir amplifikuota, ir neamplifikuota, ir epigenetinį heterogeniškumą, kai naviko ląstelės yra amplifikuotos, tačiau *HER2* baltymo viršekspressija jose yra mišri (yra / nėra) (272). Vidunavikinio genetinio heterogeniškumo atveju kartu aptinkamos amplifikuotos ir neamplifikuotos vėžinės ląstelės gali būti susimaišiusios ir išsibarsčiusios po visą audinį (mozaikinis genetinio heterogeniškumo tipas) arba sudaryti atskirus klasterius (19, 273). Ekspertai tvirtina, kad reikšmingos yra tik atskirai susitelkusios amplifikuotų ląstelių populiacijos (27). Mozaikišką heterogeniškumo formą, manoma, sąlygoja

artefaktinės priežastys, susijusios su biologiniais ir technologiniais ypatumais tiriant *in situ* hibridizacijos metodu (analizuojamų ląstelių rankiojimu, branduolių nupjovimu, aneuploidijos variacija navikinėse ląstelėse) (19, 27).

*HER2* geno amplifikacijos ir baltymo raiškos naviko audinyje heterogeniškumas yra viena iš pagrindinių priežasčių, nulemiančių klaidingus ir neatitinkančius *HER2* tyrimų rezultatus IHC ir *in situ* hibridizacijos metodais. Dėl heterogeniškumo įtakos netiksli *HER2* būklės diagnozė nustatoma nuo 11 % iki 13 % invazinio krūties vėžio atvejų (16, 19). Besiskiriantys rezultatai gali būti gaunami tiriant skirtingus to paties naviko blokus, išoperuotus navikus ir jų biopsijas, pirminius navikus ir jų metastazes (19, 273). *HER2* būklės nustatymo tikslumas priklauso nuo pasirinktos analizei audinio srities, ploto bei vertinamų ląstelių skaičiaus, todėl analizuojant genetiškai heterogeniškus navikus labai svarbu laikytis standartizuotos vertinimo metodikos (19, 265). Ilgą laiką praktikoje taikytas įvairus vertinimas: vieni tyrėjai analizuodavo visą audinio plotą, kiti – atsitiktines arba specifines sritis („karštus taškus“), kuriose būna susitelkę daugiau *HER2* kopijų turinčių ląstelių (19). 2013 m. ASCO/CAP gairėse nurodomos rekomendacijos standartizuoti *in situ* hibridizacijos vertinimo metodą – prieš pasirenkant analizės plotus, pirmiausia skenuoti visą tiriamąjį audinį ir (arba), naudojantis *HER2* IHC testu, apibrėžti galimus amplifikacijos plotus.

Pagal 2009 m. ASCO/CAP gairių apibrėžimą, *HER2* genetinis heterogeniškumas konstatuojamas, jei tiriamajame mėginyje randama  $> 5\%$  ir  $< 50\%$  ląstelių, kuriose *HER2/CEP17* santykis  $> 2,2$ . Nustačius daugiau nei  $50\%$  ląstelių, kurių *HER2/CEP17* santykis  $> 2,2$ , diagnozuojama *HER2* amplifikacija (25). Šis apibrėžimas nebuvo pagrįstas klinikinių tyrimų rezultatais, tačiau tai buvo pirmas žingsnis siekiant ištirti klinikinę *HER2* genetinio heterogeniškumo reikšmę ir galimą taikinių terapijos vaidmenį gydant genetiškai heterogeniškus navikus. Vis dėlto šios vertinimo rekomendacijos dėl ribotų genetinio heterogeniškumo dažnio, biologinės svarbos bei klinikinės reikšmės duomenų sukėlė nemažai diskusijų ir kritikos (23, 26-28, 274). Kritikuojamos tiek viršutinė, tiek apatinė *HER2* genetinį heterogeniškumą apibrėžiančios ribos. Apatinė  $5\%$  riba yra arti galimų techninių ir signalų skaičiavimo klaidų – vertinant 20 ląstelių, genetinio heterogeniškumo diagnozę gali nulemti tik viena ląstelė, kurioje *HER2/CEP17* santykis yra  $> 2,2$  (27, 275). Kiti tyrėjai mano, kad viršutinė *HER2* genetinį heterogeniškumą apibrėžianti riba turėtų būti padidinta nuo  $50\%$  iki  $95\%$  amplifikuotų ląstelių – tada apibrėžimas apimtų navikus, kuriuose amplifikuotos ląstelės dominuoja (26). Dar vienu tyrimu buvo parodyta, kad

amplifikuotų ląstelių proporcija nėra tinkamas naviko *HER2* genetinės įvairovės įvertinimo matas (276).

2013 m. gairėse *HER2* genetinis heterogeniškumas apibrėžtas kaip agreguota amplifikuotų ląstelių populiacija, sudaranti > 10 % visos naviko ląstelių populiacijos tiriamajame mėginyje (22). Ji turi būti įvertinta atskirai nuo likusios analizuojamos naviko dalies. Pagal šį apibrėžimą, atvejai, kai yra amplifikuotų ir neamplifikuotų sričių, įvertinami kaip *HER2* teigiami. Tačiau tiek šis *HER2* genetinio heterogeniškumo apibrėžimas, kuris pagrįstas ląstelių populiacijų procentinių dalių nustatymu tiriamajame mėginyje (22), tiek ankstesnis, kuris remiasi atskirų amplifikuotų ląstelių procentinėmis dalimis konkrečiame diapazone (25), nesuteikia informacijos apie tikrąją *HER2* geno kopijų variaciją.

Literatūroje nurodomas *HER2* genetinio heterogeniškumo dažnis varijuoja nuo 11 % iki 40 % (16, 17, 27, 274, 276). Tačiau taikant skirtingus vertinimo kriterijus – *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijas, buvo nustatytas nemažas genetiškai heterogeniškų atvejų dažnio skirtumas (atitinkamai 23 % ir 7 %) (274).

Vidunavikinis heterogeniškumas taip pat matomas *HER2* baltymo raiškos lygiu. Variabilus *HER2* dažymasis IHC metodu dažniausiai aptinkamas 2+ verte įvertintuose navikuose (209, 210, 277). Netgi vykdant automatizuotą skaitmeninę vaizdo analizę, paribinių atvejų grupėje buvo nustatytas platus reikšmių išsibarstymas (212). Nevienodas *HER2* baltymo dažymasis pastebimas ir 1+ įvertintais atvejais, tačiau 3+ grupės atvejams būdinga daug tolygesnė IHC reakcija (277).

Pusiau kiekybinis *HER2* IHC raiškos vertinimo metodas (pagal skalę nuo 0 iki 3) nesuteikia informacijos apie atskirų naviko ląstelių ar sričių įvairovę, o ASCO/CAP gairėse nėra pateikta galimo *HER2* raiškos heterogeniškumo diagnostinio būdo rekomendacijų. Kiekybiniam genetinio, molekulinio, mikroaplinkos heterogeniškumo krūties navikuose vertinimui yra taikomi jau daugelį metų ekologijos ir geografijos srityse naudojami biologinių sistemų įvairovės matai (209, 278, 279): *Shannon* entropija (280), *Simpsono* indeksas (281), *Rao* kvadratinė entropija (282). Literatūroje aprašytas *HER2* heterogeniškumo matavimo metodas, kai *HER2* IHC analizė sujungiama su ekologinės įvairovės statistika (209). Šiuo metodu įvertinamas *HER2* biožymens heterogeniškumas, pasireiškiantis nevienoda baltymo raiška tarp gretimų ląstelių ir tarp skirtingų audinio dalių. Naujesniuose tyrimuose kiekybiniam vidunavikinės biožymenų variacijos vertinimui taikomi *Haralicko* erdviniai tekstūros parametrai, apskaičiuojami iš pilkumo lygio pasikartojimų matricos (angl. *co-occurrence matrix*) (283-285). Iš jų

entropija, kontrastas ir skirtingumas yra įvardijami kaip netvarkingos tekstūros rodikliai (283, 284).

Įvairios studijos klinikinę patologinę genetiškai heterogeniškų navikų reikšmę nagrinėjo skirtingais aspektais. Vieni tyrėjai nustatė, kad genetiškai heterogeniškiems HER2 navikams, palyginti su HER2 teigiamais navikais, būdingas mažesnis dydis, mažesnis histologinis piktybiškumo laipsnis ir didesnis teigiamų hormonų receptorių dažnis (16, 286). IHC 2+ verte įvertintų atvejų pogrupio tyrime nustatytas reikšmingas genetinio heterogeniškumo ryšys su didesniu histologiniu naviko laipsniu, CEP17 polisomija, *HER2* geno klasterių nebuvimu (17). Dar viename tyrime, lyginant heterogeniškus ir neheterogeniškus *HER2* neamplifikuotus navikus, pirmiesiems buvo nustatytos agresyvios charakteristikos (didesnis histologinis piktybiškumo laipsnis ir didesnis naviko dydis bei didesnis limfmazgių metastazių dažnis) (287).

Itin aktualus klausimas yra genetiškai heterogeniškų navikų atsakas į gydymą trastuzumabu. Genetiškai heterogeniški navikai dažnai būna įvertinti neigiama ar paribine (pagal 2013 m. ASCO/CAP gaires) FISH verte, tačiau juose gali būti reikšmingos amplifikuotų ląstelių populiacijos (17, 194, 276). Vienoje studijoje plačiau tyrinėjant ląstelių su *HER2/CEP17* santykiu 2,2 paplitimą, nustatyta, kad paribinėje ir heterogeniškoje grupėje dominavo atvejai, kai buvo 25–35 % tokių ląstelių, o neigiamoje ir heterogeniškoje grupėje daugiausia atvejų, kai buvo 5–15 % ląstelių (274). Tikėtina, kad genetinis heterogeniškumas gali būti veiksnys, turintis įtakos skirtingam neigiamų atvejų atsakui į gydymą (288). Šiuo metu vis dar trūksta klinikinių tyrimų, leidžiančių įvertinti genetiškai heterogeniškų navikų įtaką atsakui į HER2 taikininę terapiją. Tiriant pacientės, sergančias metastazavusiu krūties vėžiu, buvo nustatytas reikšmingas ryšys tarp nevienodos amplifikacijos skirtingose naviko srityse ir blogesnio atsako į gydymą trastuzumabu (30). Keliama hipotezė, kad atsparumą HER2 taikinių terapijai gali sąlygoti *HER2* amplifikuotos, tačiau neekspresuojančios baltymo ląstelės (289). Prognozinė genetinio heterogeniškumo svarba buvo įvertinta didelėje studijoje (n = 6461), apimančioje klinikinių tyrimų dalyvius ir rutiniškai tirtus pacientus. Nustatyta, kad kliniškai reikšmingos yra ne mažiau nei 30 % amplifikuotų ląstelių (kurių *HER2/CEP17* santykis 2,2) – tokių pacientų išgyvenamumas penkerius metus be ligos buvo sumažėjęs, palyginti su pacientais, kurių navikuose šių ląstelių nebuvo (27). Kitu tyrimu pacientams, kuriems diagnozuota *HER2* geno amplifikacija ir genetinis heterogeniškumas, taip pat buvo nustatytas trumpesnis išgyvenamumas be ligos, palyginti su pacientais, kuriems genetinis heterogeniškumas nenustatytas (16). Atliekant tyrimą geno ir

baltymo metodu, nustatyta, kad HER2 vidunavikinis heterogeniškumas yra blogos prognozės veiksnys HER2 neigiamų krūties vėžio atvejų grupėje, o ypač – TN atvejų grupėje (194).

### **17 chromosomos skaičiaus pokyčiai**

HER2 *in situ* hibridizacijos tyrimuose naudojant du – HER2 ir CEP17 (angl. *centromere enumeration probe*) – žymenis, yra vertinamas ne tik HER2 geno kopijų skaičius, bet ir 17 chromosomos centromeros kopijų skaičius bei jų (HER2/CEP17) santykis. Toks vertinimo metodas buvo pagrįstas tuo, kad CEP17 kopijų skaičius galėtų būti 17 chromosomos kopijų skaičiaus surogatas: padidėjęs CEP17 skaičius reikštų 17 chromosomos polisomiją, o sumažėjęs – monosomiją. Taigi HER2/CEP17 santykis leistų tiksliau atskirti HER2 amplifikaciją nuo galbūt klaidingų rezultatų dėl 17 chromosomos aneusomijos (141).

Padidėjusių 17 chromosomos kopijų skaičių arba polisomiją sąlygoja visos chromosomos duplikacija vieną ar kelis kartus. 17 chromosomos monosomija konstatuojama, kai prarandama viena chromosomos kopija. Atliekant HER2 tyrimą *in situ* hibridizacijos metodu, slenkstinės ribos 17 chromosomos polisomijai ir monosomijai nustatyti nėra griežtai apibrėžtos (141, 252, 290). Nė vienas iš literatūroje aprašytų skirtingų 17 chromosomos polisomijos vertinimo kriterijų nėra pripažintas standartu, tačiau dažniausiai tyrimuose 17 chromosomos polisomija konstatuojama, jei ląstelės branduolyje vidutiniškai nustatomas CEP17 kopijų skaičius  $\geq 3$  (291-296). Literatūroje nurodomos monosominės būklės vertinimo ribos yra nuo 1,23 iki 1,75 CEP17 signalų branduolyje (291, 297-299). Be to, siekiant išvengti klaidingo monosomijos diagnozavimo, rekomenduojama nustatyti ne mažiau nei 60 % branduolių su vienu CEP17 signalu (252, 295). Teigiama, kad net 30 % branduolių su vienu CEP17 signalu gali sąlygoti nupjauti branduoliai ruošiant FFPI audinius (252).

Įvairiuose tyrimuose taikytos skirtingos CEP17 kopijų skaičiaus vertinimo slenkstinės ribos lėmė plačią 17 chromosomos polisomijos dažnio variaciją – ji nustatoma nuo 3 % iki 46 % (19). Monosomija nustatoma 1,4–2,5 % dažnumu (252, 300). 2007 m. ASCO/CAP gairėse pažymėta, kad polisominiai 17 chromosomos atvejai sudaro maždaug 8 % visų krūties vėžio atvejų (141).

Vis dėlto CEP17 signalų skaičiaus pagausėjimas nebūtinai reprezentuoja tikrąją 17 chromosomos polisomiją. Vėlesni tyrimai atskleidė, kad visos chromosomos duplikacija įvyksta daug rečiau nei manyta ir dabar teigiama, kad 17 chromosomos polisomija tikslingai atrinktoje populiacijoje (kai FISH ar CISH metodu nustatytas  $\geq 3$  CEP17 kopijų skaičius) aptinkama 2,4 %

dažnumu, o bendroje populiacijoje < 1 % dažnumu (301, 302). Kur kas dažniau pasitaiko centromerinės arba pericentromerinės 17 chromosomos srities amplifikacija, įgavimas ar praradimas (angl. *gain or loss*), kurie yra būdingi tiek HER2 teigiamais, tiek HER2 neigiamais atvejais ir gali nulemti neteisingus rezultatus dėl klaidinančio *HER2/CEP17* santykio (303-305).

Dar viena netikslios *HER2/CEP17* santykio interpretacijos priežastis vertinant FISH metodu gali būti abiejų kartu – *HER2* ir *CEP17* – sričių amplifikacija (koamplifikacija) (306). Vertinant fluorescenciniu mikroskopu koamplifikaciją galima atskirti pagal matomą geltoną signalą (oranžinės (*HER2*) ir žalios (*CEP17*) spalvos žymenys uždengia vienas kitą). Tai retas įvykis, nustatomas < 1 % rutiniškai tiriamų krūties vėžio atvejų (307, 308). Esant koamplifikacijai, būtina *HER2* ir *CEP17* signalus įvertinti atskirai.

Dėl dažnų 17 chromosomos centromerinės srities persitvarkymų krūties navikuose (~30 %) (309), *CEP17* nėra ypač tinkamas žymuo ląstelės ploidiškumui įvertinti (290). Netikros polisomijos nustatymas, remiantis šio žymens skaičiaus padidėjimu, yra reikšmingas *HER2* būklės tyrimo variacijos šaltinis (32, 305). 2013 m. ASCO/CAP gairėse siūloma *HER2 in situ* hibridizacija tirtus ir ribine verte įvertintus atvejus papildomai iširti alternatyviais 17 chromosomos žymenimis, tačiau jų nekonkretina (22). Atlikti tyrimai parodė, kad tebelieka atviras klausimas, kuris alternatyvus referentinis žymuo būtų tinkamiausias klinikiniam tyrimui (310).

Pagrindinė padidėjusios *HER2* baltymo raiškos priežastis yra *HER2* geno amplifikacija, tačiau yra prielaida, kad baltymo viršekspresiją galėtų sąlygoti padidėjusi geno dozė dėl 17 chromosomos polisomijos (57, 291, 298). Duomenys, gauti analizuojant 17 chromosomos polisomijos ryšį su padidėjusiomis IHC tyrimo reikšmėmis neamplifikuotuose navikuose, yra priešaringi. Dauguma tyrimų parodė, kad padidėjęs *CEP17* kiekis („polisomija“) dažniausiai būna susijęs su paribine IHC 2+ reikšme (292, 294, 296, 311), tačiau, esant dideliame *CEP17* kiekiui ( $CEP17 \geq 4$ ), šis ryšys nustatytas ir esant IHC 3+ reikšmei (57, 305). Kiti tyrėjai nenustatė padidėjusio *CEP17* kiekio sąsajos su *HER2* baltymo viršekspresija (293, 312).

Polisominiams navikams nebūdingas padidėjęs *HER2* iRNR kiekis, juose dažniausiai nustatomos 4–6 *HER2* geno kopijos (141, 292-294). Teigiama, kad polisominiai navikai, kai nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, yra panašesni į *HER2* neigiamus navikus nei į teigiamus (32, 294).

17 chromosomos monosomija dažniausiai nustatoma *HER2* neigiamuose, IHC 0 ir (ar) 1+ reikšmėmis įvertintais atvejais (252, 313).

Be *HER2* geno, 17 chromosomoje yra ir kitų su krūties vėžiu susijusių genų (pvz., *BRCA1*, *TOP2A*, *TP53*) (295, 314), kurie polisomijos atveju dėl



pasikeitusios ekspresijos gali turėti įtakos prognozei ir klinikiniam patologiniam parametrui. Be to, padidėjusį CEP17 kopijų skaičių gali sąlygoti įvairūs 17 chromosomos genetinės medžiagos persitvarkymai (genų kopijų skaičiaus pokyčiai, aleliniai praradimai, struktūriniai persitvarkymai), todėl tokie navikai gali reprezentuoti heterogenišką grupę, kurių klinikinės patologinės savybės priklausys nuo būdingų specifinių genetinių pokyčių (19). Daugumos tyrimų duomenimis, padidėjusį CEP17 kiekį turintys „polisominiai“ navikai yra siejami su nepalankiais klinikiniais patologiniais rodikliais. Lyginant neamplifikuotus polisominius ir nepolisominius navikus, pirmieji buvo reikšmingai susiję su didesniu branduolių ir histologiniu laipsniu, didesniu mitotiniu aktyvumu ar Ki67 indeksu, blogesniu Nottinghamo prognostiniu indeksu (angl. *Nottingham Prognostic Index*), didesniu naviko dydžiu, limfovaskuliarine invazija, neigiama ER ir PR būkle (298, 311, 315, 316). Tačiau yra tyrimų, kurių rezultatai priešingi – jais tokios sąsajos nebuvo nustatytos, ir teigiama, kad polisominių navikų pagal standartinius patologinius kriterijus negalima atskirti (293, 294).

Pacientams, kuriems nustatyta 17 chromosomos polisomija, tačiau *HER2* amplifikacija ar IHC 3+ vertė nedidėja, gydymas trastuzumabu netaikomas (58). Įmanoma, kad terapija trastuzumabu galėtų būti veiksminga esant didelio ploidiskumo navikams (317). Nustatyta, kad 17 chromosomos polisomija, kai nėra *HER2* amplifikacijos, neprognozuoja atsako į gydymą lapatinibu esant metastazavusiam krūties vėžiui (318). Tačiau buvo parodyta, kad CEP17 kopijų skaičiaus įgavimas yra stiprus atsako į antraciklinų terapiją prediktorius – CEP17 duplikacija buvo susijusi su reikšmingai sumažėjusia pacientų atkryčio rizika ir pagerėjusiu bendro išgyvenamumo rodikliu, kai taikomas gydymas antraciklinais (319-321).

Lyginant išgyvenamumo rodiklius, pacientams, kurių navikuose buvo padidėjęs CEP17 kiekis, nustatytas tarpinis išgyvenamumas tarp *HER2* teigiamu ir *HER2* neigiamu vėžiu sergančių pacientų (316). Kitame tyrime CEP17 kopijų skaičiaus padidėjimas liuminaliniame/*HER2* neigiamame krūties vėžio potipyje buvo reikšmingai susijęs su sumažėjusia išgyvenamumo be ligos trukme. Tokia sąsaja *HER2* teigiamame ir TN potipiuose nenustatyta (322). Be to, šioje studijoje buvo parodyta, kad padidėjęs CEP17 kiekis yra nepriklausomas blogos prognozės veiksnys sergant *HER2* neigiamu ir HR<sup>+</sup> potipių krūties vėžiu.

### 1.3.3. Vertinimo kriterijų įtaka *HER2* tyrimams

2007 m. paskelbtose ir 2013 m. bei 2018 m. atnaujintose ASCO/CAP gairėse nurodoma *HER2* būklės tyrimą atlikti visiems invaziniu krūties vėžiu

sergantiems pacientams, o rezultatus vertinti pagal rekomenduojamus kriterijus (15, 22, 141). Atsižvelgiant į rekomenduojamą HER2 tyrimo algoritmą daugumoje laboratorijų pirmiausia atliekamas IHC testas, o esant paribinei reikšmei, vykdoma analizė FISH ar kitu *in situ* hibridizacijos metodu (15, 323). FDA, 2007 m., 2013 m. ir 2018 m. ASCO/CAP HER2 IHC ir FISH vertinimo rekomendacijos pateiktos 1.2 lentelėje.

Pirmuosius HER2 vertinimo kriterijus paskelbė FDA, patvirtindama IHC (*HER2 IQFISH pharmDx, DAKO*) ir FISH (*PathVysion HER-2 DNA probe kit, Abbott Laboratories*) tiriamuosius rinkinius.

Dėl daugėjančių pranešimų apie besiskiriančius HER2 testų rezultatus ASCO/CAP, siekdama standartizuoti diagnostinių tyrimų vykdymą ir interpretaciją, 2007 m. modifikavo FDA paskelbtus kriterijus – iš naujo apibrėžė HER2 rezultatų vertinimą: IHC teigiamo rezultato (3+) riba nuo  $> 10\%$  buvo padidinta iki  $> 30\%$ , o geno amplifikacijos riba nuo  $> 2$  padidinta iki  $> 2,2$  (vertinant pagal *HER2/CEP17* santykį, tyrimui naudojant du zondus) ir nuo  $> 4$  iki  $> 6$  (vertinant *HER2* geno kopijų skaičiaus vidurkį branduolyje, tyrimui naudojant vieną zondą); anksčiau buvusi teigiamo FISH rezultato riba ( $> 2$ ) buvo pakeista paribine zona – kai *HER2/CEP17* santykis nustatomas 1,8–2,2 ribose, tyrimui naudojant du zondus ar geno kopijų skaičiaus vidurkis branduolyje yra nuo 4 iki 6 signalų, tyrimui naudojant vieną zondą; be to, paribinė IHC (2+) kategorija taip pat buvo modifikuota (141).

Iš vienos pusės, modifikuota ASCO/CAP gairių HER2 vertinimo kriterijų versija buvo paskelbta siekiant padidinti IHC ir FISH testų konkordantiškumą, tačiau, iš kitos pusės, atsiradus paribinėms vertėms, iškilo neaiškumų dėl pacientų atrankos HER2 taikinių terapijai. Tyrimai parodė, kad, taikant 2007 m. ASCO/CAP paskelbtus vertinimo kriterijus, klaidingai teigiamų rezultatų sumažėjo nuo 19 % iki 6 % (324, 325), tačiau padidėjo klaidingai neigiamų ir paribinių atvejų skaičius (20, 326), o gydymas trastuzumabu nebuvo skiriamas vidutiniškai 4 % pacientų (20). Be to, 2008 m. JAV atlikta apklausa atskleidė, kad ne visos laboratorijos vadovavosi ASCO/CAP gairių vertinimo rekomendacijomis: 84 % laboratorijų HER2 IHC rezultatus vertino atsižvelgdamos į ASCO/CAP vertinimo kriterijus, 13 % rėmėsi tiriamųjų rinkinių vertinimo rekomendacijomis, o 3 % taikė kitas vertinimo gaires (konkrečiai nenurodyta) (327).

Atnaujintose 2013 m. ASCO/CAP gairėse atlikti šie pakeitimai: sumažinta teigiamo HER2 IHC (nuo  $> 30\%$  iki  $> 10\%$ ) slenkstinė riba, kuri vėl atitiko FDA gairėse nurodytą ribą; sumažinta ir FISH rezultato slenkstinė riba, ir, svarbiausia, papildomai įtraukus *HER2* geno kopijų skaičiaus ląstelės branduolyje vertinimą, *HER2* geno amplifikacija yra konstatuojama net trimis

atvejais (žr. 1.2 lentelę); taip pat pakeisti FISH paribinės kategorijos vertinimo kriterijai – jie papildyti *HER2* geno kopijų skaičiaus ląstelės branduolyje vertinimu (22).

Atlikta nemažai tyrimų, analizuojančių pasikeitusių vertinimo kriterijų įtaką tyrimų rezultatams. Jie parodė, kad taikant 2013 m. gaires, sumažėjo klaidingai neigiamų *HER2* IHC tyrimų rezultatų ir padaugėjo 2+ ir 3+ vertėmis įvertintų atvejų (328, 329). Retrospektyviose studijose, kuriose buvo palyginti *HER2* tyrimo rezultatai, gauti remiantis 2007 m. ir 2013 m. gairių vertinimo kriterijais, nustatyta, kad didelį IHC 2+ grupės pagausėjimą sąlygojo atvejai, kurie anksčiau priklausė IHC 1+ kategorijai pagal 2007 m. ASCO/CAP gairių vertinimo kriterijus (328, 330, 331). Paribinių *HER2* IHC atvejų grupės padidėjimas neturėjo reikšmingos įtakos didesniai *HER2* teigiamų atvejų nustatymui, tačiau nulėmė didesnę FISH testų skaičių ir tai sukėlė diskusijų dėl pailgėjusios *HER2* tyrimų trukmės bei padidėjusios testo kainos (165, 328-330). Didesnis teigiamų atvejų nustatymas siejamas su pasikeitusiomis FISH vertinimo ribomis, o nustatyti teigiami IHC 3+ atvejai padidėjusiam teigiamų atvejų dažniui esminės įtakos neturėjo (329).

Modifikuotose 2013 m. gairėse *HER2* FISH tyrimo rezultatai yra vertinami atsižvelgiant ir į *HER2*/CEP17 santykį, ir į *HER2* geno kopijų skaičių. Dauguma studijų parodė, kad, ėmus taikyti šių gairių FISH testo vertinimo kriterijus, sumažėjo *HER2* neigiamų atvejų, padaugėjo *HER2* teigiamų atvejų ir ypač padidėjo paribinių atvejų skaičius (329, 332-334). Paribinę grupę labiausiai papildė *HER2* FISH atvejai, kurie pagal 2007 m. gairių vertinimo kriterijus būtų įvertinti neigiamai (323, 334, 335). Nustačius *HER2* FISH paribinę vertę, rekomenduojama atlikti to paties mėginio tyrimą alternatyviu testu arba, jei įmanoma, gauti naują mėginį ir atlikti tyrimą tuo pačiu arba alternatyviu testu (22). Taigi, naujos gairės sąlygoja pakartotinius tyrimus (333, 335).

Ypač dažni *HER2* būklės pasikeitimai nustatyti navikams, kuriems buvo būdingas 17 chromosomos skaičiaus padidėjimas ( $\geq 3$  CEP17 kopijos). Tokie navikai sudarė didžiąją *HER2* FISH paribinių atvejų dalį (323, 334).

2013 m. ASCO/CAP gairių FISH algoritmas yra išsamesnis, bet kartu ir sudėtingesnis. Vidutinio *HER2* geno kopijų skaičiaus įtraukimas į algoritmą tapo svarbiu veiksniu įvertinant galutinę *HER2* būklę, nepriklausomai nuo *HER2*/CEP17 santykio. Polisominiai arba koamplifikuoti atvejai, kuriuose nustatytas didelis ir CEP17, ir *HER2* kopijų skaičius ( $\geq 6$ ), būtų neteisingai suklasifikuoti, jei būtų atsižvelgiama tik į *HER2*/CEP17 santykį. Taip pat *HER2* geno kopijų skaičiaus vertinimas yra būtinas monosominiais atvejais, kuriuose *HER2*/CEP17 santykis yra didesnis nei  $\geq 2$  dėl mažesnio nei 2

vidutinio CEP17 kopijų skaičiaus (300). Vis dėlto kai kurie tyrėjai nebuvo patenkinti pasikeitusia *HER2* FISH klasifikacijos schema ir iškėlė abejonių dėl teisingos pacientų stratifikacijos atsižvelgiant į gairėse apibrėžtas kategorijas (336, 337).

2018 m. ASCO/CAP gairės, kuriomis šiuo metu yra remiamasi vertinant *HER2* tyrimo rezultatus, buvo vėl atnaujintos. Pagrindinis jų tikslas – pagerinti retų *HER2* FISH kategorijų interpretavimo tikslumą atsižvelgiant ir į IHC, ir į FISH metodais gautus rezultatus (15). 1.3 lentelėje yra pateikti penki galimi *HER2* FISH tyrimo variantai, kai rezultatai vertinami ir pagal *HER2*/CEP17 santykį, ir pagal *HER2* geno kopijų skaičių. Retos, daugiausia neaiškumų sukeliančios *HER2* FISH kategorijos sudaro 5 % tiriamųjų atvejų ir yra priskiriamos 2–4 grupėms. Šioms grupėms priklausančius atvejus rekomenduojama tirti derinant kartu IHC ir FISH vertinimo metodikas bei, FISH tyrimo atveju, pasitelkiant antrojo tyrėjo nuomonę. Atsižvelgiant į šią strategiją, 2 ir 4 grupės atvejai galiausiai suklasifikuojami kaip neigiami, o 3 grupės – kaip teigiami. Šiose gairėse buvo panaikinta *HER2* FISH ribinės vertės formuluotė. Taip pat pasikeitė paribinės *HER2* IHC raiškos (2+) apibrėžimas; neigiamos ir teigiamos *HER2* IHC raiškos apibrėžimai nesikeitė (1.2 lentelė) (15).

Nustatyta, kad, ėmus taikyti naujausias rekomendacijas, sumažėjo klaidingai teigiamų rezultatų (338).

**1.2 lentelė.** FDA, 2007 m., 2013 m. ir 2018 m. ASCO/CAP *HER2* IHC ir FISH vertinimo rekomendacijos

<b>HER2 vertinimo kriterijai pagal FDA ir ASCO/CAP gaires</b>		
HER2 teigiamas		
FDA kriterijai	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma intensyviai, nepertraukiamai nusidažiusi
	FISH tyrimas	<i>HER2</i> /CEP17 $\geq$ 2 (tyrimui naudojami du zondai); vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius > 4 (tyrimui naudojamas vienas zondas)
2007 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 30 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma intensyviai, nepertraukiamai nusidažiusi
	FISH tyrimas	<i>HER2</i> /CEP17 > 2,2 (tyrimui naudojami du zondai); vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius > 6 (tyrimui naudojamas vienas zondas)

2013 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma intensyviai, nepertraukiamai nusidažiusi
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 \geq 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 4$ signalai branduolyje
		$HER2/CEP17$ santykis $\geq 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$ signalai branduolyje
		$HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 6$ signalai branduolyje
2018 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma intensyviai, nepertraukiamai nusidažiusi
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 \geq 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 4$ signalai branduolyje
		$HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 6$ signalai branduolyje
HER2 paribinis		
FDA kriterijai	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana silpnai, bet visiškai ar vidutiniškai visiškai nusidažiusi
	FISH tyrimas	Netaikyta
2007 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma visiškai, bet silpnai arba silpnai / vidutiniškai nusidažiusi;  < 30 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma stipriai, visiškai nusidažiusi
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 \geq 1,8$ ir $\leq 2,2$ (tyrimui naudojami du zondai);  vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 4$ ir $< 6$ (tyrimui naudojamas vienas zondas)
2013 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma nevisiškai, silpnai arba silpnai / vidutiniškai nusidažiusi;  $\leq 10$ % ląstelių matomas stiprus, ištisinis visos membranos nusidažymas
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 4$ ir $< 6$
2018 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	> 10 % invazinio naviko ląstelių membrana matoma visiškai ir silpnai / vidutiniškai nusidažiusi

	FISH tyrimas	Netaikoma
HER2 neigiamas		
FDA kriterijai	IHC tyrimas	nėra nusidažusių ląstelių (vertinama 0); matomas silpnas, trūkinėjantis membranos nusidažymas (vertinama 1+)
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 < 2$ (tyrimui naudojami du zondai); vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$ (tyrimui naudojamas vienas zondas)
2007 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	nėra nusidažusių ląstelių (vertinama 0); matomas silpnas, trūkinėjantis membranos nusidažymas (vertinama 1+)
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 < 1,8$ (tyrimui naudojami du zondai); vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$ (tyrimui naudojamas vienas zondas)
2013 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	nėra nusidažusių ląstelių arba $\leq 10\%$ ląstelių matomas silpnas, trūkinėjantis membranos nusidažymas (vertinama 0); silpnas, trūkinėjantis membranos nusidažymas matomas $> 10\%$ invazinio naviko ląstelių (vertinama 1+)
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$
2018 m. ASCO/CAP rekomendacijos	IHC tyrimas	nėra nusidažusių ląstelių arba $\leq 10\%$ ląstelių matomas silpnas ar vos pastebimas trūkinėjantis membranos nusidažymas (vertinama 0); silpnas ar vos pastebimas trūkinėjantis membranos nusidažymas matomas $> 10\%$ invazinio naviko ląstelių (vertinama 1+)
	FISH tyrimas	$HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$ ; $HER2/CEP17$ santykis $\geq 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $< 4$ signalai branduolyje; $HER2/CEP17 < 2$ ; vid. <i>HER2</i> kopijų skaičius $\geq 4$ ir $< 6$

IHC – imunohistochemija; FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija; HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas.

### 1.3 lentelė. HER2 FISH kategorijos

Grupė	HER2 FISH tyrimo rezultatas	HER2 FISH kategorijų charakterizavimas	HER2/CEP17 santykis	Vid. HER2 kopijų skaičius
1	Teigiamas	„Klasikinė“ HER2 amplifikacija	$\geq 2$	$\geq 4$
2	Neigiamas, nebent IHC 3+	17 chromosomos monosomija	$\geq 2$	$< 4$
3	Teigiamas	Padidėjęs 17 chromosomos kopijų skaičius arba koamplifikacija	$< 2$	$\geq 6$
4	Neigiamas, nebent IHC 3+	Paribinis	$< 2$	$\geq 4$ ir $< 6$
5	Neigiamas	HER2 amplifikacijos nėra	$< 2$	$< 4$

IHC – imunohistochemija; FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija; HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas.

### 1.4. Naviko mikroaplinka sergant krūties vėžiu

Vėžio formavimuisi ir progresavimui įtakos turi ląstelių tarpusavio sąveikos navike, naviko mikroaplinka ir imuninė sistema, galinti ir skatinti, ir slopinti naviko augimą bei invaziją (339, 340). Pastaraisiais metais ėmus taikyti imunoterapiją vėžinių ligų gydymui ir atradus aktyvios imuninės sistemos reikšmę vėžio prognozei, navikines ląsteles supančios imuninės mikroaplinkos tyrimai sulaukia itin daug dėmesio (341, 342).

Krūties vėžio mikroaplinka yra nevienalytė – ją galima apibūdinti kaip „ekosistemą“, sudarytą iš skirtingų ląstelių tipų: vėžinių, stromos (fibroblastų, mezenchiminių kamieninių ląstelių, kraujagyslių endotelio ląstelių), imuninių (T ląstelių, B ląstelių, makrofagų, ląstelių natūralių žudikių) ląstelių, mikrobu, ekstraląstelinio matriksa (kolageno, fibronektino ir kt.) bei tirpių veiksnių (citokinių, chemokinių, metabolitų). Naviko mikroaplinka yra įvardijama kaip „aktyvi vėžio progresavimo skatintoja“ (343). Ankstyvojo naviko augimo metu tarp vėžio ląstelių ir naviko mikroaplinkos komponentų vystosi dinamiškas ir abipusis ryšys, palaikantis vėžio ląstelių išgyvenimą, lokalsios invazijos ir metastazavimo procesus. Esant hipoksinei ir rūgštinei mikroaplinkos sąlygoms, naviko mikroaplinka koordinuoja angiogenezę skatinančią programą, siekdama atkurti deguonies ir maistingųjų medžiagų tiekimą bei pašalinti medžiagų apykaitos atliekas. Į navikus įsiskverbia įvairios adaptyvios ir įgimtos imuninės ląstelės, kurios gali atlikti ir navikui palankias, ir priešnavikines funkcijas.

#### 1.4.1. Naviką infiltruojantys limfocitai naviko mikroaplinkoje ir jų vertinimas

Naviko imuninei mikroaplinkai būdinga imuninių ląstelių įvairovė. T limfocitai yra gausiausias ląstelių tipas krūties vėžio audiniuose (70–80 % visų imuninių ląstelių), mažesnę dalį sudaro B ląstelės (10–20 %) ir makrofagai (5–10 %), o ląstelės natūralios žudikės ir dendritinės ląstelės – mažiausią (~ 5 %) (35, 344, 345). T ląstelės yra pagrindinis naviką infiltruojančių limfocitų komponentas (346) ir pagal savo paviršiaus žymenis, atliekamas funkcijas bei sintetinus citokinus yra skirstomos į potipius: CD8+ citotoksines T ląsteles, CD4+ T pagalbines ląsteles, CD4+CD25+FOXP3+ T reguliacines ląsteles (Treg) ir kitas (347).

CD8+ T limfocitai yra pagrindinės efektorinės ląstelės, tiesiogiai naikinančios vėžines ląsteles. CD8+ T atpažįsta žmogaus audinių suderinamumo komplekso (angl. *major histocompatibility complex*; MHC) I klasės molekulių pateiktus antigenus ir, sąveikos vietoje sekretuodami citotoksinius (perforiną, granzimus), sukelia ląstelės taikinio žūtį (347).

CD4+ T limfocitai atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant imuninį atsaką. Jos atpažįsta MHC II klasės molekulių pateikiamus antigenus ir, įvykus sąveikai, diferencijuojasi į skirtingus pagalbinių CD4+ T ląstelių potipius, tokius kaip Th1, Th2, Th17 bei Treg ir kitus (348). Pagalbinės ląstelės gamina įvairius citokinus: Th1 sekretuoja IFN $\gamma$  (interferoną gama), TNF- $\alpha$  (navikų nekrozės faktorių alfa), IL-2 (interleukiną 2) ir kt., skatinačius CD8+ citotoksinių T limfocitų, natūralių žudikių aktyvumą ir yra ypač svarbūs palaikant priešvėžinį imunitetą (349); Th2 išskiria interleukinus IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, aktyvina su naviku susijusius M2 makrofagus, skatina naviko progresavimą (348); Th17 yra uždegimą skatinančios ląstelės, sintetinančios IL-17 šeimos citokinus (350).

Treg – tai imuninį atsaką slopinantys T limfocitai. Šios ląstelės, išskirdamos citokinus (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35 ir kt.) bei tiesioginio kontakto metu, slopina kitų imuninės sistemos ląstelių (T pagalbinių ląstelių, citotoksinių T limfocitų, B limfocitų, ląstelių natūralių žudikių, dendritinių ląstelių) funkcijas (347, 351).

Naviką infiltruojančių limfocitų buvimas navike ir (arba) perinavikinėse vietose yra pripažintas svarbiu imunologiniu biožymeniu – didesnis jų kiekis yra siejamas su stipresniu imuniniu atsaku į vėžines ląsteles ir paskirtą gydymą (35, 36). Krūties navikams, palyginti su melanomos ar plaučių navikais, būdingi negausūs naviką infiltruojantys limfocitai, mažas mutacijų kiekis, menka PD-L1 ekspresija, todėl ilgai manyta, kad krūties vėžys yra mažai imunogeniška liga (352). Tačiau naujesniais tyrimais parodyta, kad



krūties navikus infiltruoja limfocitai, o didesnis naviką infiltruojančių limfocitų kiekis nustatomas esant agresyvesniems – TN ir HER2 teigiamam krūties vėžio potipiams ir yra susijęs su gera prognoze (353-355). Esant HR<sup>+</sup> krūties vėžio potipiui aptinkama nedaug infiltratų (36, 355) ir tai siejama su ER raiška, kuri koreliuoja su Th2 infiltracija ir sumažėjusia MHC II klasės molekulių ekspresija krūties vėžio ląstelėse (356).

Pagal išsidėstymą naviko mikroaplinkoje išskiriami stromoje ir navike esantys limfocitai, iš kurių tik pastarieji turi tiesioginę sąlytį su vėžinėmis ląstelėmis (345, 346, 354). Tiek stromoje, tiek navike esantys limfocitai suteikia prognozinę ir predikcinę informaciją, tačiau stromą infiltruojantys limfocitai yra gausesni, todėl juos galima patikimiau kiekybiškai įvertinti (345). Krūties navikai, kuriuose ne mažiau kaip 50 % naviko ploto randama naviką infiltruojančių limfocitų, apibrėžiami kaip limfocitų gausūs navikai. Tokie navikai sudaro 20 % TN, 16 % HER2 teigiamų ir 6 % HR<sup>+</sup> navikų (355).

Naviką infiltruojančių limfocitų nustatymas galėtų būti naudingas įvertinant paciento prognozę, suteiktų tikslesnę informaciją priimant terapinius sprendimus, padėtų numatyti gydymo veiksmingumą ir kt. (357), tačiau naviką infiltruojančių limfocitų vertinimas, kuris atliekamas šviesiniu mikroskopu hematoksilinu ir eozinu dažytuose histologiniuose preparatuose, nėra įdiegtas į klinikinę praktiką, daugiausia dėl subjektyvaus ir varijuojančio tyrėjų vertinimo bei nepakankamo rezultatų atsikartojimo (35, 357). Siekdama standartizuoti naviką infiltruojančių limfocitų vertinimą krūties ir kitų tipų navikuose, Tarptautinė imunoonkologinių biožymenų darbo grupė parengė rekomendacijas (angl. *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*), kuriomis šiuo metu ir yra vadovaujama (358, 359). Pagrindiniai naviką infiltruojančių limfocitų vertinimo ypatumai: vertinamos tik vienbranduolės ląstelės ir tik invazinio naviko ribose; nustatomas invazijos kraštas – tai 1 mm pločio sritis, skirianti naviko šerdį nuo aplink naviką esančios stromos; naviką infiltruojantys limfocitai įvertinami atskirai stromos ir naviko srityse; krūties vėžio atveju siūloma vertinti tik stromoje esančius limfocitus; įvertinus naviką infiltruojančius limfocitus, pagal imuninio infiltrato gausumą navikai yra priskiriami žemai (< 10 %), vidutinei (≥ 10 ir ≤ 40 %) bei aukštai kategorijoms (> 40 %).

Nors naviką infiltruojančių limfocitų tyrimo hematoksilinu ir eozinu dažytuose preparatuose metodas yra praktiškas ir laboratorijose lengvai prieinamas, tyrimuose dažnai taikomas IHC metodas, kuriuo galima specifiskai nustatyti imunines ląsteles (345, 358, 359). Taip pat galimi daugybinių imunofluorescencijos, tėkmės citometrijos ir kiti naviką infiltruojančių limfocitų tyrimo metodai (357-359).

Ypač didelės galimybes naviko imuninės aplinkos tyrimuose atveria skaitmeninės vaizdo analizės technologijos (360, 361). Taikant jas, galima pašalinti daugelį vizualaus vertinimo trūkumų (362), atlikti tikslius kiekybinius imuninių ląstelių matavimus, įvertinti erdvinius naviką infiltruojančių limfocitų pasiskirstymo aspektus viso pjūvio vaizduose ir atskleisti galimus svarbius skirtumus tarp navike ir stromoje esančių infiltratų (363-365).

#### 1.4.2. Prognozinė ir predikcinė naviką infiltruojančių limfocitų reikšmė

Naviką infiltruojantys limfocitai siejami su palankiomis pacientų klinikinėmis baigtimis (išgyvenamumu be ligos, bendruoju išgyvenamumu) sergant melanoma, plaučių, strosios žarnos, krūties bei kitomis vėžinėmis ligomis (345, 366-368).

Krūties vėžio atveju prognozinė naviką infiltruojančių limfocitų reikšmė skiriasi ir priklauso nuo potipio: nustatyta teigiama didesnio naviką infiltruojančių limfocitų kiekio koreliacija su geresne pacientų išgyvenamumo prognoze esant TN ir HER2 teigiamam potipiui, tačiau liuminalinio tipo navikuose ji kol kas neaiški (353, 357, 369). Vieni tyrėjų nuomone, esant ER+ krūties vėžiui, naviką infiltruojantys limfocitai nėra prognozinis rodiklis (36, 370), kiti nustatė didesnio imuninio ląstelių infiltrato kiekio sąsają su trumpesniu pacientų išgyvenamumu (354, 371).

Be to, ne tik naviką infiltruojančių limfocitų buvimas naviko mikroaplinkoje, bet ir jų tipai bei pasiskirstymas stromoje arba navikiniame audinyje yra susijęs su pacientų prognoze (372, 373). Ypač daug tyrimų atlikta analizuojant CD8+ T limfocitų prognozinę reikšmę. Šie, būdami vieni pagrindinių imuninio atsako komponentų, yra siejami su geresne prognoze ir didesne visiško patologinio atsako tikimybe (374), ypač esant ER neigiamam krūties vėžiui (37, 346). Ištyrus daugiau nei 12 000 krūties navikų, nustatyta, kad CD8+ T ląstelių infiltratų buvimas yra susijęs su sumažėjusia mirties nuo krūties vėžio rizika esant TN ir HER2 teigiamam potipiui, tačiau ER teigiamuose navikuose tokio ryšio nenustatyta (37). CD4+T ląstelių potipių prognozinė reikšmė yra skirtinga: Th1, būdamas pagrindinis IFN $\gamma$  šaltinis, siejamas su gera pacientų išgyvenamumo prognoze (349), padidėjusi Th2 ir Th17 infiltracija dažniausiai siejama su nepalankiomis pacientų prognozėmis (375). Treg prognozinis vaidmuo taip pat priklauso nuo krūties vėžio potipio. Daugumoje tyrimų nustatomas padidėjusio Treg kiekio naviko mikroaplinkoje ryšys su nepalankia pacientų išgyvenamumo prognoze (376, 377), tačiau pateikiama ir priešingų rezultatų (378).

Naviką infiltruojančių limfocitų buvimas yra siejamas su atsaku į chemoterapiją esant TN ir HER2 teigiamam krūties vėžio potipiams (354, 357). Didelėse klinikinėse ankstyvųjų TN navikų studijose, tyrusiose prognozinę naviką infiltruojančių limfocitų reikšmę, stromoje esantys imuniniai infiltratai po gydymo adjuvantine chemoterapija nustatyti kaip nepriklausomas prognozinis geresnio išgyvenamumo be ligos ir bendrojo išgyvenamumo veiksnys (379). Nustatyta, kad kai TN krūties vėžiu sergančioms pacientėms taikoma chemoterapija, 10 % navike ir stromoje esančių naviką infiltruojančių limfocitų padidėjimas sumažina ligos pasikartojimo riziką atitinkamai 17 % ir 15 %, o mirties riziką atitinkamai 27 % ir 17 % (36).

Nustatyta, kad TN ir HER2 teigiamu krūties vėžiu sergantiems pacientams gausūs limfocitų kiekiai prognozuoja visišką patologinį atsaką po neoadjuvantinės chemoterapijos (354, 380). Be to, didelio naviką infiltruojančių limfocitų kiekio ir visiško patologinio atsako ryšys nustatytas ir HR<sup>+</sup>/HER2 neigiamu krūties vėžiu sergantiems pacientams (354, 381).

Duomenys apie gydymui taikomo trastuzumabo ryšį su naviką infiltruojančiais limfocitais yra prieštaringi. Vienoje iš studijų nustatytos geresnės pacientų, sergančių HER2 teigiamu krūties vėžiu ir kuriems nustatytas didesnis naviką infiltruojančių limfocitų kiekis, klinikinės baigtys, kai jų gydymui taikyta chemoterapija ir trastuzumabas (379). Tačiau kitoje studijoje tokios sąveikos nauda nepatvirtinta – sumažėjęs ligos atsinaujinimas buvo nustatytas pacientų, kuriems nustatytas didesnis naviką infiltruojančių limfocitų kiekis ir jie gydyti tik chemoterapija, grupėje, o ne kai gydymui taikyta chemoterapija ir trastuzumabas (382).

## 2. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

### 2.1. Tiriamieji ir tyrimo strategija

Retrospektyviam *HER2* geno būklės tyrimui skaitmenine vaizdo analize atrinkta Nacionaliniame vėžio institute gydytų 50 pacienčių, kurioms 2012 m. rugsėjį–2015 m. vasarį Valstybiniame patologijos centre, VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale, diagnozuota invazinė duktalinė krūties karcinoma ir IHC diagnostikos metodu nustatyta paribinė (IHC 2+) *HER2* baltymo raiška, o FISH metodu įvertinta *HER2* geno būklė pagal 2013 m. ASCO/CAP gaires. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 6B-13-90 (pateikta 1 priede).

Automatizuotam *HER2* vertinimui atrinkti tie mėginiai, kurių kokybė buvo tinkama šiai analizei atlikti. Atvejai neanalizuoti, kai:

- branduoliai buvo iš dalies uždengę vienas kitą, neturėjo aiškių ribų ar buvo sunkiai sufokusuojami;
- signalai buvo mažo intensyvumo, nediskretūs, nespecifiniai ar sunkiai sufokusuojami;
- buvo triukšmingų foninių darinių;
- riebalinis audinys uždengė didelę analizuojamų branduolių dalį.

Išsamiai krūties vėžio imunohistocheminių (ER, PR, *HER2*, Ki67) bei CD8 žymenų skaitmeninei vaizdo analizei atlikti pradinė imtis (n = 50) papildyta tiriamaisiais invazinės duktalinės krūties karcinomos atvejais, kuriuose nustatyta paribinė IHC 2+ raiška, ir įvertinta *HER2* geno būklė (n = 252), rinktais laikotarpiu nuo 2012 m. rugsėjo iki 2017 m. kovo. Tyrimą pratęsti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 6B-16-161 (pateikta 2 priede). Į tyrimą neįtraukti atvejai, kai parafino blokuose esančios medžiagos nepakako atlikti ER, PR, Ki67 ir CD8 IHC dažymus ir skaitmeninę vaizdo analizę (n = 15). Taip pat neįtrauktos pacientės, kurių statusas (gyva / mirusi) nebuvo žinomas (n = 12). Galutinę tiriamųjų imtį sudarė 275 pacientės. Imtis pagal *HER2* geno būklę dichotomizuota į *HER2* neamplifikuotą ( $HER2/CEP17 < 2$ ; vid. *HER2* kopijų sk.  $< 4$  signalai branduolyje) ir amplifikuotą ( $HER2/CEP17 \geq 2$ ; vid. *HER2* kopijų sk.  $\geq 4$  signalai branduolyje) grupes (15), kuriose duomenys analizuojami atskirai. 2018 m. pasikeitus ASCO/CAP gairių vertinimo kriterijams, visi atvejai (n = 59, 37,3 %), kurie pagal 2013 m. ASCO/CAP gaires priklausė *HER2* FISH paribinei kategorijai ( $HER2/CEP17$  santykis  $< 2$ ; vid. *HER2* kopijų sk.  $\geq 4$  ir  $< 6$  signalų branduolyje ribose) (22), buvo perklasifikuoti ir priskirti *HER2* neamplifikuotų navikų grupei.

Pacienčių klinikinės-patologinės charakteristikos pateiktos 2.1 lentelėje. Pacienčių, kurioms diagnozuota *HER2* geno amplifikacija, grupėje nustatyta daugiau blogai diferencijuotų navikų (G3), palyginti su pacienčių, kurioms nedidžiaguota *HER2* amplifikacija, grupe (atitinkamai 50,4 % ir 25,5 %,  $p < 0,0001$ ). Pasiskirstymas pagal naviko stadiją abiejose grupėse nesiskyrė: dominavo T1 (48,7 % ir 44,4 % atitinkamai neamplifikuotoje ir amplifikuotoje) ir T2 navikai (46,2 % ir 47,9 % atitinkamai neamplifikuotoje ir amplifikuotoje), o T3 ir T4 kategorijos navikai sudarė gerokai mažesnę dalį (atitinkami abiejų po 2,5 % neamplifikuotoje grupėje bei 4,3 % ir 3,4 % amplifikuotoje grupėje). Didesei daliai pacienčių (60,8 % ir 59 % atitinkamai neamplifikuotoje ir amplifikuotoje grupėse) metastazių sritiniuose limfmazgiuose (N0) nenustatyta. Likusiai daliai pacienčių metastazių pažeistų sritinių limfmazgių procentas buvo pasiskirstęs taip: N1 – 26 % ir 24,4 %, N2 – 10,1 %, ir 12 %, N3 – 3,2 %, 7,7 % atitinkamai neamplifikuotoje ir amplifikuotoje grupėse. Trims pacientėms (1,09 %) buvo nustatytos tolimosios metastazės.

**2.1 lentelė.** Pacienčių, suskirstytų pagal *HER2* geno būklę, klinikinės-patologinės charakteristikos

Charakteristika	Iš viso, n	<i>HER2</i> neamplifikuota grupė, n (%)	<i>HER2</i> amplifikuota grupė, n (%)	<i>p</i> reikšmė
Pacienčių skaičius	275	158 (57,5)	117 (42,5)	–
Amžiaus mediana, metai (intervalas)	60 (29–92)	59 (33–86)	63 (29–92)	0,2247
Stebėjimo laikotarpis, mėnesiai				
Mediana (intervalas)	58 (0,7–102)	64 (2–102)	52 (0,7–100)	–
Mirčių skaičius	42	22 (13,7)	20 (17,1)	–
Naviko diferenciacijos laipsnis (G)				
G1	22	18 (11,4)	4 (3,4)	< 0,0001*
G2	153	99 (62,7)	54 (46,2)	
G3	100	41 (25,5)	59 (50,4)	
Pirminis navikas (T)				
T1	129	77 (48,7)	52 (44,4)	0,7578
T2	129	73 (46,2)	56 (47,9)	
T3	9	4 (2,5)	5 (4,3)	
T4	8	4 (2,5)	4 (3,4)	
Naviko išplitimas į limfmazgius (N)				
N0	166	96 (60,8)	69 (59)	0,3225
N1	66	41 (26)	25 (21,4)	

N2	30	16 (10,1)	14 (12)	
N3	14	5 (3,2)	9 (7,7)	
Tolimosios metastazės (M)				
M0	272	156 (98,73)	116 (99,15)	0,9999
M1	3	2 (1,27)	1 (0,85)	

G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas; T1 – navikas  $\leq 2$  cm, T2 – navikas  $> 2$  cm,  $\leq 5$  cm); T3 – navikas  $> 5$  cm; T4 – bet kokio dydžio navikas, tiesiogiai infiltravęs krūtinės ląstos sieną ir (arba) odą; N0 – metastazių sritiniuose limfmazgiuose nenustatyta, N1 – metastazės 1–3 sritiniuose limfmazgiuose, N2 – metastazės 4–9 sritiniuose limfmazgiuose, N3 – metastazės 10 ir daugiau sritinių limfmazgių; M0 – tolimųjų metastazių nėra; M1 – tolimosios metastazės yra; kintamieji palyginti naudojant  $\chi^2$  ir Fišerio tikslųjį kriterijų; \* – statistiškai reikšmingi ( $p < 0,05$ ) skirtumai.

## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. Fluorescencinės *in situ* hibridizacijos tyrimai

#### 2.2.1.1. HER2 FISH reakcija

*HER2* geno būklei nustatyti naudotas *PathVysion HER2* FISH rinkinys (*Abbott-Vysis, Inc., Downers Grove, IL, JAV*). Šiame rinkinyje naudojami du fluorescenciniais dažais pažymėti žymenys: *SpectrumOrange* žymi *HER2* geną (17q11.2-q12), o *SpectrumGreen* – 17 chromosomos centromerą (17p11.1-q11.1).

Atpjauti 4  $\mu$ m storio į parafiną įlieti audinių pjūviai perkeliama ant objektinių, elektrostatinę krūvį turinčių stiklelių ir inkubuojami per naktį 56 °C temperatūroje. Pjūviai deparafinuojami ksilene, dehidratuojami etilo alkoholyje ir išdžiovinami ore. Kitame etape pjūviai 20 min. veikiami 0,2 N HCl tirpalu, plaunami 2x SSC buferiu (pH 7,0), 30 min. inkubuojami specialiaame *PathVysion* rinkinio tirpale ( $80 \pm 1$  °C) ir 26 min. apdorojami proteazės tirpalu ( $37 \pm 1$  °C). Paskui ant tiriamųjų pjūvių užlašinami žymenys. Stiklai uždengiami dengiamaisiais stikleliais, sutvirtinami gumos klėjais ir dedami į hibridizatorių (*Dako Diagnostics, Glostrupas, Danija*). Pjūviai denatūruojami 5 min. 72 °C temperatūroje, paskui 19 val. hibridizuojami 37 °C temperatūroje. Reakcijai pasibaigus stiklai su tiriamaisiais pjūviais 2 min. plaunami 72 °C temperatūros 2 x SSC/0,3 % NP-40 buferiu. Ant pjūvių užlašinamas DAPI tirpalas (*Invitrogen Corporation, Carlsbadas, JAV*) ir šie uždengiami dengiamaisiais stikleliais.

### 2.2.1.2. *HER2* FISH vertinimas mikroskopu

Mikroskopinis ir skaitmeninis tiriamųjų atvejų vertinimas atliekamas tuo pačiu fluorescenciniu *Zeiss* mikroskopu (*Zeiss, Axio Imager.Z2*, Gottingenas, Vokietija). Mikroskopu signalai vertinami naudojant *SpectrumOrange* (*HER2* nustatymas), *SpectrumGreen* arba *FITC* (CEP17 nustatymas) ir trigubą *DAPI/FITC/Texas Red* fluorescencijos filtrus. *HER2* FISH analizė atlikta vadovaujantis 2013 m. ASCO/CAP gairių rekomendacijomis (22), o nuo 2018 m. įsigaliojus naujoms gairėms, atvejai perklasifikuoti pagal naujus nustatytus kriterijus (15). Analizuojami du naviko laukai, kuriuose skirtingi tyrėjai įvertina po 20 branduolių (iš viso 40). Nustačius ribinę *HER2* vertę įvertinama dar 20 branduolių. Apskaičiuojami *HER2*, CEP17 kopijų skaičiaus vidurkiai bei *HER2*/CEP17 santykis, kuris suskaičiuojamas *HER2* signalų sumą dalijant iš CEP17 signalų sumos.

*HER2* geno būklė vertinta pagal 2013 m.(22) ir 2018 m. (15) ASCO/CAP gairėse pateiktus vertinimo kriterijus (žr. 1.2 lentelę).

*HER2* heterogeniškumas vertintas remiantis: 1) ASCO/CAP gairėse nurodytu genetinio heterogeniškumo apibrėžimu – jis konstatuojamas, jei tiriamajame mėginyje randama > 5 % ir < 50 % ląstelių, kuriose *HER2*/CEP17 santykis > 2,2; taip pat, atsižvelgiant į *HER2* genetinio heterogeniškumo apibrėžimą, nenaudojant kontrolinio CEP17 zondo, atskirai įvertintas heterogeniškumas pagal *HER2* kopijų skaičių – jis konstatuojamas, kai tiriamajame mėginyje randama > 5 % ir < 50 % ląstelių, kuriose *HER2* geno kopijų skaičius > 6 (25) (taikyta mikroskopu (MD) ir automatinio būdu (AD) įvertintiems duomenims); 2) statistiniais bimodališkumo rodikliais – Ašmano D (angl. *Ashman's D*, toliau AshD) rodikliu ir bimodališkumo indeksu (BI), kurie abu taikyti tik automatinio būdu įvertintiems *HER2*, CEP17 bei *HER2*/CEP17 santykiui. AshD apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AshD = \sqrt{2} \frac{|\mu_1 - \mu_2|}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}},$$

čia  $\mu_1$  ir  $\mu_2$  yra vidurkiai,  $\sigma_1$  ir  $\sigma_2$  – standartiniai nuokrypiai; skaičiavimui taikytas Gauso skirstinių mišinio modelis (angl. *Gaussian Mixture Model*) (383) ir tikėtinumo maksimizavimo (angl. *Expectation Maximization*) algoritmas (384).

Bimodališkumas nustatomas, kai  $AshD > 2$ .

Bimodališkumo indeksas apskaičiuojamas pagal formulę (283):

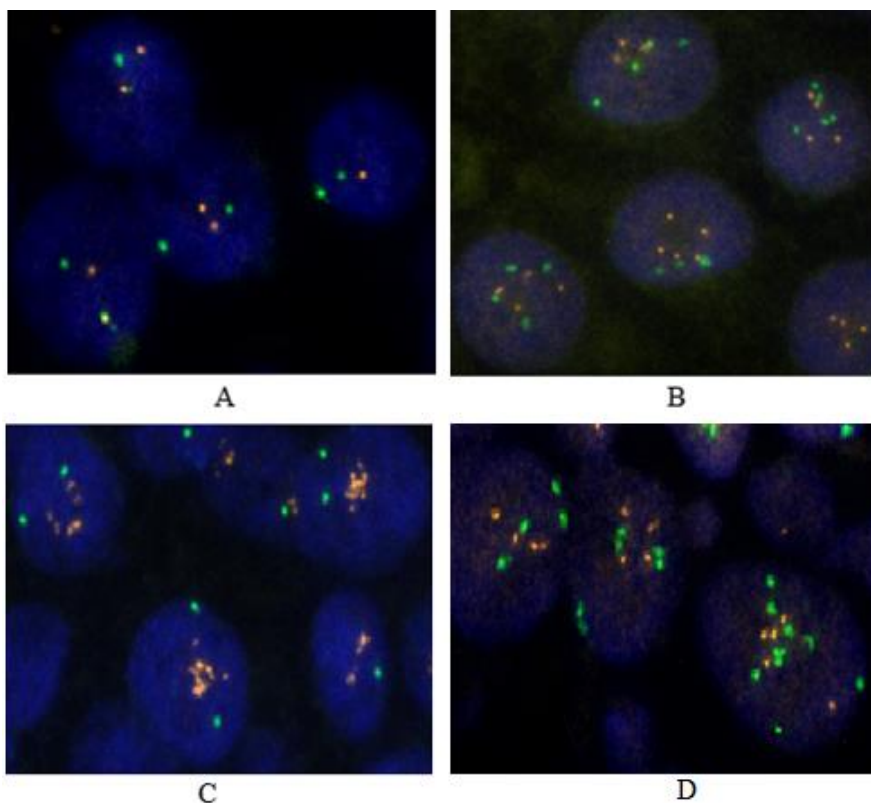
$$BI = \frac{|\mu_1 - \mu_2|}{\sigma} \sqrt{w(1 - w)},$$

čia  $\mu_1$  ir  $\mu_2$  yra vidurkiai;  $\sigma$  – standartinis nuokrypis;  $W$  – svorio koeficientas pirmajam komponentui; skaičiavimui taikytas Gauso skirstinių mišinio ir tikėtimumo maksimizavimo algoritmas (384).

Bimodališkumas nustatomas, kai  $BI \geq 0,6$ .

Padidėjęs 17 chromosomos skaičius konstatuojamas, jei ląstelės branduolyje nustatomas  $\geq 3$  vidutinis CEP17 kopijų skaičius (296).

*HER2* neamplifikuotų, paribinių, amplifikuotų ir kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius atvejų pavyzdžiai pateikti 2.1 pav.



**2.1 pav.** *HER2* geno būklės pavyzdžiai: (A) *HER2* geno amplifikacija nenustatyta; (B) nustatyta ribinė *HER2* geno vertė ir padidėjęs CEP17 kopijų skaičius; (C) nustatyta *HER2* geno amplifikacija; (D) nustatytas padidėjęs CEP17 kopijų skaičius. *HER2* signalai yra oranžinės spalvos, CEP17 – žalios spalvos. Vaizdai skenuoti 63 x padidiniu (skiriamoji geba 0,16  $\mu\text{m}$ /pikseliui).

### 2.2.1.3. Skaitmeninių *HER2* FISH vaizdų sukūrimas ir jų analizė

Skaitmeniniai *HER2* FISH vaizdai kurti *TissueFax-plus* skaitmeninės mikroskopijos įranga (*TissueGnostics*, Austrija). Vaizdai skenuoti imersiniu 63 x padidinimo objektyvu (skaitinė apertūra 1,4). Skenuotame audio vaizde



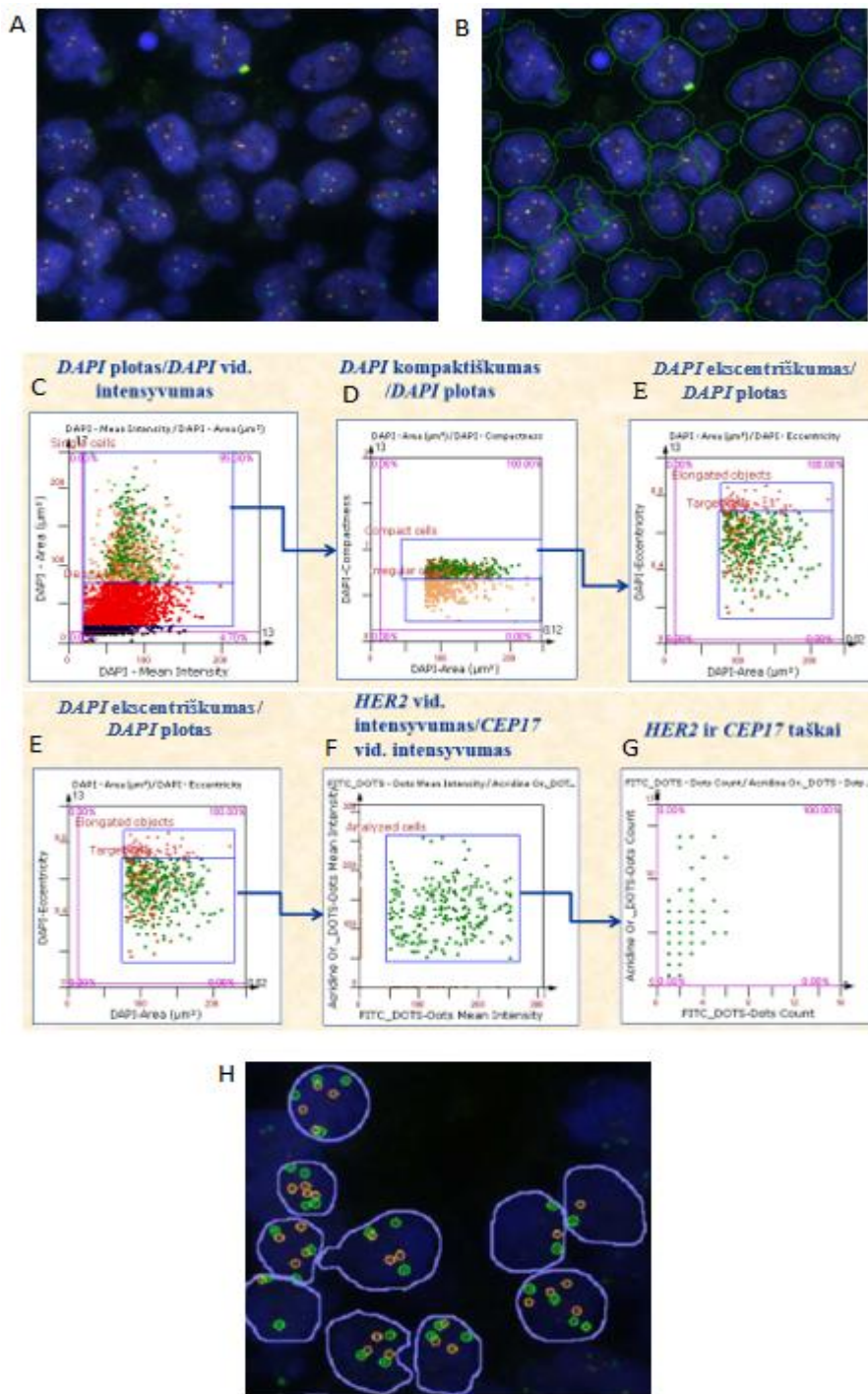
rankiniu būdu pažymimos norimos analizuoti sritys (angl. *regions of interest (ROI)*), sudarytos iš matymo laukų (angl. *fields of view (FOVs)*), kurių kiekvieną reprezentuoja iš trijų kanalų gautų signalų vaizdai: *DAPI* (branduolio nustatymas), *Acridine Orange (HER2)* nustatymas), *FITC* (CEP17 nustatymas). Kiekvieną *ROI* sudaro mažiausiai 4 matymo laukai (vieno matymo lauko dydis yra 0,12 mm<sup>2</sup> (0,4 mm pločio ir 0,3 mm ilgio)). Galutinis geriausiai fokusuotas kiekvieno kanalo vaizdas gautas sujungus atskirus vaizdus iš 9 plokštumų, 0,45 μm atstumu.

Skaitmeninė automatinė *HER2* FISH vaizdų analizė atlikta *StrataQuest v.205 (TissueGnostics, Austrija)* programa, apimančia branduolių segmentavimo bei *HER2* ir CEP17 taškų nustatymo algoritmus. Pirmiausia, vykdyta abiejų algoritmų kalibracija: branduolių nustatymui parinkti branduolių dydžio, ploto, intensyvumo, atskyrimo nuo fono slenkstinės vertės bei kompaktiškumo parametrai, o *HER2* ir CEP17 taškų nustatymui – dyžio, intensyvumo, atskyrimo nuo fono slenkstinės vertės ir jautrumo parametrai. Segmentuoti branduoliai kiekybiškai įvertinami pagal dydį, formą ir intensyvumą. Pagal šiuos parametrus, naudojantis diagramomis, atrenkama tikslinė branduolių subpopuliacija, o įvairūs branduolių fragmentai, netaisyklingų formų dariniai bei artefaktai yra atmetami. Atrankos seka pavaizduota ir išsamiau paaiškinta 2.2 pav.

Tiriamuosiuose mėginiuose analizuota nuo 2 iki 5 sričių. Jose įvertinti visi algoritmo nustatyti branduoliai (kiekvienoje srityje turėjo būti ne mažiau nei 40 branduolių).

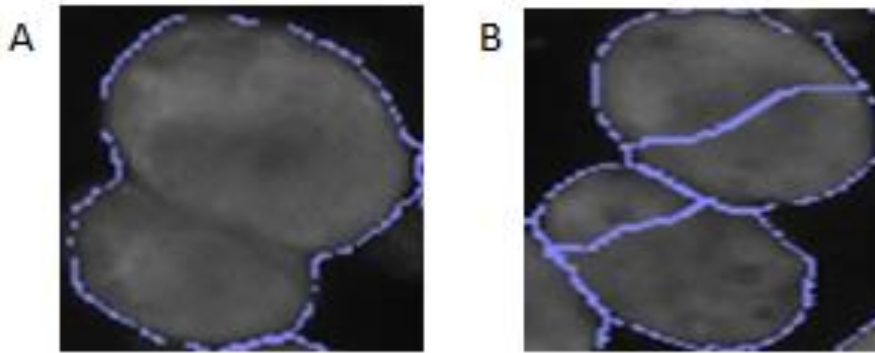
Automatinio branduolių segmentavimo bei *HER2* ir CEP17 nustatytų taškų rezultatai kompiuterio ekrane buvo patikrinti ir, radus klaidą, ištaisyti (koreguoti duomenys (KD)). Segmentavimo uždavinys yra sudėtingas, nes branduoliai skiriasi tiek savo morfologija: dydžiu, forma, tekstūra, tiek išsidėstymu: yra atskiri, susitelkę į grupes, besiliečiantys kraštais arba iš dalies uždengia vienas kitą. Be to, dėl didelės fluorescencinių vaizdų variacijos (fondo intensyvumo skirtumai, morfologinė branduolių įvairovė, autofluorescencija ir kt.) nei segmentavimo, nei signalų nustatymo klaidų neįmanoma išvengti nustačius net ir optimalias parametrų vertes. Galimos branduolių segmentavimo klaidos parodytos 2.3 pav. Skaitmeninės vaizdo analizės programoje įdiegtu įrankiu branduoliai galėjo būti atskiriami (jei sujungti po keletą į vieną darinį), sujungiami (jei perskelti), sukuriami arba ištrinami. *HER2* ir CEP17 signalus taip pat buvo galima ištrinti arba sukurti (2.4 pav.).

AD ir KD *HER2/CEP17* santykis apskaičiuojamas taip pat kaip ir MD.

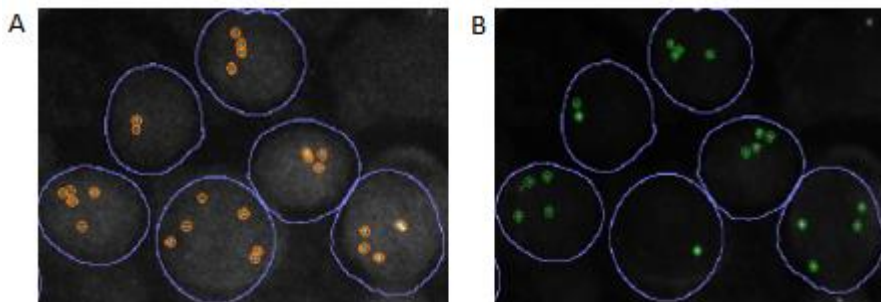


**2.2 pav.** Analizei tinkamų branduolių atrankos naudojantis diagramomis etapai. (A) pradinis skenuotas vaizdas; (B) segmentuoti branduoliai; (C) *DAPI* ploto ( $\mu\text{m}^2$ ) / *DAPI* vid. intensyvumo diagrama, kurioje atmetamos branduolių „nuolaužos“;

smulkūs neanalizuojami branduoliai (apibrėžta apatinė dalis); likę branduoliai (apibrėžta viršutinė dalis) toliau analizuojami D diagramoje; (D) *DAPI* kompaktiškumo / *DAPI* ploto ( $\mu\text{m}^2$ ) diagrama, kurioje atmetamos netaisyklingos formos branduoliai (apibrėžta apatinė dalis); toliau analizuojami disko formos branduoliai (apibrėžta viršutinė dalis) E diagramoje; (E) *DAPI* ekscentriškumo (matuoja, kiek objekto forma atitinka apskritimą ir linijos segmentą) / *DAPI* ploto ( $\mu\text{m}^2$ ) diagrama, kurioje atmetami ištįsę branduoliai (apibrėžta viršutinė dalis); toliau atrenkami branduoliai, kuriuose bus skaičiuojami *HER2* ir *CEP17* taškai (apibrėžta apatinė dalis); (F) *HER2* vid. intensyvumo / *CEP17* vid. intensyvumo diagrama, kurioje atmetami nevertintini branduoliai, turintys tik po vieną žalią arba oranžinį signalą (išsidėstę ant x ir y ašių); (G) *HER2* taškų / *CEP17* taškų diagrama, kurioje pažymėti visi tiriamieji branduoliai su įvertintais *HER2* ir *CEP17* taškais; (H) galutinis analizuotinių segmentuotų branduolių su juose nustatytais *HER2* (oranžinės spalvos apskritimai) ir *CEP17* (žalios spalvos apskritimai) taškais vaizdas.



**2.3 pav.** Branduolių segmentavimo klaidos: (A) du branduoliai sujungti į vieną; (B) perskelti branduoliai.



**2.4 pav.** Branduoliuose nustatyti *HER2* (A) ir *CEP17* (B) signalai, kuriuos, esant klaidai, buvo galima koreguoti.

## 2.2.2. Imunohistocheminis tyrimas

Imunohistocheminei ER, PR, HER2, Ki67 ir CD8 žymenų analizei atlikti iš FFPI naviko audinių blokų, atrinktų gydytojo patologo, atpjauti 3 µm storio pjūviai ir perkelti ant objektinių *SuperFrost Plus* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) stiklelių. Prieš pradėdant IHC reakcijas pjūviai 60 min. inkubuoti termostate, 56 °C temperatūroje. Dažymas atliktas naudojant visiškai automatizuotą *Roche Ventana BenchMark ULTRA* (*Ventana Medical Systems*, JAV) sistemą. Pjūviai deparafinuoti *EZ prep* (*Ventana Medical Systems*, JAV) tirpalu, antigenų epitopai atkurti Ventanos ląstelių kondicionavimo tirpalu (pH 8,5) 36 min., 95 °C temperatūroje, o inkubacija su antikūnais vykdyta 32 min. 37 °C temperatūroje, išryškinimui naudojant *ultraView Universal DAB Detection kit* sistemą (8 min., 36 °C temperatūroje; *Ventana Medical Systems*, JAV). ER, PR ir HER2 IHC reakcijose naudoti gamintojo paruošti triušio monokloniniai antikūnai, atitinkamai SP1, 1E2 ir 4B5 klonai (*Ventana Medical Systems*, JAV); Ki67 ir CD8 IHC – pelės monokloniniai antikūnai, atitinkamai MIB-1 ir C8/144B klonai (Dako, Danija), abu skiesti santykiu 1:100.

Dvigubam PR-HER2 IHC dažymui naudoti pirmiau išvardyti gamintojo paruošti antikūnai; pirmiausia 12 min. 37 °C temperatūroje vykdyta inkubacija prieš PR, išryškinimui naudojant *ultraView Universal DAB Detection kit* sistemą; paskui, atkūrus antigenų epitopus (4 min. 37 °C temperatūroje), 12 min 37°C temperatūroje vykdyta inkubacija prieš HER2, išryškinimui naudojant *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit* (*Ventana Medical Systems*, JAV) sistemą.

Reakcijų pabaigoje pjūviai nudažyti Mayer hematoksilinu 10 min., 37 °C temperatūroje, dehidratuoti etilo ir izopropilo alkoholiais ir uždengti dengiamaisiais stikleliais, naudojant *Biomount* medžiagą (*Biognost*, Kroatija).

IHC reakcijų kokybės kontrolei naudoti krūties navikų audiniai.

ER ir PR baltymus ekspresuojančių ląstelių skaičius įvertinamas procentais – pagal ASCO/CAP gairių rekomendacijas teigiama jų raiška nustatoma esant > 1 % slenkstinei vertei (114).

HER2 raiška vertinama atsižvelgiant į tris parametrus: baltymą ekspresuojančių ląstelių skaičių, įvertintą procentais, membranos nusidažymo vientisumą bei stiprumą ir priskiriama vienai iš kategorijų pagal skalę nuo 0 iki 3 (0, 1+ (neigiama), 2+ (paribinė), 3+ (teigiama)) (15).

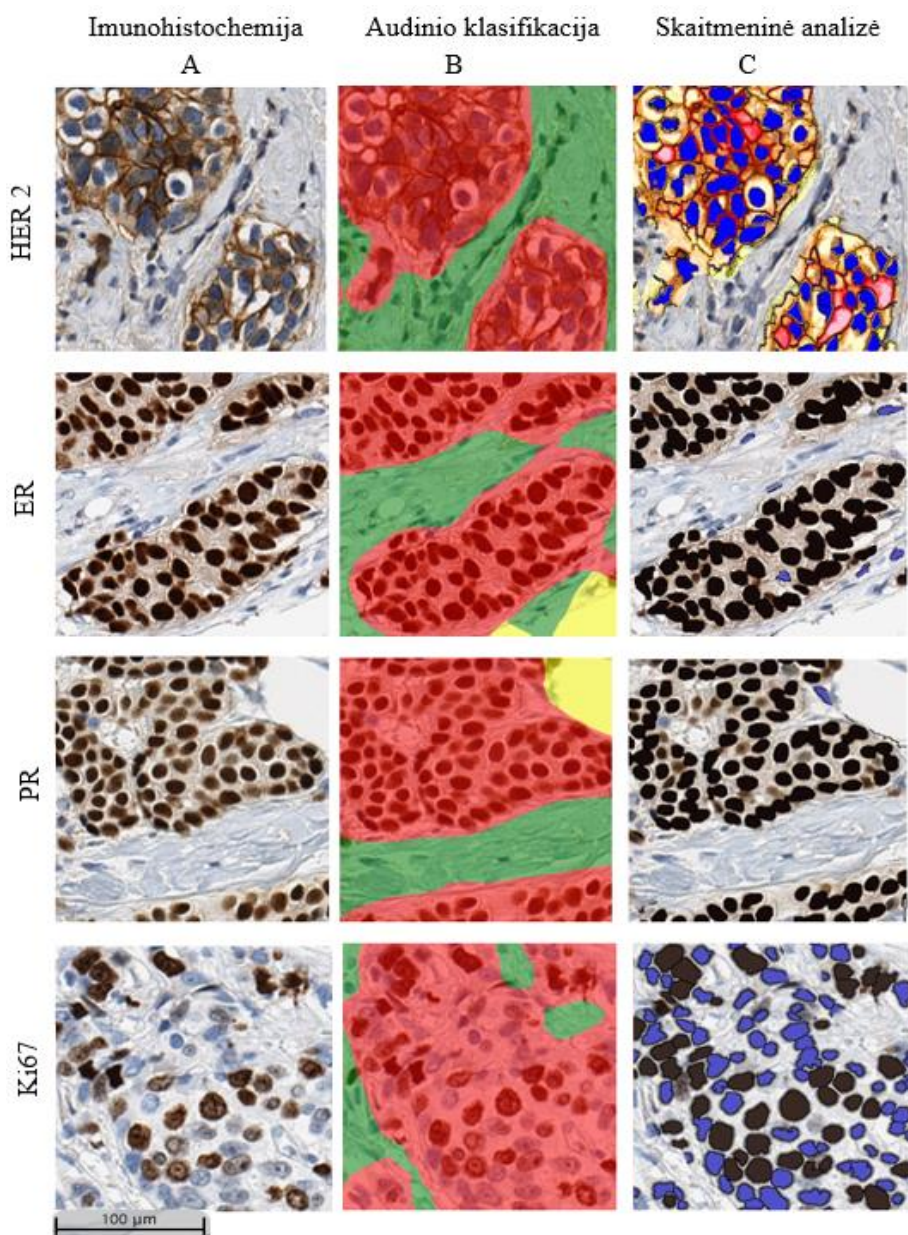
### 2.2.3. Skaitmeninė vaizdo analizė

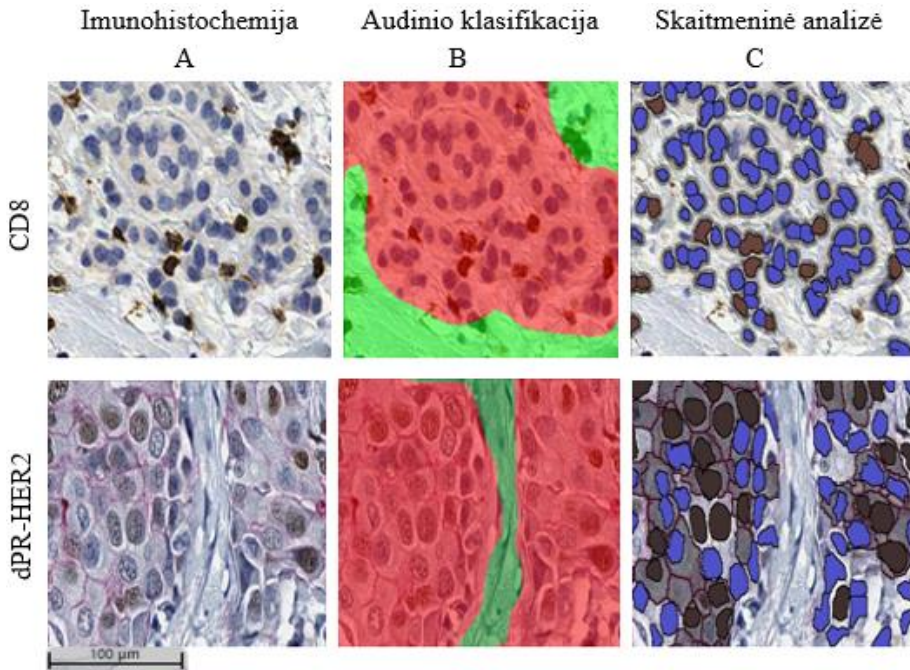
ER, PR, HER2 ir Ki67 IHC mikropreparatai skenuoti *ScanScope XT Slide Scanner (Leica Aperio Technologies, Vista, JAV)*, o CD8 ir dPR-HER2 – *Aperio AT2 Slide Scanner (Leica Biosystems, Buffalo Grove, JAV)* įranga, abiem atvejais taikant 20 x padidinimą (skiriamoji geba – 0,5 μm). Skaitmeniniai vaizdai analizuoti naudojant *HALO* programinės įrangos platformą (3.0311.174 versija, *Indica Labs*, Koralis, JAV).

#### 2.2.3.1. Tiriamojo audinio klasifikavimas

Tiriamojo audinio klasifikavimui taikytas dirbtinio intelekto pagrindu veikiantis *HALO AI* (versija 1.2) modulis. Klasifikatorius buvo apmokomas atpažinti tikslines audinio struktūras – navikinį epitelį, stromą ir foną (stiklą, nekrozės ir uždegimines sritis bei kitus artefaktus). Apmokymui struktūros rankiniu būdu pažymėtos pasirinktuose kuo įvairesniuose vaizduose (15–20 atvejų). Mokymas klasifikuoti audinį atliktas taikant 0,5 μm/pikseliui skiriamąją gebą ir 600 μm<sup>2</sup> minimalaus atpažįstamo objekto plotą. Pasibaigus mokymuisi ( $\geq 400\ 000$  ciklų, kai kryžminės entropijos (angl. *cross-entropy*) klaidos funkcija  $< 0,1$ ) audinių struktūrų priskyrimo naviko, stromos ir fono klasėms tikslumas įvertintas gydytojo patologo. Tikslumas pakankamas esant  $\geq 90\ %$ .

Skirtingi klasifikatoriai taikyti HER2, CD8 ir dPR-HER2 IHC dažymų audiniams, o ER, PR ir Ki67 – tas pats (2.5 pav.).





**2.5 pav.** HER2, ER, PR, Ki67, CD8 ir dPR-HER2 imunohistochemijos, audinio klasifikavimo ir kiekybinės skaitmeninės analizės rezultatai. A stulpelyje pateikti analizuotų žymenų IHC rezultatai: ruda spalva pažymėtos baltymus ekspresuojančios ląstelės, mėlyna – ląstelės, kuriose nėra baltymų raiškos; dPR-HER2 analizėje ruda spalva žymi PR raišką, raudona – HER2. B stulpelyje pateikti analizuotų žymenų audinio klasifikavimo rezultatai: raudona spalva žymi navikinį audinį, žalia – stromą, geltona – fono klasės darinius. C stulpelyje pateikti skaitmeninės vaizdo analizės rezultatai: HER2 analizėje raudona spalva žymi stiprią baltymo raišką (3+), oranžinė – paribinę (2+), geltona – silpną (1+), o mėlyna spalva pažymėti branduoliai; ER, PR, Ki67 ir CD8 raiška ląstelėse pažymėta ruda spalva, jos nebuvimas – mėlyna; dPR-HER2 analizėje PR ekspresuojančios ląstelės pažymėtos ruda spalva, neekspresuojančios – mėlyna; HER2 raišką žymi raudona spalva.

### 2.2.3.2. Skaitmeninė imunohistocheminių žymenų analizė

Kiekybinė žymenų analizė atlikta taikant skirtingus *HALO* programos algoritmus: branduolyje ekspresuojamiems ER, PR, Ki67 baltymams bei citoplazmoje ekspresuojamam CD8 baltymui taikytas *Multiplex IHC* algoritmas (versija 1.2), o HER2 žymens, kurio raiška vyksta membranoje, – membraninis HER2 algoritmas (versija 1.4).

Algoritmai buvo kalibruoti atpažinti ir segmentuoti biožymenis ekspresuojančias / neekspresuojančias ląstelių struktūras – branduolius, citoplazmą ar membraną, atsižvelgiant į sintetinio baltymo lokalizaciją.

Atpažinimas pagrįstas spalvų atpažinimu – parinkus ląstelės fragmentą, jam pagal RGB spalvų maišymo sistemą priskiriami atitinkamos spalvos pikseliai. Kalibruoti branduolių ir membranos nustatymo parametrai: jautrumas, kontrastas, optinis tankis, dydis, forma, vientisumas, atskyrimo nuo fono slenkstinės vertės, segmentavimo stiprumas. Siekiant užtikrinti kokybę, visos skaitmeninės analizės peržiūrėtos gydytojo patologo. Kiekvieno IHC žymens skaitmeninės vaizdo analizės pavyzdžiai pateikti 2.5 pav.

Pagal HER2 algoritmu nustatytus baltymo raiškos vientisumo membranoje (membrana gali būti trūkinėjanti arba vientisa) bei reakcijos dažymosi stiprumo rodiklius ląstelės yra automatiškai priskiriamos 0, 1+, 2+, 3+ kategorijoms.

Tolesnei analizei naudoti šie skaitmenine analize gauti IHC žymenų rodikliai:

- ER, PR, Ki67 ir CD8 – šiuos baltymus ekspresuojančių ląstelių procentai;
- HER2 – baltymą ekspresuojančių ląstelių, priklausančių 2+ ir 3+ kategorijoms (jų suma), procentai ir membranos vientisumo rodiklis.

Be to, skaitmeninės vaizdo analizės algoritmais nustatomos tiriamų ląstelių koordinatės vaizde, kurios yra naudojamos šešiakampių gardelių analitikoje.

#### Vidunavikinio heterogeniškumo parametrų apskaičiavimas

Siekiant apskaičiuoti erdvinės naviko tekstūros ir žymenų raiškos vidunavikinio heterogeniškumo parametrus, buvo pritaikyta šešiakampių gardelių metodika. Ši metodika, išrasta jungtinėmis Pranzūzijos ir Lietuvos tyrėjų pajėgomis (283), yra pagrįsta skaitmeninės vaizdo analizės duomenų (pagal jų koordinates) padalijimu į vienodo dydžio šešiakampius, kuriais padengiamas visas audinio plotas. Naudoti šešiakampiai, kurių kraštinės ilgis – 257  $\mu\text{m}$ , skersmuo – 514  $\mu\text{m}$ , plotas – 0,17  $\text{mm}^2$ . Gardelės, turinčios mažiau nei 50 ląstelių, buvo laikomos neinformatyviomis ir į tolesnę analizę neįtrauktos. Kiekviename šešiakampyje apskaičiuoti ER, PR, HER2 ir Ki67 žymenų raiškos procentai suskirstyti į 10 intervalų: (0–10 %, > 10–20 %, > 20–30 %, > 30–40 %, > 40–50 %, > 50–60 %, > 60–70 %, > 70–80 %, > 80–90 %, > 90–100 %). Šie intervalai reikalingi bendrosios masės matricos, skirtos Haralicko tekstūros rodikliams (kontrastui, skirtingumui, entropijai, energijai ir homogeniškumui) apskaičiuoti, sudarymui (385).



Taip pat apskaičiuoti kiekvieno IHC biožymens pasiskirstymą apibūdinantys bimodališkumo rodikliai (AshD).

### 2.2.3.3. Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas ir CD8+ limfocitų tankio rodiklių apskaičiavimas

Automatizuotas naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas pagrįstas skaitmeninės vaizdo analizės audinių klasifikacijos duomenimis ir jų padalijimu į šešiakampes gardeles. Neseniai išrastas metodas (jį kuriant dalyvavo Vilniaus universiteto tyrėjų grupė) yra išsamiai aprašytas Rasmusson ir bendraautorių (365).

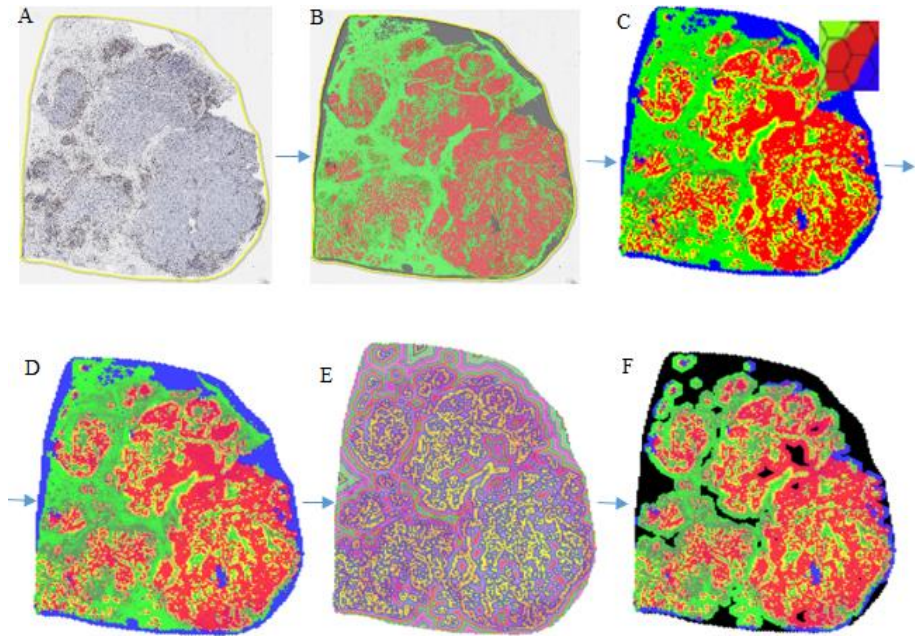
Sąveikos zonos nustatymo etapui supaprastintai pavaizduoti 2.6 pav. Taikytos gardelės, kurių kraštinės ilgis – 65  $\mu\text{m}$ , skersmuo – 130  $\mu\text{m}$ , plotas – 0,01  $\text{mm}^2$  (mažesnio dydžio šešiakampiai nei šešiakampiai, naudoti apskaičiuojant vidunavikinio heterogeniškumo rodiklius, buvo tinkamesni subtiliems audinių klasių plotų pokyčiams aptikti). Pirmiausia nustatoma naviko ir stromos sąlyčio riba – naviko kraštas. Tuo tikslu naviko kraštui priskiriamos gardelės pagal kiekviename šešiakampyje apskaičiuotus naviko, stromos ir fono klasių plotus bei įvertintus staigius naviko audinio ploto pokyčius. Pagal tam tikras taisykles priskyrimas šešiakampių naviko, stromos, naviko krašto ir fono klasėms, kitame etape nustatoma naviko ir stromos sąveikos zona. Apskaičiuojami visų naviko ir stromos klasių šešiakampių trumpiausieji atstumai iki naviko krašto. Jais remiantis ir gardelėms suteikiant rangus pagal toliau pateiktą taisyklę, išskiriamos naviko ir stromos sritys sąveikos zonoje:

$$\text{rangas} = \begin{cases} \text{jei šešiakampis priklauso naviko klasei, rangas} = \text{atstumas} \\ \text{jei šešiakampis priklauso stromos klasei, rangas} = -\text{atstumas} \\ \text{jei šešiakampis priklauso naviko krašto klasei, rangas} = 0 \\ \text{kitu atveju šešiakampį ignoruoti} \end{cases}$$

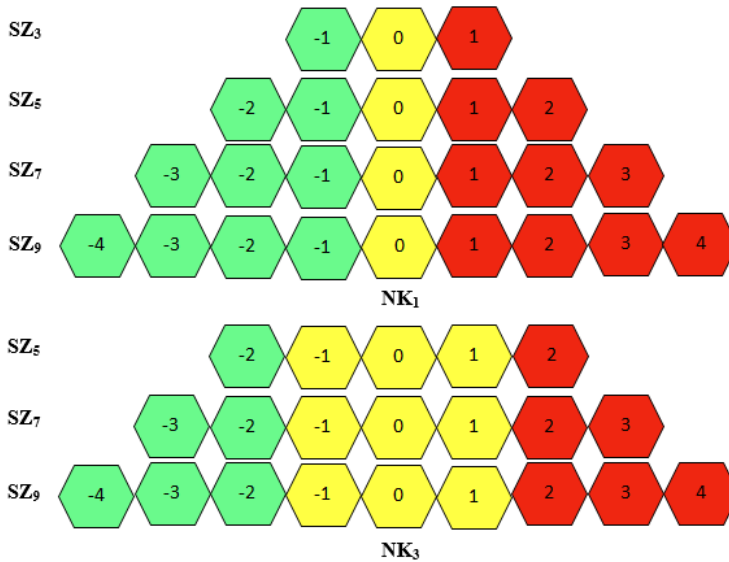
Taigi sąveikos zonos naviko kraštui suteikiamas rangas 0; nuo jo atstumams stromos pusėje suteikiamas neigiamas ženklas, o atstumams naviko pusėje suteikiamas teigiamas ženklas. Likusioms fono bei naviko ir fono klasėms priklausantys šešiakampiai toliau neanalizuojami.

Toks rangų suteikimo principas leidžia pasirinkti įvairius sąveikos zonos, sudarytos iš naviko krašto ir abipus jo esančių naviko ir stromos sričių, pločius (2.7 pav.). Naviko kraštas taip pat gali būti skirtingų rangų pločių. Darbe ištirti optimalūs kiekybiniai ir erdviniai CD8+ limfocitų tankio parametrams

apskaičiuoti sąveikos zonos ir naviko krašto pločiai (rezultatai pateikti 3.2.2 skyriuje).



**2.6 pav.** Naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymo etapai. (A) – skenuotas viso pjūvio CD8 IHC dažymo vaizdas. (B) – skaitmeninė vaizdo analizė, audinio klasifikavimo etapas: raudona spalva žymi naviko audinio, žalia – stromos audinio, pilka – fono klases. (C) – skaitmeninė vaizdo analizė šešiakampėse gardelėse. (D) – gardelės priskiriamos naviko (raudona spalva), stromos (žalia spalva), naviko ir stromos sąveikos krašto (naviko kraštas, geltona spalva), naviko ir fono krašto (pilka spalva) bei fono (mėlyna spalva) klasėms. (E) – atsitiktinėmis spalvomis vizualizuoti gardelių atstumai nuo naviko krašto. (F) – nustatyta 7 rangų pločio naviko ir stromos sąveikos zona: stromos sritis pažymėta žalia, naviko krašto – geltona, naviko – raudona spalvomis.



**2.7 pav.** Skirtingų pločių naviko ir stromos sąveikos zonas (SZ) reprezentuojanti schema: SZ<sub>3</sub>, SZ<sub>5</sub>, SZ<sub>7</sub> ir SZ<sub>9</sub> atitinka 3, 5, 7 ir 9 rangų pločio SZ, o NK<sub>1</sub> ir NK<sub>3</sub> atitinka 1 ir 3 rangų pločio naviko kraštą. Žalia spalva pažymėti SZ-os stromos srities rangai, geltona – naviko krašto rangai, raudona – naviko srities rangai.

Taikant šešiakampių gardelių metodiką gauti audinių klasifikavimo duomenys ir tiriamų ląstelių koordinatės leido apskaičiuoti CD8<sup>+</sup> ląstelių tankį, pirmiausia, visose gardelėse; vėliau CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti kiekvienoje nustatytos sąveikos zonos srityje (stromoje, naviko krašte ir navike). CD8<sup>+</sup> ląstelių tankis apskaičiuojamas žymenį ekspresuojančių ląstelių skaičių padalijus iš tiriamojo audinio ploto (mm<sup>2</sup>).

Be kiekybinių kintamųjų, siekiant išreikšti CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio profilių (t. y. CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio pasiskirstymus ir variacijas sąveikos zonos ranguose) išilgai analizuojamos sąveikos zonos, gradientą nuo stromos į naviką, apskaičiuoti erdviniai CD8<sup>+</sup> limfocitų tankio parametrai – imunogradiento rodikliai:

- Masės centras (MC).

MC rodikliu apskaičiuojama CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio profilio koordinatė palei horizontalią ašį, kurioje būtų išlaikyta ideali jo pusiausvyra. MC rodikliu nusakoma ir įvertinama CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio kitimo kryptis (gradientas) sąveikos zonoje iš stromos į naviką. MC apskaičiuojamas pagal formulę:

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

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

- Imunonuokrytis (IN)

Imunonuokryčio rodiklis parodo staigius CD8+ ląstelių tankio pokyčius šalia sąveikos zonos naviko krašto. Būtent pastebėtas dažnas CD8+ ląstelių tankio sumažėjimas („kritimas“) artimiausiuose naviko kraštui ranguose iš stromos (–1) ir naviko (1) sričių pusių sąlygojo šio reiškinio pavadinimą. IN apskaičiuojamas pagal formulę:

$$IN(q) = \frac{q(r_{-1})}{q(r_1)},$$

čia  $q(r_{-1})$  ir  $q(r_1)$  – atitinkamuose sąveikos zonos stromos ir naviko sričių ranguose (–1 arba 1) apskaičiuotas CD8+ ląstelių tankio vidurkis.

Taip pat vidutinis CD8+ ląstelių tankis buvo įvertintas ir viso pjūvio naviko ir stromos srityse (ne sąveikos zonoje).

#### 2.2.4. Statistinė analizė

Kiekybiniai kintamieji (IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, bimodališkumo, CD8+ ląstelių tankio ir imunogradiento rodikliai) aprašyti pateikiant jų vidurkį, standartinį nuokrypį ir medianą, kokybiniai kintamieji (klinikos ir patologijos rodikliai) – pateikiant jų absoliutų skaičių ir procentus.

Duomenų pasiskirstymo normalumas įvertintas Šapiro ir Vilko (angl. *Shapiro-Wilk*) bei Kolmogorovo ir Smirnov (angl. *Kolmogorov-Smirnov*) testais. Normaliai pasiskirsčiusių duomenų analizei taikyti parametriniai testai, o esant asimetriškai duomenų sklaidai – neparametriniai. Siekiant normalizuoti asimetriškai pasiskirsčiusius kiekybinius ir erdvinius CD8+ ląstelių tankio kintamuosius ir tenkinti parametrinės statistikos testų prielaidas, atlikta logaritminė kintamųjų verčių transformacija.

Automatiniu ir koreguotu bei automatiniu ir mikroskopavimo būdais nustatytų vidutinių *HER2*, *CEP17* kopijų skaičiaus bei *HER2/CEP17* santykio skirtumai palyginti dvipusiu poriniu *t* testu ir Bland-Altman analize.

Dviejų grupių (*HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų) kiekybinių kintamųjų vidurkiams palyginti taikytas parametrinis Stjudento *t* testas arba neparametrinis Mano ir Vitnio (*Mann-Whitney's*) *U* testas. CD8+ ląstelių tankio variacijos skirtingose sąveikos zonos srityse analizuotos vienfaktorine

dispersine analize (angl. *one-way ANOVA*) atliekant tarpgrupinį palyginimą, naudojant Bonferonio (*Bonferroni post-hoc*) testą. Kiekybinių kintamųjų porinėms sąsajoms įvertinti taikytos Pirsono (angl. *Pearson*) arba Spirmano (angl. *Spearman*) koreliacijos analizės. Kokybinių kintamųjų skirtumai grupėse analizuoti porinėmis dažnių lentelėmis, taikant  $\chi^2$  ir Fišerio tikslųjį kriterijų.

Kiekybinių kintamųjų sąsajos tirtos faktorinės analizės būdu, taikant pagrindinių komponentų metodą ir naudojant ortogonalųjį pasukimą *varimax* metodu. Kintamųjų tinkamumas faktorinei analizei tikrintas Kaizerio–Mejerio–Olkinio (angl. *Kaiser–Meyer–Olkin*; KMO) matu (tinkamas, kai  $KMO \geq 0,6$ ) (386). Veiksnių skaičius nustatomas pagal tikrines reikšmes (angl. *eigenvalue*), kurios turi būti  $> 1$ .

*HER2 FISH* kintamųjų faktorinės analizės metu išskirtų veiksnių įverčių klasterinė analizė atlikta taikant nehierarchinio klasterizavimo *k*-vidurkių (angl. *k-means clustering*) metodą.

Išgyvenamumo analizei atlikti taikytas Kaplano ir Mejerio (angl. *Kaplan–Meier*) išgyvenamumo metodas, o skirtumai tarp grupių vertinti logranginiu kriterijumi (angl. *log-rank*). Pacienčių išgyvenamumas skaičiuotas nuo krūties vėžio operacijos datos (stebėjimo pradžia) iki 2020 m. gegužės 31 d. (stebėjimo pabaiga) arba iki mirties datos. Slenkstinės kintamųjų reikšmės, pagal kurias pacientės stratifikuotos į prognozinės grupes, nustatytos naudojant *Cutoff Finder* įrankį (2.1 versija; *Charité* universitetas, Berlynas, Vokietija) (387).

Bendrojo išgyvenamumo prognoziniai veiksniai įvertinti Kokso regresijos metodu (angl. *Cox proportional hazards regression*), taikant vienaveiksnę ir daugiaveiksnę analizes. Kokso regresijos modeliai patvirtinti vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros būdu (angl. *leave-one-out cross-validation*) (388).

Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai *p* reikšmė buvo  $< 0,05$ .

Statistinė analizė atlikta SAS programiniu paketu (9.4 versija; *SAS Institute Inc.*, Keris, JAV). Paveikslai ruošti naudojantis SAS ir R programiniais paketais (4.1.0 versija; *R Development Core Team*).

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Skaitmeninė *HER2* FISH vaizdo analizė

##### 3.1.1. Automatinio būdu nustatytų, koreguotų ir vertintų mikroskopu *HER2* FISH rezultatų palyginimas

Išanalizuoti 155 *HER2* FISH skaitmeniniai vaizdai iš 50 krūties karcinomos atvejų. Juose nustatyti 36 154 branduoliai, iš kurių 27 266 (75,4 %) buvo teisingai segmentuoti, 5 626 (15,6 %) klaidingai, o 3 262 (9 %) branduoliai visai nesegmentuoti. Viename tiriamajame mėginyje vidutiniškai įvertinti 723 branduoliai (mažiausiai 192, o daugiausia 1 789 branduoliai). Atmetus nevertinamus branduolius (t. y. tuos, kurie neturėjo signalų arba turėjo tik po vieną žalią ar oranžinį signalą), automatiškai išanalizuotas 25 731 branduolys.

Automatine analize iš viso nustatyti 87 092 *HER2* ir 65 309 CEP17 signalai. Iš jų 81 704 (93,8 %) *HER2* ir 64 233 (98,4 %) CEP17 signalai nustatyti teisingai, 2 163 (2,5 %) *HER2* ir 1 116 (1,7 %) CEP17 klaidingai teigiamai, o 3 225 (3,7 %) *HER2* ir 1 115 (1,7 %) CEP17 klaidingai neigiamai.

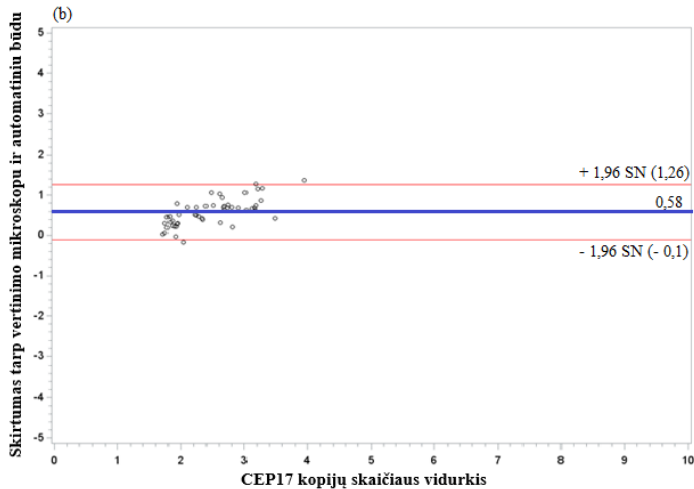
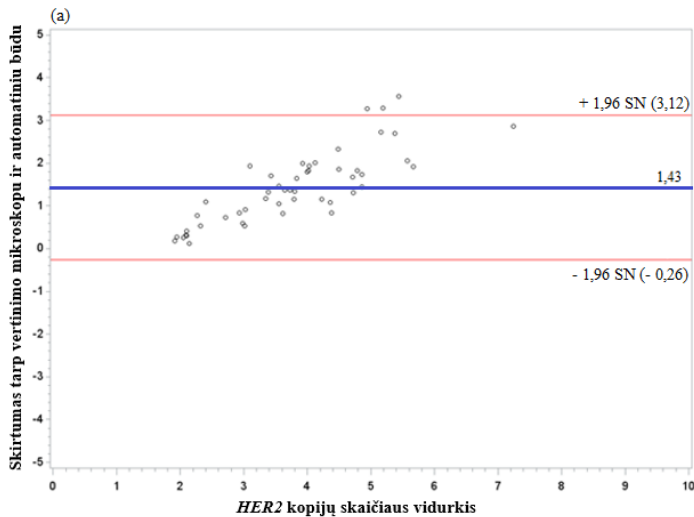
Palyginus automatinio ir koreguotu būdais gautus duomenis, reikšmingo nuokrypio nustatant vidutinį CEP17 kopijų skaičių navike nenustatyta (vidutinis skirtumas  $-0,0023$ , PI =  $[-0,013; 0,008]$ ,  $p = 0,6614$ ), o nustatant *HER2* kopijų skaičių ir vidutinį *HER2*/CEP17 santykį nustatytas tik nedidelis nuokrypis atitinkamai (vidutinis skirtumas  $0,046$ , PI =  $[0,013; 0,078]$ ,  $p = 0,0072$  ir vidutinis skirtumas  $0,025$ , PI =  $[0,005; 0,045]$ ,  $p = 0,0149$ ). Šiuos rezultatus atspindi duomenų palyginimas Bland-Altman grafikuose (3 priedas).

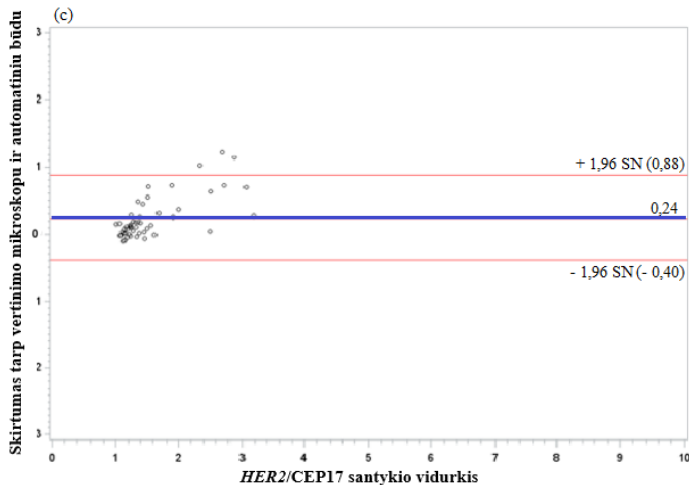
Tačiau palyginus duomenis, vertintus automatinio būdu ir mikroskopu, nustatytas didelis sisteminis nuokrypis: automatine analize gautos reikšmingai mažesnės vidutinės *HER2* kopijų vertės navike (vidutinis skirtumas  $1,428$ , PI =  $[1,188; 1,668]$ ,  $p < 0,0001$ ), vidutinės CEP17 kopijų skaičiaus (vidutinis skirtumas  $0,580$ , PI =  $[0,483; 0,676]$ ,  $p < 0,0001$ ) ir vidutinės *HER2*/CEP17 santykio (vidutinis skirtumas  $0,240$ , PI =  $[0,150; 0,330]$ ,  $p < 0,0001$ ) reikšmės nei analizuojant mikroskopu. Tai taip pat buvo patvirtinta Bland-Altman analize (3.1 pav.).

Prielaidą, kad signalai gali būti prarandami skenavimo metu, leidžia atmesti taikyta skenavimo technologija, kai skenuojamos devynios atskiros plokštumos, kurios vėliau sujungiamos į geriausiai fokusuotą vaizdą. Be to, siekiant paneigti abejonę, kad signalai galėjo išblukti skenuojant, FISH

signalų kiekis buvo palygintas skenuotuose vaizduose ir žiūrint „gyvai“ per mikroskopą; jokių neatitikimų nerasta.

Apibendrinant – nustatėme, kad vertinant FISH signalus automatinio būdu, aptinkamas sisteminis nuokrypis ir nustatomos mažesnės *HER2*, *CEP17* kopijų skaičiaus ir *HER2/CEP17* santykio reikšmės, palyginti su mikroskopijos metodu.





**3.1 pav.** FISH signalų nustatymo skirtumai tarp automatinio ir vertinant mikroskopu būdų: (a) *HER2* kopijų skaičiaus (vidurkių skirtumas 1,43,  $p < 0,0001$  (mėlyna linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 0,26, viršutinė riba 3,12 (raudonos linijos)); (b) CEP17 kopijų skaičiaus (vidurkių skirtumas 0,58,  $p < 0,0001$  (mėlyna linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 0,1, viršutinė riba 1,26 (raudonos linijos)); (c) *HER2/CEP17* santykio (vidurkių skirtumas 0,24,  $p < 0,0001$  (mėlyna linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 0,40, viršutinė riba 0,88 (raudonos linijos)).

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; SN – standartinis nuokrypis.

### 3.1.2. *HER2* FISH analizės mikroskopu rezultatai

Įvertinus 50 tiriamųjų atvejų mikroskopu pagal 2013 m. ASCO/CAP *HER2* FISH tyrimo rekomendacijas, 16 (32 %) atvejų *HER2* geno amplifikacija nenustatyta, 21 (42 %) nustatyta paribinė vertė, 13 (26 %) nustatyta *HER2* geno amplifikacija. „Klasikinė“ *HER2* amplifikacija, kai  $HER2/CEP17 \geq 2$ , o vid. *HER2* kopijų skaičius  $\geq 4$  signalai branduolyje, nustatyta 6 (46,2 %) atvejais; 2 (15,4 %) atvejai buvo amplifikuoti tik pagal *HER2* geno kopijų skaičių (t. y. kai  $HER2/CEP17 < 2$ , o vid. *HER2* kopijų skaičius  $\geq 6$  signalai branduolyje) ir 5 (38,5 %) tik pagal *HER2/CEP17* santykį (t. y. kai  $HER2/CEP17 \geq 2$ , o *HER2* geno kopijų skaičiaus vidurkis ląstelės branduolyje yra  $< 4$ ).

Nustatyti 8 (16 %) genetiškai heterogeniški atvejai, iš kurių 3 buvo amplifikuoti ir 5 paribiniai.

Nustatyti 22 atvejai, kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius ( $\geq 3$  kopijos); iš jų 3 buvo amplifikuoti, 17 paribinių ir 2 neamplifikuoti atvejai.



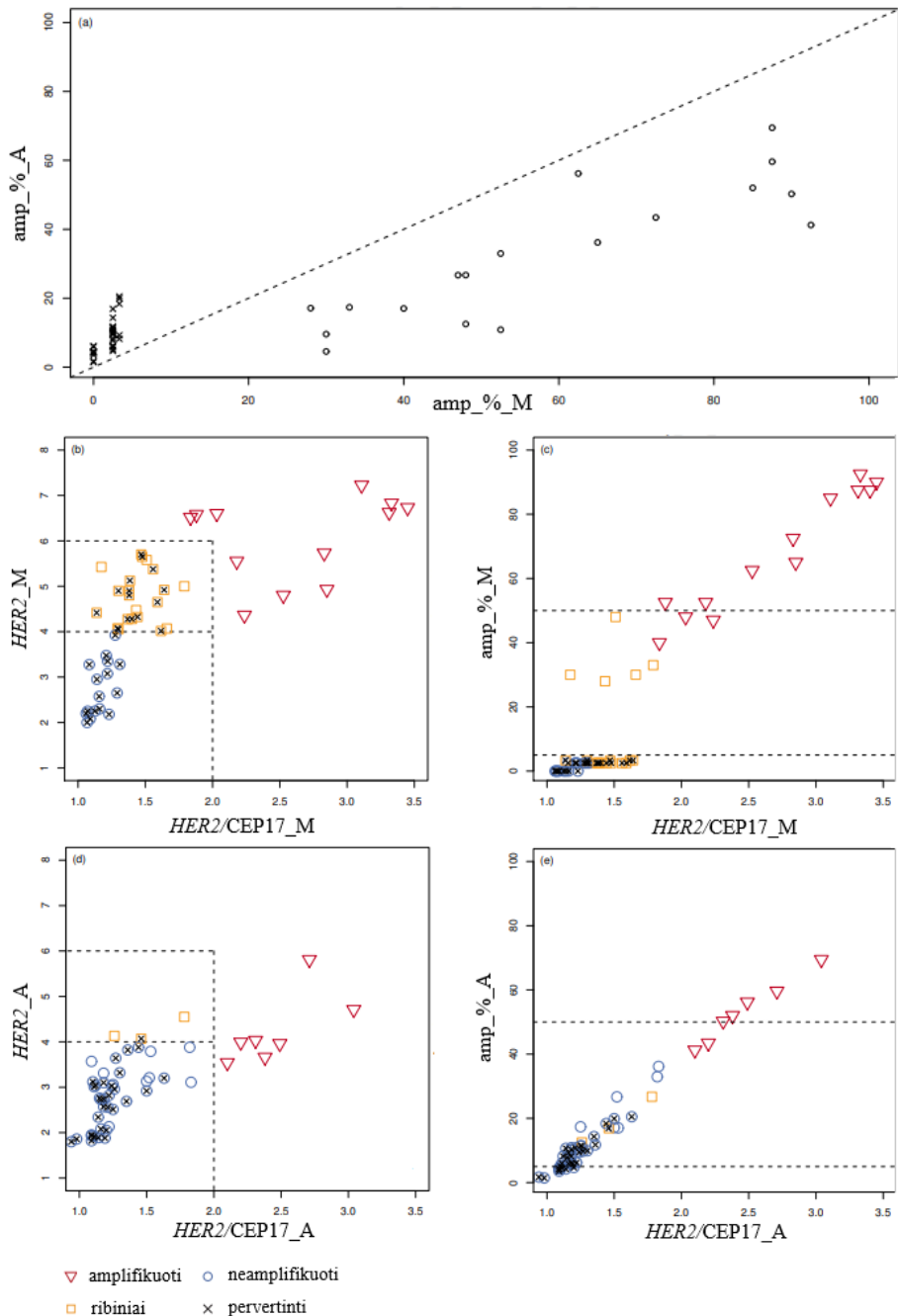
### 3.1.3. Automatinio būdu vertintų *HER2* FISH duomenų heterogeniškumo analizė

Automatizuotu būdu nustatytos mažesnės *HER2* FISH duomenų reikšmės turėjo įtakos skirtingam amplifikuotų ląstelių (*HER2*/CEP17 santykis  $> 2,2$ ) procentinių dalių nustatymui automatinio ir mikroskopinio vertinimo būdais. Šis skirtumas atsiskleidžia skirtinguose diapazonuose: 3.2 (a) paveiksle parodyta, kad vertinant mikroskopu, nuo 25 % amplifikuotų ląstelių ribos, nustatyta didesnė amplifikuotų ląstelių procentinė dalis (amp\_%\_M) nei vertinant automatinio būdu (amp\_%\_A); tačiau, esant žemesnei nei 5 % ribai, amp\_%\_A yra didesnė (siekia iki 20 %) nei amp\_%\_M.

Teigiamų, paribinių, neigiamų bei genetiškai heterogeniškų atvejų, įvertintų mikroskopu pagal ASCO/CAP *HER2* FISH gairių rekomendacijas (22, 25), išsidėstymas parodytas atitinkamai 3.2 (b) ir 3.2 (c) paveiksluose. Genetiškai heterogeniški atvejai buvo aptikti tik, kai juose yra bent 28 % amplifikuotų ląstelių, tačiau nuo 5 iki 28 % tokių atvejų nenustatyta (3.2 (c) pav.). 3.2 (d) pav. parodytas automatinio būdu nustatytų teigiamų, paribinių ir neigiamų atvejų išsidėstymas. Matyti, kad dėl mažesnių automatinio būdu nustatytų reikšmių dauguma mikroskopu įvertintų teigiamų ir paribinių atvejų „perėjo“ į neigiamų atvejų grupę (3.2 (d) pav.): nustatyti 7 amplifikuoti, 3 paribiniai ir 40 neamplifikuotų atvejų; ši įtaka atsispindi ir 3.2 (e) pav. parodytam amp\_%\_A pasiskirstymui. Tačiau svarbu pabrėžti, kad būtent automatinio būdu nustatytų amp\_%\_A pasiskirstymas yra tolydus (3.2 (e) pav.)).

*HER2* FISH vertinimas remiasi klinikinėse ASCO/CAP gairėse nurodytomis reikšmėmis, skirtomis mikroskopu analizuotiems duomenims, todėl AD negali būti naudojami apibrėžiant *HER2* būklę be tinkamos validacijos. Tačiau tolydūs duomenys, gauti didelio pajėgumo automatine vaizdo analize, atveria galimybę atskleisti ląstelių įvairovę informatyvesniais būdais nei tradiciniu mikroskopavimu. Šis automatinės vaizdo analizės pranašumas gali būti panaudotas aptinkant išsibarsčiusius po visą audinį amplifikuotus branduolius. Viso tiriamojo audinio ploto skenavimas mikroskopu yra varginanti procedūra, todėl išsibarstę pavieniai amplifikuoti branduoliai gali likti nepastebėti. Siekiant patikrinti šią hipotezę, išmatuota atstumo tarp artimiausių amplifikuotų branduolių (kuriuose *HER2*/CEP17 santykis  $> 2,2$ ) mediana automatinio būdu ir mikroskopu analizuotuose duomenyse. Atlikus logaritminę transformaciją, rasta, kad 24-iais galbūt heterogeniškais automatinio būdu nustatytais atvejais amplifikuotų branduolių pasiskirstymas buvo reikšmingai retesnis ( $p = 0,0138$ ) nei

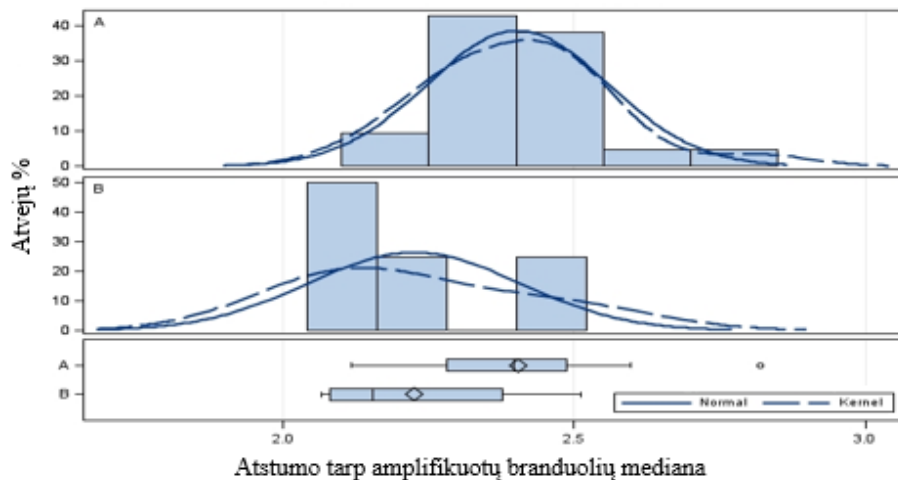
aštuoniais mikroskopu nustatytais genetiškai heterogeniškais atvejais (3.3 pav.).



**3.2 pav.** Navikų pasiskirstymas atsižvelgiant į *HER2* amplifikacijos būklės ir genetinio heterogeniškumo gaires. (a) pavaizduota atitiktis tarp amplifikuotų ląstelių procentinių dalių, apskaičiuotų mikroskopu ir automatinio būdu vertintuose

duomenyse, atitinkamai  $amp\_M$  ir  $amp\_A$ . Punktyrinė linija žymi atitikimą. AD pervertina mažas mikroskopu nustatytas reikšmes (pažymėta kryžiuokais), tačiau nepakankamai jas įvertina nuo  $> 28\%$  ribos (pažymėta apskritimais); (b) grafiko y ašyje atidėjus  $HER2$  kopijų skaičiaus, o x –  $HER2/CEP17$  santykio rodiklius, gautus vertinant mikroskopu, ir punktyrine linija pažymėjus 2013 m. ASCO/CAP gairėse nurodytas slenkstines vertinimo reikšmes, pavaizduotas teigiamų, paribinių, neigiamų atvejų pasiskirstymas. Kryžiuokais pažymėti atvejai yra pervertinti atvejai iš (a); (c) grafiko y ašyje atidėjus  $amp\_M$ , o x –  $HER2/CEP17$  santykio rodiklius, pavaizduotas atvejų pasiskirstymas genetinio heterogeniškumo vertinimo ribose. Horizontalios punktyrinės linijos žymi genetinio heterogeniškumo slenkstines ribas (5–50%). Ribose nuo 3% iki 28% galima pastebėti atvejų trūkumą; (d) grafiko y ašyje atidėjus  $HER2$  kopijų skaičiaus, o x –  $HER2/CEP17$  santykio rodiklius, gautus vertinant automatinio būdu ir punktyrine linija pažymėjus 2013 m. ASCO/CAP gairėse nurodytas slenkstines vertinimo reikšmes, pavaizduotas teigiamų, paribinių, neigiamų atvejų pasiskirstymas; (e) grafiko y ašyje atidėjus  $amp\_A$ , o x –  $HER2/CEP17$  santykio rodiklius, pavaizduotas atvejų pasiskirstymas genetinio heterogeniškumo vertinimo ribose. Iš viso vertinant mikroskopu nustatyta: 13 amplifikuotų, 21 paribinis, 16 neamplifikuotų ir 8 genetiškai heterogeniški atvejai; vertinant automatinė analize nustatyta: 7 amplifikuoti, 3 paribiniai, 40 neamplifikuotų ir 36 genetiškai heterogeniški atvejai.

$HER2$  – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas;  $HER2\_M$ ,  $HER2/CEP17\_M$  – mikroskopu nustatyti atitinkamai  $HER2$  kopijų skaičius bei  $HER2/CEP17$  santykis;  $HER2\_A$ ,  $HER2/CEP17\_A$  – automatinė analize nustatyti atitinkamai  $HER2$  kopijų skaičius ir  $HER2/CEP17$  santykis;  $amp\_M$  ir  $amp\_A$  – amplifikuotų ląstelių procentinės dalys, nustatytos mikroskopu ir automatinė analize.

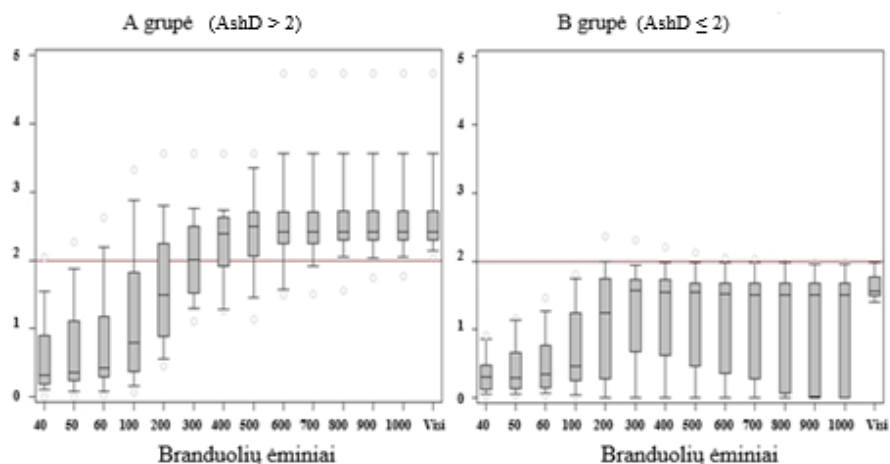


**3.3 pav.** Vidutinis atstumas tarp artimiausių amplifikuotų branduolių (matuotas pikseliais; skiriamoji geba 0,16  $\mu\text{m}$ /pikseliui) heterogeniškuose automatinio būdu ir

mikroskopu nustatytuose navikuose. A grupę sudaro ( $n = 24$ ) galbūt heterogeniški automatinio būdu nustatyti atvejai ( $5 \leq \text{amp\_}\%\_A < 25$ ), kurie mikroskopu nebuvo įvertinti kaip heterogeniški. B grupę reprezentuoja ( $n = 8$ ) heterogeniški mikroskopu nustatyti atvejai ( $5 \leq \text{amp\_}\%\_M < 50$ ). A grupėje atstumo mediana tarp amplifikuotų branduolių buvo didesnė (2,4024) nei B grupėje (2,2249),  $p = 0,0138$ .

Dar vienas didelio pajėgumo skaitmeninės vaizdo analizės pranašumas yra galimybė apskaičiuoti objektyvius bimodališkumo rodiklius. Darbe bimodališkumas vertintas apskaičiuotu AshD koeficientu. Pirmiausia, siekiant nustatyti patikimą bimodališkumą, pagrįstą AshD kriterijumi, buvo apskaičiuotas reikalingas minimalus tiriamųjų branduolių kiekis atsitiktinai parenkant AD branduolių ėminius ir modeliuojant laipsniškai didėjančių jų kiekį (nuo 40 iki 1 000 branduolių). Apskaičiuotus AshD kaip vidurkį iš 1 000 pakartojimų kiekvienam skirtingam branduolių ėminiui, nustatyta, kad esant 200 naviko ląstelių branduolių, antroji pasiskirstymo smailė aptinkama retai (mažiau nei pusėje branduolių ėminių iteracijų), nors tokie atvejai, remiantis visos tiriamosios branduolių imties analize ir priklausė bimodalinių atvejų kategorijai ( $n = 23$ ). Modeliavimo rezultatai parodė, kad, didėjant branduolių ėminių apimtims, bimodališkumo nustatymas įvertinant AshD ( $\text{AshD} > 2$ ) akivaizdžiai gerėja, o norint patikimai nustatyti šį rodiklį, būtų tikslinga įvertinti apie 800 branduolių (3.4 pav). Šis eksperimentas parodo automatizuotos vaizdo analizės pajėgumą iširti didelį ląstelių branduolių kiekį, gerokai viršijantį mikroskopinės analizės pajėgumą, kai įvertinamas tik ribotas branduolių skaičius.

Nustatyti 23, 11 ir 5 bimodališki ( $\text{AshD} > 2$ ) atitinkamai pagal *HER2* kopijas, CEP17 kopijas ir *HER2/CEP17* santykį atvejai.



**3.4 pav.** Ašmano D (AshD) reikšmių pasiskirstymas atsitiktinai parinktuose branduolių ėminiuose. Horizontalioje ašyje pažymėti atsitiktinai parinktų branduolių ėminių dydžiai. Vertikaliuoje ašyje pažymėtos AshD reikšmės. Stačiakampėse diagramose parodyta, kaip vidutinės AshD reikšmės, gautos iš atsitiktinai parinktų branduolių ėminių, pasiskirsto dviejose grupėse: remiantis visos branduolių imties AshD reikšme, grupę A sudaro atvejai, kai  $AshD > 2$  ( $n = 23$ ), o B – atvejai, kai  $AshD \leq 2$  ( $n = 27$ ).

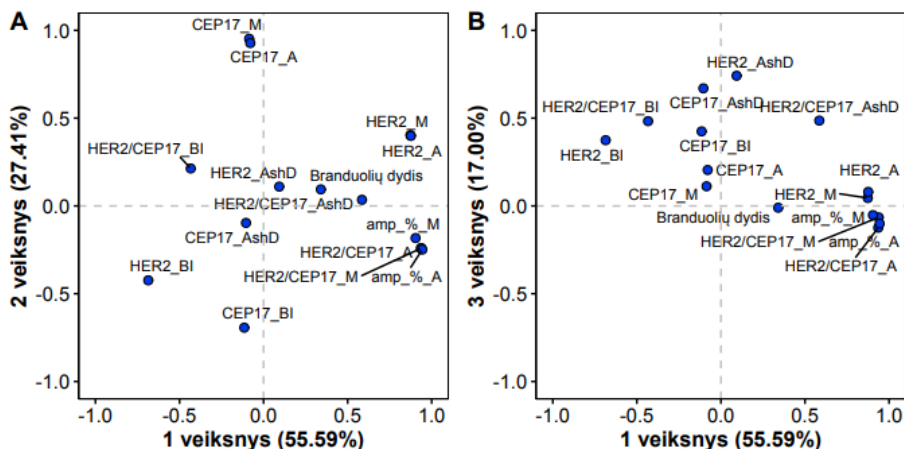
#### 3.1.4. *HER2* FISH rodiklių faktorinė analizė

Prieš faktorinę analizę kintamųjų tarpusavio ryšiai įvertinti porine koreliacijos analize (4 priedas). Duomenų tinkamumą faktorinei analizei patvirtino bendrasis visų kintamųjų KMO rodiklis, kuris buvo 0,72. Atsižvelgta ir į kiekvieno kintamojo KMO – esant mažesnei nei 0,5 reikšmei, kintamasis į faktorinę analizę neįtraukiamas.

Atlikus faktorinę FISH MD ir AD (*HER2* ir CEP17 kopijų skaičiaus, *HER2*/CEP17 santykio, amplifikuotų ląstelių procentinių dalių, branduolių dydžio) bei bimodaliskumo parametrų (*HER2*\_AshD, CEP17\_AshD, *HER2*/CEP17\_AshD, *HER2*\_BI, CEP17\_BI, *HER2*/CEP17\_BI) analizę, išskirti trys veiksniai, kurie kartu paaiškino 74 % visos duomenų variacijos. Visų trijų veiksnių krūviai, po *varimax* pasukimo, pateikti 3.5 pav., o jų struktūra – 5 priede.

Pirmąjį veiksni apibūdino stiprūs teigiami *HER2* amplifikaciją rodantys krūviai: *HER2* kopijų skaičius, *HER2*/CEP17 santykis bei amplifikuotų ląstelių procentinės dalys, nustatytos vertinant mikroskopu ir automatiškai būdu. Šis veiksnys paaiškino didžiausią kintamųjų dispersijos dalį (55,59 %) ir buvo pavadintas amplifikacijos veiksniumi. Antrąjį veiksni – padidėjusį CEP17 kopijų skaičių, paaiškinantį 27,41 % kintamųjų variacijos,

charakterizavo stiprūs CEP17 kopijų skaičiaus, nustatyto mikroskopu ir automatinio būdu, krūviai bei neigiamas CEP17 kopijų skaičiaus bimodališkumo indeksas. Trečiąjį veiksnį, sudarantį 17 % kintamųjų variacijos, apibūdino bimodališkumo rodiklių krūviai: stipresni AshD koeficientai, apskaičiuoti *HER2* bei CEP17 kintamiesiems ir silpnesnis *HER2/CEP17* kintamajam; todėl šis veiksnys pavadintas bimodališkumo veiksmiu.



**3.5 pav.** *HER2* FISH rodiklių, gautų automatine analize bei vertinant mikroskopu, pasuktų veiksmių krūviai: (A) 1-ojo ir 2-ojo, (B) 1-ojo ir 3-iojo.

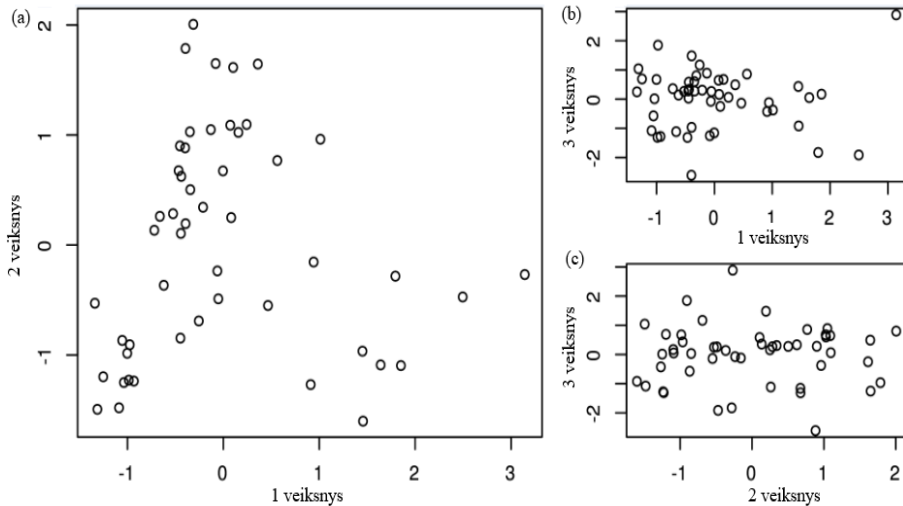
*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksmio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; *HER2\_A*, CEP17\_A, *HER2/CEP17\_A* – automatinė analize nustatyti atitinkamai *HER2*, CEP17 kopijų skaičius bei *HER2/CEP17* santykis; *HER2\_M*, CEP17\_M, *HER2/CEP17\_M* – mikroskopu nustatyti *HER2*, CEP17 kopijų skaičius ir *HER2/CEP17* santykis atitinkamai; amp\_%\_A ir amp\_%\_M – amplifikuotų ląstelių procentinės dalys, nustatytos automatinė analize ir mikroskopu; *HER2\_AshD*, CEP17\_AshD ir *HER2/CEP17\_AshD* – Ašmano D rodikliai, apskaičiuoti automatinio būdu nustatytiems *HER2*, CEP17 bei *HER2/CEP17* santykiui; *HER2\_BI*, CEP17\_BI ir *HER2/CEP17\_BI* – bimodališkumo indeksai, apskaičiuoti automatinio būdu nustatytiems *HER2*, CEP17 bei *HER2/CEP17* santykiui.

### 3.1.5. Klasterinė analizė

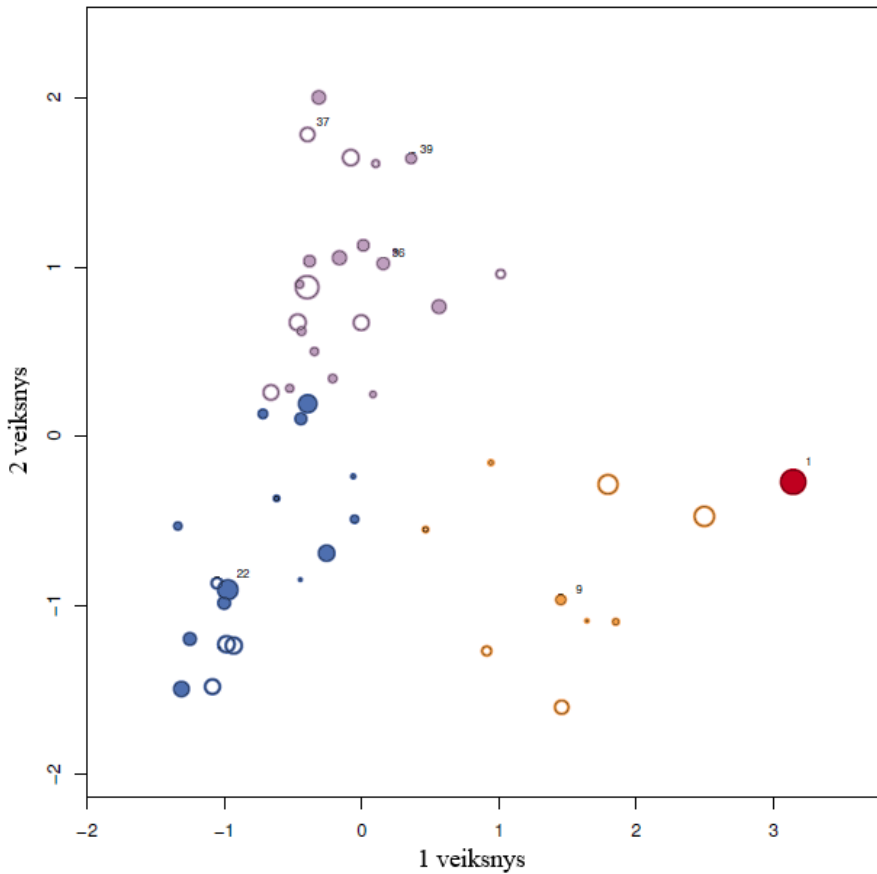
Toliau analizuojant veiksmius, gautus atliekant faktoriinę analizę, nubraižyti jų įverčių išsibarstymo grafikai (3.6 (a–c) pav.). 3.6 (a) pav. matyti galbūt netiesinis ryšys tarp amplifikacijos ir padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus veiksmių bei navikų susigrupavimas į klasterius.

Atlikus klasterinę 3-ų veiksmių įverčių analizę, išskirti 4 skirtingi klasteriai. Klasteriai pavaizduoti 3.7 pav., jų charakteristikos pateiktos 3.1 lentelėje, o informacija apie visus atvejus klasteriuose aprašyta 6 priede. 1-am ir 2-am

klasteriams (sudarytiems atitinkamai iš 1 ir 9 atvejų) priklausė įvairaus amplifikacijos ir bimodališkumo veiksmių įverčių laipsnio navikai. 3-įjį klasterį sudarė neamplifikuoti navikai (18 atvejų); tačiau nemažai jų daliai buvo būdingas didelis *HER2* bimodališkumo įvertis (33,3 % atvejų ( $AshD > 2$ )). 4-ąjį klasterį sudarė daugiausia paribiniai, kurių CEP17 kopijų skaičius padidėjęs, navikai (22 atvejai).



**3.6 pav.** Veiksmių įverčių išsibarstymo grafikai tarp: (a) pirmojo (amplifikacijos) ir antrojo (padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus) veiksmių; (b) pirmojo ir trečiojo (bimodališkumo) veiksmių; (c) tarp antrojo ir trečiojo veiksmių.



**3.7 pav.** Diagrama, kurioje pavaizduoti klasteriai, gauti iš 1, 2 ir 3 veiksnių įverčių. Klasteriai pažymėti spalvomis: 1 klasteris – raudona, 2 klasteris – geltona, 3 klasteris – mėlyna, 4 klasteris – violetinė. Burbulo dydis reprezentuoja 3 veiksnį (bimodališkumą); pilnaviduriai burbuliukai atspindi teigiamas 3 veiksnio įverčio reikšmes, tuščiaviduriai – neigiamas. Skaičiais pažymėti keletas atvejų iš visų klasterių, kurie pavaizduoti ir išsamiau charakterizuoti 3.8 pav.

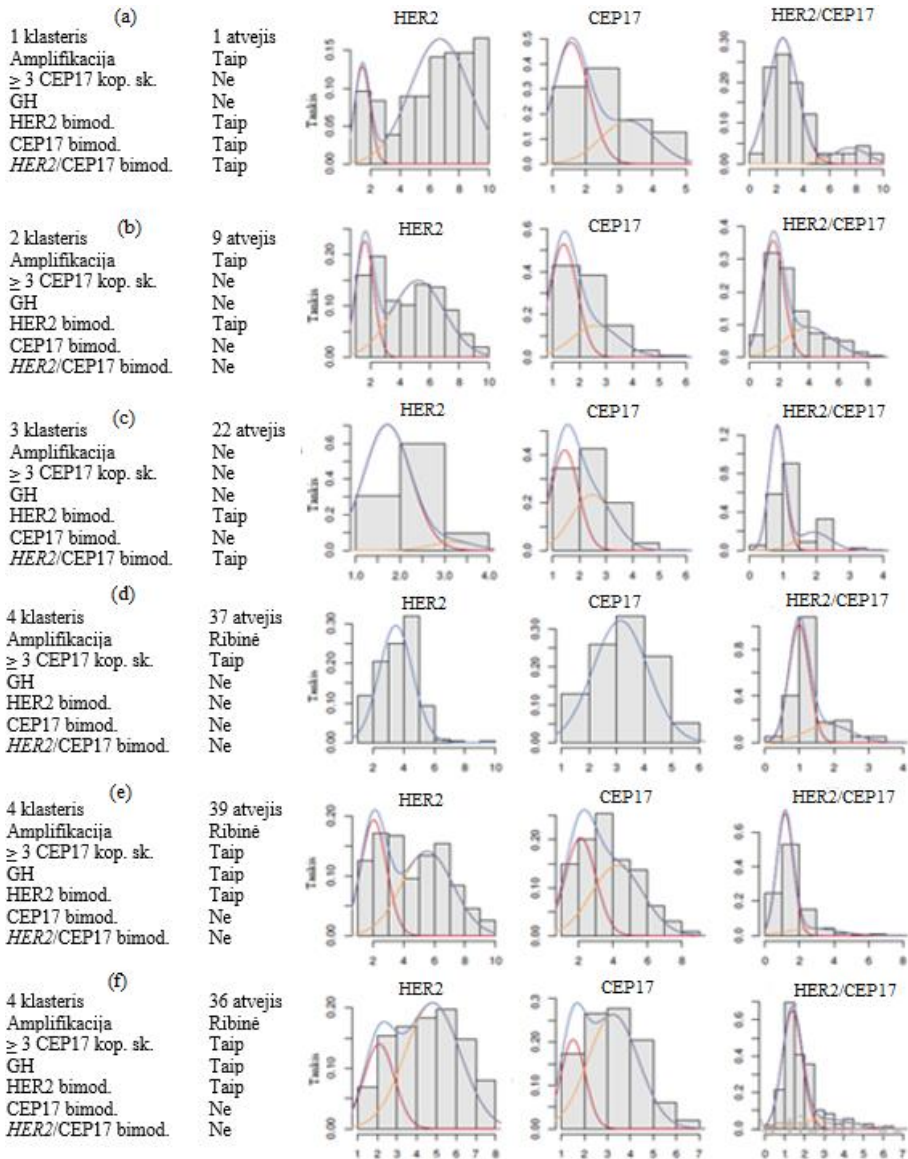


**3.1 lentelė.** Klasterių, sudarytų remiantis automatinės vaizdo analizės duomenimis, charakteristikos

	1 klasteris	2 klasteris	3 klasteris	4 klasteris	Iš viso
Atvejų skaičius	1 (2 %)	9 (18 %)	18 (36 %)	22 (44 %)	50
Amplifikacija imtyje Yra / Paribinė / Nėra	1 (2 %)/0/0	9 (18 %)/0/0	0/4 (8 %)/14 (28 %)	3 (6 %)/17 (34 %)/2 (4 %)	50
Amplifikacija klasteriuose Yra / Paribinė / Nėra	1 (7,7 %)/0/0	9 (69,2 %)/0/0	0/4 (19,1 %)/14 (87,5 %)	3 (23,1 %)/17 (80,9 %)/2 (12,5 %)	13/21/16
≥ 3 CEP17 kopijų sk.	0	0	3 (13,6 %)	19 (86,4 %)	22
GH (amp_%_M), apskaič. iš <i>HER2/CEP17</i>	0	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	6 (75 %)	8
GH (amp_%_M), apskaič. iš <i>HER2</i> kop. sk.	0	4 (14,8 %)	6 (22,2 %)	17 (63 %)	27
<i>HER2/CEP17_AshD</i> > 2	1 (20 %)	1 (20 %)	2 (40 %)	1 (20 %)	5
<i>HER2_AshD</i> > 2	1 (4,3 %)	4 (17,4 %)	6 (26,1 %)	12 (52,2 %)	23
<i>CEP17_AshD</i> > 2	1 (9 %)	0	5 (45,5 %)	5 (45,5 %)	11
Vyraujantys atvejai	Amplifik.	Amplifik.	Neamplifik.	Paribiniai; Su ≥ 3 CEP17 kopijų sk.; Bimodaliniai	

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; GH (amp\_%\_M): genetinis heterogeniškumas vertinant mikroskopu – apskaičiuotas amplifikuotų ląstelių procentinės dalys iš *HER2/CEP17* santykio ir vien tik pagal *HER2* kopijų skaičių. *HER2\_AshD*, CEP17\_AshD ir *HER2/CEP17\_AshD*: Ašmano D rodiklis, apskaičiuotas automatiškai būdu gautiems *HER2*, CEP17 ir *HER2/CEP17* duomenims.

Nors klasterinės analizės būdu navikai buvo aiškiai suskirstyti į amplifikuotus, neamplifikuotus ir paribinius, kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius, tipus, bimodališkumo veiksnys buvo kintantis visuose klasteriuose ir suteikė nepriklausomą ląstelių įvairovės charakteristiką. Atvejų iš visų klasterių pavyzdžiai pateikti 3.8 pav. *HER2* kopijų skaičiaus ir (arba) *HER2/CEP17* santykio pasiskirstymo bimodališkumas gali būti nustatytas kaip nepriklausomas ir neamplifikuotų, ir amplifikuotų atvejų požymis – tokių atvejų pavyzdžiai pateikti 3.8 (a), (b) ir (c) pav. (nė vienas iš šių atvejų nebuvo nustatytas kaip genetiškai heterogeniškas vertinant mikroskopu). Svarbu pažymėti, kad paribinių ir kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius atvejų klasteryje (3.8 (d), (e) ir (f) pav.) buvo atvejų, kuriems būdingas bimodalinis *HER2* ir (arba) CEP17 pasiskirstymas, todėl jie gali būti suskirstyti į „paribinių, kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius“ (3.8 (d) pav.) ir „paribinių, kai padidėjęs CEP17 kopijų skaičius ir esančiu *HER2* bimodališkumu“ (3.8 (e) ir 3.8 (f) pav.) kategorijas. Tik vienas atvejis (3.8 (e)) iš šių pavyzdžių pagal galiojančių gairių apibrėžimą buvo genetiškai heterogeniškas.



**3.8 pav.** Navikų atvejų iš visų klasterių pavyzdžiai. Parodytos 3.7 pav. skaičiais pažymėtų atvejų *HER2*, *CEP17* ir *HER2/CEP17* histogramos su apibendrintomis Gauso kreivėmis. Amplifikacijos,  $\geq 3$  CEP17 kopijų skaičiaus (padidėjęs CEP17 kopijų skaičius) ir genetinio heterogeniškumo kategorijos yra pagrįstos įprastos vertinimo mikroskopu procedūros rezultatais. *HER2\_bimod*, *CEP17\_bimod* ir *HER2/CEP17\_bimod* reprezentuoja bimodališkumo kategorijas, pagrįstas Ašmano D > 2 kriterijumi.

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; *CEP17* – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; GH – genetinis heterogeniškumas; *HER2\_bimod*, *CEP17\_bimod* ir *HER2/CEP17\_bimod* – *HER2*, *CEP17* ir *HER2/CEP17* bimodališkumas.

### 3.2. Išsami krūties vėžio imunohistocheminių (ER, PR, HER2, Ki67) ir CD8 žymenų skaitmeninė vaizdo analizė

#### 3.2.1. IHC, FISH ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių analizė

IHC žymenų (ER, PR, HER2, Ki67) raiškos ir jų vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių (Haralicko tekstūros ir bimodališkumo parametrai) analizė atlikta 2-ose pagal HER2 būklę atskirtose pacienčių grupėse; rezultatai, kartu įtraukiant ir *HER2* FISH mikroskopinio vertinimo duomenis, pateikti 3.2 lentelėje.

Palyginus rodiklius tarp grupių, didesnė ER ir PR, o mažesnė Ki67 biožymenų raiška nustatyta *HER2* neamplifikuotuose navikuose. Analizuojant vidunavikinio heterogeniškumo rodiklius, reikšmingai skyrėsi tik Ki67 žymens tekstūros parametrai: didesnės kontrasto, skirtingumo ir entropijos bei mažesnės energijos ir homogeniškumo reikšmės nustatytos *HER2* amplifikuotuose navikuose. Šiuose navikuose, kartu su didesniu *HER2* kopijų skaičiumi, nustatytas ir reikšmingai didesnis CEP17 kopijų skaičius.

**3.2 lentelė.** IHC, FISH ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių aprašomosios statistikos rezultatai *HER2* neamplifikuotuose (n = 158) ir amplifikuotuose (n = 117) navikuose

Rodikliai	Neamplifikuota <i>HER2</i> būklė			Amplifikuota <i>HER2</i> būklė			
	Vid.	SN	Mediana	Vid.	SN	Mediana	p reikšmė
<b>IHC rodikliai</b>							
HER2 %	29,37	13,96	28,07	31,76	15,76	29,29	0,414
HER2 MV	44,55	13,02	48,16	44,46	11,85	48,26	0,6574
ER %	82,72	17,43	87,99	71,39	30,35	84,74	0,0017*
PR %	51,76	34,79	67,6	38,65	34,12	36,91	0,0007*
Ki67 %	13,54	11,26	9,49	18,19	12,52	14,24	< 0,0001*
<b>FISH rodikliai</b>							
<i>HER2</i> kopijų skaičius	3,66	1,03	3,55	7,37	2,48	6,7	< 0,0001*
CEP17 kopijų skaičius	2,78	0,72	2,78	3,39	1,62	3,23	< 0,0001*
<i>HER2</i> /CEP17 santykis	1,32	0,21	1,28	2,43	1,12	2,23	< 0,0001*
<b>Vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai</b>							
HER2_kontrastas	1,25	0,8	1,07	1,32	0,77	1,18	0,3803
HER2_skirtingumas	0,71	0,27	0,69	0,73	0,26	0,74	0,4768
HER2_entropija	3,71	1,12	3,9	3,84	0,94	3,99	0,4299

HER2_energija	0,16	0,19	0,1	0,14	0,14	0,09	0,5662
HER2_homogeniškumas	0,69	0,1	0,69	0,69	0,09	0,67	0,5477
HER2_AshD	4,21	4,6	2,37	3,7	3,52	2,32	0,8704
HER2 MV_kontrastas	0,89	0,5	0,82	0,96	0,51	0,86	0,4157
HER2 MV_skirtingumas	0,57	0,23	0,58	0,6	0,22	0,58	0,5569
HER2 MV_entropija	3,18	1,07	3,36	3,35	0,9	3,47	0,3976
HER2 MV_energija	0,22	0,2	0,15	0,19	0,13	0,15	0,602
HER2 MV_homogeniškumas	0,74	0,09	0,74	0,73	0,08	0,73	0,642
HER2 MV_AshD	2,07	1,18	1,84	2,1	1,17	1,77	0,9688
ER_kontrastas	1,33	1,36	0,91	1,25	1,13	0,96	0,9067
ER_skirtingumas	0,58	0,39	0,54	0,57	0,39	0,53	0,9359
ER_entropija	2,7	1,51	2,68	2,7	1,57	2,81	0,8607
ER_energija	0,35	0,28	0,25	0,36	0,31	0,23	0,8296
ER_homogeniškumas	0,77	0,13	0,77	0,77	0,14	0,76	0,8022
ER_AshD	4,67	7,15	1,92	3,63	4,52	1,87	0,5756
PR_kontrastas	1,66	1,38	1,52	1,55	1,52	1,17	0,229
PR_skirtingumas	0,66	0,45	0,67	0,62	0,52	0,58	0,2751
PR_entropija	3,06	1,8	3,41	2,82	2,08	3,13	0,4117
PR_energija	0,35	0,36	0,19	0,42	0,39	0,25	0,4303
PR_homogeniškumas	0,75	0,16	0,73	0,77	0,18	0,77	0,3256
PR_AshD	2,3	1,87	1,84	2,3	2,12	1,82	0,558
Ki67_kontrastas	0,5	0,44	0,38	0,63	0,51	0,47	0,0034*
Ki67_skirtingumas	0,36	0,24	0,35	0,47	0,24	0,42	0,001*
Ki67_entropija	2,05	1,22	2	2,55	1,11	2,49	0,0013*
Ki67_energija	0,42	0,3	0,31	0,29	0,22	0,23	0,0006*
Ki67_homogeniškumas	0,83	0,11	0,83	0,78	0,1	0,79	0,0004*
Ki67_AshD	4,36	7,25	1,87	5,06	7,44	2,08	0,9274

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; HER2\_MV – HER2 membranos vientisumas; Vid. – vidurkis; SN – standartinis nuokrypis; AshD – Ašmano D bimodalškumo rodiklis; p\* – statistiškai reikšmingi (p < 0,05) skirtumai.

### 3.2.2. CD8+ limfocitų tankio rodiklių analizė

CD8+ limfocitų pasiskirstymo matavimai atlikti automatinio būdu nustatytuose naviko krašte bei naviko ir stromos sąveikos zonoje. Ši metodika, kadangi šešiakampėms gardelėms priskiriami erdviniai rangai, leidžia pasirinkti įvairius sąveikos zonos, sudarytos iš naviko krašto ir abipus jo esančių naviko ir stromos sričių, plotčius (žr. 2.2.3.3 skyrių). Renkantis didžiausią galimą sąveikos zonos plotį, remtasi tyrėjų, kurie pirmieji pritaikė šį analizės įrankį imuninio atsako rodiklių tyrimams krūties vėžio audinyje, duomenimis: gardelės nuo naviko krašto gali būti nutolusios ne didesniu kaip 4 rangų atstumu (sąveikos zonos išplėtimas didesniu naviko klasės gardelių rangų skaičiumi gali turėti įtakos skaičiavimams naudojamų rangų duomenų disproporcijoms) (389). Taigi kiekybiniais ir erdviniais CD8+ limfocitų tankio parametrų apskaičiuoti sudaryti 7 skirtingų plotčių naviko krašto (1 rango pločio (NK<sub>1</sub>, sudaro 0 rangas) ir 3 rangų pločio (NK<sub>3</sub>, sudaro -1, 0 ir 1 rangai)) bei naviko ir stromos sąveikos zonos (SZ<sub>3</sub>, SZ<sub>5</sub>, SZ<sub>7</sub>, SZ<sub>9</sub>, atitinkamai 3, 5, 7 ir 9 rangų pločio sąveikos zonos) variantai (2.7 pav.). Kiekviename iš jų apskaičiuoti CD8+ ląstelių tankio (vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai) rodikliai visose sąveikos zono srityse (stromoje, naviko krašte, navike) bei imunogradiento (CD8+ ląstelių masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis bei imunonuokrytis) rodikliai.

Tinkamiausio naviko krašto ir sąveikos zonos derinio, kai būtų nustatyti prognoziškai stipriausi rodikliai, atranka atlikta vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros būdu. Galimų Kokso regresijos modelių, į juos įtraukiant ir klinikos bei patologijos rodiklius, pasikartojimo bei statistinio reikšmingumo rezultatai pateikti 3.3 (*HER2* neamplifikuota navikų grupė) ir 3.4 (*HER2* amplifikuota navikų grupė) lentelėse. *HER2* neamplifikuotoje grupėje visų Kokso modelių pasikartojimų skaičius buvo labai panašus, todėl galutinį pasirinkimą lėmė modelių statistinis reikšmingumas ( $\chi^2$ ), kuris didžiausias (13,82,  $p = 0,0002$ ) nustatytas, esant 1 rango pločio naviko kraštui ir 7 rangų pločio sąveikos zonos variantui (t. y. NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>7</sub>). Be to, renkantis tarp NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>9</sub> bei NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>7</sub>, pastaroji sąveikos zona būtų „saugesnė“, jei tiriamasis navikas būtų nedidelis. *HER2* amplifikuotoje grupėje visi modeliai, kuriuose naviko kraštas buvo 3 rangų pločio (NK<sub>3</sub>), pasikartojė daugiau kartų, tačiau jų statistinis reikšmingumas buvo mažesnis, palyginti su modeliais, kurių naviko kraštas buvo 1 rango pločio (NK<sub>1</sub>) (išskyrus NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>9</sub> derinio modelį). Iš modelių variantų, kai NK<sub>1</sub>, 7 rangų pločio sąveikos zonos (t. y. NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>7</sub>) abu atrankos kriterijai buvo vieni geriausių – pasikartojė 107 kartus, o  $\chi^2$  siekė 8,04 ( $p = 0,005$ ). Taigi CD8+ limfocitų pasiskirstymo

tyrimams pasirinkta 1 rango pločio naviko kraštas ir 7 rangų pločio sąveikos zona abiejose, *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse.

**3.3 lentelė.** Skirtingų naviko krašto ir sąveikos zonos pločių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje

<b>NK ir SZ derinys</b>	<b>Modelio kintamieji</b>	<b>Modelio pasikartojimai</b>	$\chi^2$	<b><i>p</i> reikšmė</b>
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>3</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_MC_t	131	8,26	0,004
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>5</sub>	CD8_MC_t CD8_sn_NK	134	10,04	0,002
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>7</sub>	CD8_t_N CD8_MC_t CD8_sn_NK	133	13,82	0,0002
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>9</sub>	CD8_t_N CD8_MC_t CD8_sn_NK	131	13,53	0,0002
NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>5</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	133	11,02	0,0009
NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>7</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	131	12,87	0,0004
NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>9</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	128	12,64	0,0004

NK – naviko kraštas; SZ – sąveikos zona; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; CD8\_MC\_t – CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis; CD8\_sn\_NK – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto srityje; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje.

**3.4 lentelė.** Skirtingų naviko krašto ir sąveikos zonos pločių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą *HER2* amplifikuotų navikų grupėje

<b>NK ir SZ derinys</b>	<b>Modelio kintamieji</b>	<b>Modelio pasikartojimai</b>	$\chi^2$	<b><i>p</i> reikšmė</b>
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>3</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	75	8,03	0,004
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>5</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	79	8,10	0,004
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>7</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	107	8,04	0,005
NK <sub>1</sub> ir SZ <sub>9</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_sn_NK	107	4,50	0,035
NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>5</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_NK CD8_IN_t	111	5,24	0,023

NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>7</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_NK CD8_IN_t	110	5,24	0,023
NK <sub>3</sub> ir SZ <sub>9</sub>	N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_NK CD8_IN_t	110	6,14	0,014

NK – naviko kraštas; SZ – sąveikos zona; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje; CD8\_sn\_NK – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto srityje; CD8\_t\_NK – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko krašto srityje; CD8\_IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis.

Abiejose navikų grupėse apskaičiuoti CD8+ ląstelių tankio ir imunogradianto (masės centras ir imunonuokrytis) rodikliai naviko ir stromos sąveikos zonos stromos, naviko krašto ir naviko srityse; CD8+ ląstelių tankis taip pat apskaičiuotas viso pjūvio naviko ir stromos srityse (ne sąveikos zonoje) (3.5 lentelė).

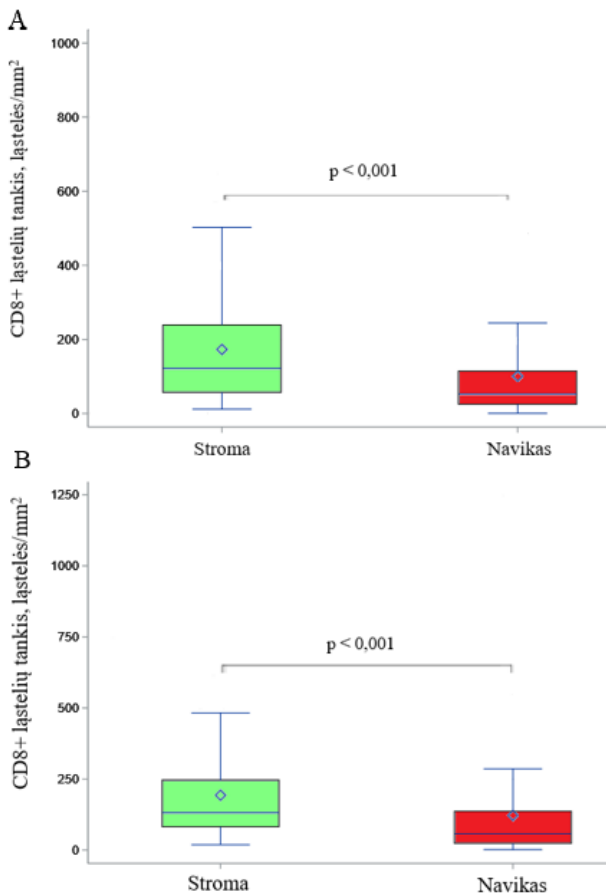
**3.5 lentelė.** CD8+ ląstelių tankio ir imunogradianto rodiklių aprašomoji statistika *HER2* neamplifikuotų (n = 158) ir amplifikuotų (n = 117) navikų grupėse

CD8 ląst. tankio ir imunogradianto rodikliai	Neamplifikuota <i>HER2</i> būklė			Amplifikuota <i>HER2</i> būklė			
	Vid.	SN	Mediana	Vid.	SN	Mediana	<i>p</i> reikšmė
CD8_S	135,6	132,6	94,87	154,4	158,4	96,65	0,2457
CD8_N	109,1	127,6	60,9	130,9	176,7	72,25	0,6105
CD8_t_S	173,1	160,9	122,3	193,4	178,3	131,83	0,2396
CD8_sn_S	268,1	157,6	228,8	286,7	58,5	245,14	0,2577
CD8_t_NK	158,4	173,9	101,1	184,5	201,5	109,35	0,1746
CD8_sn_NK	229,5	145,5	189,6	256,3	142,9	226,86	0,0524
CD8_t_N	100,9	125,2	52,7	121,9	181,2	57,93	0,618
CD8_sn_N	153,7	115,8	122,5	173,3	125,9	141,08	0,1592
CD8_MC_t	-0,61	0,67	-0,64	-0,56	0,63	-0,56	0,5245
CD8_MC_sn	-0,64	0,48	-0,60	-0,56	0,45	-0,53	0,1917
CD8_IN_t	3,48	4,56	2,14	3,42	3,48	2,19	0,5683

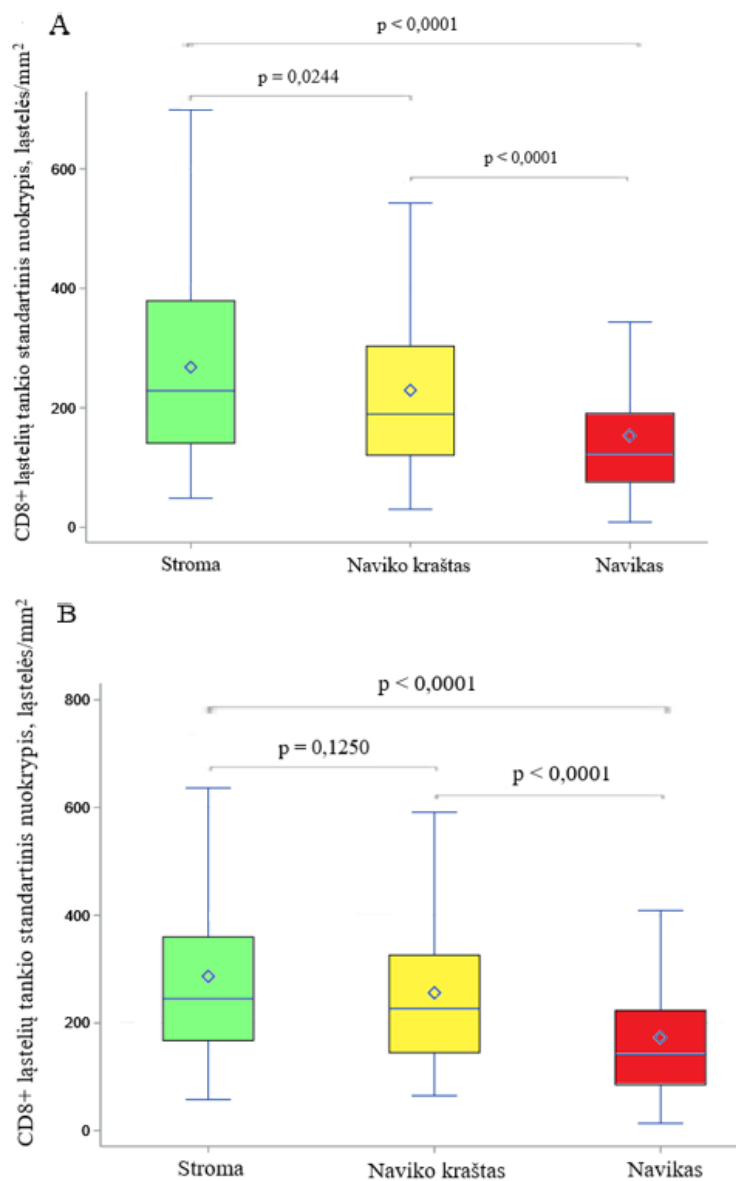
CD8\_S ir CD8\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) atitinkamai stromos ir naviko audinių srityse; CD8\_t ir CD8\_sn – CD8+ ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; MC\_t ir MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis; SN – standartinis nuokrypis.



Tarp vidutinio CD8+ ląstelių tankio viso pūvio naviko ir stromos srityse statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta nei *HER2* neamplifikuotuose, nei amplifikuotuose navikuose ( $p > 0,05$ ). Tačiau vidutinis CD8+ ląstelių tankis sąveikos zonos stromos srityje buvo reikšmingai didesnis nei naviko srityje ir *HER2* neamplifikuotuose, ir amplifikuotuose navikuose ( $p < 0,001$ ) (3.9 pav.). Didžiausia CD8+ ląstelių variacija nustatyta sąveikos zonos stromos srityje, mažesnė naviko krašto ir mažiausia – naviko srityje *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje (3.10 pav.). *HER2* amplifikuotuose navikuose CD8+ ląstelių variacija stromos srityje buvo didesnė nei naviko srityje ( $p < 0,0001$ ), tačiau naviko krašto ir stromos srityse CD8+ ląstelių išsibarstymas buvo panašus ( $p > 0,05$ ). Palyginus CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymą tarp *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupių, reikšmingų skirtumų nė vienoje iš sąveikos zonos sričių nenustatyta.



**3.9 pav.** CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymas sąveikos zonos stromos (žalia spalva) ir navikinėje (raudona spalva) srityse *HER2* neamplifikuotų (A) ir amplifikuotų (B) navikų grupėse.



**3.10 pav.** CD8+ ląstelių tankio variacija sąveikos zonos stromos (žalia spalva), naviko krašto (geltona spalva) ir navikinėje (raudona spalva) srityse *HER2* neamplifikuotų (A) ir amplifikuotų (B) navikų grupėse.

### 3.2.3. IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo ir CD8+ ląstelių tankio rodiklių faktorinė analizė

Faktorine analize įvertinti vidiniai variacijos veiksniai, nusakantys tarpusavio sąsajas (daugybines koreliacijas) šiame kintamųjų rinkinyje ir šių kintamųjų informatyvumą vidinių veiksnių kontekste:

- IHC: ER, PR, Ki67, HER2 (raiška, įvertinta %) ir HER2 membranos vientisumo parametras;
- FISH: *HER2* kopijų skaičius, CEP17 kopijų skaičius, *HER2*/CEP17 santykis, amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2* kopijų skaičių (amp\_%\_HER2) ir *HER2*/CEP17 santykį (amp\_%\_S);
- vidunavikinio heterogeniškumo: visų IHC kintamųjų Haralicko tekstūros (kontrasto, skirtingumo, entropijos, homogeniškumo, energijos) ir bimodališkumo (Ašmano D) parametrai;
- CD8+ limfocitų tankio: vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai sąveikos zonos stromos, naviko krašto, naviko srityse (kiekybiniai rodikliai) ir CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, standartinis nuokrypis ir imunonuokrytis (erdviniai rodikliai).

Taip pat šių kintamųjų tarpusavio ryšiai įvertinti atliekant porinę koreliacijos analizę abiejose *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse.

Nustatyti labai stiprūs ryšiai tarp Haralicko tekstūros rodiklių ( $r > 0,9$  arba  $r < -0,9$ ), galintys iškreipti tyrimo rezultatus ir jų interpretaciją (rezultatai pateikti atitinkamai 7 ir 8 prieduose). Todėl, siekiant išvengti daugialypiškumo (angl. *multicollinearity*) ar išskirtinumo (angl. *singularity*) tolesnėje analizėje vienos dalies atidėjimo kryžminio patikrinimo būdu atrinkta po vieną, prognoziškai stipriausią ER, PR, Ki67, HER2 ir HER2 membranos vientisumo kintamųjų tekstūros heterogeniškumo rodiklį. Atrankoje analizuotų modelių, sudarytų iš IHC, FISH, bimodališkumo, klinikos ir patologijos rodiklių bei vieno konkretaus Haralicko tekstūros rodiklio, rezultatai pateikti 3.6 ir 3.7 lentelėse, atitinkamai tiriamosiose *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse. Geriausi rezultatai gauti esant entropijos parametrai: *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje modelis pasikartojė 149 kartus,  $\chi^2$  siekė 6,75 ( $p = 0,01$ ), o amplifikuotų navikų grupėje modelis pasikartojė 112 kartų,  $\chi^2$  siekė 6,42 ( $p = 0,01$ ); todėl faktorinėse analizėse naudotas IHC žymenų Haralicko tekstūros entropijos rodiklis.

**3.6 lentelė.** Haralicko tekstūros rodiklių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje

Haralicko tekstūros rodikliai	Modelio kintamieji	Modelio pasikartojimai	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
Energija	T grupė HER2 MV Ki67 % HER2 MV_energija	135	4,17	0,04
Homogeniškumas	T grupė HER2 MV Ki67 %	130	6,62	0,01
Entropija	T grupė HER2 MV Ki67 % HER2 MV_entropija	149	6,75	0,01
Kontrastas	T grupė HER2 MV Ki67 % ER_kontrastas	133	6,69	0,01
Skirtingumas	T grupė HER2 MV Ki67 %	130	6,62	0,01

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; T – pirminis naviko dydis.

**3.7 lentelė.** Haralicko tekstūros rodiklių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą *HER2* amplifikuotų navikų grupėje

Haralicko tekstūros rodikliai	Modelio kintamieji	Modelio pasikartojimai	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
Energija	N grupė	108	6,12	0,01
Homogeniškumas	N grupė HER2 MV HER2 MV_homogen.	50	7,17	0,008
Entropija	N grupė HER2 MV_entropija	112	6,42	0,01
Kontrastas	N grupė HER2 MV_kontrast.	110	6,39	0,01
Skirtingumas	N grupė HER2 MV_skirting.	88	4,89	0,03

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; N – išplitimas į sritinius limfmazgius.

Labai stipri koreliacija nustatyta ir tarp CD8+ ląstelių tankio kintamųjų – vidurkių ir standartinių nuokrypių (9 ir 10 priedai, atitinkamai *HER2*

neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėms). Vienos dalies atidėjimo kryžminio patikrinimo būdu palyginti modeliai, sudaryti iš (1) CD8+ ląstelių tankio vidurkių visose sąveikos zonos srityse bei klinikos ir patologijos rodiklių ir iš (2) CD8+ ląstelių tankio standartinių nuokrypių visose sąveikos zonos srityse bei klinikos ir patologijos rodiklių. Pirmesniojo (1) modelio rezultatai (pasikartojo 150 kartų,  $\chi^2 = 6,78$  ( $p = 0,009$ ) neamplifikuotuose navikuose ir 74 kartus,  $\chi^2 = 7,9$  ( $p = 0,005$ ) amplifikuotuose navikuose) buvo šiek tiek geresni nei antrojo (2) (pasikartojo 147 kartus,  $\chi^2 = 4,98$  ( $p = 0,03$ ) neamplifikuotuose navikuose ir pasikartojo 77 kartus,  $\chi^2 = 6,76$  ( $p = 0,01$ ) amplifikuotuose navikuose)). Todėl į faktorinę analizę įtraukti CD8+ ląstelių tankio vidurkių sąveikos zonos stromos ir naviko srityse kintamieji (CD8\_t\_S ir CD8\_t\_N); tačiau CD8+ ląstelių tankio vidurkio sąveikos zonos naviko krašto srityje kintamasis (CD8\_t\_NK) labai stipriai koreliavo net su trimis kintamaisiais, todėl vietoj jo įtrauktas ląstelių tankio standartinio nuokrypio sąveikos zonos naviko krašto srityje kintamasis (CD8\_sn\_NK).

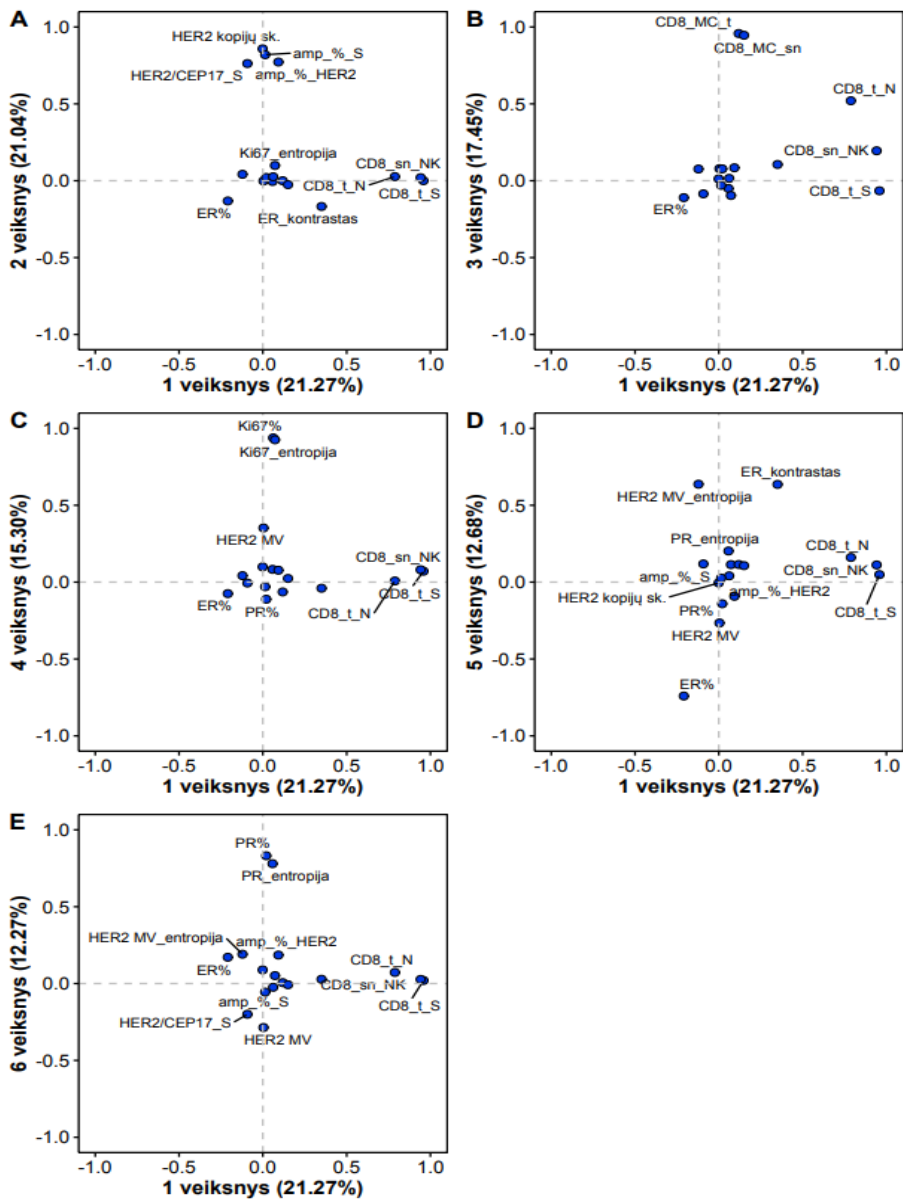
Pašalinus labai stipriai koreliuojančius kintamuosius, sudaryta faktorinės analizės kintamųjų koreliacijų matrica (pateikta 11 ir 12 prieduose, atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėms). Tarpusavio koreliacijos rodo, kad kintamieji yra tinkami faktorinei analizei.

Duomenų tinkamumą faktorinei analizei patvirtino bendrasis visų kintamųjų KMO rodiklis, kuris buvo 0,66 abiejose tirtų navikų grupėse. Jei kintamojo KMO buvo mažesnė nei 0,5, jis į faktorinę analizę neįtrauktas. Būtent dėl šios priežasties į analizę įtraukti ne *HER2* % ir *HER2* entropijos kintamieji, o *HER2* membranos vientisumas ir *HER2* membranos vientisumo entropija; be to, ER entropijos rodiklis buvo pakeistas kontrastu *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje (remiantis Haralicko tekstūros rodiklių atrankos rezultatais 3.6 lentėje). *HER2* amplifikuotų navikų grupėje nė vieno iš *HER2* membranos vientisumo Haralicko tekstūros rodiklių KMO nesiekė 0,5, todėl jie į faktorinę analizę neįtrauki. Abiejose, *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų, grupėse nustatyta po 6 nepriklausomus veiksniai, kurie kartu paaiškino atitinkamai 74 % ir 80 % visos duomenų variacijos. Veiksnių krūviai, po *varimax* pasukimo, pavaizduoti 3.11 ir 3.12 pav., o jų struktūra pateikta 13 ir 14 prieduose, atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupių.

*HER2* neamplifikuotų navikų grupėje 1-ąjį veiksnį apibūdino teigiami CD8+ ląstelių tankio visose sąveikos zonos srityse kintamųjų krūviai; todėl jis buvo pavadintas CD8+ tankio veiksnium. Antrąjį veiksnį apibūdino teigiami *HER2* FISH kintamųjų (*HER2* kopijų skaičius, *HER2*/CEP17 santykis, amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2* kopijų skaičių ir

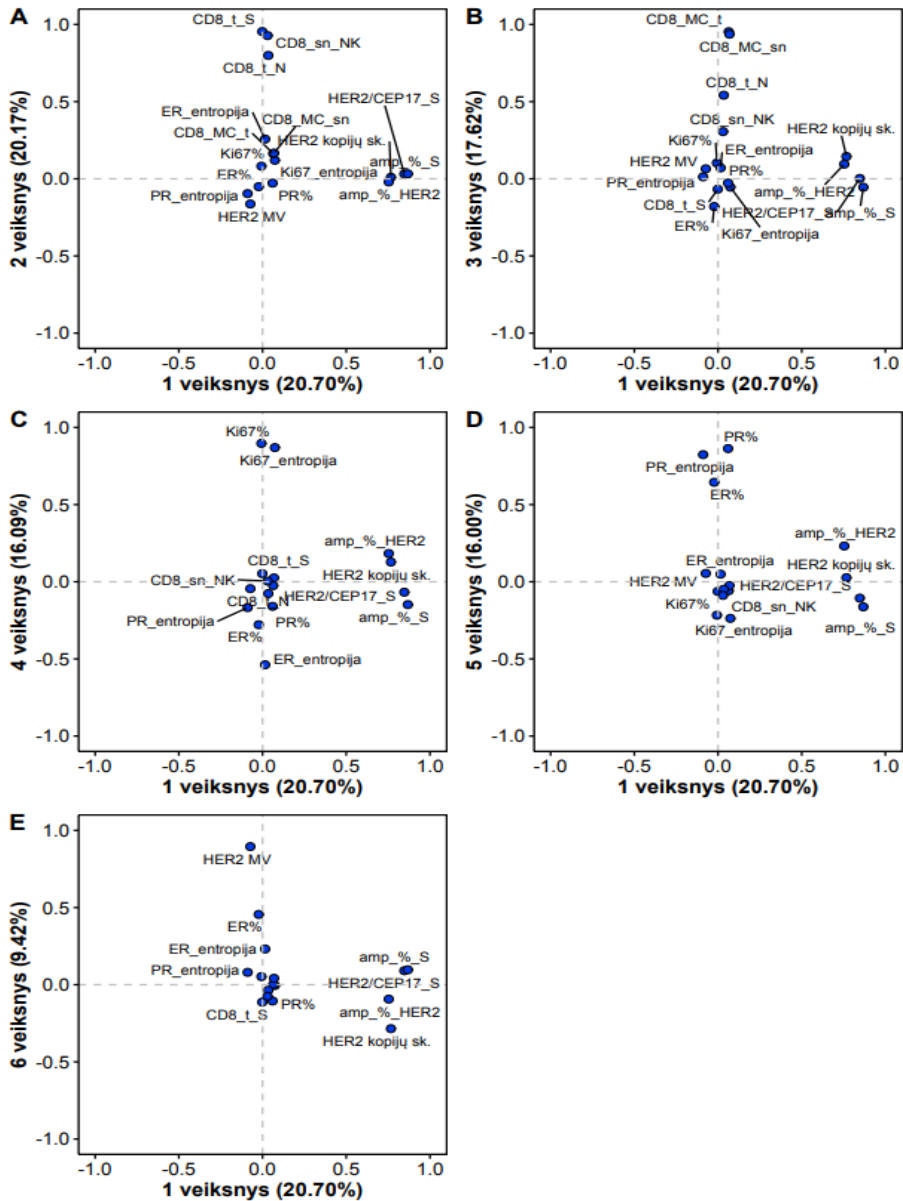
amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2/CEP17* santykį) krūviai; šis veiksnys pavadintas amplifikacijos veiksnium. Trečiąjį veiksnių charakterizavo didėjantis CD8+ ląstelių tankis link sąveikos zonos naviko srities (stiprūs teigiami CD8+ ląstelių tankio MC vidurkio ir standartinio nuokrypio kintamųjų krūviai) ir vidutinis CD8+ tankio sąveikos zonos naviko srityje krūvis; veiksnys pavadintas CD8+ tankio gradiento veiksnium. Ketvirtąjį veiksnių apibūdino stiprūs teigiami Ki67 raiškos bei Ki67 entropijos kintamųjų krūviai. Penktąjį veiksnių charakterizavo teigiami 2-ą Haralicko tekstūros rodiklių – *HER2* membranos vientisumo entropijos ir ER kontrasto krūviai bei neigiamas ER raiškos krūvis; šis veiksnys interpretuotas kaip *HER2&ER* heterogeniškumo veiksnys. Šeštąjį veiksnių apibūdino teigiami PR raiškos bei PR entropijos kintamųjų krūviai.

*HER2* amplifikuotų navikų grupėje 1-asis veiksnys buvo amplifikacijos veiksnys, 2-asis – CD8+ tankio veiksnys, 3-iasis – CD8+ tankio gradiento veiksnys. Ketvirtąjį veiksnių charakterizavo stiprūs teigiami Ki67 raiškos ir Ki67 entropijos kintamųjų krūviai bei vidutinis neigiamas ER raiškos krūvis. Penktąjį veiksnių apibūdino teigiami abiejų hormonų receptorių raiškos bei PR entropijos kintamųjų krūviai. Šeštąjį veiksnių charakterizavo stiprus teigiamas *HER2* membranos vientisumo kintamojo krūvis.



**3.11 pav.** Pasuktų veiksmių krūviai *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje: (A) 1-ojo ir 2-ojo, (B) 1-ojo ir 3-ojo, (C) 1-ojo ir 4-ojo, (D) 1-ojo ir 5-ojo, (E) 1-ojo ir 6-ojo veiksmių krūviai.

*HER2/CEP17\_S* – *HER2/CEP17* santykis; *amp\_%\_S* ir *amp\_%\_HER2* – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijų skaičių; *CD8\_MC\_t* ir *CD8\_MC\_sn* – atitinkamai *CD8+* ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; *CD8\_t\_S*, *CD8\_t\_N* – atitinkamai *CD8+* ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos (S) ir naviko (N) srityse; *CD8\_sn\_NK* – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje; *HER2 MV* – *HER2* membranos vientisumas.



**3.12 pav.** Pasuktų veiksmų krūviai *HER2* amplifikuotų navikų grupėje: (A) 1-ojo ir 2-ojo, (B) 1-ojo ir 3-ojo, (C) 1-ojo ir 4-ojo, (D) 1-ojo ir 5-ojo, (E) 1-ojo ir 6-ojo veiksmų krūviai.

*HER2/CEP17\_S* – *HER2/CEP17* santykis; *amp\_%\_S* – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2/CEP17* santykį; *amp\_%\_HER2* – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant *HER2* kopijų skaičių; *CD8\_MC\_t* ir *CD8\_MC\_sn* – atitinkamai *CD8+* ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; *CD8\_t\_S*, *CD8\_t\_N* – atitinkamai *CD8+* ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos (S) ir naviko (N) srityse; *CD8\_sn\_NK* – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje; *HER2 MV* – *HER2* membranos vientisumas.



### 3.2.4. IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, CD8+ ląstelių tankio, klinikos ir patologijos rodiklių prognozė

Prognozė klinikos ir patologijos, IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, CD8+ ląstelių tankio ir imunogradiento rodiklių potencialas, siekiant prognozuoti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą, iširtas vienaveiksne regresijos analize. Nustatyti statistiškai reikšmingi rodikliai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse pateikti 3.8 lentelėje. *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje nustatyta, kad aukštesnė pirminio naviko išplitimo kategorija (pT3–4), naviko išplitimas į limfmazgius, didesni sąveikos zonos CD8+ ląstelių tankio stromos srityje, CD8+ ląstelių tankio standartinio nuokrypio sąveikos zonos stromos ir naviko krašto srityse, CD8+ ląstelių tankio imunonukryčio rodikliai bei didesni Haralicko tekstūros rodikliai, atspindintys *HER2* procentinės raiškos ir *HER2* membranos vientisumo homogeniškumą (energija, homogeniškumas), buvo statistiškai reikšmingai susiję su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu ( $p < 0,05$ ); didesni *HER2* raiškos lygio, CD8+ ląstelių tankio ir jo standartinio nuokrypio sąveikos zonos naviko srityje, CD8+ ląstelių masės centro ir jo standartinio nuokrypio rodikliai, taip pat didesni Haralicko tekstūros rodikliai, atspindintys *HER2* procentinės raiškos ir *HER2* membranos vientisumo heterogeniškumą (entropija, kontrastas ir skirtingumas), buvo statistiškai reikšmingai susiję su ilgesniu pacienčių išgyvenamumu ( $p < 0,05$ ). *HER2* amplifikuotų navikų grupėje nustatyta reikšminga sąsaja tarp trumpesnio pacienčių išgyvenamumo ir aukštesnės pirminio naviko išplitimo kategorijos (pT3–4), naviko išplitimo į limfmazgius, didesnio CD8+ ląstelių tankio imunonukryčio, *HER2* membranos vientisumo homogeniškumo, Ki67 entropijos ir PR AshD (bimodališkumo) rodiklių ( $p < 0,05$ ) ir tarp ilgesnio pacienčių išgyvenamumo ir didesnio CEP17 kopijų skaičiaus, CD8+ ląstelių tankio sąveikos zonos naviko ir naviko krašto srityse, CD8+ ląstelių tankio standartinio nuokrypio sąveikos zonos naviko srityje, CD8+ ląstelių masės centro, *HER2* entropijos, *HER2* membranos vientisumo kontrasto ir skirtingumo rodiklių ( $p < 0,05$ ).

**3.8 lentelė.** IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, CD8+ ląstelių tankio bei klinikos ir patologijos rodiklių vienaveiksės regresijos analizės taikant logranginį kriterijų pacienčių išgyvenamumui prognozuoti, rezultatai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse.

<b>Rodikliai</b>	<b>RS</b>	<b>95 % PI</b>	<b><i>p</i> reikšmė</b>	<b>Slenkstinė reikšmė</b>
<b>HER2 neamplifikuotų navikų grupė</b>				
pT stadija (pT1–2 prieš pT3–4)	4,41	1,30–14,97	0,0173	–
pN stadija (pN0 prieš pN1–3)	3,2	1,30–7,86	0,0111	–
HER2 %	0,25	0,11–0,62	0,001	16,62
HER2 MV	0,12	0,05–0,32	< 0,0001	23,19
HER2_kontrastas	0,22	0,09–0,52	0,0002	0,65
HER2_skirtingumas	0,21	0,08–0,55	0,0005	0,44
HER2_entropija	0,23	0,10–0,56	0,0004	2,92
HER2_energija	4,28	1,81–10,08	0,0003	0,17
HER2_homogeniškumas	2,95	1,26–6,90	0,009	0,72
HER2 MV_kontrastas	0,37	0,14–0,94	0,029	0,41
HER2 MV_skirtingumas	0,36	0,14–0,92	0,025	0,34
HER2 MV_entropija	0,31	0,13–0,72	0,004	2,31
HER2 MV_energija	3,25	1,36–7,79	0,005	0,32
HER2 MV_homogeniškumas	2,9	1,18–7,13	0,015	0,83
ER_kontrastas	0,21	0,05–0,91	0,021	1,34
CD8_N	0,37	0,16–0,87	0,017	3,25
CD8_MC_t	0,2	0,08–0,49	< 0,0001	–1,46
CD8_MC_sn	0,36	0,15–0,84	0,013	–1,08
CD8_t_S	3,22	0,94–11,05	0,049	6,10
CD8_sn_S	2,65	1,08–6,51	0,027	5,45
CD8_sn_NK	2,81	1,21–6,54	0,012	5,54
CD8_t_N	0,3	0,13–0,71	0,003	2,97
CD8_sn_N	0,35	0,14–0,85	0,016	3,94
CD8_IN_t	3,49	1,51–8,06	0,002	1,49
<b>HER2 amplifikuotų navikų grupė</b>				
pT stadija (pT1–2 prieš pT3–4)	3,49	1,01–12,05	0,049	–

pN stadija (pN0 prieš pN1–3)	3,2	1,31–7,83	0,011	–
CEP17 kopijų skaičius	0,25	0,09–0,68	0,003	1,93
HER2_entropija	0,4	0,16–1,02	0,047	3,98
HER2 MV_kontrastas	0,32	0,12–0,85	0,016	0,44
HER2 MV_skirtingumas	0,35	0,14–0,88	0,019	0,39
HER2 MV_homogeniškumas	2,49	0,99–6,27	0,044	0,81
Ki67_entropija	2,39	0,99–5,77	0,044	3,18
PR_AshD	3,72	1,35–10,26	0,006	3,66
CD8_N	0,38	0,16–0,91	0,024	3,58
CD8_MC_t	0,41	0,17–0,99	0,041	–0,89
CD8_t_NK	0,37	0,15–0,89	0,021	4,22
CD8_t_N	0,34	0,13–0,89	0,021	2,80
CD8_sn_N	0,35	0,14–0,89	0,022	4,35
CD8_IN_t	3,05	1,24–7,48	0,01	1,23

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2; MV – membranos vientisumas; T – pirminis naviko dydis; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; CD8\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) naviko audinio srityje; MC\_t ir MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_t ir CD8\_sn – CD8+ ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis; AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis.

Vienaveiksne regresijos analize nustatytų rodiklių, turinčių reikšmingą įtaką išgyvenamumui, nepriklausoma vertė analizuota daugiaveiksne Kokso regresijos analize. Abiejose pagal HER2 geno būklę atskirtose grupėse sudaryti trijų tipų prognoziniai modeliai iš skirtingų rodiklių rinkinių: 1) modeliai, apimantys klinikinius, patologinius, IHC, FISH ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklius; 2) modeliai, apimantys klinikinius, patologinius ir CD8+ ląstelių tankio bei imunogrado rodiklius; 3) modeliai, apimantys 1-ojo ir 2-ojo modelių rodiklius (3.9 ir 3.10 lentelės atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėms).

*HER2* neamplifikuotoje grupėje 1-ajame modelyje nustatyti trys nepriklausomi geros prognozės rodikliai: didesni HER2 membranos vientisumo, HER2 membranos vientisumo entropijos ir ER kontrasto (atitinkamai  $p = 0,0007$ ;  $p = 0,0341$  ir  $p = 0,0449$ ) rodikliai prognozavo ilgesnį pacienčių išgyvenamumą; aukštesnė pirminio naviko išplitimo kategorija buvo susijusi su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu ( $p \leq 0,0014$ ). 2-ajame

modelyje nustatyti trys nepriklausomi rodikliai: didesnis CD8+ ląstelių tankis sąveikos zonos naviko srityje ir didesnis CD8+ ląstelių tankio masės centras buvo susiję su geresne pacienčių išgyvenamumo prognoze (atitinkamai  $p = 0,0079$  ir  $p = 0,0014$ ), o CD8+ ląstelių tankio variacija sąveikos zonos naviko krašto srityje buvo susijusi su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu ( $p = 0,0002$ ). Visi šie trys rodikliai turėjo nepriklausomą vertę ir 3-iajame modelyje ir gerokai sustiprino jo prognozinę galią (TS: 56,1,  $p < 0,0001$ , palyginti su 1-ojo modelio TS: 27,1,  $p < 0,0001$ ). *HER2* amplifikuotoje grupėje 1-ojo tipo modelyje (4 modelis) nustatyti didesni *HER2* membranos vientisumo kontrasto ir CEP17 kopijų skaičiaus (atitinkamai  $p = 0,0367$  ir  $p = 0,0035$ ) rodikliai buvo ilgesnio pacienčių išgyvenamumo veiksniai, o naviko išplitimas į limfmazgius prognozavo trumpesnę pacienčių išgyvenamumą ( $p = 0,0018$ ). Penktajame modelyje (2-ojo tipo modelis) nustatytas didesnis CD8+ ląstelių tankis sąveikos zonos naviko srityje buvo nepriklausomas ilgesnio pacienčių išgyvenamumo prognozinis rodiklis ( $p = 0,0047$ ), o naviko išplitimas į limfmazgius prognozavo trumpesnę pacienčių išgyvenamumą ( $p = 0,0023$ ). Šeštajame modelyje (3-iojo tipo modelis) taip pat CD8+ ląstelių tankio bei imunogradiento rodiklių prijungimas sustiprino modelio galią (TS: 29,03,  $p < 0,0001$  palyginti su 4-ojo modelio TS: 17,64,  $p < 0,0005$ ).

Visi modeliai patvirtinti vienos dalies atidėjimo kryžminės patikros būdu (15 ir 16 priedai atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėms).

**3.9 lentelė.** Daugiaveiksni prognozių veiksmų, susijusių su pacienčių bendroju išgyvenamumu, regresijos analizė *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje.

Rodiklis	RS	95 % PI	<i>p</i> reikšmė
<b>1 modelis (TS: 27,1, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
pT stadija (pT1–2 prieš pT3–4)	6,04	2,31–33,04	0,0014
HER2 MV	0,18	0,07–0,48	0,0007
HER2 MV_entropija	0,37	0,15–0,93	0,0341
ER_kontrastas	0,21	0,05–0,97	0,0449
<b>2 modelis (TS: 28,26, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
CD8_MC_t	0,14	0,04–0,47	0,0014
CD8_t_N	0,23	0,08–0,68	0,0079
CD8_sn_NK	9,45	2,9–30,78	0,0002
<b>3 modelis (TS: 56,05, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			

pT stadija (pT1–2 prieš pT3-4)	13,65	3,05–61,03	0,0006
HER2 MV	0,17	0,05–0,66	0,0102
HER2 MV_entropija	0,33	0,13–0,88	0,0263
ER_kontrastas	0,16	0,03–0,80	0,0258
CD8_MC_t	0,223	0,08–0,64	0,0053
CD8_t_N	0,147	0,05–0,47	0,0013
CD8_sn_NK	7,82	2,63–23,28	0,0002

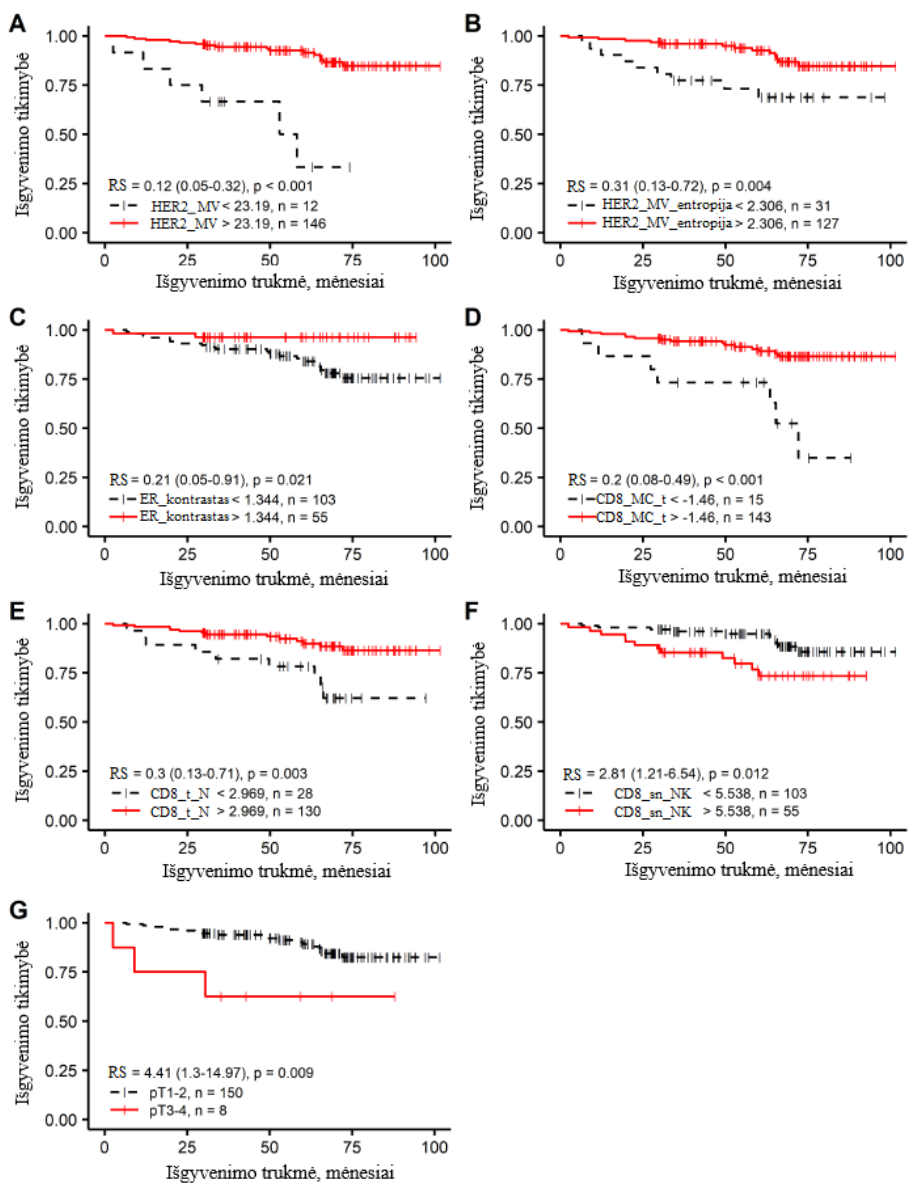
HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; T – pirminis naviko dydis; CD8\_MC\_t – CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje; CD8\_sn\_NK – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto srityje.

**3.10 lentelė.** Daugiaveiksnių prognozinių veiksnių, susijusių su pacienčių bendroju išgyvenamumu, regresijos analizė *HER2* amplifikuotų navikų grupėje.

Rodiklis	RS	95 % PI	<i>p</i> reikšmė
<b>4 modelis (TS: 17,64, <i>p</i> = 0,0005)</b>			
pN stadija (pN0 prieš pN1–3)	4,75	1,77–12,62	0,0018
HER2 MV_kontrastas	0,35	0,13–0,94	0,0367
CEP17 kopijų skaičius	0,191	0,06–0,58	0,0035
<b>5 modelis (TS: 12,52, <i>p</i> = 0,0019)</b>			
pN stadija (pN0 prieš pN1–3)	4,55	1,72–12,06	0,0023
CD8_t_N	0,22	0,08–0,63	0,0047
<b>6 modelis (TS: 29,03, <i>p</i> &lt; 0,0001)</b>			
pN stadija (pN0 prieš pN1–3)	7,985	2,7–23,63	0,0002
HER2 MV_kontrastas	0,243	0,09–0,69	0,0077
CEP17 kopijų skaičius	0,135	0,04–0,44	0,0008
CD8_t_N	0,117	0,04–0,37	0,0002

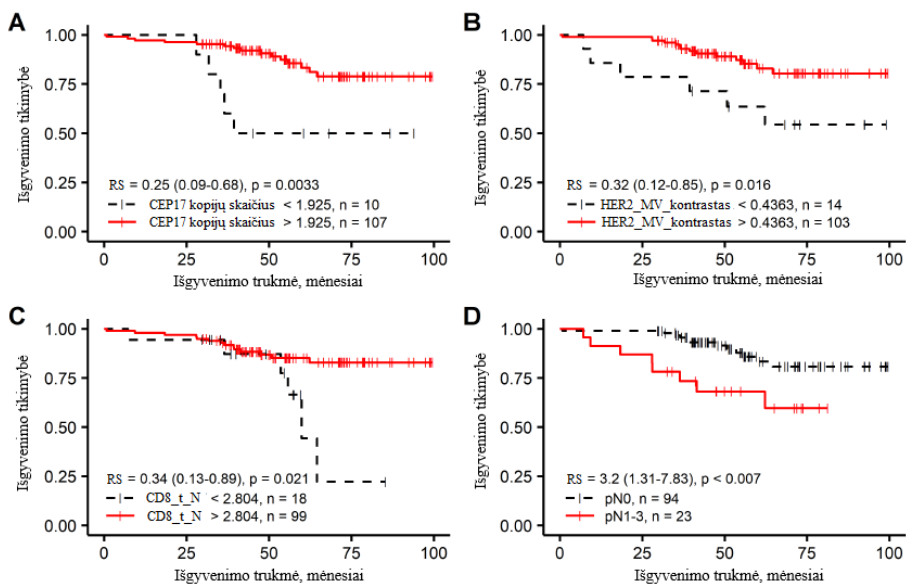
HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje.

Nustatytų reikšmingų nepriklausomų rodiklių Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės pateiktos 3.13 ir 3.14 pav. atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėms.



**3.13 pav.** Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, vaizduojančios bendrojo išgyvenamumo ir nepriklausomų prognozinių rodiklių sąsajas pacienčių, kurioms nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, grupėje.

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; *MV* – membranos vientisumas; *ER* – estrogenų receptoriai; *CD8\_MC\_t* – *CD8+* ląstelių tankio masės centro vidurkis; *CD8\_t\_N* – *CD8+* ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje; *CD8\_sn\_NK* – *CD8+* ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto srityje; *T* – pirminis naviko dydis.

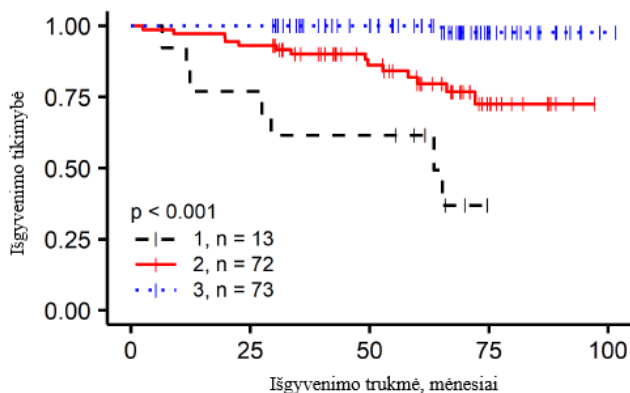


**3.14 pav.** Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, vaizduojančios bendrojo išgyvenamumo ir nepriklausomų prognozinių rodiklių sąsajas pacienčių, kurioms nustatyta *HER2* geno amplifikacija, grupėje.

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2; *CEP17* – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; *MV* – membranos vientisumas; *CD8\_t\_N* – *CD8+* ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos naviko srityje; *N* – išplitimas į sritinius limfmazgius.

### 3.2.5. Sudėtinis nepriklausomų *SZ*-os *CD8+* tankio rodiklių prognozinių įvertis pacienčių, kurioms nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, grupėje

Siekiant papildomai įvertinti prognozinę nepriklausomų *CD8+* limfocitų erdvinio pasiskirstymo rodiklių, nustatytų daugiaveiksnių Kokso regresijos analizės būdu *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje, galią, apskaičiuotas sudėtinis sąveikos zonos *CD8+* tankio rodiklių prognozinių įvertis. Tuo tikslu susumuoti rodiklių, pagal mažas / dideles vertes priskirtų atitinkamai kategorijai, balai: didelių *CD8\_MC\_t* ir *CD8\_t\_N* rodiklių verčių kategorijoms suteiktas 1 balas, mažų – 0 balų; didelei *CD8\_sn\_NK* rodiklio vertei suteikta 0 balų, mažai – 1 balas. Šis prognozinių įvertis leidžia patikimai stratifikuoti pacientus į tris prognozinės grupes, kurių penkerių metų bendrojo išgyvenamumo tikimybės buvo 98 %, 80 % ir 49 %, kai rodiklių balų įverčiai yra atitinkamai 3, 2 ir 1 (3.15 pav.). Pacienčių, kurių visiems trimis rodikliais būtų suteikta 0 balų, nebuvo.



**3.15 pav.** Prognoziinių grupių, gautų apskaičiuavus sudėtinę sąveikos zonos CD8+ tankio rodiklių prognozinę įvertį pacienčių, kurioms nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, grupėje, bendrojo išgyvenamumo Kaplano ir Mejerio kreivė.

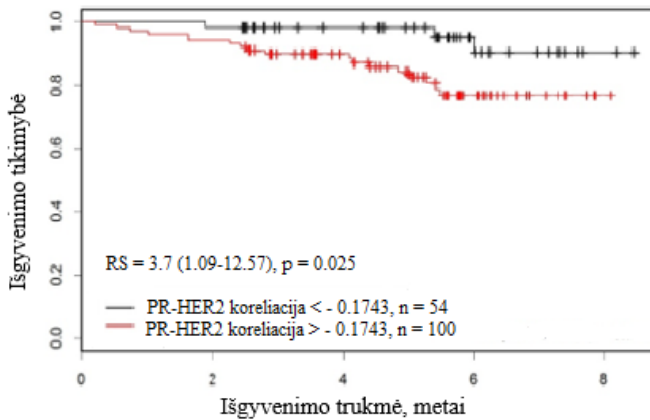
### 3.2.6. PR ir HER2 biožymenų raiškos sąsajų tyrimai

PR ir HER2 biožymenų raiškos sąsajos analizuotos 154 *HER2* neamplifikuotuose ir 94 amplifikuotuose atvejuose (visų imčių nebuvo galimybės ištirti dėl tiriamosios medžiagos trūkumo). Tuo tikslu atliktas dvigubas šių IHC žymenų dažymas ir jų skaitmeninė vaizdo analizė pasitelkus šešiakampių gardelių analitiką.

Nustatyta, kad abiejų baltymų koekspresija ląstelėse yra labai reta: dvigubai teigiamų ląstelių mediana buvo 0,11 % ir 0,35 %, o maksimali – 5,88 % ir 4,31 % atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse.

Tačiau, nepaisant nepriklausomos PR ir HER2 raiškos ląstelėje, buvo iškelta hipotezė apie galimą regioninę abiejų žymenų sąveiką, kuri galėtų paaiškinti prognoziiniuose modeliuose nustatytus heterogeniškumo matmenis. Atlikus porinę koreliacijos analizę tarp PR ir HER2 baltymus ekspresuojančių ląstelių kiekviename šešiakampyje, *HER2* neamplifikuotoje imtyje gauta statistiškai reikšminga pacienčių stratifikacija į prognozinės grupes; neigiamas regioninis PR ir HER2 ryšys buvo susijęs su geresne pacienčių bendrojo išgyvenamumo prognoze (3.16 pav.).

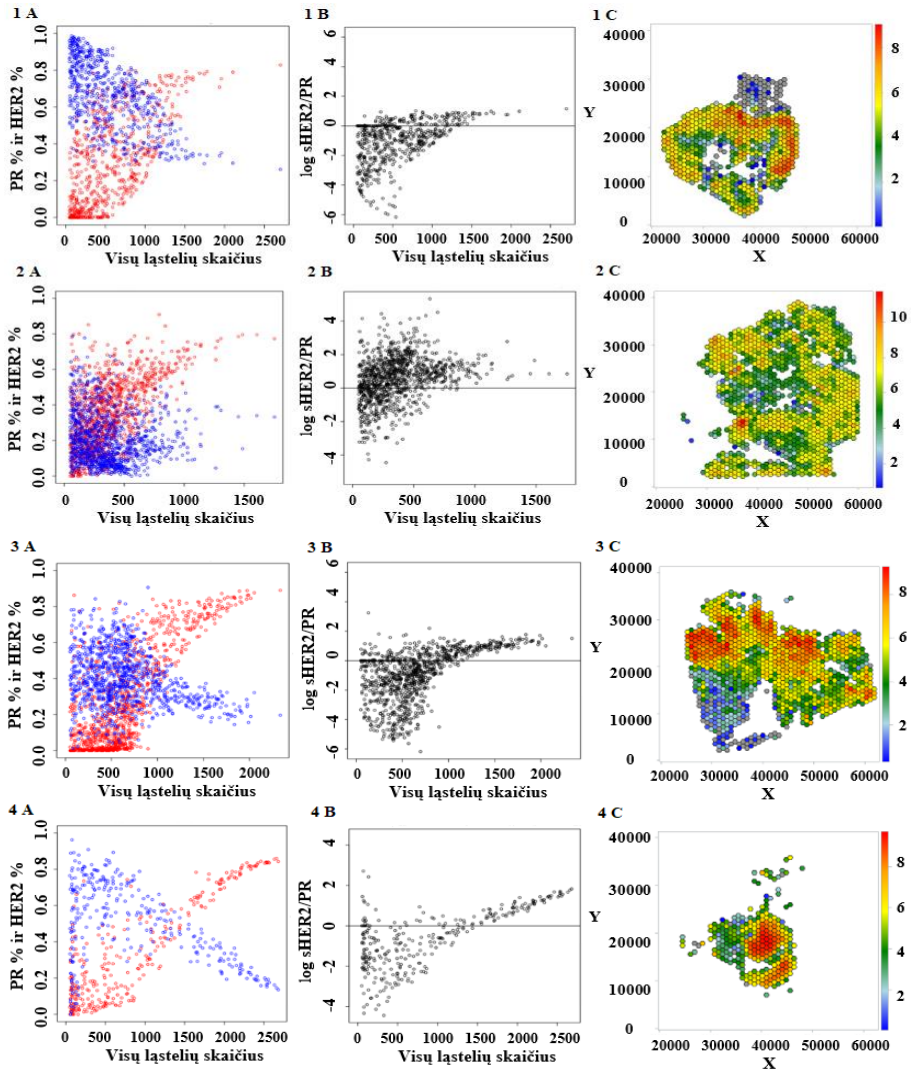




**3.16 pav.** Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivė, vaizduojanti regioninio PR ir HER2 ryšio sąsają su bendroju išgyvenamumu pacienčių, kurioms nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, grupėje.

Siekiant išaiškinti abiejų biožymenų tarpusavio priklausomybes, nubraižyti išsibarstymo grafikai tarp PR ir HER2 baltymus ekspresuojančių ląstelių (%) ir viso ląstelių skaičiaus kiekviename šešiakampyje. Rasta įvairių abiejų žymenų pasiskirstymo formų. Pateiktuose pavyzdžiuose matyti, kad, didėjant navikinių ląstelių skaičiui šešiakampiuose, vyksta pasikeitimas tarp PR ir HER2 teigiamų ląstelių proporcijų (3.17 1–4 A, 1–4 B pav.). Kitaip tariant, lokalus PR raiškos sumažėjimas, HER2 ekspresuojančių ląstelių padidėjimas ir kartu vykstantis lokalus naviko ląstelių sutankėjimas (ląstelingumo padidėjimas) gali reprezentuoti lokalių ląstelių profilio transformacijų procesą naviko mikroaplinkoje. 17 priede pateikti kiti PR ir HER2 regioninių sąveikų formų pavyzdžiai. Taip pat, apskaičiavę HER2 ekspresuojančių ląstelių (%) ir PR ekspresuojančių ląstelių (%) santykio logaritmą ( $\log sHER2/PR$ ) ir padauginę jį iš viso ląstelių skaičiaus, galėjome nubraižyti regioninės abiejų žymenų ekspresijos žemėlapius (3.17, 1–4 C pav.), kuriuose parodėme PR ir HER2 sąveikų variaciją ir „karštus taškus“.

Šis „regioninis iš PR į HER2 ir būdingu padidėjusiu ląstelingumu“ transformacijos reiškinys, kuris yra įvairaus masto ir pasiskirstymo navikuose, nustatytas 10 ir 12 atvejų atitinkamai *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupėse (3.17 1–4 A, 1–4 B pav.). Daugumoje šių atvejų buvo nustatytas padidėjęs CEP17 kopijų skaičius (5 ir 9 *HER2* atitinkamai neamplifikuotuose ir amplifikuotuose navikuose). Be to, 6 iš šių atvejų buvo įvertinti kaip *HER2* FISH paribiniai pagal 2013 m. ASCO/CAP gaires (22), o 4 iš jų dar buvo ir genetiškai heterogeniški (25).



**3.17 pav.** Keturių atvejų, kai nustatytas transformacijos iš PR vyraujančios raiškos į HER2 dominuojančią, reiškinys, išsibarstymo grafikai ir žemėlapiai *HER2* neamplifikuotuose (1 A–C, 2 A–C) ir amplifikuotuose (3 A–C, 4 A–C) navikuose. (1–4 A) išsibarstymo grafikai, kuriuose Y ašyje atidėti PR % (mėlyni burbuliukai) ir HER2 % (raudoni burbuliukai), o X ašyje – visų ląstelių skaičius. Norint parodyti abiejų baltymų ekspresiją tame pačiame šešiakampyje, tas pats burbuliukas pavaizduotas du kartus. (1–4 B) išsibarstymo grafikai, kuriuose Y ašyje atidėtas log sHER2/PR, o X ašyje – visų ląstelių skaičius. (1–4 C) žemėlapiai, vaizduojantys erdvinį PR ir HER2 raiškos heterogeniškumą navikuose. Spalvų juosta koduoja log sHER2/PR lygį: mėlyna spalva apačioje rodo mažiausią reikšmę, o raudona spalva viršuje rodo didžiausią reikšmę. Pilka spalva pažymėti šešiakampiai, kuriuose biožymenų raiškos nėra.

## 4. REZULTATŲ APITARIMAS

### 4.1. Skaitmeninė *HER2* FISH vaizdo analizė

Disertaciniame darbe iširta galimybė automatizuotai vertinti *HER2* geno būklę krūties vėžio audinyje taikant FISH skaitmeninę vaizdo analizę (*StrataQuest v.205* programa (*TissueGnostics*, Austrija)). Išanalizavus 50 IHC paribinių krūties karcinomos atvejų, nustatyta, kad automatiniu *HER2* FISH vaizdų analizės būdu nustatomi vidutiniškai mažesni *HER2* ir CEP17 taškų skaičius bei *HER2*/CEP17 santykis nei vertinant mikroskopu (žr. 3.1.1 skyrių), todėl skaitmeninė vaizdo analizė negali būti naudojama kaip klinikinį sprendimą padedanti priimti priemonė vertinant *HER2* geno raišką. Nuokrypį labiausiai sąlygojo analizuojamų ląstelių atrankos skirtumai minėtais tyrimo būdais: mikroskopu įvertinamas ribotas ląstelių skaičius atkreipiant dėmesį į „įtartinesnius“ (galbūt amplifikuotus) branduolius su gausesniais *HER2* signalais, o skaitmenine analize įvertinami visi algoritmo aptikti branduoliai.

Tačiau skaitmeninės vaizdo analizės suteikiami didelio pajėgumo ir neselektyvaus navikinių ląstelių tyrimo pranašumai buvo panaudoti kuriant objektyvius kiekybinius vidunavikinio *HER2* heterogeniškumo rodiklius. Be to, darbe parodyta, kad AD atskleidė tolydų amplifikuotų ląstelių dalies pasiskirstymą, o to negalima nustatyti vertinant mikroskopu. AD taip pat leido gauti vidunavikinio heterogeniškumo charakteristikas, pagrįstas ne amplifikuotų ląstelių dalimi, o bimodališkumo rodikliais. Galiausiai, automatinis tyrimo metodas leido išskirti tiesiškai nepriklausomus amplifikacijos, padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus ir bimodališkumo įverčius, o paskui ir stratifikuoti navikus į vienmodalinius ir bimodalinius; pastaroji kategorija tik iš dalies sutapo su genetiškai heterogeniškais atvejais, apibrėžtais pagal ASCO/CAP gairėse nurodytą apibrėžimą (25).

Klinikinis *HER2* FISH neamplifikuotų ir amplifikuotų atvejų tyrimas yra gana nesudėtingas, tačiau nemažų sunkumų kelia paribinių atvejų vertinimas tiek tradiciniu mikroskopavimo, tiek skaitmeninės vaizdo analizės metodais (226, 227, 390). Patikimų, įrodymais pagrįstų analizės metodų poreikį rodo tai, kad dabartiniai terapiniai sprendimai priimami remiantis riboto ląstelių skaičiaus analize, kuri turi atspindėti egzistuojančią ląstelių įvairovę *HER2* kopijų skaičiaus atžvilgiu, ir kiek dirbtiniais apibrėžimais ir slenkstinėmis reikšmėmis. Viename iš naujesnių tyrimų nustačius, kad dabartinis ASCO/CAP reikalavimas iširti tik 40 navikinių ląstelių yra arti klaidingo įvertinimo ribos (ypač esant paribiniams ir heterogeniškiems atvejams), siūloma didinti analizuojamų ląstelių skaičių, kartu į pagalbą pasitelkiant ir skaitmeninę vaizdo analizę (275). Vietoj vizualaus riboto ląstelių skaičiaus

vertinimo didelio pajėgumo vaizdo analizės taikymas gali suteikti papildomą vertę įveikiant įprasto *HER2* tyrimo apribojimus, ypač tobulinant genetinio heterogeniškumo sąvoką ir atskleidžiant CEP17 variabilumo įtaką teisingai testo rezultatų interpretacijai.

Darbe pademonstruota, kad matematiniai bimodališkumo rodikliai, apskaičiuoti iš AD, yra tiesiškai nepriklausomi nuo *HER2* amplifikacijos ar padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus (ar *HER2*/CEP17 santykio). Todėl jie gali būti naudojami kaip objektyvūs ir kiekybiniai vidunavikinio heterogeniškumo matavimo įrankiai, pagrįsti tikra vidunavikine variacija. Toks vidunavikinio heterogeniškumo matavimo būdas yra pranašesnis už genetinio heterogeniškumo koncepciją, kuri remiasi tik amplifikuotų ląstelių dalimi ir, kaip pademonstruota Chang ir bendraautorių (23), yra priklausoma nuo bendro amplifikacijos lygio. Ši sąsaja buvo pastebėta ir mūsų tyrime (3.2 (c) pav.). Bimodališkumo rodikliai atspindi tirtos ląstelių populiacijos pasiskirstymo struktūrą, todėl, kitaip nei ASCO/CAP gairėse apibrėžta genetinio heterogeniškumo samprata (22, 25), perteikia informaciją apie skirtingas navikų heterogeniškumo charakteristikas. Pabrėžtina, kad mūsų tyrime nustatytas tik dalinis genetiškai heterogeniškų ir bimodalinių ( $AshD > 2$ ) atvejų sutapimas. Be to, atlikus eksperimentą, kuriame buvo modeliuojami atsitiktiniai skirtingi imties dydžiai, nustatyta, kad, norint patikimai aptikti *HER2* amplifikacijos bimodališkumo požymį krūties vėžiniame audinyje, reikia mažiausiai 800 ląstelių. Nors, siekiant nustatyti optimalų reikalingą ląstelių ėminių kiekį, reiktų šį eksperimentą atlikti sukaupus didesnius duomenų rinkinius, akivaizdu, kad mikroskopinio vertinimo pajėgumas šiam reiškiniui atskleisti yra per mažas.

Dar viena automatinės vaizdo analizės didelio pajėgumo teikiama potenciali *HER2* FISH tyrimo nauda yra susijusi su galimybe neselektyviai ištirti navikinių ląstelių pasiskirstymą ir aptikti retai išsibarsčiusias amplifikuotas ląsteles didelėse ląstelių populiacijose. Mūsų tyrime automatinio būdu ir mikroskopu įvertintų duomenų palyginimas atsižvelgiant į ASCO/CAP genetinio heterogeniškumo apibrėžimą (25) atskleidė specifinius amplifikuotų ląstelių pasiskirstymų skirtumus (3.2 (a), (c), (e) pav.). Visi mikroskopu nustatyti genetiškai heterogeniški atvejai ( $n = 8$ ) turėjo mažiausiai 28 % amplifikuotų ląstelių, tačiau žemesniame intervale (nuo 5 iki 28 %) tokių atvejų nenustatyta. Būtent žemesniame diapazone automatinio būdu iš 36 galbūt genetiškai heterogeniškų nustatytų atvejų net 24 turėjo amplifikuotų ląstelių intervale nuo 5 % iki 21 %.

Šis neatitikimas gali būti susijęs su tuo, kad amplifikuotos ląstelės yra išsibarsčiusios po audinį ir jų galima nepastebėti dėl didelio mikroskopuojamo

audinio ploto. Patikrinus šią hipotezę, nustatyta, kad vidutinis atstumas tarp amplifikuotų branduolių buvo reikšmingai didesnis atvejais, kuriais heterogeniškumas mikroskopu nebuvo aptiktas (3.3 pav.). Diapazonas, kuriame nustatytas amplifikuotų ląstelių procentinės dalies vertinant mikroskopu trūkumas, atitinka kitų tyrėjų pranešimuose iškeltas abejones dėl gairėse apibrėžtų genetinio heterogeniškumo slenkstinių verčių: klausimas dėl apatinės slenkstinės genetinio heterogeniškumo ribos (5 %) tinkamumo kyla dėl galinčios būti klaidingos atvejų klasifikacijos kaip genetiškai heterogeniškų, kai juose randama tik 1 iš 20 lastelių, kurių *HER2/CEP17* santykis  $> 2,2$  (27, 28, 274). Layfield ir Schmidt parodė, kad ląstelės, kuriose nustatytas 3:1 *HER2/CEP17* santykis, buvo lemiantis genetinio heterogeniškumo veiksnys 46 % heterogeniškų atvejų, kai net 35 % genetiškai heterogeniškų atvejų buvo nustatyti dėl vienos ląstelės su 3:1 *HER2/CEP17* santykiu (28). Tačiau 2,2 santykis gali būti dėl CEP17 signalų nupjovimo (pvz., *HER2/CEP17* santykis 3:1 ir 4:1) (253) ar minimaliai pagausėjusių *HER2* signalų (*HER2/CEP17* santykis 5:2). Šių signalų kombinacijų klinikinė svarba nėra aiški. Kita vertus, Bartlett su bendraautoriais pranešė, kad tik tie atvejai, kuriais nustatyta  $> 30$  % amplifikuotų ląstelių (*HER2/CEP17* santykis  $> 2,2$ ), buvo siejami su trumpesniu išgyvenamumu be ligos (27). Allison su bendraautoriais parodė, kad skirtingoms kategorijoms priklausančiais atvejais heterogeniškumas buvo nustatytas skirtinguose intervaluose – neigiamuose nuo 5 % iki 15 %, paribiniuose – 25–35 % intervale (274). Autoriai iškėlė prielaidą, kad rekomenduojamos genetinio heterogeniškumo slenkstinės vertės gali būti per mažos. Ir nors nuo 2013 m. *HER2* genetinio heterogeniškumo apibrėžimas yra pagrįstas ląstelių populiacijų procentinių dalių nustatymu tiriamajame mėginyje (22), ir jis nesuteikia informacijos apie tikrąją *HER2* raiškos variaciją.

Šiame tyrime nesiekėme kalibruoti skaitmeninės vaizdo analizės įrankio, kuriuo naudojantis būtų skaičiuojami FISH signalai ribotame ląstelių skaičiuje pagal ASCO/CAP gaires. Ankstesnėse studijose, kuriose taikyta *HER2* FISH vaizdo analizė *HER2* būklės įvertinimui, netyrinėti didesnio ląstelių kiekio teikiami pranašumai ir įprastai analizuota nuo 40 iki 60 branduolių (224, 227) ar „mažiausiai 60 tinkamų branduolių“ (390), arba „vidutiniškai 113 ląstelių atvejyje (mediana lygi 93, nuo 47 iki 254)“ (226). Mūsų tyrimas parodė, kad automatinė vaizdo analizė gali būti naudojama ne vien tik kaip pagalbinė priemonė vizualiam vertinimui pagal dabartines klinikines gaires, bet ir suteikti pridėtinę vertę, nes ją pasitelkus gaunama naujos kokybės informacija apie vidunavikinį heterogeniškumą. Bimodališkumo rodikliai yra matematiškai pagrįsti duomenimis ir, nustačius jų klinikinę / predikcinę vertę,

gali būti įrodyta, kad jie yra biologiškai svarbesni vidunavikinio heterogeniškumo požymiai, į kuriuos reikia atsižvelgti apibrėžiant genetinio heterogeniškumo reiškinių.

#### 4.2. Išsami krūties vėžio imunohistocheminių (ER, PR, HER2, Ki67) ir CD8 žymenų skaitmeninė vaizdo analizė

Disertacijoje pristatyti prognoziniai modeliai, pagrįsti ER, PR, HER2 ir Ki67 biožymenų raiškos bei CD8+ ląstelių tankio rodikliais, apskaičiuotais remiantis navikinio audinio skaitmeninės vaizdo analizės duomenimis, leidžia prognozuoti pacienčių, sergančių krūties vėžio, kai nustatyta paribinė HER2 baltymo raiška, bendrąjį išgyvenamumą. Šie standartiniai IHC biožymenys, pasitelkus skaitmeninės vaizdo analizės rezultatų matematinę aprodoriją, buvo praturtinti apskaičiuotais rodikliais, kiekybiškai įvertinančiais erdvinis vidunavikinio heterogeniškumo ir naviko mikroaplinkos aspektus. Darbe atskleista CD8+ limfocitų pasiskirstymo krūties vėžio mikroaplinkoje rodiklių prognozinė vertė – jie labai sustiprino modelius abiejose, *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų, navikų grupėse. Be to, šie rodikliai buvo stipresni prognoziniai veiksniai nei patologijos rodikliai ir leido nepriklausomai stratifikuoti pacientės, kurioms nenustatyta *HER2* geno amplifikacija, į prognozes grupes.

Atkreiptinas dėmesys, kad mūsų tyrimas yra retrospektyvus, neapimantis standartizuotos informacijos apie pacientėms taikytas gydymo schemas bei gydymo efektus, kurie galėjo paveikti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą. Todėl mūsų pateiktiems prognoziniams modeliams galėjo turėti įtakos skirtingos gydymo schemas, ypač *HER2* amplifikuoto vėžio grupėje, taikant atitinkamą taikinių terapiją. Antra vertus, pacientės buvo gydomos vienoje įstaigoje, taikant standartinius klinikinius algoritmus.

Nustatydami darbe aprašytus rodiklius kartu parodėme skaitmeninės vaizdo analizės technologijos taikymo, matuojant IHC žymenų raišką, galimybes. Didžiulis automatizuotos analizės pajėgumas yra vienas iš esminių jos pranašumų, palyginti su vizualiu IHC tyrimo vertinimu. Gausios informacijos, slypinčios dideliuose tiriamųjų mėginių plotuose, atskleisti tyrėjui tradiciniu mikroskopavimo būdu atrankiai įvertinant ribotą ląstelių skaičių neįmanoma. Vis dėlto, nepaisant ir kitų skaitmeninės vaizdo analizės teikiamų pranašumų, tokių kaip kiekybinis biožymenų raiškos matavimas, tikslūs, objektyvūs ir atsikartojantys rezultatai (205, 391, 392), kasdienėje patologijos praktikoje tebėra taikomas vizualus IHC reakcijų vertinimas. Skaitmeninės vaizdo analizės diegimas į rutininę diagnostiką yra nelengvas daugiaetapis procesas, kurio sudėtingumą atspindi visai neseniai išleistos CAP

gairės, skirtos kiekybinio HER2 vertinimo vaizdo analize įdiegimui laboratorijose (393). Biologinių žymenų vertinimas audiniuose kiekybiniais parametrais atskleidžia vertingą informaciją apie ląstelių populiacijų įvairovę ir jų erdvines sąsajas naviko mikroaplinkoje. ER, PR, HER2 ir Ki67 biožymenų heterogeniškumo analizei taikėme šešiakampių gardelių metodiką, pagrįstą skaitmeninės vaizdo analizės rezultatų padalijimu į lygias šešiakampes gardeles. Šis įrankis leido apskaičiuoti naviko tekstūros parametrus, kurie atskleidžia erdvinius biožymenų pasiskirstymo navikiniame audinyje ypatumus. Netolygios žymenų raiškos nustatymas yra itin svarbus individualizuotoje terapijoje, kuris leidžia numatyti nepakankamą atsaką į gydymą, nulemiantį tolesnį ligos progresavimą.

Skaitmeninės vaizdo analizės technologijų pranašumai ir tikslios HER2 diagnostikos svarba lėmė šio žymens tyrimų gausą taikant įvairią skaitmeninės vaizdo analizės įrangą ir algoritmus. Dauguma atliktų tyrimų parodė, kad skaitmeninė vaizdo analizė gali patikimai įvertinti atvejus, kuriuose HER2 raiška nepadidėjusi (0–1+) arba padidėjusi (3+) ir sumažinti atvejų, kai yra paribinė baltymo raiška (2+), skaičių (204, 207, 208). Darbų, kuriuose žymenų raiškos heterogeniškumo matavimai krūties navikuose atliekami taikant skaitmeninę vaizdo analizę, nėra daug. Viename jų HER2 raiškos heterogeniškumas matuotas ekologijos moksle dažnai naudojamu biologinės įvairovės matu – *Rao* kvadratine entropija (209). Tyrėjai įvertino HER2 ekspresijos variaciją dviem – ląsteliniu (variacija tarp gretimų ląstelių) ir naviko (variacija tarp sričių navike) lygiais, patologo pažymėtose srityse, tačiau konstatavo, kad tirtų sričių skaičius gali būti nepakankamas nustatant naviko lygio heterogeniškumą. Naujesniuose tyrimuose IHC biožymenų heterogeniškumas įvertintas viso pjūvio vaizduose taikant šešiakampių gardelių metodiką (283-285). Šiuo būdu nustatyti prognoziškai informatyvūs erdvinio biožymenų heterogeniškumo navikiniame audinyje rodikliai.

Disertacijoje siekėme įvertinti analizuotų daugybinių IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo, CD8+ ląstelių tankio bei klinikos ir patologijos rodiklių prognozinę reikšmę krūties navikuose, kuriuose nustatyta paribinė HER2 baltymo raiška. *HER2* neamplifikuotoje grupėje nustatyta, kad iš visų tirtų IHC kintamųjų tik du – HER2 % ir HER2 membranos vientisumo rodikliai – buvo reikšmingai susiję su pacienčių bendruoju išgyvenamumu (atitinkamai  $RS = 0,25$ ,  $p = 0,001$  ir  $RS = 0,12$ ,  $p < 0,0001$ , 3.8 lentelė). Iš jų HER2 membranos vientisumo rodiklis pasižymėjo stipresne prognozinė reikšme ir kartu su dviem vidunavikinio heterogeniškumo rodikliais – HER2 membranos vientisumo entropija ir ER kontrastu – daugiaveiksniuose Kokso regresijos modeliuose nustatyti kaip nepriklausomi geros prognozės veiksniai,

susiję su ilgesniu pacienčių bendroju išgyvenamumu. Pirminio naviko išplitimo kategorijos rodiklis šiuose modeliuose buvo nepriklausomas blogos prognozės veiksnys, susijęs su trumpesniu pacienčių bendroju išgyvenamumu (3.9 lentelė, 1 ir 3 modeliai). Neseniai atliktoje studijoje, tyrusioje HR<sup>+</sup> krūties navikus, didesnė HER2 raiška (%) taip pat buvo susijusi su geresne pacienčių prognoze vienaveiksnėje regresijos analizėje (285). Kitoje studijoje, tyrusioje ER teigiamus, HER2 neamplifikuotus navikus, palankesnė pacienčių išgyvenamumo be atkryčio prognozė nustatyta navikuose, kuriuose didesnis HER2 RNR kiekis (394).

HER2 baltymo raiška vyksta ląstelės membranoje, todėl HER2 membranos vientisumo rodiklis atspindi HER2 raiškos laipsnį. Taigi ir HER2 membranos vientisumo entropija, būdama erdvinio heterogeniškumo rodiklis, atskleidžia informaciją apie HER2 baltymo raiškos vidunavikinį heterogeniškumą. Nustatytas netiesinis ryšys tarp HER2 membranos vientisumo ir jo entropijos rodiklių: didelis vidunavikinis heterogeniškumas buvo būdingas viduriniam HER2 membranos vientisumo diapazonui, o mažesnis – esant mažoms ir ypač didelėms HER2 membranos vientisumo reikšmėms (18 priedas). Analogiškos sąsajos tarp PR ir Ki67 žymenų raiškos ir jų vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių jau buvo nustatytos ankstesniuose tyrimuose (283-285); juose parodyta, kad IHC žymenų vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai buvo prognoziškai stipresni už pačią šių žymenų ekspresiją. Šiame darbe šis radinys buvo patvirtintas – nustatyta didesnė ER vidunavikinio heterogeniškumo prognozinė vertė nei jo paties raiškos laipsnis. ER kontrastas buvo vienintelis prognoziškai reikšmingas hormonų receptorių vidunavikinio heterogeniškumo rodiklis ir vienaveiksnėje regresijos analizėje (3.8 lentelė, RS = 0,21,  $p = 0,021$ ), ir daugiaveiksniuose Kokso regresijos modeliuose (3.9 lentelė, RS = 0,21,  $p = 0,0449$ , 1 modelis; RS = 0,16,  $p = 0,0258$ , 3 modelis). Nustatytų dviejų prognoziškai reikšmingų vidunavikinio HER2 ir ER raiškos heterogeniškumo rodiklių – HER2 membranos vientisumo entropijos ir ER kontrasto – sąsaja ir jų atvirkštinis ryšys su ER raiška parodyti faktorinėje analizėje (5 veiksnys, 3.11 pav. ir 13 priedas). Šis HER2&ER heterogeniškumo veiksnys atspindi didesnę HER2 ir ER baltymų raiškos vidunavikinį heterogeniškumą navikuose, kuriuose ER raiška yra sumažėjusi.

Didžiajai daliai pacienčių, kurių navikuose buvo nustatyta *HER2* geno amplifikacija, taikytas adjuvantinis gydymas trastuzumabu (87 pacientams, 74,4 %). Tikėtina, kad taikininė terapija turėjo įtakos pacienčių išgyvenamumui, todėl gautus prognozinis modelius šiame pogrupyje reikia vertinti atsargiai. Daugiaveiksniuose Kokso regresijos modeliuose nustatyta



didesnė vidunavikinio HER2 raiškos heterogeniškumo rodiklio (membranos vientisumo kontrasto) prognozinė vertė nei paties kiekybinio HER2 baltymo raiškos rodiklio (membranos vientisumo) įverčio (3.10 lentelė, RS = 0,35,  $p = 0,0367$ , 4 modelis ir RS = 0,243,  $p = 0,0077$ , 6 modelis). Nustatyto kito nepriklausomo prognozinio veiksnio – CEP17 kopijų skaičiaus, susijusio su ilgesniu pacienčių išgyvenamumu, reikšmė nėra aiški, nes tai gali būti susiję su įvairiais gydymo būdais, taikytais pacientėms, sergančioms HER2 teigiamu krūties vėžiu. Keliuose tyrimuose buvo parodytas ryšys tarp CEP17 kopijų skaičiaus padidėjimo ir atsako į antraciklinais pagrįstą chemoterapinį gydymą (319-321). Be to, 17 chromosomoje, be *HER2* geno, yra ir kitų svarbių su krūties vėžio patogenezė bei DNR reparacija susijusių genų: *BRCA1*, *TOP2A*, *TP53*, *RAD51C* (295, 395). Todėl įvairios 17 chromosomos anomalijos gali turėti įtakos pacienčių išgyvenamumo prognozei bei atsakui į gydymą.

Navikai, kuriuose nustatyta HER2 IHC 2+ raiška nesant *HER2* geno amplifikacijos, kliniškai priskiriami HER2 neigiamų navikų kategorijai; mūsų tirtoje pacienčių imtyje jie atitinka liuminalinį A (93 atvejai) ir liuminalinį B (65 atvejai) krūties vėžio potipius, kai yra padidėjusi HER2 baltymo raiška. Pastaruoju metu yra įvardijama dar viena – mažos HER2 raiškos (angl. *HER2-low*) kategorija, reprezentuojanti IHC 2+ ir IHC 1+ *HER2* neamplifikuotus navikus ir sudaranti apie 40–55 % krūties navikų (396-398). Klinikinių tyrimų duomenimis, šios grupės pacientų gydymas naujos kartos anti-HER2 agentais gali būti veiksmingas (399, 400), todėl, nors ši kategorija dar nėra oficialiai apibrėžta, ilgainiui poreikis atskirti tikrus HER2 neigiamus navikus nuo navikų, kurių maža HER2 raiška, gali tapti aktualus (398). Gydymo pažanga skatina vykdyti išsamesnius šios navikų grupės tyrimus. Šiuo metu vis dar trūksta informacijos apie biologinę ir klinikinę paribinės HER2 raiškos reikšmę liuminaliniuose krūties vėžio potipiuose, kuriems būdinga ER ir (arba) PR ekspresija. Sudėtingos kryžminės sąveikos tarp HER2 ir hormonų receptorių signalų perdavimo kelių gali sąlygoti atsiradimą įvairių naviko savybių, kurios paskatintų navikų progresavimą bei atsparumo išsivystymą taikomoms terapijoms (401-403). Atvirkščias ryšys tarp hormonų receptorių ir HER2 raiškos yra gerai žinomas (404); tačiau teigiama koreliacija tarp ER ir HER2 RNR bei baltymo kiekio ER teigiamuose, *HER2* neamplifikuotuose navikuose taip pat buvo nustatyta (394). Be to, buvo parodyta, kad augimo veiksniai gali sumažinti PR raiškos lygį nepriklausomai nuo ER (99, 404, 405). Todėl mažesnė PR raiška arba jos nebuvimas gali rodyti ne tik ER aktyvumo trūkumą, bet ir padidėjusią kryžminę sąveiką tarp ER ir augimo veiksmių signalų perdavimo kelių (99).

Maža PR raiška arba jos nebuvimas krūties vėžio audinyje siejami su blogesne prognoze (406). Neseniai buvo nustatyta nepriklausoma prognozinė vidunavikinio PR heterogeniškumo vertė  $HR^+$  krūties navikuose (285). Šiame darbe, nepaisant nustatyto glaudaus ryšio tarp PR raiškos ir jos entropijos faktorinėse analizėse (6-as ir 5-as veiksniai atitinkamai *HER2* neamplifikuotuose ir amplifikuotuose navikuose), nei PR ekspresija, nei PR entropija ar kitas Haralicko tekstūros rodiklis nenustatyti kaip statistiškai reikšmingi nei vienaveiksneje, nei daugiaveiksneje regresijos analizėse. Tik vienintelis prognoziškai reikšmingas PR bimodališkumo rodiklis (AshD) nustatytas vienaveiksneje *HER2* amplifikuotų navikų grupės analizėje (3.8 lentelė,  $RS = 3,72$ ,  $p = 0,006$ ). Norėdami toliau iširti galimas PR ir *HER2* raiškos sąveikas naviko mikroaplinkoje, darbe taikėme dPR-*HER2* IHC skaitmeninę vaizdo analizę ir šešiakampių gardelių analitiką, kuri leido įvertinti dviejų biožymenų raiškos regionines sąsajas. Mūsų žiniomis ši metodika dar niekada nebuvo taikyta lokalių vidunavikinių ryšių tarp hormonų receptorių ir *HER2* raiškos tyrimuose. Ją pasitelkę atskleidėme, kad krūties vėžio audinyje gali būti skirtingos lokalsios PR ir *HER2* raiškos proporcijos, galimai pasireiškiančios transformacija iš PR vyraujančios regioninės raiškos į *HER2* teigiamų ląstelių vyravimą, susijusį su padidėjusiu naviko ląstelingumu. Kitaip tariant, krūties vėžio audinyje aptinkami židiniai, kuriems būdingas santykinis (1) PR ekspresuojančių ląstelių sumažėjimas, (2) *HER2* ekspresuojančių ląstelių pagausėjimas ir (3) naviko ląstelių tankio padidėjimas. Šis lokalus transformacijos iš PR į *HER2* reiškinys gali atspindėti ligos progresavimą ir paremti teoriją, kad navikas evoliucionuoja pradėdamas nuo liuminalinio A į liuminalinį B ir, galiausiai, į *HER2* teigiamą krūties vėžio potipį (407). Pažymėtina, kad šiems „lokaliai transformuotiems“ navikams būdingi radiniai, tokie kaip CEP17 kopijų skaičiaus padidėjimas, didesnis *HER2* geno kopijų skaičius (ankstesnė *HER2* FISH paribinė kategorija) (22) ir įvairios *HER2* amplifikuotų klonų proporcijos tarp neamplifikuotų navikinių ląstelių (genetinio heterogeniškumo kategorija) (25), taip pat gali rodyti vėžio progresavimą (16, 322, 408).

Nors PR/*HER2* heterogeniškų atvejų dalis yra maža (6,5 % ir 12,8 % atitinkamai *HER2* neamplifikuotuose ir amplifikuotuose navikuose), šis radinys gali būti kliniškai svarbus. Židininė PR/*HER2* transformacija gali rodyti potencialų naviko progresavimą ir gydymo atsakus paribiniais *HER2* IHC 2+ atvejais, nepriklausomai nuo *HER2* amplifikacijos būklės pagal dabartinius klinikinius apibrėžimus (15). Tokie pacientai, kuriems *HER2* amplifikacija nebuvo nustatyta, galėtų būti papildomai tiriami ir vertinami kaip potencialiai sergantys *HER2* teigiamu krūties vėžiu. Be to, taikant dPR-

HER2 IHC tyrimą, galima būtų tiksliau parinkti tiriamo audinio vietą HER2 FISH analizei esant paribiniams atvejams.

Diseratacijoje tyrėme vieno iš imuninio atsako rodiklių – CD8+ limfocitų pasiskirstymą krūties vėžio mikroaplinkoje ir siekėme įvertinti nustatytų CD8+ ląstelių tankio rodiklių prognozinę vertę. Šiam uždaviniui pritaikėme neseniai išrastą naviko ir stromos sąveikos zonos automatinio nustatymo metodiką (365). Dėl mažo kai kurių krūties vėžio potipių imunogeniškumo yra ypač svarbu parinkti tinkamą metodiką, kuria būtų įmanoma kuo tiksliau įvertinti CD8+ limfocitų pasiskirstymą naviko mikroaplinkoje. Automatizuotas naviko krašto bei naviko ir stromos sąveikos zonos nustatymas taikant šešiakampių gardelių analitiką, pagrįstą skaitmeninės vaizdo analizės duomenimis, suteikia pranašumą prieš įprastai naudojamus naviką infiltruojančių limfocitų pasiskirstymo tyrimo metodus. Pirmiausia, toks sąveikos zonos, kurios koncepcija panaši į invazinio krašto, nustatymas yra nepriklausomas nuo vizualaus ir subjektyvaus tyrėjo vertinimo. Preciziškai akimi įvertinti ir ranka nubrėžti liniją tarp naviko ir stromos sričių yra sudėtinga, ypač kai naviko augimo pobūdis skirtingas (409). Šis metodas pasižymi universalumu – sąveikos zonos plotis gali būti adaptuojamas įvairiems navikų tipams. Ištyrę skirtingų plokčių naviko krašto ir sąveikos zonos variantus, nustatėme, kad prognoziškai stipriausi rodikliai buvo nustatyti esant 1 rango pločio naviko kraštui ir 7 rangų pločio sąveikos zonai. Panašaus pločio sąveikos zona (NK<sub>3</sub> ir SZ<sub>9</sub>), kaip prognoziškai informatyviausia, buvo nustatyta tiriant imuninio atsako rodiklius ankstyvosios stadijos HR<sup>+</sup> duktalinės krūties karcinomose, tačiau storosios žarnos navikuose prognoziškai pranašesnė nustatyta kur kas siauresnė sąveikos zona (NK<sub>1</sub> ir SZ<sub>3</sub>) (365). Šiuos skirtumus greičiausiai nulemia tiriamų navikų morfologija ir imunogeninės savybės. Galiausiai, šio metodo išskirtinumas atsiskleidžia galimybe išmatuoti limfocitų tankio gradientą (imunogradientą), parodantį, ar limfocitai yra „linke“ skverbti į vėžio audinį.

Mūsų tyrimas patvirtina, kad imunogradiento metodu įvertinamas imuninių ląstelių tankio pokytis naviko ir stromos sąveikos zonoje yra informatyvesnis nei įprastiniai naviką infiltruojančių limfocitų tankio matavimai naviko mikroaplinkoje. Nors CD8+ ląstelių tankis navikinėje audinio dalyje buvo susijęs su ilgesniu bendruoju išgyvenamumu vienaveiksneje regresijos analizėje abiejose pacienčių grupėse (3.8 lentelė, RS = 0,37,  $p = 0,017$  ir RS = 0,38,  $p = 0,024$  atitinkamai *HER2* neamplifikuotuose ir amplifikuotuose navikuose), jų nepriklausoma prognozinė vertė daugiaveiksniuose Kokso regresijos modeliuose nenustatyta. Ir priešingai, net trys naviko ir stromos sąveikos zonoje nustatyti rodikliai buvo nepriklausomi

prognoziniai veiksniai *HER2* neamplifikuotuose navikuose: CD8+ ląstelių tankis sąveikos zonos naviko srityje ir CD8+ ląstelių tankio gradientas į naviką buvo susiję su ilgesniu išgyvenamumu, o CD8+ ląstelių tankio variacija (standartinis nuokrypis) sąveikos zonos naviko krašto srityje – su trumpesniu. Sujungus šias tris nepriklausomas erdvinės CD8+ ląstelių pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje savybes į sudėtinį sąveikos zonos CD8+ tankio rodiklių prognozinį įvertį, gauta stipri pacienčių stratifikacija į prognozes grupes. Tai parodo, kaip, atliekant tik vieno IHC žymens kompiuterinę analizę, galima amplifikuoti gaunamą prognozinę informaciją (3.15 pav.). Pažymėtina, kad šių trijų rodiklių pakako prognozuoti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą nepriklausomai nuo visų kitų kintamųjų (3.9 lentelė, 2 modelis), o modelio statistinė galia buvo beveik tokia pati kaip ir modelio, sudaryto iš pataloginių, IHC ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių (3.9 lentelė, 1 modelis). Galiausiai, prijungus CD8+ ląstelių tankio ir imunogradiento rodiklius, modelio statistinė galia padvigubėjo (3.9 lentelė, 3 modelis). Šio tyrimo radiniai yra panašūs į Rasmusson ir bendraautorių gautus rezultatus (365), kai ir CD8+ ląstelių tankio sąveikos zonos naviko srityje, ir CD8+ ląstelių tankio MC rodikliai buvo nepriklausomi geros prognozės veiksniai, susiję su ilgesniu bendruoju pacienčių, sergančių ankstyvuoju HR<sup>+</sup> krūties vėžiu, išgyvenamumu. O kitų prognozinės CD8+ limfocitų reikšmės tyrimų rezultatai yra priešaringi. Palanki didesnio CD8+ ląstelių tankio prognozė nustatyta krūties navikuose, kai sritiniai limfmazgiai nepažeisti metastazių (410), taip pat kombinuotoje analizėje su CD163+ (373). Tačiau kituose, HR<sup>+</sup>/HER2 neigiamų navikų tyrimuose, parodyta, kad didesnis CD8+ ląstelių kiekis yra susijęs su bloga prognoze (37, 411, 412) arba statistiškai reikšmingas ryšys tarp CD8+ ir pacientų prognozės nenustatytas (36, 346, 370). Tokie kontroversiški rezultatai HR<sup>+</sup> krūties navikuose gali būti susiję su skirtingais taikomais tyrimų metodais, kuriems trūksta tikslumo vertinant naviką infiltruojančių limfocitų pasiskirstymo audiniuose erdvinis aspektus (412, 413). Taigi, norint atskleisti naviką infiltruojančių limfocitų prognozinį vaidmenį liuminaliniuose krūties vėžio potipiuose, reikalingi itin tikslūs erdvinės imuninių ir navikinių ląstelių tarpusavio sąveikos analizės metodai.

Mūsų tyrime reikšmingų CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymo skirtumų tarp *HER2* neamplifikuotų ir amplifikuotų navikų grupių nenustatyta. Tai galėtų būti paaiškinta tuo, kad *HER2* amplifikuotą navikų grupę sudarė abu – ir liuminalinis B, ir *HER2* teigiamas molekuliniai potipiai. Ankstesni tyrimai parodė, kad *HER2* teigiamas potipis yra labiau imunogeniškas nei liuminalinis B (414). Šiame darbe *HER2* amplifikuotoje grupėje nustatytas tik vienas nepriklausomas – CD8+ ląstelių tankio sąveikos zonos naviko srityje rodiklis,

susijęs su ilgesniu pacienčių išgyvenamumu (3.10 lentelė, 5 ir 6 modeliai). Gausi limfocitų infiltracija yra siejama su geresne HER2 teigiamu krūties vėžiu sergančių pacienčių prognoze (visišku patologiniu atsaku, išgyvenamumu, kai liga neatsikartoja ar po gydymo nekyla kitų komplikacijų) (353, 354). Tačiau tyrimuose, kuriuose vertinta tik CD8+ prognozinė reikšmė, gauti prieštaringi rezultatai (37, 346, 412). O tai rodo, kad sąsajų tarp naviką infiltruojančių limfocitų ir prognozės rezultatai priklauso nuo tiriamų limfocitų tipo, jų lokalizacijos audinyje, analizės metodų ir kitų veiksnių. Be to, manoma, kad, sergant HER2 teigiamu krūties vėžiu, naviko ir imuninės sistemos sąveikai (taip pat imuninio atsako prognozei) įtakos turi kompleksiniai gydymo būdai, įskaitant anti-HER2 terapiją, chemoterapiją ir hormonų terapiją (415). Trastuzumabo, pasižyminčio ir citotoksiniu, ir imunologiniu poveikiu navikinėms ląstelėms (416, 417), terapijos efektas priklauso nuo imuninio atsako (418), kuris didžiausias pasiekiamas esant gausiems naviką infiltruojančių limfocitų kiekiams (379). Vis dėlto ne visi tyrimai šį teiginį patvirtino (382, 419).

Apibendrinant – mūsų pateikti kombinuoti prognoziniai pacienčių, sergančių krūties vėžiu, esant paribinei HER2 baltymo raiškai, bendrojo išgyvenamumo modeliai iš esmės yra pagrįsti automatizuotais ir apskaičiuotais IHC biožymenų vidunavikinio heterogeniškumo ir imuninio CD8+ limfocitų atsako naviko mikroaplinkos rodikliais – „skaitmeniniais biožymenimis“. Nustatyta nepriklausoma vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių (HER2 membranos vientisumo entropija ir ER kontrastas *HER2* neamplifikuotuose bei HER2 membranos vientisumo kontrastas amplifikuotuose navikuose) vertė prognozuojant geresnę pacienčių išgyvenamumą. CD8+ sąveikos zonos imunogradiiento rodikliai, įvertinantys antinavikinį imuninį atsaką *HER2* neamplifikuotuose navikuose, pranoko standartinius patologijos ir IHC rodiklius bei patikimai ir nepriklausomai stratifikavo pacientes į prognozes grupes. Galiausiai, aptiktas naujas vidunavikinio heterogeniškumo reiškinys ir potencialus krūties vėžio progresijos požymis – židininis poslinkis iš PR teigiamų ląstelių populiacijų vyravimo link HER2 ekspresuojančių ląstelių vyravimo ir padidėjusio ląstelių tankio.

#### 4.3. Tyrimo tęstinumas

Vėžinių ląstelių heterogeniškumas, lemiantis atsparumą gydymui, naviko progresijos bei ligos atkryčio procesus, skatina atlikti tolesnius visapusiškus krūties vėžio biožymenų raiškos ir naviko mikroaplinkos heterogeniškumo tyrimus.

Siekiant praktikoje panaudoti informaciją apie heterogenišką *HER2* geno raišką remiantis disertacijoje pristatytais naujais bimodališkumo rodikliais, reikalingi tyrimai surinkus didesnes pacienčių imtis ir klinikinės / predikcinės šių rodiklių vertės nustatymas.

Mūsų tyrimas yra retrospektyvus ir monocentris, todėl, siekiant patvirtinti nustatytus nepriklausomus prognozinis rodiklius skirtingose *HER2* geno amplifikacijos atžvilgiu krūties vėžiu sergančių pacienčių grupėse, būtina išplėsti tiriamąsias imtis kartu atsižvelgiant į informaciją apie taikytas terapijas ir pasiektą gydymo efektą. Šiuo metu nėra pakankamai informacijos apie regioninę hormonų receptorių ir *HER2* ekspresuojančių ląstelių sąveiką bei konkurenciją, todėl darbe nustatytas radinys atliekant PR ir *HER2* biožymenų raiškos sąsajų analizę ypač intriguoja ir kartu reikalauja platesnių tyrimų, įtraukiant ir ER raiškos sąsajų su *HER2* analizę. Tikėtina, kad tokių tyrimų suteikiama papildoma informacija gali būti labai svarbi numatant galimą naviko progresavimą bei rizikos grupes, ypač *HER2* paribinio ir heterogeniško krūties vėžio atvejais, kai gydymo sprendimai ypač sudėtingi.

Disertacijoje nustatyti reikšmingi nepriklausomi prognoziniai imuninio atsako rodikliai, pagrįsti CD8+ žymens matavimais skaitmenine vaizdo analize, parodė, kad tikslinga toliau plėtoti imuninių ląstelių naviko mikroaplinkoje tyrimus, praturtinant juos ir kitų naviką infiltruojančių žymenų tyrimais.

## IŠVADOS

1. *HER2* geno būklės tyrimas FISH metodu, taikant automatizuotos skaitmeninės vaizdo analizės algoritmus, aptinka sistemškai mažesnes *HER2* amplifikacijos vertes, palyginti su įprastiniu mikroskopijos metodu, paremtu labiau amplifikuotų ląstelių atranka vertinimui. Todėl neatrankus skaitmeninis kiekybinis amplifikacijos vertinimas negali būti tiesiogiai taikomas klinikinėje praktikoje.
2. Didelės apimties skaitmeninė *HER2* FISH vaizdų analizė suteikia naujas galimybes vertinti vidunavikinį *HER2* geno raiškos heterogeniškumą. Apskaičiuoti *HER2*, CEP17 ir jų santykio bimodališkumo rodikliai linijiniu požūriu nepriklauso nuo amplifikacijos laipsnio ir padidėjusio CEP17 kopijų skaičiaus ir leidžia kiekybiškai įvertinti jų variaciją navikiniame audinyje.
3. Skaitmeninės vaizdo analizės ir šešiakampių gardelių analitikos metodais nustatyti *HER2* ir ER žymenų raiškos vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai yra nepriklausomi prognoziniai bendrojo išgyvenamumo veiksniai pacienčių, sergančių krūties vėžiu, kai yra nustatyta *HER2* baltymo paribinė raiška, imtyje. *HER2* neamplifikuotoje grupėje *HER2* membranos vientisumo entropija ir ER kontrastas, o *HER2* amplifikuotoje grupėje – *HER2* membranos vientisumo kontrastas yra nepriklausomi ilgesnio pacienčių bendrojo išgyvenamumo prognoziniai veiksniai.
4. Pacienčių, kurioms nustatyta paribinė *HER2* baltymo raiška, imtyje nustatyta CD8<sup>+</sup> limfocitų pasiskirstymo krūties vėžio mikroaplinkoje rodiklių nepriklausoma prognozinė vertė. *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje trys apskaičiuotieji imuninio atsako rodikliai, pagrįsti CD8<sup>+</sup> žymens matavimais naviko ir stromos sąveikos zonoje (CD8<sup>+</sup> ląstelių tankis naviko srityje, CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio gradientas į naviką ir CD8<sup>+</sup> ląstelių tankio standartinis nuokrypis naviko krašte) leidžia patikimai ir nepriklausomai nuo kitų klinikos ir patologijos parametrų prognozuoti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą. *HER2* amplifikuotų navikų grupėje CD8<sup>+</sup> ląstelių tankis sąveikos zonos naviko srityje yra vienintelis nepriklausomas prognozinis antinavikinio imuninio atsako rodiklis.

## PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

Darbo rezultatai paskelbti recenzuojamuose tarptautiniuose mokslo leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį (angl. *Impact Factor*) *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje.

### Publikacijos:

1. **Radžiuvienė G**, Rasmusson A, Augulis R, Leščiūtė-Krilavičienė D, Laurinavičienė A, Clim E, Laurinavičius A: Automated Image Analysis of HER2 Fluorescence In Situ Hybridization to Refine Definitions of Genetic Heterogeneity in Breast Cancer Tissue. *BioMed Research International*, 2017; 2017:2321916.
2. **Radžiuvienė G**, Rasmusson A, Augulis R, Grinevičiūtė R. B, Žilėnaitė D, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Laurinavičius A: Intratumoral heterogeneity and immune response indicators to predict overall survival in HER2-bordeline (IHC2+) breast cancer patients. *Front Oncol.*, 2021; 11:774088.

### Žodiniai pranešimai:

1. **Radžiuvienė G**. Digital image analysis for Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Molecular techniques in tissue-based pathology diagnosis*, 2014. Vilnius, Lietuva.
2. **Radžiuvienė G**, Rasmusson A, Augulis R, Leščiūtė-Krilavičienė D, Laurinavičienė A, Clim E, Laurinavičius A: Automated Image Analysis of HER2 FISH Enables New Definitions of Genetic Heterogeneity in Breast Cancer Tissue. 13-asis Europos skaitmeninės patologijos kongresas, 2016. Berlynas, Vokietija.

### Stendiniai pranešimai konferencijose:

1. **Radžiuvienė G**, Rasmusson A, Augulis R, Leščiūtė-Krilavičienė D, Laurinavičienė A, Clim E, Laurinavičius A: Automated Image Analysis of HER2 FISH in Breast Cancer Tissue to Support Cell Heterogeneity, 3-asis Šiaurės šalių skaitmeninės patologijos simpoziumas, 2015. Linkopingas, Švedija.
2. **Radžiuvienė G**, Rasmusson A, Augulis R, Grinevičiūtė R. B, Žilėnaitė D, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Laurinavičius A: Intratumoral heterogeneity and immune response indicators to predict overall survival



in HER2-bordeline (IHC2+) breast cancer patients, *Life Sciences Baltics*  
2021. Vilnius, Lietuva.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Prieiga internete: <https://www.nvi.lt/vezio-registras/>.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
3. Daiva G, Laura S, Nadežda L. Krūties vėžys Lietuvoje. *Acta medica Lituanica.* 2015;22(3).
4. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1674.
5. Rakha EA, Pareja FG. New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology. *Semin Cancer Biol.* 2021;72:102–13.
6. Wu HJ, Chu PY. Recent Discoveries of Macromolecule- and Cell-Based Biomarkers and Therapeutic Implications in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177–82.
8. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009;14(4):320–68.
9. Dieci MV, Miglietta F, Griguolo G, Guarneri V. Biomarkers for HER2-positive metastatic breast cancer: Beyond hormone receptors. *Cancer Treat Rev.* 2020;88:102064.
10. Triulzi T, Bianchi GV, Tagliabue E. Predictive biomarkers in the treatment of HER2-positive breast cancer: an ongoing challenge. *Future Oncol.* 2016;12(11):1413–28.
11. Klocker EV, Suppan C. Biomarkers in Her2- Positive Disease. *Breast Care (Basel).* 2020;15(6):586–93.
12. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783–92.

13. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*. 2007;7:153.
14. Tinoco G, Warsch S, Gluck S, Avancha K, Montero AJ. Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies. *J Cancer*. 2013;4(2):117–32.
15. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105–22.
16. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol*. 2012;25(7):938–48.
17. Ohlschlegel C, Zahel K, Kradofner D, Hell M, Jochum W. HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2011;64(12):1112–6.
18. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Portier B, Parwani AV, et al. HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;166(2):447–57.
19. Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol*. 2014;27(1):4–18.
20. Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Reinholz MM, Tenner KS, Davidson NE, et al. Predictability of adjuvant trastuzumab benefit in N9831 patients using the ASCO/CAP HER2-positivity criteria. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(2):159–62.
21. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18–43.
22. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997–4013.

23. Chang MC, Malowany JI, Mazurkiewicz J, Wood M. 'Genetic heterogeneity' in HER2/neu testing by fluorescence in situ hybridization: a study of 2,522 cases. *Mod Pathol*. 2012;25(5):683–8.
24. Stanta G, Bonin S. Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:85.
25. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, Fitzgibbons PL, Hicks DG, Jenkins RB, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(4):611–2.
26. Hsu CY, Li AF, Yang CF, Ho DM. Proposal of modification for the definition of genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(2):162; author reply 3.
27. Bartlett AI, Starczynski J, Robson T, Maclellan A, Campbell FM, van de Velde CJ, et al. Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(2):266–74.
28. Layfield LJ, Schmidt RL. HER2/neu gene amplification heterogeneity: the significance of cells with a 3:1 HER2/CEP17 ratio. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(6):543–9.
29. Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*. 2003;22(47):7316–39.
30. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, et al. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(6):755–66.
31. Filho OM, Viale G, Stein S, Trippa L, Yardley DA, Mayer IA, et al. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discov*. 2021;11(10):2474–87.
32. Liu Y, Ma L, Liu D, Yang Z, Yang C, Hu Z, et al. Impact of polysomy 17 on HER2 testing of invasive breast cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):163–73.
33. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med*. 2015;13:202.
34. Badr NM, Berditchevski F, Shaaban AM. The Immune Microenvironment in Breast Carcinoma: Predictive and Prognostic Role in the Neoadjuvant Setting. *Pathobiology*. 2020;87(2):61–74.

35. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13.
36. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):860–7.
37. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1536–43.
38. Prieiga internete: <https://gco.iarc.fr/>.
39. Prieiga internete: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/440-lithuania-factsheets.pdf>.
40. Broeders M, Moss S, Nystrom L, Njor S, Jonsson H, Paap E, et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen.* 2012;19 Suppl 1:14–25.
41. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics.* 1989;4(3):362–6.
42. Committee HGN. ERBB2 erbb2 Receptor Tyrosine kinase 2 [Homo sapiens (human)].
43. Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Molecular and cellular biology.* 1986;6(5):1729–40.
44. Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244(4905):707–12.
45. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55–62.
46. Nelson E. HER2/neu: An increasingly important therapeutic target: Part 1 Basic Biology & Therapeutic Armamentarium 2014. 649–71 p.
47. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127–37.

48. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469–87.
49. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO journal*. 1997;16(7):1647–55.
50. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(12):5321–5.
51. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The oncologist*. 1998;3(4):237–52.
52. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13(1):63–72.
53. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(7):1974–82.
54. Boshier JM, Williams T, Hurst HC. The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(3):744–7.
55. Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grootclaes M, Winkler R. Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *The Biochemical journal*. 2003;370(Pt 1):323–9.
56. Bae CD, Juhn YS, Park JB. Post-transcriptional control of c-erb B-2 overexpression in stomach cancer cells. *Experimental & molecular medicine*. 2001;33(1):15–9.
57. Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(1):70–7.

58. Rosenberg CL. Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. *J Clin Oncol*. 2008;26(30):4856–8.
59. The Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
60. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer discovery*. 2013;3(2):224–37.
61. Zhu X, Lu Y, Lu H, Yang W, Tu X, Cai X, et al. Genetic alterations and protein expression of HER2 and chromosome 17 polysomy in breast cancer. *Human pathology*. 2011;42(10):1499–504.
62. Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(6):1669–75.
63. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, Chauhan N, Hugh J, Mackey JR, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(36):5658–63.
64. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The oncologist*. 2003;8(4):307–25.
65. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. *American journal of surgery*. 2003;185(2):165–7.
66. Di Modica M, Tagliabue E, Triulzi T. Predicting the Efficacy of HER2-Targeted Therapies: A Look at the Host. *Disease markers*. 2017;2017:7849108.
67. Kreutzfeldt J, Rozeboom B, Dey N, De P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *Am J Cancer Res*. 2020;10(4):1045–67.
68. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10):4285–9.
69. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003;421(6924):756–60.

70. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):719–26.
71. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(11):783–92.
72. Harbeck N, Beckmann MW, Rody A, Schneeweiss A, Muller V, Fehm T, et al. HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast care*. 2013;8(1):49–55.
73. Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):461–71.
74. Isakoff SJ, Baselga J. Trastuzumab-DM1: building a chemotherapy-free road in the treatment of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(4):351–4.
75. Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene*. 2002;21(41):6255–63.
76. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European journal of cancer*. 2017;75:284–98.
77. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869–74.
78. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
79. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus



- on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206–23.
80. Clarke RB. Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids.* 2003;68(10-13):789–94.
  81. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human reproduction update.* 2000;6(3):225–36.
  82. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry.* 1994;63:451–86.
  83. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews.* 2001;81(4):1535–65.
  84. Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer letters.* 2006;238(1):1–14.
  85. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1997;82(12):4258–65.
  86. Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):218–20.
  87. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2015;29(4):557–68.
  88. Zhou Y, Liu X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomark Res.* 2020;8:39.
  89. Treeck O, Latratch C, Springwald A, Ortmann O. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast cancer research and treatment.* 2010;120(3):557–65.
  90. Cotrim CZ, Fabris V, Doria ML, Lindberg K, Gustafsson JA, Amado F, et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. *Oncogene.* 2013;32(19):2390–402.
  91. Murphy LC, Leygue E. The role of estrogen receptor-beta in breast cancer. *Semin Reprod Med.* 2012;30(1):5–13.
  92. Elebro K, Borgquist S, Rosendahl AH, Markkula A, Simonsson M, Jirstrom K, et al. High Estrogen Receptor beta Expression Is Prognostic among Adjuvant Chemotherapy-Treated Patients-Results from a

- Population-Based Breast Cancer Cohort. *Clin Cancer Res.* 2017;23(3):766–77.
93. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, Osborne CK, Fuqua SA. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(22):7490–9.
  94. Lange CA, Sartorius CA, Abdel-Hafiz H, Spillman MA, Horwitz KB, Jacobsen BM. Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. *Advances in experimental medicine and biology.* 2008;630:94–111.
  95. Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, et al. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocrine-related cancer.* 2009;16(2):333–50.
  96. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ. Progesterone and Breast Cancer. *Endocr Rev.* 2020;41(2).
  97. Obr AE, Edwards DP. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology.* 2012;357(1-2):4–17.
  98. Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1978;253(7):2223–8.
  99. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7721–35.
  100. Carroll JS, Hickey TE, Tarulli GA, Williams M, Tilley WD. Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nature reviews Cancer.* 2017;17(1):54–64.
  101. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature.* 2015;523(7560):313–7.
  102. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal.* 1990;9(5):1603–14.
  103. Meyer ME, Quirin-Stricker C, Lerouge T, Bocquel MT, Gronemeyer H. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *The Journal of biological chemistry.* 1992;267(15):10882–7.

104. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular endocrinology*. 1993;7(10):1244–55.
105. Lamb CA, Fabris VT, Jacobsen B, Molinolo AA, Lanari C. Biological and clinical impact of imbalanced progesterone receptor isoform ratios in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2018.
106. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(17):1254–61.
107. Sun JY, Wu SG, Li FY, Lin HX, He ZY. Progesterone receptor loss identifies hormone receptor-positive and HER2-negative breast cancer subgroups at higher risk of relapse: a retrospective cohort study. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:1707–13.
108. Chan M, Chang MC, Gonzalez R, Lategan B, del Barco E, Vera-Badillo F, et al. Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer. *PloS one*. 2015;10(7):e0132449.
109. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(1):R6.
110. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4772–8.
111. Rhodes A, Jasani B. The oestrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive breast tumour: a biological entity or a technical artefact? *J Clin Pathol*. 2009;62(1):95–6.
112. De Maeyer L, Van Limbergen E, De Nys K, Moerman P, Pochet N, Hendrickx W, et al. Does estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast carcinoma exist? *J Clin Oncol*. 2008;26(2):335-6; author reply 6–8.
113. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):21–7.
114. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in

- Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346–66.
115. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology.* 1984;133(4):1710–5.
  116. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology.* 2000;182(3):311–22.
  117. Harper-Wynne C, Ross G, Sacks N, Salter J, Nasiri N, Iqbal J, et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: a pilot study for breast cancer prevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2002;11(7):614–21.
  118. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between Steroid Receptor Expression and Cell Proliferation in the Human Breast. *Cancer research.* 1997;57(22):4987–91.
  119. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2021;113(7):808–19.
  120. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro Jr G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British journal of cancer.* 2007;96:1504.
  121. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17(4):323–34.
  122. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2011;22(8):1736–47.
  123. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *Journal of the National Cancer Institute.* 2013;105(24):1897–906.

124. Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2015;28(6):778–86.
125. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2015;26(8):1533–46.
126. Kim KI, Lee KH, Kim TR, Chun YS, Lee TH, Park HK. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2014;17(1):40–6.
127. Sun J, Chen C, Wei W, Zheng H, Yuan J, Tu YI, et al. Associations and indications of Ki67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study. *Oncology letters.* 2015;10(3):1741–8.
128. Alco G, Bozdogan A, Selamoglu D, Pilanci KN, Tuzlali S, Ordu C, et al. Clinical and histopathological factors associated with Ki-67 expression in breast cancer patients. *Oncology letters.* 2015;9(3):1046–54.
129. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC cancer.* 2011;11:486.
130. Tan S, Fu X, Xu S, Qiu P, Lv Z, Xu Y, et al. Quantification of Ki67 Change as a Valid Prognostic Indicator of Luminal B Type Breast Cancer After Neoadjuvant Therapy. *Pathol Oncol Res.* 2021;27:1609972.
131. Tao M, Chen S, Zhang X, Zhou Q. Ki-67 labeling index is a predictive marker for a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine.* 2017;96(51):e9384.
132. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, et al. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.* 2017;13(9):843–57.
133. Jang MH, Kim HJ, Chung YR, Lee Y, Park SY. A comparison of Ki-67 counting methods in luminal Breast Cancer: The Average Method vs. the Hot Spot Method. *PloS one.* 2017;12(2):e0172031.
134. Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(8):806–14.

135. Wu X, Baig A, Kasymjanova G, Kafi K, Holcroft C, Mekouar H, et al. Pattern of Local Recurrence and Distant Metastasis in Breast Cancer By Molecular Subtype. *Cureus*. 2016;8(12):e924.
136. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(6):619–26.
137. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical medicine & research*. 2009;7(1-2):4–13.
138. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(2):279–87.
139. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288–300.
140. Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, Diorio C. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(5):686–703.
141. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(1):118–45.
142. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Ruschoff J, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(4):539–48.
143. Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM. HER2 testing: current status and future directions. *Cancer treatment reviews*. 2014;40(2):276–84.
144. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323–33.
145. Jorgensen JT, Winther H, Askaa J, Andresen L, Olsen D, Mollerup J. A Companion Diagnostic With Significant Clinical Impact in Treatment of Breast and Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:676939.
146. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of

- frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol.* 2002;20(14):3095–105.
147. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol.* 2005;36(3):250–61.
  148. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *Jama.* 2004;291(16):1972–7.
  149. Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer. *Immunohistochemistry, FISH, or ELISA? American journal of clinical pathology.* 2002;117 Suppl:S26–35.
  150. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *The American journal of pathology.* 2000;157(5):1467–72.
  151. Garcia-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology.* 2010;56(4):472–80.
  152. Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, et al. Metallographic in situ hybridization. *Hum Pathol.* 2007;38(8):1145–59.
  153. Dietel M, Ellis IO, Hofler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch.* 2007;451(1):19–25.
  154. Tubbs R, Pettay J, Skacel M, Powell R, Stoler M, Roche P, et al. Gold-facilitated in situ hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *The American journal of pathology.* 2002;160(5):1589–95.
  155. Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated

- silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. *Diagn Mol Pathol.* 2009;18(2):88–95.
156. Koh YW, Lee HJ, Lee JW, Kang J, Gong G. Dual-color silver-enhanced in situ hybridization for assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2011;24(6):794–800.
  157. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, et al. Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol.* 2008;3:41.
  158. Gao FF, Dabbs DJ, Cooper KL, Bhargava R. Bright-field HER2 dual in situ hybridization (DISH) assay vs fluorescence in situ hybridization (FISH): focused study of immunohistochemical 2+ cases. *American journal of clinical pathology.* 2014;141(1):102–10.
  159. Mansfield AS, Sukov WR, Eckel-Passow JE, Sakai Y, Walsh FJ, Lonzo M, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and dual-ISH (DISH) in the determination of HER2 status in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(2):144–50.
  160. Layfield LJ, Wallander ML, Tripp SR, Redpath S, Banks PM. Comparison of Dual-ISH (DISH) With Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Correlation With Immunohistochemical Findings for HER2/Neu Status in Breast Carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM.* 2016.
  161. Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, Mozziconacci MJ, Antoine M, Arnould L, et al. SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC cancer.* 2013;13:351.
  162. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer.* 2004;5(1):63-9.
  163. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *The Journal of pathology.* 2003;199(4):418–23.



164. Eswarachary V, Mohammed IG, Jayanna PK, Patilokaly GV, Nargund AR, Dhondalay GK, et al. HER2/neu Testing In 432 Consecutive Breast Cancer Cases using FISH and IHC – A Comparative Study. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(4):EC01–EC5.
165. Solomon JP, Dell'Aquila M, Fadare O, Hasteh F. Her2/neu Status Determination in Breast Cancer: A Single Institutional Experience Using a Dual-Testing Approach With Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization. *Am J Clin Pathol.* 2017;147(4):432–7.
166. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *Journal of clinical pathology.* 2000;53(5):374–81.
167. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):354–63.
168. Ballinger TJ, Sanders ME, Abramson VG. Current HER2 Testing Recommendations and Clinical Relevance as a Predictor of Response to Targeted Therapy. *Clin Breast Cancer.* 2015;15(3):171–80.
169. Tse C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer treatment reviews.* 2012;38(2):133–42.
170. Muller V, Thomssen C, Karakas C, Eustermann I, Ramirez Porras J, Coith C, et al. Quantitative assessment of HER-2/neu protein concentration in breast cancer by enzyme-linked immunosorbent assay. *The International journal of biological markers.* 2003;18(1):13–20.
171. Leyland-Jones B, Smith BR. Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *The Lancet Oncology.* 2011;12(3):286–95.
172. Lam L, McAndrew N, Yee M, Fu T, Tchou JC, Zhang H. Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD. *Biochimica et biophysica acta.* 2012;1826(1):199–208.
173. Carney WP, Litzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast cancer research : BCR.* 2007;9(3):207.
174. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, van Diest PJ. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology.* 2011;80(3):380–92.

175. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y, Yagata H, Yoshida A, Ota H, et al. Serum HER2 levels determined by two methods in patients with metastatic breast cancer. *International journal of clinical oncology*. 2012;17(1):55–62.
176. Lee SB, Lee JW, Yu JH, Ko BS, Kim HJ, Son BH, et al. Preoperative serum HER2 extracellular domain levels in primary invasive breast cancer. *BMC cancer*. 2014;14:929.
177. Shi Y, Huang W, Tan Y, Jin X, Dua R, Penuel E, et al. A novel proximity assay for the detection of proteins and protein complexes: quantitation of HER1 and HER2 total protein expression and homodimerization in formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines and breast cancer tissue. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2009;18(1):11–21.
178. Huang W, Reinholz M, Weidler J, Yolanda L, Paquet A, Whitcomb J, et al. Comparison of central HER2 testing with quantitative total HER2 expression and HER2 homodimer measurements using a novel proximity-based assay. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(2):303–11.
179. Larson JS, Goodman LJ, Tan Y, Defazio-Eli L, Paquet AC, Cook JW, et al. Analytical Validation of a Highly Quantitative, Sensitive, Accurate, and Reproducible Assay (HERmark) for the Measurement of HER2 Total Protein and HER2 Homodimers in FFPE Breast Cancer Tumor Specimens. *Patholog Res Int*. 2010;2010:814176.
180. Yardley DA, Kaufman PA, Huang W, Krekow L, Savin M, Lawler WE, et al. Quantitative measurement of HER2 expression in breast cancers: comparison with 'real-world' routine HER2 testing in a multicenter Collaborative Biomarker Study and correlation with overall survival. *Breast Cancer Res*. 2015;17:41.
181. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn*. 2004;6(1):42–51.
182. Park S, Wang HY, Kim S, Ahn S, Lee D, Cho Y, et al. Quantitative RT-PCR assay of HER2 mRNA expression in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(10):6752–9.
183. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-

- negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical chemistry*. 2007;53(6):1084–91.
184. Susini T, Bussani C, Marini G, Nori J, Olivieri S, Molino C, et al. Preoperative assessment of HER-2/neu status in breast carcinoma: the role of quantitative real-time PCR on core-biopsy specimens. *Gynecologic oncology*. 2010;116(2):234–9.
  185. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC clinical pathology*. 2006;6:2.
  186. Moelans CB, de Weger RA, Ezendam C, van Diest PJ. HER-2/neu amplification testing in breast cancer by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: influence of manual- and laser microdissection. *BMC Cancer*. 2009;9:4.
  187. Moerland E, van Hezik RL, van der Aa TC, van Beek MW, van den Brule AJ. Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting. *Cell Oncol*. 2006;28(4):151–9.
  188. Downs-Kelly E, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Yoder B, Rybicki L, et al. Analytical validation and interobserver reproducibility of EnzMet GenePro: a second-generation bright-field metallography assay for concomitant detection of HER2 gene status and protein expression in invasive carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(11):1505–11.
  189. Varga Z, Tubbs RR, Moch H. Concomitant detection of HER2 protein and gene alterations by immunohistochemistry (IHC) and silver enhanced in situ hybridization (SISH) identifies HER2 positive breast cancer with and without gene amplification. *PLoS One*. 2014;9(8):e105961.
  190. Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP. PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15(3):316–24.
  191. Reisenbichler ES, Horton D, Rasco M, Andea A, Hameed O. Evaluation of dual immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization for HER2 on a single section. *American journal of clinical pathology*. 2012;137(1):102–10.
  192. Nitta H, Kelly BD, Padilla M, Wick N, Brunhoeber P, Bai I, et al. A gene-protein assay for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2):

- brightfield tricolor visualization of HER2 protein, the HER2 gene, and chromosome 17 centromere (CEN17) in formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue sections. *Diagnostic pathology*. 2012;7:60.
193. Li Z, Dabbs DJ, Cooper KL, Bhargava R. Dual HER2 gene protein assay: focused study of breast cancers with 2+ immunohistochemical expression. *American journal of clinical pathology*. 2015;143(3):451–8.
  194. Kurozumi S, Padilla M, Kurozumi M, Matsumoto H, Inoue K, Horiguchi J, et al. HER2 intratumoral heterogeneity analyses by concurrent HER2 gene and protein assessment for the prognosis of HER2 negative invasive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;158(1):99–111.
  195. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, et al. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol*. 2005;205(5):577–84.
  196. Gatta LB, Incardona P, Cadei M, Grigolato P, Simoncelli S, Balzarini P. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and Her-2/neu genotyping (FICTION) in breast carcinoma candidates to target therapy. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2012;20(4):413–20.
  197. Gaiser T, Berroa-Garcia L, Kemmerling R, Dutta A, Ried T, Heselmeyer-Haddad K. Automated analysis of protein expression and gene amplification within the same cells of paraffin-embedded tumour tissue. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2010;33(2):105–12.
  198. Tubbs RR, Das K, Cook JR, Pettay JD, Roche PC, Grogan T. Genotyping of phenotypically defined cells in neoplasia: enhanced immunoFISH via tyramide signal amplification (TSA) segregates immunophenotypically-defined cell populations for gated genotyping. *Journal of molecular histology*. 2007;38(2):129–34.
  199. Alba J, Gutierrez J, Coupe VM, Fernandez B, Vazquez-Boquete A, Alba J, et al. HER2 status determination using RNA-ISH--a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. *Histology and histopathology*. 2012;27(8):1021–7.
  200. Bankfalvi A, Boecker W, Reiner A. Comparison of automated and manual determination of HER2 status in breast cancer for diagnostic use: a comparative methodological study using the Ventana BenchMark automated staining system and manual tests. *Int J Oncol*. 2004;25(4):929–35.

201. Ohlschlegel C, Kradolfer D, Hell M, Jochum W. Comparison of automated and manual FISH for evaluation of HER2 gene status on breast carcinoma core biopsies. *BMC clinical pathology*. 2013;13:13.
202. Gavrielides MA, Gallas BD, Lenz P, Badano A, Hewitt SM. Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(2):233–42.
203. Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN, Burke N, Coppola D, Bui MM. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? *J Pathol Inform*. 2010;1:29.
204. Bruggmann A, Eld M, Lelkaitis G, Nielsen S, Grunkin M, Hansen JD, et al. Digital image analysis of membrane connectivity is a robust measure of HER2 immunostains. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(1):41–9.
205. Dobson L, Conway C, Hanley A, Johnson A, Costello S, O'Grady A, et al. Image analysis as an adjunct to manual HER-2 immunohistochemical review: a diagnostic tool to standardize interpretation. *Histopathology*. 2010;57(1):27–38.
206. Laurinaviciene A, Dasevicius D, Ostapenko V, Jarmalaite S, Lazutka J, Laurinavicius A. Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol*. 2011;6:87.
207. Holten-Rossing H, Moller Talman ML, Kristensson M, Vainer B. Optimizing HER2 assessment in breast cancer: application of automated image analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;152(2):367–75.
208. Helin HO, Tuominen VJ, Ylinen O, Helin HJ, Isola J. Free digital image analysis software helps to resolve equivocal scores in HER2 immunohistochemistry. *Virchows Arch*. 2016;468(2):191–8.
209. Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, Eberhard DA, Young GD, Schmechel SC, et al. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest*. 2012;92(9):1342–57.
210. Buckley NE, Forde C, McArt DG, Boyle DP, Mullan PB, James JA, et al. Quantification of HER2 heterogeneity in breast cancer-implications for identification of sub-dominant clones for personalised treatment. *Sci Rep*. 2016;6:23383.
211. Veta M, Pluim JP, van Diest PJ, Viergever MA. Breast cancer histopathology image analysis: a review. *IEEE transactions on biomedical engineering*. 2014;61(5):1400–11.

212. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *American journal of clinical pathology*. 2001;116(4):495–503.
213. Howat WJ, Blows FM, Provenzano E, Brook MN, Morris L, Gazinska P, et al. Performance of automated scoring of ER, PR, HER2, CK5/6 and EGFR in breast cancer tissue microarrays in the Breast Cancer Association Consortium. *J Pathol Clin Res*. 2015;1(1):18–32.
214. Thakur SS, Li HC, Chan AMY, Tudor R, Bigras G, Morris D, et al. The use of automated Ki67 analysis to predict Oncotype DX risk-of-recurrence categories in early-stage breast cancer. *PloS one*. 2018;13(1).
215. Bankhead P, Fernandez JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab Invest*. 2018;98(1):15–26.
216. Dennis J, Parsa R, Chau D, Koduru P, Peng Y, Fang Y, et al. Quantification of human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry using the Ventana Image Analysis System: correlation with gene amplification by fluorescence in situ hybridization: the importance of instrument validation for achieving high (>95%) concordance rate. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(5):624–31.
217. Peck AR, Gironde MA, Liu C, Kovatich AJ, Hooke JA, Shriver CD, et al. Validation of tumor protein marker quantification by two independent automated immunofluorescence image analysis platforms. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2016;29(10):1143–54.
218. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neumeister VM, Rimm DL. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab Invest*. 2015;95(4):385–96.
219. McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp RL, Rimm DL. Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1808–15.
220. Camp RL, Chung GG, Rimm DL. Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nature medicine*. 2002;8(11):1323–7.

221. Giltane JM, Ryden L, Cregger M, Bendahl PO, Jirstrom K, Rimm DL. Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(21):3007–14.
222. Faratian D, Christiansen J, Gustavson M, Jones C, Scott C, Um I, et al. Heterogeneity mapping of protein expression in tumors using quantitative immunofluorescence. *J Vis Exp*. 2011(56):e3334.
223. Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Livanos G, Zervakis M, Pitas I, Lyroutdia K. Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2007;71(7):439–50.
224. Prins MJ, Rurda JP, van Diest PJ, van Hillegersberg R, ten Kate FJ. Evaluation of the HER2 amplification status in oesophageal adenocarcinoma by conventional and automated FISH: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 2014;67(1):26–32.
225. van der Logt EM, Kuperus DA, van Setten JW, van den Heuvel MC, Boers JE, Schuurin E, et al. Fully automated fluorescent in situ hybridization (FISH) staining and digital analysis of HER2 in breast cancer: a validation study. *PLoS one*. 2015;10(4):e0123201.
226. Stevens R, Almanaseer I, Gonzalez M, Caglar D, Knudson RA, Ketterling RP, et al. Analysis of HER2 gene amplification using an automated fluorescence in situ hybridization signal enumeration system. *J Mol Diagn*. 2007;9(2):144–50.
227. Furrer D, Jacob S, Caron C, Sanschagrín F, Provencher L, Diorio C. Validation of a new classifier for the automated analysis of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene amplification in breast cancer specimens. *Diagn Pathol*. 2013;8:17.
228. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(11):852–4.
229. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(11):855–7.
230. Pfitzner BM, Lederer B, Lindner J, Solbach C, Engels K, Rezai M, et al. Clinical relevance and concordance of HER2 status in local and central

- testing-an analysis of 1581 HER2-positive breast carcinomas over 12 years. *Mod Pathol.* 2018;31(4):607–15.
231. Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Pathology research international.* 2010;2011:903202.
232. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Cooper KL, Chivukula M, McManus K, Bhargava R. The effect of 96-hour formalin fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *American journal of clinical pathology.* 2012;137(5):691–8.
233. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22(11):1457–67.
234. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of pathology and translational medicine.* 2016;50(6):411–8.
235. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, Rowe JJ, Patil D, Lanigan C, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2013;26(1):1–9.
236. Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, England AM, Zarrella ER, Vassilakopoulou M, et al. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. *Journal of the National Cancer Institute.* 2012;104(23):1815–24.
237. Lee AH, Key HP, Bell JA, Kumah P, Hodi Z, Ellis IO. The effect of delay in fixation on HER2 expression in invasive carcinoma of the breast assessed with immunohistochemistry and in situ hybridisation. *Journal of clinical pathology.* 2014;67(7):573–5.
238. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2012;25(8):1098–105.
239. Varga Z, Noske A, Ramach C, Padberg B, Moch H. Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC cancer.* 2013;13:615.



240. Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, Mulligan AM. The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(4):545–52.
241. Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2002;10(2):183–6.
242. Selvarajan S, Bay BH, Choo A, Chuah KL, Sivaswaren CR, Tien SL, et al. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(12):1693–6.
243. Bogdanovska Todorovska M, Petrushevska G, Janevska V, Spasevska L, Kostadinova Kunovska S. Standardization and optimization of fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 assessment in breast cancer: A single center experience. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2018.
244. Cornejo KM, Kandil D, Khan A, Cosar EF. Theranostic and molecular classification of breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):44-56.
245. Han G. ER, PR and HER2 testing in breast cancer. *Diagnostic Histopathology*.20(11):440–5.
246. Kalkman S, Barentsz MW, van Diest PJ. The effects of under 6 hours of formalin fixation on hormone receptor and HER2 expression in invasive breast cancer: a systematic review. *American journal of clinical pathology*. 2014;142(1):16–22.
247. Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Durmuller U, Simon R, et al. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(11):1414–20.
248. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(15):1054–9.
249. Jiang H, Bai X, Zhao T, Zhang C, Zhang X. Fluorescence in situ hybridization of chromosome 17 polysomy in breast cancer using thin tissue sections causes the loss of CEP17 and HER2 signals. *Oncology reports*. 2014;32(5):1889–96.

250. McCampbell AS, Raghunathan V, Tom-Moy M, Workman RK, Haven R, Ben-Dor A, et al. Tissue Thickness Effects on Immunohistochemical Staining Intensity of Markers of Cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2017.
251. Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology--past, present, and future. *Advances in anatomic pathology*. 2010;17(6):404–18.
252. Brunelli M, Nottegar A, Bogina G, Calio A, Cima L, Eccher A, et al. Monosomy of chromosome 17 in breast cancer during interpretation of HER2 gene amplification. *Am J Cancer Res*. 2015;5(7):2212–21.
253. Kouvaras E, Papandreou CN, Daliani DD, Athanasiadis A, Koukoulis GK. Comparative study of spatial localization of HER-2 and CEP17 signals and of HER-2/CEP17 ratios, in "thin" and "thick" tissue sections. *Breast*. 2012;21(1):34–9.
254. Bartley AN, Washington MK, Ventura CB, Ismaila N, Colasacco C, Benson AB, 3rd, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *American journal of clinical pathology*. 2016;146(6):647–69.
255. Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *American journal of clinical pathology*. 2008;129(2):263–73.
256. Bianchi S, Caini S, Paglierani M, Saieva C, Vezzosi V, Baroni G, et al. Accuracy and Reproducibility of HER2 Status in Breast Cancer Using Immunohistochemistry: A Quality Control Study in Tuscany Evaluating the Impact of Updated 2013 ASCO/CAP Recommendations. *Pathology oncology research : POR*. 2015;21(2):477–85.
257. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2001;49(8):931–7.
258. Nunes CB, Rocha RM, Buzelin MA, Balabram D, de Souza Foureaux F, Porto SS, et al. False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(11):946–50.
259. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*. 1994;54(10):2771–7.

260. Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J, et al. Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. *Pathology*. 1994;26(3):261–7.
261. Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(1):434.
262. Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology*. 2004;45(3):207–17.
263. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2001;14(11):1079–86.
264. Hamilton PW, Bankhead P, Wang Y, Hutchinson R, Kieran D, McArt DG, et al. Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods*. 2014;70(1):59–73.
265. Bernasconi B, Chiaravalli AM, Finzi G, Milani K, Tibiletti MG. Genetic heterogeneity in HER2 testing may influence therapy eligibility. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(1):161–8.
266. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, et al. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(3):233–7.
267. Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry--experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC). *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016;468(1):19–29.
268. Bartlett JM, Ibrahim M, Jasani B, Morgan JM, Ellis I, Kay E, et al. External quality assurance of HER2 FISH and ISH testing: three years of the UK national external quality assurance scheme. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(1):106–11.
269. Perez T, Makrestsov N, Garatt J, Torlakovic E, Gilks CB, Mallett S. Modeling Canadian Quality Control Test Program for Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer: Diagnostic Accuracy Study. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2016;24(10):679–87.
270. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1805(1):105–17.
271. Aleskandarany MA, Vandenberghe ME, Marchio C, Ellis IO, Sapino A, Rakha EA. Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology

- to Personalised Medicine. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2018;85(1-2):23–34.
272. Nitta H, Li Z, Reis-Filho J, Sotiriou C, Chenard MP, Nielsen S, et al., editors. HER2 intratumoral heterogeneity in breast cancer: Proposal of a new classification. *VIRCHOWS ARCHIV*; 2017: SPRINGER 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA.
273. Sapino A, Goia M, Recupero D, Marchio C. Current Challenges for HER2 Testing in Diagnostic Pathology: State of the Art and Controversial Issues. *Frontiers in oncology*. 2013;3:129.
274. Allison KH, Dintzis SM, Schmidt RA. Frequency of HER2 heterogeneity by fluorescence in situ hybridization according to CAP expert panel recommendations: time for a new look at how to report heterogeneity. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(6):864–71.
275. Polonia A, Caramelo A. HER2 in situ hybridization test in breast cancer: quantifying margins of error and genetic heterogeneity. *Mod Pathol*. 2021;34(8):1478–86.
276. Chang MC, Malowany JI, Mazurkiewicz J, Wood M. ‘Genetic heterogeneity’ in HER2/neu testing by fluorescence in situ hybridization: a study of 2522 cases. *Modern Pathology*. 2012;25:683.
277. Lewis JT, Ketterling RP, Halling KC, Reynolds C, Jenkins RB, Visscher DW. Analysis of intratumoral heterogeneity and amplification status in breast carcinomas with equivocal (2+) HER-2 immunostaining. *American journal of clinical pathology*. 2005;124(2):273–81.
278. Park SY, Gonen M, Kim HJ, Michor F, Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest*. 2010;120(2):636–44.
279. Natrajan R, Sailem H, Mardakheh FK, Arias Garcia M, Tape CJ, Dowsett M, et al. Microenvironmental Heterogeneity Parallels Breast Cancer Progression: A Histology-Genomic Integration Analysis. *PLoS Med*. 2016;13(2):e1001961.
280. Shannon CE. The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput*. 1997;14(4):306–17.
281. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature*. 1949;163:688.
282. Rao CR. Diversity and dissimilarity coefficients: A unified approach. *Theoretical Population Biology*. 1982;21(1):24–43.
283. Plancoulaine B, Laurinaviciene A, Herlin P, Besusparis J, Meskauskas R, Baltrusaityte I, et al. 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*. 2015.

284. Laurinavicius A, Plancoulaine B, Rasmusson A, Besusparis J, Augulis R, Meskauskas R, et al. Bimodality of intratumor Ki67 expression is an independent prognostic factor of overall survival in patients with invasive breast carcinoma. *Virchows Arch.* 2016;468(4):493–502.
285. Zilenaite D, Rasmusson A, Augulis R, Besusparis J, Laurinaviciene A, Plancoulaine B, et al. Independent Prognostic Value of Intratumoral Heterogeneity and Immune Response Features by Automated Digital Immunohistochemistry Analysis in Early Hormone Receptor-Positive Breast Carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:950.
286. Yang YL, Fan Y, Lang RG, Gu F, Ren MJ, Zhang XM, et al. Genetic heterogeneity of HER2 in breast cancer: impact on HER2 testing and its clinicopathologic significance. *Breast cancer research and treatment.* 2012;134(3):1095–102.
287. Shafi H, Astvatsaturyan K, Chung F, Mirocha J, Schmidt M, Bose S. Clinicopathological significance of HER2/neu genetic heterogeneity in HER2/neu non-amplified invasive breast carcinomas and its concurrent axillary metastasis. *J Clin Pathol.* 2013;66(8):649–54.
288. Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2008;358(13):1409–11.
289. Nitta H, Horii R, Murillo A, Portier B, Akiyama F. Abstract P2-06-02: Breast cancer HER2 epigenetic intratumoral heterogeneity results from lack of HER2 protein translation. *Cancer Research.* 2018;78:P2–06.
290. Nielsen KV, Ejlersen B, Moller S, Jensen MB, Balslev E, Muller S, et al. Lack of independent prognostic and predictive value of centromere 17 copy number changes in breast cancer patients with known HER2 and TOP2A status. *Molecular oncology.* 2012;6(1):88–97.
291. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(12):4393–9.
292. Bose S, Mohammed M, Shintaku P, Rao PN. Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers: possible role of chromosome 17/Her-2/neu polysomy. *Breast J.* 2001;7(5):337–44.
293. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, Tubbs RR, Skacel M, Grogan T, et al. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization,

- immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(9):1221–7.
294. Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens MR, et al. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol.* 2008;26(30):4869–74.
295. Reinholz MM, Bruzek AK, Visscher DW, Lingle WL, Schroeder MJ, Perez EA, et al. Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol.* 2009;10(3):267–77.
296. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res.* 2005;7(2):R267–73.
297. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2002;15(2):137–45.
298. Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;77(2):109–14.
299. Hyun CL, Lee HE, Kim KS, Kim SW, Kim JH, Choe G, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *Journal of clinical pathology.* 2008;61(3):317–21.
300. Ballard M, Jalikis F, Krings G, Schmidt RA, Chen YY, Rendi MH, et al. 'Non-classical' HER2 FISH results in breast cancer: a multi-institutional study. *Mod Pathol.* 2017;30(2):227–35.
301. Moelans CB, van Diest PJ. CEP17 copy number increase does not indicate polysomy 17. *Journal of clinical pathology.* 2014;67(5):454–5.
302. Koudelakova V, Trojanec R, Vrbkova J, Donevska S, Bouchalova K, Kolar Z, et al. Frequency of chromosome 17 polysomy in relation to CEP17 copy number in a large breast cancer cohort. *Genes, chromosomes & cancer.* 2016;55(5):409–17.
303. Marchio C, Lambros MB, Gugliotta P, Di Cantogno LV, Botta C, Pasini B, et al. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol.* 2009;219(1):16–24.

304. Yeh IT, Martin MA, Robetorye RS, Bolla AR, McCaskill C, Shah RK, et al. Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22(9):1169–75.
305. Vranic S, Teruya B, Repertinger S, Ulmer P, Hagenkord J, Gatalica Z. Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. *Cancer.* 2011;117(1):48–53.
306. Varga Z, Tubbs RR, Wang Z, Sun Y, Noske A, Kradolfer D, et al. Co-amplification of the HER2 gene and chromosome 17 centromere: a potential diagnostic pitfall in HER2 testing in breast cancer. *Breast cancer research and treatment.* 2012;132(3):925–35.
307. Press MF. How Is Her-2/neu Status Established When Her-2/neu Gene and Chromosome 17 Centromere Are Both Amplified? *American journal of clinical pathology.* 2006;126(5):673–4.
308. Starczynski J, Atkey N, Connelly Y, O'Grady T, Campbell FM, di Palma S, et al. HER2 gene amplification in breast cancer: a rogues' gallery of challenging diagnostic cases: UKNEQAS interpretation guidelines and research recommendations. *Am J Clin Pathol.* 2012;137(4):595–605.
309. Moelans CB, de Weger RA, van Diest PJ. Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(1):1–7.
310. Griffin BB, Pincus JL, Siziopikou KP, Blanco LZ, Jr. Double-Equivocal HER2 Invasive Breast Carcinomas: Institutional Experience and Review of Literature. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2018.
311. Krishnamurti U, Hammers JL, Atem FD, Storto PD, Silverman JF. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22(8):1044–8.
312. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(10):2572–9.
313. Kokate P, Sawaimoon S, Bhatia S, Mandava S. Evaluation of genetic status of HER-2/neu and aneusomy 17 by fluorescence in situ hybridization and comparison with immunohistochemistry assay from

- Indian breast cancer patients. Genetic testing and molecular biomarkers. 2012;16(4):239–45.
314. Zhang W, Yu Y. The important molecular markers on chromosome 17 and their clinical impact in breast cancer. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(9):5672–83.
315. Orsaria M, Khelifa S, Buza N, Kamath A, Hui P. Chromosome 17 polysomy: correlation with histological parameters and HER2NEU gene amplification. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(12):1070–5.
316. Ji H, Xuan Q, Nanding A, Zhang H, Zhang Q. The Clinicopathologic and Prognostic Value of Altered Chromosome 17 Centromere Copy Number in HER2 Fish Equivocal Breast Carcinomas. *PLoS one*. 2015;10(7):e0132824.
317. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmoller P, Gutjahr T, et al. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol*. 2008;61(1):89–94.
318. Downey L, Livingston RB, Koehler M, Arbushites M, Williams L, Santiago A, et al. Chromosome 17 polysomy without human epidermal growth factor receptor 2 amplification does not predict response to lapatinib plus paclitaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(4):1281–8.
319. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, et al. Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol*. 2010;11(3):266–74.
320. Bartlett JM, McConkey CC, Munro AF, Desmedt C, Dunn JA, Larsimont DP, et al. Predicting Anthracycline Benefit: TOP2A and CEP17-Not Only but Also. *J Clin Oncol*. 2015;33(15):1680–7.
321. Tibau A, Lopez-Vilaro L, Perez-Olabarria M, Vazquez T, Pons C, Gich I, et al. Chromosome 17 centromere duplication and responsiveness to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Neoplasia*. 2014;16(10):861–7.
322. Lee K, Jang MH, Chung YR, Lee Y, Kang E, Kim SW, et al. Prognostic significance of centromere 17 copy number gain in breast cancer depends on breast cancer subtype. *Hum Pathol*. 2017;61:111–20.
323. Fan YS, Casas CE, Peng J, Watkins M, Fan L, Chapman J, et al. HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline. *Breast cancer research and treatment*. 2016;155(3):457–62.



324. Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(5):775–80.
325. Chen X, Yuan Y, Gu Z, Shen K. Accuracy of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status between core needle and open excision biopsy in breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment.* 2012;134(3):957–67.
326. Schalper KA, Kumar S, Hui P, Rimm DL, Gershkovich P. A retrospective population-based comparison of HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast carcinomas: impact of 2007 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists criteria. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2014;138(2):213–9.
327. Nakhleh RE, Grimm EE, Idowu MO, Souers RJ, Fitzgibbons PL. Laboratory compliance with the American Society of Clinical Oncology/college of American Pathologists guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: a College of American Pathologists survey of 757 laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(5):728–34.
328. Garbar C, Savoye AM, Mascaux C, Brabencova E, Cure H. The human epidermal growth factor receptor 2 screening tests for breast cancer suggested by the new updated recommendation of the american society of clinical oncology/college of american pathologists will involve a rise of the in-situ hybridization tests for the European laboratories of pathology. *ISRN oncology.* 2014;2014:793695.
329. Varga Z, Noske A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. *PloS one.* 2015;10(10):e0140652.
330. Tchrakian N, Flanagan L, Harford J, Gannon JM, Quinn CM. New ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing increase the proportion of reflex in situ hybridization tests and of HER2 positive breast cancers. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2016;468(2):207–11.
331. Lambein K, Van Bockstal M, Denys H, Libbrecht L. 2013 update of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline for human epidermal growth factor receptor 2

- testing: impact on immunohistochemistry-negative breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(17):1856–7.
332. Muller KE, Marotti JD, Memoli VA, Wells WA, Tafe LJ. Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 Guideline Updates at an Academic Medical Center That Performs Primary HER2 FISH Testing: Increase in Equivocal Results and Utility of Reflex Immunohistochemistry. *American journal of clinical pathology*. 2015;144(2):247–52.
333. Lim TH, Lim AS, Thike AA, Tien SL, Tan PH. Implications of the Updated 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations on Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Gene Testing Using Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization for Breast Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016;140(2):140–7.
334. Xu FP, Wang K, Xu J, Chen J, Zhang YF, Wu HM, et al. Impact of repeat HER2 testing after initial equivocal HER2 FISH results using 2013 ASCO/CAP guidelines. *Breast cancer research and treatment*. 2017;166(3):757–64.
335. Singh K, Tantravahi U, Lomme MM, Pasquariello T, Steinhoff M, Sung CJ. Updated 2013 College of American Pathologists/American Society of Clinical Oncology (CAP/ASCO) guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) fluorescent in situ hybridization (FISH) testing increase HER2 positive and HER2 equivocal breast cancer cases; retrospective study of HER2 FISH results of 836 invasive breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2016;157(3):405–11.
336. Press MF, Villalobos I, Santiago A, Guzman R, Cervantes M, Gasparyan A, et al. Assessing the New American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines for HER2 Testing by Fluorescence In Situ Hybridization: Experience of an Academic Consultation Practice. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016.
337. Ragazzi M, Bisagni A, Gasparini E, Kuhn E, Bassano C, Tamagnini I, et al. Impact of 2013 ASCO/CAP guidelines on HER2 determination of invasive breast cancer: A single institution experience using frontline dual-color FISH. *Breast*. 2017;34:65–72.
338. Murray C, D'Arcy C, Gullo G, Flanagan L, Quinn CM, Quinn CM. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing by Fluorescent In

- Situ Hybridization: Positive or Negative? ASCO/College of American Pathologists Guidelines 2007, 2013, and 2018. *J Clin Oncol*. 2018;JCO1800788.
339. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321–30.
  340. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921–R5.
  341. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
  342. Emens LA. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(3):511–20.
  343. Truffi M, Sorrentino L, Corsi F. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1234:15–29.
  344. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):2796–801.
  345. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71.
  346. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949–55.
  347. Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J Leukoc Biol*. 2019;105(2):243–55.
  348. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.
  349. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2873–92.
  350. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4).
  351. Paluskiewicz CM, Cao X, Abdi R, Zheng P, Liu Y, Bromberg JS. T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:2453.
  352. Gatti-Mays ME, Balko JM, Gameiro SR, Bear HD, Prabhakaran S, Fukui J, et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2019;5:37.

353. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):448–54.
354. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):40–50.
355. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2016;4:59.
356. Mostafa AA, Codner D, Hirasawa K, Komatsu Y, Young MN, Steimle V, et al. Activation of ERalpha signaling differentially modulates IFN-gamma induced HLA-class II expression in breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87377.
357. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228–41.
358. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. 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.* 2017;24(5):235–51.
359. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. 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.* 2017;24(6):311–35.
360. Laurinavicius A, Rasmusson A, Plancoulaine B, Shribak M, Levenson R. Machine-Learning-Based Evaluation of Intratumoral Heterogeneity and Tumor-Stroma Interface for Clinical Guidance. *Am J Pathol.* 2021;191(10):1724–31.

361. Heindl A, Nawaz S, Yuan Y. Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology. *Lab Invest.* 2015;95(4):377–84.
362. Amgad M, Stovgaard ES, Balslev E, Thagaard J, Chen W, Dudgeon S, et al. Report on computational assessment of Tumor Infiltrating Lymphocytes from the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ Breast Cancer.* 2020;6:16.
363. Sun P, He J, Chao X, Chen K, Xu Y, Huang Q, et al. A Computational Tumor-Infiltrating Lymphocyte Assessment Method Comparable with Visual Reporting Guidelines for Triple-Negative Breast Cancer. *EBioMedicine.* 2021;70:103492.
364. Le H, Gupta R, Hou L, Abousamra S, Fassler D, Torre-Healy L, et al. Utilizing Automated Breast Cancer Detection to Identify Spatial Distributions of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Invasive Breast Cancer. *Am J Pathol.* 2020;190(7):1491–504.
365. Rasmusson A, Zilenaite D, Nestarenkaite A, Augulis R, Laurinaviciene A, Ostapenko V, et al. Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection. *Am J Pathol.* 2020;190(6):1309–22.
366. Weiss SA, Hanniford D, Hernando E, Osman I. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer.* 2015;121(23):4108–23.
367. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S, et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(11):1223–30.
368. Reissfelder C, Stamova S, Gossmann C, Braun M, Bonertz A, Walliczek U, et al. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest.* 2015;125(2):739–51.
369. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2016;2(10):1354–60.
370. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delaloge S, Andre F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1698–704.
371. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R, et al. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-

- positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2019;17(2):2177–86.
372. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y. Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2015;28(12):1621.
373. Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, Haritos C, Vaxevanis CK, Anastasopoulou EA, et al. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2017;5:39.
374. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, Kim HJ, Jang MH, Lee HE, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2705–13.
375. Kaewkangsan V, Verma C, Eremin JM, Cowley G, Ilyas M, Eremin O. Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer. *J Immunol Res.* 2016;2016:4757405.
376. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373–80.
377. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2016;16:687.
378. Kos K, de Visser KE. The Multifaceted Role of Regulatory T Cells in Breast Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2021;5:291–310.
379. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1544–50.
380. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, et al. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer.* 2019;118:41–8.
381. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, Kunz G, Nekljudova V, Schrader I, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative

- breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One*. 2013;8(12):e79775.
382. Perez EA, Ballman KV, Tenner KS, Thompson EA, Badve SS, Bailey H, et al. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(1):56–64.
383. Xuan GR, Zhang W, Chai PQ. EM algorithms of Gaussian Mixture Model and Hidden Markov Model. *Ieee Image Proc*. 2001:145–8.
384. Dempster AP. Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 1977;39:1–38.
385. Haralick R, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1973;SMC-3:610–21.
386. Čekanavičius V. *Statistika ir jos taikymai 2.*, Vilnius. 2002.
387. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 2012;7(12):e51862.
388. Rushing C, Bulusu A, Hurwitz HI, Nixon AB, Pang H. A leave-one-out cross-validation SAS macro for the identification of markers associated with survival. *Comput Biol Med*. 2015;57:123–9.
389. Žilėnaitė D. Imunohistocheminių biožymenų tyrimai hormonų receptorių teigiamos duktalinės krūties karcinomos mikroadplinkos erdviame kontekste skaitmeninės vaizdo analizės metodu. 2021.
390. Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Karayannopoulou G, Kostopoulos I, Bobos M, Bevilacqua G, et al. Evaluation of FISH image analysis system on assessing HER2 amplification in breast carcinoma cases. *Breast*. 2008;17(1):80–4.
391. Stalhammar G, Fuentes Martinez N, Lippert M, Tobin NP, Molholm I, Kis L, et al. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(4):318–29.
392. Barnes M, Srinivas C, Bai I, Frederick J, Liu W, Sarkar A, et al. Whole tumor section quantitative image analysis maximizes between-pathologists' reproducibility for clinical immunohistochemistry-based biomarkers. *Lab Invest*. 2017;97(12):1508–15.
393. Bui MM, Riben MW, Allison KH, Chlipala E, Colasacco C, Kahn AG, et al. Quantitative Image Analysis of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemistry for Breast Cancer: Guideline From

- the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(10):1180–95.
394. Pinhel I, Hills M, Drury S, Salter J, Sumo G, A'Hern R, et al. ER and HER2 expression are positively correlated in HER2 non-overexpressing breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R46.
395. Zody MC, Garber M, Adams DJ, Sharpe T, Harrow J, Lupski JR, et al. DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature.* 2006;440(7087):1045–9.
396. Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, et al. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J Clin Oncol.* 2020;38(17):1951–62.
397. Eiger D, Agostinetti E, Saude-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2021;13(5).
398. Marchio C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol.* 2021;72:123–35.
399. Iwata H, Tamura K, Doi T, Tsurutani J, Modi S, Park H, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in subjects with HER2-expressing solid tumors: Long-term results of a large phase 1 study with multiple expansion cohorts. *American Society of Clinical Oncology*; 2018.
400. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(17):1887–96.
401. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev.* 2008;29(2):217–33.
402. Nicholson RI, Hutcheson IR, Britton D, Knowlden JM, Jones HE, Harper ME, et al. Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;93(2-5):257–62.
403. Cui J, Germer K, Wu T, Wang J, Luo J, Wang SC, et al. Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2012;72(21):5625–34.
404. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone



- receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(2):142–53.
405. Kim HJ, Cui X, Hilsenbeck SG, Lee AV. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 2):1013s–8s.
406. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer.* 2014;110(3):565–72.
407. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics.* 2012;6:289–97.
408. Lee K, Kim HJ, Jang MH, Lee S, Ahn S, Park SY. Centromere 17 copy number gain reflects chromosomal instability in breast cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):17968.
409. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology.* 1986;10(5):437–59.
410. Chen Z, Chen X, Zhou E, Chen G, Qian K, Wu X, et al. Intratumoral CD8(+) cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(4):e95475.
411. Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M, Kruger DT, Beelen KJ, van der Noort V, et al. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):90.
412. Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar TA, Terracciano L, Foulkes WD. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology.* 2011;58(7):1107–16.
413. Verma R, Hanby AM, Horgan K, Verghese ET, Volpato M, Carter CR, et al. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;183(1):49–59.
414. Nuciforo P, Pascual T, Cortes J, Llombart-Cussac A, Fasani R, Pare L, et al. A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade. *Ann Oncol.* 2018;29(1):170–7.

415. Griguolo G, Pascual T, Dieci MV, Guarneri V, Prat A. Interaction of host immunity with HER2-targeted treatment and tumor heterogeneity in HER2-positive breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):90.
416. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*. 2010;18(2):160–70.
417. Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiow SF, Duret H, Yagita H, et al. Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(17):7142–7.
418. Bianchini G, Gianni L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol*. 2014;15(2):e58–68.
419. Kim RS, Song N, Gavin PG, Salgado R, Bandos H, Kos Z, et al. Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in NRG Oncology/NSABP B-31 Adjuvant Trial for Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(8):867–71.

## PRIEDAI

### 1 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 6B-13-90



#### LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Biudžetinė įstaiga, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,  
faks. (8 5) 260 8640, el. p. [lbeik@sam.lt](mailto:lbeik@sam.lt), <http://bioetika.sam.lt>  
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

Biomedicininio tyrimo pagrindinei tyrėjai  
Aidai Laurinavičienei

2013-03-18 Nr. 6B-13-90  
į 2013-01-03  
2013-02-14

El. paštas: [Gedmante.Radziuviene@vpc.lt](mailto:Gedmante.Radziuviene@vpc.lt)

kodas: 07-06-07

#### DĖL BIOMEDICININIO TYRIMO „MOLEKULINIŲ KRŪTIES VĖŽIO ŽYMNŲ VERTĖ NUSTATANT LIGOS EIGOS IR GYDYMO YPATUMUS“

Susipažinę su Jūsų 2013 m. sausio 4 d. gautu prašymu (registracijos Nr. 5B-13-04) dėl biomedicininio tyrimo „Molekulinių krūties vėžio žymenų vertė nustatant ligos eigos ir gydymo ypatumus“ (protokolo Nr. 40) trukmės pratęsimo bei tyrimo protokolo atnaujinimo, informuojame, kad Lietuvos bioetikos komitetas neprieštarauja minėto biomedicininio tyrimo pratęsimui iki 2016 m. liepos mėn. ir neprieštarauja atnaujinto tyrimo protokolo naudojimui. Taip pat informuojame, jog Lietuvos bioetikos komitetas neprieštarauja ir tyrėjų profesoriaus Arvydo Laurinavičiaus, dr. Juozo Rimanto Lazutkos, Gėdantės Radžiuvienės bei gyd. Indros Baltrušaitytės dalyvavimui biomedicininiame tyrime „Molekulinių krūties vėžio žymenų vertė nustatant ligos eigos ir gydymo ypatumus“.

Be to, 2013 m. vasario 19 d. vykusiame Lietuvos bioetikos komiteto Biomedicininių tyrimų ekspertų grupės posėdyje buvo svarstomas Jūsų prašymas, atleisti nuo reikalavimo gauti asmens sutikimą, papildomai ištiriant 300 Valstybinio Patologijos Centro archyve esančius parafininius mėginius. Posėdžio metu nutarta atleisti nuo reikalavimo gauti asmens sutikimą, atliekant minėtą biomedicininį tyrimą.

Norėtume atkreipti dėmesį, kad vadovaujantis Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymu „Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo“ (Žin., 2008, Nr. 6-225; 2010, Nr. 55-2706; 2011, Nr. 233-1570) 18<sup>l</sup> punktu biomedicininio tyrimo užsakovas, jo įgaliotas atstovas ar tyrimo pagrindinis tyrėjas per 30 kalendorinių dienų privalo raštu pranešti leidimą atlikti biomedicininį tyrimą išdavusiai institucijai (Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininių tyrimų etikos komitetui) apie tyrimo pabaigą ir per 90 kalendorinių dienų pateikti tyrimo vykdymo ataskaitos santrauką.

Direktorius

Eugenijus Gefenas

## 2 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 6B-16-161



### LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Biudžetinė įstaiga, Vilniaus g. 16, LT-01402 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,  
faks. (8 5) 260 8640, el. p. [lbek@bioetika.sam.lt](mailto:lbek@bioetika.sam.lt), <http://bioetika.sam.lt>  
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

---

Gedmantei Radžiuvienei  
[Gedmante.radziuviene@vpc.lt](mailto:Gedmante.radziuviene@vpc.lt)

2016-07-04 Nr. 6B-16-161  
i Nr.  
kodas: 07-06-07

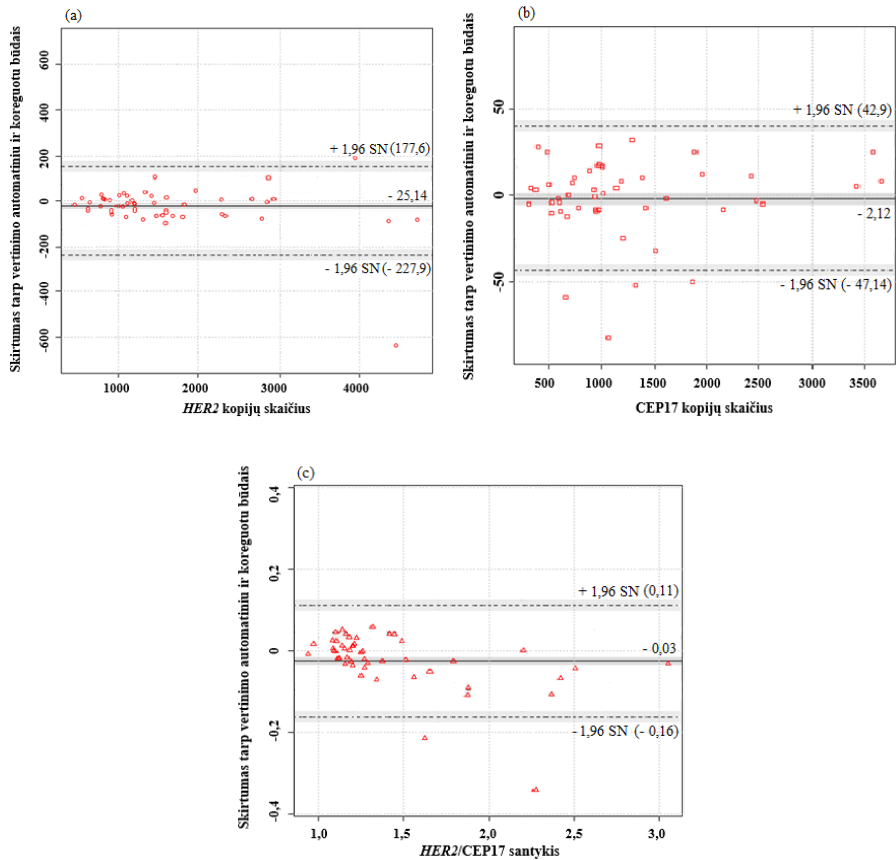
#### DĖL BIOMEDICININIO TYRIMO NR. 40

Susipažinę su Jūsų 2016 m. gegužės 19 d. gautu prašymu dėl tyrimo „Molekulinių krūties vėžio žymenų vertė nustatant ligos eigos ir gydymo ypatumus“ (protokolo Nr. 40) informuojame, kad Lietuvos bioetikos komitetas neprieštariauja tyrimo pratęsimui iki 2019 m. sausio mėn.

Direktorius

Eugenijus Gefenas

**3 priedas.** FISH signalų nustatymo skirtumai tarp automatinio ir koreguoto vertinimo būdų: a) *HER2* kopijų skaičiaus (vidurkių skirtumas – 25,14,  $p = 0,0072$  (ištisinė linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 227,9, viršutinė riba 177,6 (punktyrinės linijos)); b) *CEP17* kopijų skaičiaus (vidurkių skirtumas – 2,12,  $p = 0,6614$  (ištisinė linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 47,14, viršutinė riba 42,9 (punktyrinės linijos)); c) *HER2/CEP17* santykio (vidurkių skirtumas – 0,03,  $p = 0,0149$  (ištisinė linija), matavimų skirtumų apatinė riba – 0,16, viršutinė riba 0,11 (punktyrinės linijos)).



*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; *CEP17* – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; SN – standartinis nuokrypis.

**4 priedas.** FISH rodiklių, gautų atliekant automatinę analizę ir vertinant mikroskopu, tarpusavio ryšių rezultatai (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės)

Rodiklis	HER2_M	CEP17_M	HER2/CEP17_M	HER2_A	CEP17_A	HER2/CEP17_A	AmpL%_M	AmpL%_A	HER2_AshD	CEP17_AshD	HER2/CEP17_AshD	Branduolių dydis	HER2_BI	CEP17_BI	HER2/CEP17_BI
HER2_M	1														
CEP17_M	<b>0,34</b> 0,02	1													
HER2/CEP17_M	<b>0,8</b> < 0,0001	-0,27 0,06	1												
HER2_A	<b>0,91</b> < 0,0001	<b>0,31</b> 0,03	<b>0,73</b> < 0,0001	1											
CEP17_A	<b>0,31</b> 0,03	<b>0,89</b> < 0,0001	-0,24 0,1	<b>0,35</b> 0,01	1										
HER2/CEP17_A	<b>0,72</b> < 0,0001	-0,28 0,051	<b>0,92</b> < 0,0001	<b>0,76</b> < 0,0001	<b>-0,32</b> 0,02	1									
AmpL%_M	<b>0,69</b> < 0,0001	<b>-0,43</b> 0,005	<b>0,83</b> < 0,0001	<b>0,59</b> < 0,0001	-0,28 0,07	<b>0,72</b> < 0,0001	1								
AmpL%_A	<b>0,76</b> < 0,0001	-0,11 0,44	<b>0,88</b> < 0,0001	<b>0,78</b> < 0,0001	-0,14 0,32	<b>0,92</b> < 0,0001	<b>0,74</b> < 0,0001	1							
HER2_AshD	0,15 0,31	0,17 0,24	0,01 0,93	0,16 0,26	0,22 0,13	-0,03 0,86	-0,007 0,9	0,03 0,84	1						
CEP17_AshD	-0,06 0,7	0,03 0,83	-0,13 0,38	-0,06 0,68	0,12 0,42	-0,19 0,2	-0,03 0,86	-0,14 0,34	<b>0,29</b> 0,04	1					
HER2/CEP17_AshD	<b>0,54</b> < 0,0001	0,08 0,59	<b>0,49</b> 0,0003	<b>0,57</b> < 0,0001	0,1 0,49	<b>0,47</b> 0,0006	<b>0,41</b> 0,008	<b>0,52</b> < 0,0001	<b>0,32</b> 0,03	0,02 0,89	1				
Branduolių dydis	<b>0,29</b>	0,08	0,25	<b>0,35</b>	0,09	<b>0,29</b>	0,15	<b>0,31</b>	-0,12	0,1	0,13	1			

	0,04	0,6	0,08	0,01	0,52	0,04	0,35	0,03	0,4	0,48	0,35				
<i>HER2</i> _BI	<b>-0,72</b> < 0,0001	<b>-0,31</b> 0,03	<b>-0,59</b> < 0,0001	<b>-0,73</b> < 0,0001	-0,26 0,07	<b>-0,62</b> < 0,0001	<b>-0,38</b> 0,02	<b>-0,68</b> < 0,0001	0,22 0,13	<b>0,32</b> 0,02	<b>-0,33</b> 0,02	-0,23 0,1	1		
CEP17_BI	<b>-0,38</b> 0,01	<b>-0,75</b> < 0,0001	0,08 0,59	<b>-0,33</b> 0,03	<b>-0,85</b> < 0,0001	0,24 0,13	0,06 0,75	0,04 0,82	-0,26 0,09	-0,15 0,36	-0,09 0,55	-0,18 0,25	0,29 0,06	1	
<i>HER2</i> /CEP17_BI	<b>-0,29</b> 0,04	0,24 0,1	<b>-0,46</b> 0,0007	<b>-0,3</b> 0,03	0,26 0,07	<b>-0,51</b> 0,0002	<b>-0,4</b> 0,009	<b>-0,5</b> 0,0002	0,18 0,21	0,25 0,08	0,11 0,46	-0,15 0,31	<b>0,34</b> 0,02	-0,16 0,33	1

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; *HER2*\_M, CEP17\_M, *HER2*/CEP17\_M – mikroskopu nustatyti atitinkamai *HER2*, CEP17 kopijų skaičius bei *HER2*/CEP17 santykis; *HER2*\_A, CEP17\_A, *HER2*/CEP17\_A – automatine analize nustatyti atitinkamai *HER2*, CEP17 kopijų skaičius bei *HER2*/CEP17 santykis; amp\_%\_M ir amp\_%\_A - amplifikuotų ląstelių procentinės dalys, nustatytos mikroskopu ir automatine analize; AshD – Ašmano D bimodalitės rodiklis; BI – bimodalitės indeksas. Paryškinti statistškai reikšmingi koreliacijos koeficientai.

**5 priedas.** *HER2* FISH rodiklių, gautų automatine analize bei vertinant mikroskopu, pasuktų veiksmių struktūra

<b>Rodiklis</b>	<b>1 veiksnys</b>	<b>2 veiksnys</b>	<b>3 veiksnys</b>
amp_%_A	0,94417	- 0,24872	- 0,1008
<i>HER2</i> /CEP17_M	0,93852	- 0,24069	- 0,06523
<i>HER2</i> /CEP17_A	0,93578	- 0,24086	- 0,12421
amp_%_M	0,90412	- 0,18301	- 0,05237
<i>HER2</i> _A	0,87620	0,39889	0,07985
<i>HER2</i> _M	0,87342	0,40326	0,04503
<i>HER2</i> /CEP17_AshD	0,58526	0,03489	0,48597
Branduolių dydis	0,34081	0,09432	- 0,01018
<i>HER2</i> _BI	- 0,68591	- 0,42381	0,37431
CEP17_M	- 0,08560	0,95189	0,11186
CEP17_A	- 0,07906	0,92753	0,20470
CEP17_BI	- 0,11475	- 0,69350	0,42455
<i>HER2</i> _AshD	0,09314	0,11001	0,74157
CEP17_AshD	- 0,10454	- 0,09680	0,66970
<i>HER2</i> /CEP17_BI	- 0,43345	0,21325	0,48284

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija; *HER2*\_A, CEP17\_A, *HER2*/CEP17\_A – automatine analize nustatyti atitinkamai *HER2*, CEP17 kopijų skaičius bei *HER2*/CEP17 santykis; *HER2*\_M, CEP17\_M, *HER2*/CEP17\_M – mikroskopu nustatyti atitinkamai *HER2*, CEP17 kopijų skaičius bei *HER2*/CEP17 santykis; amp\_%\_A ir amp\_%\_M – amplifikuotų ląstelių procentinės dalys, nustatytos automatine analize ir mikroskopu; *HER2*\_AshD, CEP17\_AshD ir *HER2*/CEP17\_AshD – Ašmano D rodikliai, apskaičiuoti automatinio būdu nustatytiems *HER2*, CEP17 bei *HER2*/CEP17 santykiui; *HER2*\_BI, CEP17\_BI ir *HER2*/CEP17\_BI – bimodališkumo indeksai, apskaičiuoti automatinio būdu nustatytiems *HER2*, CEP17 bei *HER2*/CEP17 santykiui.



**6 priedas.** Visų atvejų klasteriuose charakteristikos: amplifikacijos būklė, genetinis heterogeniškumas (GH), padidėję CEP17 kopijų skaičius, bimodališkumas

Klasteris	ID	HER2 būklė	GH	CEP17 kop. sk. padidėjimas	HER2_bim	CEP17_bim	HER2/CEP17_bim
1	1	Amplifikuota	Ne	Ne	Taip	Taip	Taip
2	2	Amplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	3	Amplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	4	Amplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	5	Amplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	6	Amplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
2	23	Amplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Taip
2	7	Amplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
2	8	Amplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
2	9	Amplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
3	10	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Taip	Ne
3	11	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	12	Neamplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
3	35	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Ne	Ne
3	13	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	14	Neamplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
3	15	Paribinė	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
3	16	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Taip
3	17	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	18	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Taip	Ne
3	19	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Taip	Ne
3	20	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	21	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	22	Neamplifikuota	Ne	Ne	Taip	Ne	Taip
3	46	Neamplifikuota	Ne	Taip	Taip	Taip	Ne
3	24	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Klasteris	ID	<i>HER2</i> būklė	GH	CEP17 kop. sk. padidėjimas	<i>HER2_bim</i>	CEP17_bim	<i>HER2/CEP17_bim</i>
3	26	Paribinė	Taip	Ne	Ne	Ne	Ne
3	27	Paribinė	Ne	Ne	Ne	Taip	Ne
4	28	Amplifikuota	Taip	Taip	Taip	Taip	Ne
4	29	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Ne	Ne
4	30	Amplifikuota	Taip	Taip	Ne	Taip	Ne
4	31	Paribinė	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	32	Paribinė	Taip	Taip	Ne	Ne	Ne
4	33	Paribinė	Ne	Ne	Taip	Ne	Ne
4	34	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Ne	Ne
4	36	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Taip	Ne
4	37	Paribinė	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	38	Paribinė	Ne	Ne	Taip	Ne	Taip
4	39	Paribinė	Taip	Taip	Taip	Ne	Ne
4	40	Paribinė	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	41	Paribinė	Taip	Taip	Taip	Taip	Ne
4	42	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Ne	Ne
4	43	Paribinė	Taip	Ne	Taip	Ne	Ne
4	44	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Taip	Ne
4	45	Paribinė	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	47	Paribinė	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	48	Neamplifikuota	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	49	Amplifikuota	Ne	Taip	Ne	Ne	Ne
4	25	Neamplifikuota	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
4	50	Paribinė	Ne	Taip	Taip	Ne	Ne

*HER2* – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; GH – genetinis heterogeniškumas; *HER2\_bim*, CEP17\_bim ir *HER2/CEP17\_bim* – *HER2*, CEP17 bei *HER2/CEP17* bimodališkumas; ID – atvejų identifikacijos numeris.

**7 priedas.** IHC žymenų Haralicko tekstūros rodiklių tarpusavio ryšių analizės *HER2* neamplifikuotuose navikuose rezultatai (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės))

Rodiklis	Energija	Homogeniškumas	Entropija	Kontrastas	Skirtingumas
<b>HER2</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,94</b> < 0,0001	1			
Entropija	-0,88 < 0,0001	-0,79 < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,84 < 0,0001	-0,89 < 0,0001	0,85 < 0,0001	1	
Skirtingumas	<b>-0,92</b> < 0,0001	<b>-0,98</b> < 0,0001	0,77 < 0,0001	<b>0,90</b> < 0,0001	1
<b>HER2 MV</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,95</b> < 0,0001	1			
Entropija	-0,83 < 0,0001	-0,81 < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,83 < 0,0001	<b>-0,91</b> < 0,0001	0,68 < 0,0001	1	
Skirtingumas	<b>-0,94</b> < 0,0001	<b>-0,99</b> < 0,0001	0,81 < 0,0001	<b>0,95</b> < 0,0001	1
<b>ER</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,98</b> < 0,0001	1			
Entropija	<b>-0,98</b> < 0,0001	<b>-0,98</b> < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,8 < 0,0001	-0,87 < 0,0001	0,88 < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,82 < 0,0001	-0,88 < 0,0001	0,85 < 0,0001	<b>0,96</b> < 0,0001	1
<b>PR</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,94</b> < 0,0001	1			
Entropija	-0,79 < 0,0001	-0,79 < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,77 < 0,0001	-0,81 < 0,0001	<b>0,95</b> < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,79 < 0,0001	-0,81 < 0,0001	<b>0,98</b> < 0,0001	<b>0,98</b> < 0,0001	1
<b>Ki67</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,97</b> < 0,0001	1			
Entropija	<b>-0,99</b> < 0,0001	<b>-0,96</b> < 0,0001	1		

Kontrastas	-0,82 < 0,0001	-0,86 < 0,0001	0,86 < 0,0001	1	
Skirtingumas	<b>-0,95</b> < 0,0001	<b>-0,99</b> < 0,0001	<b>0,96</b> < 0,0001	0,87 < 0,0001	1

Paryškintos reikšmės rodo labai stiprius ryšius tarp kintamųjų ( $r > 0,9$  arba  $r > -0,9$ ).

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriai; MV – membranos vientisumas; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesteronų receptoriai.

**8 priedas.** IHC žymenų Haralicko tekstūros rodiklių tarpusavio ryšių analizės *HER2* amplifikuotuose navikuose rezultatai (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės)

Rodiklis	Energija	Homogeniškumas	Entropija	Kontrastas	Skirtingumas
<b>HER2</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,9</b> < 0,0001	1			
Entropija	-0,89 < 0,0001	-0,79 < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,81 < 0,0001	<b>-0,9</b> < 0,0001	0,87 < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,86 < 0,0001	<b>-0,98</b> < 0,0001	0,77 < 0,0001	<b>0,94</b> < 0,0001	1
<b>HER2 MC</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,9</b> < 0,0001	1			
Entropija	<b>-0,97</b> < 0,0001	<b>-0,92</b> < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,84 < 0,0001	<b>-0,94</b> < 0,0001	0,89 < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,89 < 0,0001	<b>-0,99</b> < 0,0001	<b>0,9</b> < 0,0001	<b>0,96</b> < 0,0001	1
<b>ER</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,96</b> < 0,0001	1			
Entropija	<b>-0,98</b> < 0,0001	<b>-0,96</b> < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,74 < 0,0001	-0,8 < 0,0001	0,81 < 0,0001	1	
Skirtingumas	<b>-0,93</b> < 0,0001	<b>-0,98</b> < 0,0001	<b>0,94</b> < 0,0001	0,78 < 0,0001	1
<b>PR</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	<b>0,97</b> < 0,0001	1			
Entropija	-0,82 < 0,0001	-0,8 < 0,0001	1		
Kontrastas	-0,83 < 0,0001	-0,84 < 0,0001	<b>0,95</b> < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,84 < 0,0001	-0,84 < 0,0001	<b>0,99</b> < 0,0001	<b>0,99</b> < 0,0001	1
<b>Ki67</b>					
Energija	1				
Homogeniškumas	0,88 < 0,0001	1			
Entropija	<b>-0,99</b> < 0,0001	-0,86 < 0,0001	1		

Kontrastas	-0,83 < 0,0001	-0,84 < 0,0001	0,85 < 0,0001	1	
Skirtingumas	-0,79 < 0,0001	-0,79 < 0,0001	0,8 < 0,0001	<b>0,98</b> < 0,0001	1

Paryškintos reikšmės rodo labai stiprius ryšius tarp kintamųjų ( $r > 0,9$  arba  $r > -0,9$ ).

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriai; MV – membranos vientisumas; ER – estrogenų receptoriai; PR – progesteronų receptoriai.

**9 priedas.** CD8+ ląstelių tankio ir imunogradiento rodiklių tarpusavio ryšių analizės *HER2* neamplifikuotuose navikuose rezultatai (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės))

Rodiklis	CD8_ t_S	CD8_ sn_S	CD8_ t_NK	CD8_ sn_NK	CD8_ t_N	CD8_ sn_N	CD8_ MC_t	CD8_ MC_sn	CD8_ IN_t
CD8_ t_S	1								
CD8_ sn_S	<b>0,97</b> < 0,0001	1							
CD8_ t_NK	0,89 < 0,0001	0,85 < 0,0001	1						
CD8_ sn_NK	0,89 < 0,0001	0,89 < 0,0001	<b>0,97</b> < 0,0001	1					
CD8_ t_N	0,72 < 0,0001	0,65 < 0,0001	<b>0,92</b> < 0,0001	0,84 < 0,0001	1				
CD8_ sn_N	0,75 < 0,0001	0,71 < 0,0001	<b>0,93</b> < 0,0001	0,89 < 0,0001	<b>0,97</b> < 0,0001	1			
CD8_ MC_t	0,06 0,49	0,01 0,94	0,39 < 0,0001	0,3 0,0001	0,61 < 0,0001	0,56 < 0,0001	1		
CD8_ MC_sn	0,1 0,2	0,04 0,66	0,42 < 0,0001	0,35 < 0,0001	0,59 < 0,0001	0,59 < 0,0001	0,89 < 0,0001	1	
CD8_ IN_t	0,02 0,8	0,09 0,28	-0,36 < 0,0001	-0,24 0,0021	-0,67 < 0,0001	-0,59 < 0,0001	-0,78 < 0,0001	-0,7 < 0,0001	1

CD8\_t\_S, CD8\_t\_NK, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos atitinkamai stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_S, CD8\_sn\_NK, CD8\_sn\_N – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos atitinkamai stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; CD8\_MC\_t ir MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis. Paryškintos reikšmės rodo labai stiprius ryšius tarp kintamųjų ( $r > 0,9$ ).

**10 priedas.** CD8+ ląstelių tankio ir imunogradiento rodiklių tarpusavio ryšių analizės *HER2* amplifikuotuose navikuose rezultatai (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės))

Rodiklis	CD8_ t_S	CD8_ sn_S	CD8_ t_NK	CD8_ sn_NK	CD8_ t_N	CD8_ sn_N	CD8_ MC_t	CD8_ MC_sn	CD8_ IN_t
CD8_ t_S	1								
CD8_ sn_S	<b>0,96</b> < 0,0001	1							
CD8_ t_NK	0,88 < 0,0001	0,81 < 0,0001	1						
CD8_ sn_NK	0,87 < 0,0001	0,87 < 0,0001	<b>0,95</b> < 0,0001	1					
CD8_ t_N	0,69 < 0,0001	0,62 < 0,0001	<b>0,92</b> < 0,0001	0,84 < 0,0001	1				
CD8_ sn_N	0,7 < 0,0001	0,66 < 0,0001	<b>0,9</b> < 0,0001	0,88 < 0,0001	<b>0,96</b> < 0,0001	1			
CD8_ MC_t	0,08 0,38	0,05 0,63	0,45 < 0,0001	0,37 < 0,0001	0,66 < 0,0001	0,63 < 0,0001	1		
CD8_ MC_sn	0,13 0,18	0,08 0,42	0,44 < 0,0001	0,39 < 0,0001	0,6 < 0,0001	0,62 < 0,0001	0,88 < 0,0001	1	
CD8_ IN_t	-0,05 0,62	0,03 0,74	-0,46 < 0,0001	-0,35 0,0001	-0,74 < 0,0001	-0,68 < 0,0001	-0,77 < 0,0001	-0,67 < 0,0001	1

CD8\_t\_S, CD8\_t\_NK, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis sąveikos zonos atitinkamai stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_S, CD8\_sn\_NK, CD8\_sn\_N – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos atitinkamai stromos (S), naviko krašto (NK) ir naviko (N) srityse; CD8\_MC\_t ir MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis. Paryškintos reikšmės rodo labai stiprius ryšius tarp kintamųjų ( $r > 0,9$ ).



**11 priedas.** IHC, FISH, VH ir CD8+ ląstelių tankio rodiklių koreliacijų matrica (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės)  
*HER2* neamplifikuotų navikų grupėje

Rodiklis	HER2_MV	ER %	PR %	Ki67 %	<i>HER2</i> kopijų skaičius	HER2/CEP17_S	amp_%_S	amp_%_HER2	HER2_MV_entropija	ER_kontrastas	PR_entropija	Ki67_entropija	CD8_MC_t	CD8_MC_sn	CD8_LS	CD8_LN	CD8_sn_NK
HER2_MV	1																
ER %	0,1 0,23	1															
PR %	-0,13 0,11	0,12 0,15	1														
Ki67 %	<b>0,17</b> 0,03	-0,16 0,05	-0,15 0,07	1													
<i>HER2</i> kopijų skaičius	-0,01 0,94	-0,07 0,39	0,05 0,52	0,1 0,22	1												
<i>HER2</i> /CEP17_S	0,05 0,51	- <b>0,17</b> 0,03	-0,14 0,08	0,02 0,79	<b>0,55</b> < 0,0001	1											
amp_%_S	0,02 0,83	-0,1 0,21	-0,04 0,67	0,03 0,67	<b>0,55</b> < 0,0001	<b>0,57</b> < 0,0001	1										
amp_%_HER2	0,03 0,74	-0,06 0,46	0,14 0,09	0,08 0,35	<b>0,66</b> < 0,0001	<b>0,34</b> < 0,0001	<b>0,5</b> < 0,0001	1									
HER2_MV_entropija	-0,05 0,56	- <b>0,22</b> 0,007	0,07 0,36	0,01 0,91	0,06 0,49	0,02 0,85	0,05 0,56	0,01 0,88	1								
ER_kontrastas	-0,01 0,9	- <b>0,4</b> < 0,0001	-0,05 0,55	-0,005 0,95	-0,08 0,3	-0,12 0,15	-0,13 0,11	-0,05 0,53	<b>0,19</b> 0,02	1							
PR_entropija	-0,13 0,1	-0,02 0,77	<b>0,41</b> < 0,0001	0,03 0,73	0,04 0,65	-0,03 0,68	0,11 0,88	0,06 0,43	0,13 0,12	<b>0,19</b> 0,02	1						
Ki67_entropija	<b>0,17</b> 0,04	-0,15 0,06	-0,09 0,29	0,83 < 0,0001	<b>0,19</b> 0,02	0,08 0,3	0,05 0,51	0,14 0,08	0,08 0,3	0,04 0,6	0,07 0,37	1					
CD8_MC_t	-0,03 0,73	- <b>0,22</b> 0,007	0,06 0,44	-0,02 0,77	-0,03 0,98	-0,03 0,68	-0,03 0,73	0,06 0,46	0,12 0,14	<b>0,21</b> 0,008	0,01 0,86	-0,11 0,18	1				
CD8_MC_sn	-0,01 0,88	- <b>0,2</b> 0,01	0,03 0,72	0,06 0,48	-0,008 0,92	-0,1 0,22	-0,01 0,91	0,06 0,49	0,14 0,08	<b>0,23</b> 0,0046	0,004 0,96	-0,03 0,75	<b>0,89</b> < 0,0001	1			

CD8_t_S	0,01 0,93	<b>-0,2</b> 0,01	0,01 0,87	0,12 0,14	-0,003 0,97	-0,07 0,37	0,02 0,8	0,06 0,47	0,03 0,71	<b>0,27</b> 0,0006	0,05 0,53	0,13 0,11	0,07 0,41	0,12 0,14	1			
CD8_t_N	-0,04 0,6	<b>-0,33</b> < 0,0001	0,08 0,31	0,06 0,47	0,04 0,66	-0,08 0,31	0,03 0,76	0,12 0,15	0,09 0,28	<b>0,4</b> < 0,0001	0,1 0,24	0,04 0,59	<b>0,62</b> < 0,0001	<b>0,6</b> < 0,0001	<b>0,72</b> < 0,0001	1		
CD8_sn_NK	0,01 0,95	<b>-0,23</b> 0,0004	0,01 0,89	0,13 0,1	0,03 0,74	-0,06 0,42	0,02 0,85	0,1 0,24	0,03 0,69	<b>0,37</b> < 0,0001	0,09 0,26	0,13 0,11	<b>0,32</b> < 0,0001	<b>0,37</b> < 0,0001	<b>0,89</b> < 0,0001	<b>0,84</b> < 0,0001	1	

Dėl gausaus kintamųjų kiekio lentelėje pateikti tik tų kintamųjų tarpusavio koreliacijų rezultatai, kurie, įverinus KMO rodiklį (žr. 3.2.3 skyrių), buvo įtraukti į faktoriinę analizę. IHC – imunohistochemija; FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija; VH – vidunavikinis heterogeniškumas; HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; *HER2/CEP17\_S - HER2/CEP17* santykis; amp\_%\_S ir amp\_%\_HER2 – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant atitinkamai *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijų skaičių; CD8\_MC\_t ir CD8\_MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_t\_S, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos atitinkamai stromos (S) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_NK – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje. Paryškinti statistiškai reikšmingi koreliacijos koeficientai.

**12 priedas.** IHC, FISH, VH ir CD8+ ląstelių tankio rodiklių koreliacijų matrica (koreliacijos koeficientai (*r*) ir *p* reikšmės) *HER2* amplifikuotų navikų grupėje

Rodiklis	HER2_MV	ER %	PR %	Ki67 %	<i>HER2</i> kopijų skaičius	HER2/CEP17_S	amp_%_S	amp_%_HER2	ER_entropija	PR_entropija	Ki67_entropija	CD8_MC_t	CD8_MC_sn	CD8_t_S	CD8_t_N	CD8_sn_NK
HER2_MV	1															
ER %	<b>0,33</b> 0,0002	1														
PR %	0,07 0,94	<b>0,46</b> < 0,0001	1													
Ki67 %	-0,07 0,47	<b>-0,39</b> < 0,0001	<b>-0,34</b> 0,0002	1												
<i>HER2</i> kopijų skaičius	<b>-0,2</b> 0,028	-0,18 0,05	0,01 0,9	0,1 0,3	1											
<i>HER2</i> /CEP17_S	-0,05 0,62	-0,05 0,56	0,02 0,86	-0,02 0,85	<b>0,47</b> < 0,0001	1										
amp_%_S	-0,05 0,63	-0,06 0,54	-0,02 0,83	-0,09 0,35	<b>0,45</b> < 0,0001	<b>0,83</b> < 0,0001	1									
amp_%_HER2	-0,08 0,38	0,05 0,56	0,13 0,15	0,08 0,37	<b>0,71</b> < 0,0001	<b>0,38</b> < 0,0001	<b>0,44</b> < 0,0001	1								
ER_entropija	0,09 0,33	<b>0,23</b> 0,01	0,06 0,5	<b>-0,32</b> 0,0004	-0,02 0,84	-0,06 0,53	0,03 0,72	0,03 0,77	1							
PR_entropija	0,12 0,2	<b>0,51</b> < 0,0001	<b>0,63</b> < 0,0001	<b>-0,31</b> 0,0006	-0,14 0,13	-0,05 0,57	-0,12 0,24	-0,02 0,83	0,14 0,14	1						
Ki67_entropija	-0,16 0,09	<b>-0,39</b> < 0,0001	<b>-0,33</b> 0,0003	<b>0,8</b> < 0,0001	0,11 0,25	0,05 0,58	0,02 0,86	0,11 0,22	<b>-0,03</b> 0,0009	<b>-0,32</b> 0,0004	1					
CD8_MC_t	0,001 0,99	<b>-0,19</b> 0,04	-0,07 0,48	0,1 0,27	0,14 0,13	0,11 0,22	0,05 0,62	0,08 0,41	0,1 0,27	-0,04 0,66	-0,01 0,89	1				
CD8_MC_sn	0,04 0,68	-0,14 0,12	-0,06 0,54	0,13 0,15	0,16 0,09	0,06 0,53	0,05 0,62	0,13 0,18	0,09 0,35	-0,05 0,57	-0,004 0,97	<b>0,88</b> < 0,0001	1			
CD8_t_S	<b>-0,22</b> 0,01	-0,15 0,1	-0,08 0,39	0,11 0,25	0,06 0,5	-0,002 0,98	0,02 0,82	-0,01 0,91	0,1 0,27	-0,17 0,06	0,13 0,17	0,08 0,37	0,13 0,18	1		

CD8_t_N	-0,12 0,18	-0,16 0,07	-0,06 0,54	0,05 0,6	0,1 0,3	0,09 0,35	0,04 0,67	0,03 0,76	<b>0,23</b> 0,01	-0,1 0,28	0,02 0,86	<b>0,66</b> < 0,0001	<b>0,6</b> < 0,0001	<b>0,69</b> < 0,0001	1	
CD8_sn_NK	<b>-0,22</b> 0,02	<b>-0,3</b> 0,0014	<b>-0,19</b> 0,04	0,17 0,07	0,12 0,21	0,07 0,45	0,05 0,56	0,01 0,88	0,13 0,18	<b>-0,27</b> 0,003	<b>0,19</b> 0,04	<b>0,37</b> < 0,0001	<b>0,39</b> < 0,0001	<b>0,87</b> < 0,0001	<b>0,84</b> < 0,0001	1

Dėl gausaus kintamųjų kiekio lentelėje pateikti tik tų kintamųjų tarpusavio koreliacijų rezultatai, kurie, įvertinus KMO rodiklį, (žr. 3.2.3 skyrių), buvo įtraukti į faktoriinę analizę. IHC – imunohistochemija; FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija; VH – vidunavikinis heterogeniškas; HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; *HER2/CEP17\_S – HER2/CEP17* santykis; amp\_%\_S ir amp\_%\_HER2 – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant atitinkamai *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijų skaičių; CD8\_MC\_t ir CD8\_MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_t\_S, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos atitinkamai stromos (S) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_NK ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje. Paryškinti statistiškai reikšmingi koreliacijos koeficientai.

**13 priedas.** Pasuktų IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo ir CD8+ ląstelių tankio veiksmų struktūra *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje

Rodiklis	1 veiksny	2 veiksny	3 veiksny	4 veiksny	5 veiksny	6 veiksny
HER2 MV	0,004	-0,0015	0,0785	0,3526	-0,2656	-0,2859
ER %	-0,2089	-0,1315	-0,1101	-0,0747	-0,7408	0,1712
PR %	0,0204	0,0216	0,0771	-0,1111	-0,1407	0,8313
Ki67 %	0,0617	0,0257	0,0154	0,9384	0,0409	-0,0241
<i>HER2</i> kopijų sk.	-0,0011	0,8579	0,0118	0,0992	-0,0051	0,0887
<i>HER2/CEP17_S</i>	-0,0921	0,7622	-0,0853	-0,0058	0,1184	-0,1998
amp_%_S	0,0141	0,8196	-0,0302	-0,0299	0,0264	-0,0554
amp_%_HER2	0,0929	0,7720	0,0841	0,0774	-0,0922	0,1853
CD8_MC_t	0,1185	-0,0001	0,9576	-0,0638	0,1148	0,0059
CD8_MC_sn	0,1502	-0,0257	0,9462	0,0238	0,1073	-0,0078
CD8_t_S	0,9583	0,0004	-0,0656	0,0711	0,0489	0,0199
CD8_sn_NK	0,9416	0,0198	0,1948	0,0805	0,1119	0,0268
CD8_t_N	0,7880	0,0265	0,5202	0,0076	0,1605	0,0722
HER2_MV entropija	-0,1214	0,0417	0,0761	0,0422	0,637	0,1909
ER_kontrastas	0,3504	-0,1675	0,1057	-0,0396	0,6358	0,0277
PR_entropija	0,0579	-0,0049	-0,0507	0,0831	0,2026	0,7797
Ki67_entropija	0,0725	0,0991	-0,0960	0,9259	0,1139	0,0516

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas; *HER2/CEP17\_S* – *HER2/CEP17* santykis; amp\_%\_S ir amp\_%\_HER2 – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant atitinkamai *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijų skaičių; CD8\_MC\_t ir CD8\_MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_t\_S, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos atitinkamai stromos (S) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_NK – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje.

**14 priedas.** Pasuktų IHC, FISH, vidunavikinio heterogeniškumo ir CD8+ ląstelių tankio veiksmų struktūra *HER2* amplifikuotų navikų grupėje

Rodiklis	1 veiksny	2 veiksny	3 veiksny	4 veiksny	5 veiksny	6 veiksny
HER2 MV	0,0729	-0,1633	0,0645	-0,0448	0,0541	0,8948
ER %	-0,0229	-0,0512	-0,1799	-0,2788	0,6445	0,4554
PR %	0,0601	-0,0283	-0,0278	-0,1593	0,8629	-0,1056
Ki67 %	-0,0068	0,0818	0,1023	0,8965	-0,2169	0,0526
<i>HER2</i> kopijų sk.	0,7669	0,0098	0,1445	0,1277	0,0264	-0,2848
<i>HER2/CEP17_S</i>	0,8469	0,031	0,0023	-0,0679	-0,1061	0,0904
amp_%_S	0,8680	0,032	-0,0549	-0,1483	-0,1627	0,0967
amp_%_HER2	0,7540	-0,0206	0,0945	0,1828	0,2316	-0,0934
CD8_MC_t	0,0638	0,1637	0,9529	-0,0247	-0,0582	0,0024
CD8_MC_sn	0,0685	0,1666	0,9368	0,0249	-0,0245	0,0416
CD8_t_S	-0,0016	0,9541	-0,0677	0,0527	-0,0625	-0,1129
CD8_sn_NK	0,0301	0,9277	0,3055	0,0042	-0,0884	-0,0748
CD8_t_N	0,0342	0,7992	0,5414	-0,0767	-0,0488	-0,0358
ER_entropija	0,0154	0,2572	0,0705	-0,5380	0,0492	0,2314
PR_entropija	-0,0891	-0,0961	0,0122	-0,1678	0,8236	0,0801
Ki67_entropija	0,0737	0,1200	-0,0543	0,8692	-0,2374	-0,0051

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksmo receptoriaus 2; MV – membranos vientisumas; *HER2/CEP17\_S* – *HER2/CEP17* santykis; amp\_%\_S ir amp\_%\_HER2 – amplifikuotų ląstelių procentinė dalis vertinant atitinkamai *HER2/CEP17* santykį ir *HER2* kopijų skaičių; CD8\_MC\_t ir CD8\_MC\_sn – atitinkamai CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis ir standartinis nuokrypis; CD8\_t\_S, CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos atitinkamai stromos (S) ir naviko (N) srityse; CD8\_sn\_NK – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) srityje.

**15 priedas.** Daugiaveiksnių Kokso regresijos modelių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą *HER2* neamplifikuotų navikų grupėje

Modelio kintamieji	Modelio pasikartojimai	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
<b>1 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV HER2 MV_kontrastas	1	4,74	0,029
N grupė (N0 ir N1-3) HER2_energija HER2 MV_entropija ER_kontrastas	1	5,12	0,024
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV ER_kontrastas	7	4,6	0,032
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV HER2 MV_entropija	16	6,51	0,011
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV HER2 MV_entropija ER_kontrastas	130	8,44	0,011
HER2 MV	1	9,58	< 0,0001
HER2 MV HER2 MV_entropija	2	5,11	0,024
<b>2 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) CD8_MC_t CD8_t_N	1	12,51	0,006
CD8_MC_t CD8_t_N CD8_sn_NK	150	11,67	0,004
T grupė (T1-2 ir T3-4) CD8_MC_t CD8_t_N CD8_sn_NK	2	11,32	0,008
T grupė (T1-2 ir T3-4) CD8_MC_t CD8_sn_NK	1	9,27	0,023
T grupė (T1-2 ir T3-4) CD8_sn_S CD8_t_N CD8_sn_NK	1	3,99	0,037
<b>3 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 %	1	13,19	

HER2 MV HER2 MV_kontrastas CD8_sn_S CD8_t_N			
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV HER2 MV_kontrastas CD8_MC_t CD8_t_N CD8_sn_NK	1	14,4	0,013
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV HER2 MV_entropija CD8_t_N CD8_sn_NK	1	13,24	0,006
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV HER2 MV_kontrastas ER_kontrastas CD8_t_N CD8_sn_NK	1	13,58	0,009
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV HER2 MV_entropija ER_kontrastas CD8_MC_t CD8_t_N CD8_sn_NK	138	16,85	0,005
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV CD8_t_N CD8_sn_NK	6	14,72	0,022
T grupė (T1-2 ir T3-4) HER2 MV CD8_t_N CD8_sn_NK CD8_IN_t	3	5,32	0,037

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2; MV – membranos vientisumas; ER – estrogenų receptoriai; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; T – pirminis naviko dydis; CD8\_MC\_t – CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos naviko (N) srityje; CD8\_sn\_NK ir CD8\_sn\_S – ląstelių tankio standartinis nuokrypis sąveikos zonos naviko krašto (NK) ir stromos (S) srityse; CD8\_IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis.

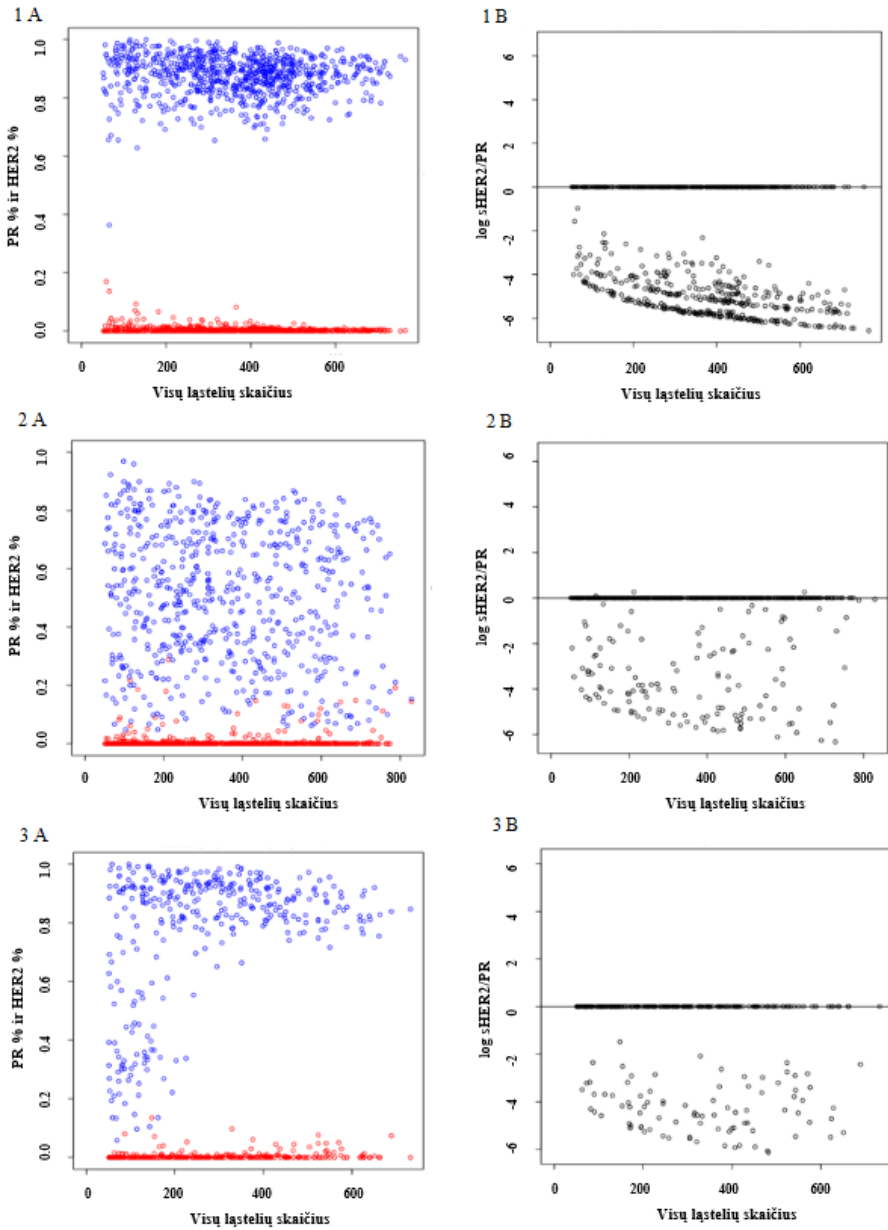


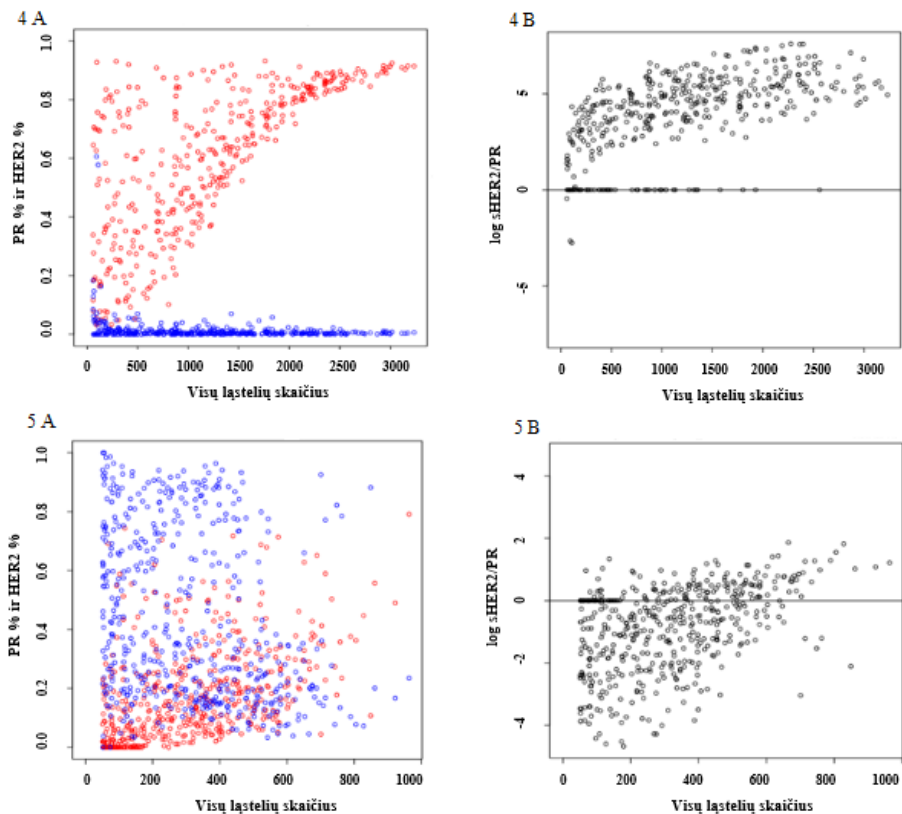
**16 priedas.** Daugiaveiksnių Kokso regresijos modelių atrankos rezultatai, taikant vienos dalies atidėjimo kryžminį patikrinimą HER2 amplifikuotų navikų grupėje

Modelio kintamieji	Modelio pasikartojimai	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
<b>4 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas CEP17 kopijų skaičius	93	8,46	0,004
N grupė (N0 ir N1-3) HER2_entropija CEP17 kopijų skaičius	8	11,01	0,001
N grupė (N0 ir N1-3) HER2_entropija PR_AshD	1	9,8	0,002
N grupė (N0 ir N1-3) CEP17 kopijų skaičius	6	11,23	0,035
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas Ki67_entropija	1	6,33	0,011
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas Ki67_entropija PR_AshD	1	5,74	0,017
<b>5 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) CD8_IN_t	39	7,91	0,005
N grupė (N0 ir N1-3) CD8_t_N	73	7,92	0,005
T grupė (T1-2 ir T3-4) CD8_IN_t	1	8,056	0,005
<b>6 modelis</b>			
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas CEP17 kopijų skaičius CD8_t_N	110	13,38	0,0003
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas CEP17 kopijų skaičius CD8_MC_t	4	12,79	0,0004
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas PR_AshD CD8_t_N	1	11,88	0,0006
N grupė (N0 ir N1-3) HER2 MV_kontrastas CEP17 kopijų skaičius CD8_IN_t	1	8,43	0,004

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2; MV – membranos vientisumas; CEP17 – 17 chromosomos centromerą žymintis zondas; PR – progesteronų receptoriai; N – išplitimas į sritinius limfmazgius; T – pirminis naviko dydis; AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis; CD8\_MC\_t – CD8+ ląstelių tankio masės centro vidurkis; CD8\_t\_N – CD8+ ląstelių tankio vidurkis (ląstelės/mm<sup>2</sup>) sąveikos zonos stromos naviko (N) srityje; CD8\_IN\_t – CD8+ ląstelių tankio imunonuokryčio vidurkis.

17 priedas. PR ir HER2 regioninių sąveikų formų pavyzdžiai.

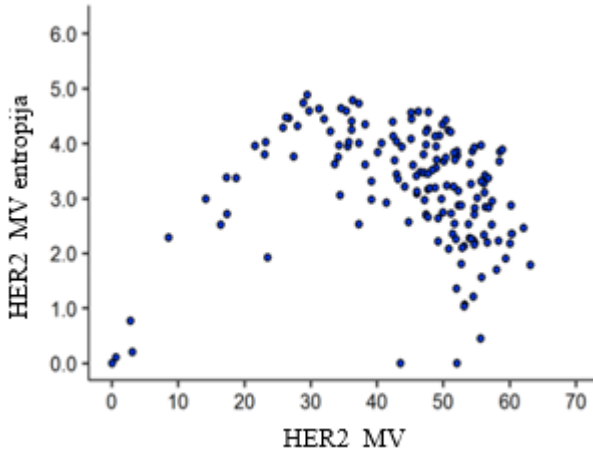




5-ųjų atvejų, kurių PR ir HER2 raiškos pasiskirstymo formos skirtingos, pavyzdžiai: (1–5 A) išsibarstymo grafikai, kuriuose Y ašyje atidėti PR % (mėlyni burbuliukai) ir HER2 % (raudoni burbuliukai), o X ašyje – visų ląstelių skaičius. Norint parodyti abiejų baltymų ekspresiją tame pačiame šešiakampyje, tas pats burbuliukas pavaizduotas du kartus. (1–5 B) išsibarstymo grafikai, kuriuose Y ašyje atidėtas  $\log_5 \text{HER2/PR}$ , o X ašyje – visų ląstelių skaičius. 1A, 1 B atveju dominuoja PR ekspresija, HER2 raiška yra minimali; 2 A, 2 B atveju PR raiška heterogeniška, HER2 raiška minimali; 3 A, 3 B atveju PR raiška bimodališka, HER2 raiška minimali; 4 A, 4 B atveju dominuoja HER2 ekspresija, PR raiška yra minimali; 5 A, 5 B atveju PR ir HER2 raiška yra heterogeniška.

HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2; PR – progesterono receptoriai.

**18 priedas.** HER2 membranos vientisumo ir jo entropijos ryšys



Išsibarstymo grafike parodytas netiesinis ryšys tarp HER2 MV ir jo entropijos kintamųjų, kuris buvo teigiamas kryptimi iš kairės apatinės dalies į dešinę viršutinę dalį (mažiau vienodas membranos nusidažymas) ir neigiamas kryptimi iš kairės viršutinės dalies į apatinę dešinę dalį (vienodesnis membranos nusidažymas).  
HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių 2; MV – membranos vientisumas.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui prof. dr. Arvydui Laurinavičiui už galimybę studijuoti doktorantūroje, kad mokėte ir drąsinote eiti šiuo pažinimo ir atradimų keliu. Jūsų pamokos, perteiktos žinios, optimistinis ir palaikantis požiūris augino norą pažinti, eiti į priekį ir tobulėti. Ačiū Jums už plačiai atvertą išminties ir idėjų pasaulį.

Nuoširdžiai dėkoju doc. dr. Aidai Laurinavičienei už paskatinimą rinktis šias studijas ir palaikymą jų metu.

Dėkoju šio darbo konsultantui prof. habil. dr. Juozui Rimantui Lazutkai už naudingas pastabas ir patarimus.

Dėkoju kolegai Renaldui Auguliui už pagalbą ieškant atsakymų į rūpimus klausimus, už vertingus patarimus ir konsultacijoms skirtą laiką.

Ačiū Valstybinio patologijos centro darbuotojams, geranoriškai prisidėjusiems įvairiuose šio darbo etapuose.

Dėkoju savo šeimai – vyrui ir vaikams, Mamytei ir Tėveliui už palaikymą, pagalbą, rūpestį ir supratingumą.

Tariu ačiū savo artimiesiems ir draugams, palaikiusiems ir tikėjusiems mano sėkme.

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 20 egz.