

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Dovilė
ŽILĖNAITĖ

Imunohistocheminių biožymenų tyrimai
hormonų receptorių teigiamos
duktalinės krūties karcinomos
mikroaplinkos erdviniam kontekste
skaitmeninės vaizdo analizės metodu

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS, 2021

Disertacija rengta 2015–2020 metais Valstybiniame patologijos centre, VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (doktorantūra buvo finansuojama ES struktūrinių fondų lėšomis).

Mokslinis vadovas

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

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.142>

<https://orcid.org/0000-0002-7221-2868>

VILNIUS UNIVERSITY

Dovilė
ŽILĖNAITĖ

Assessing Immunohistochemistry Biomarkers in the Spatial Context of the Microenvironment of Hormone Receptor-Positive Ductal Breast Carcinoma by Digital Image Analysis

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS, 2021

This dissertation was written between 2015 and 2020 at the National Center of Pathology, affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos. The research was supported by the Research Council of Lithuania (the doctoral studies were financed from the EU structural funds).

Academic supervisor

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

TURINYS

SANTRUMPŲ SAŖAŠAS	8
1. ĮVADAS	10
1.1. Tiriamojo darbo problema ir jos aktualumas	10
1.2. Tyrimo tikslas	12
1.3. Darbo uždaviniai	12
1.4. Ginamieji disertacijos teiginiai	12
1.5. Darbo naujumas ir reikšmė	13
1.6. Darbo aprobacija (publikacijos ir pranešimai)	14
2. LITERATŪROS APŽVALGA	16
2.1. Krūties vėžys pasaulyje ir Lietuvoje	16
2.2. Krūties vėžio rizikos veiksniai, genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai	16
2.3. Krūties vėžio karcinogenezės mechanizmai	18
2.4. Krūties vėžio diagnostika	21
2.4.1 TNM klasifikavimas ir krūties vėžio skirstymas pagal stadijas	21
2.4.2 Krūties vėžio skirstymas pagal histologinius tipus	23
2.4.3 Krūties vėžio skirstymas pagal molekulinis biožymenis	24
2.5. Naviko mikroaplinka	27
2.5.1 Krūties vėžys ir naviką infiltruojantys limfocitai	28
2.5.2 Sąsaja tarp naviką infiltruojančių limfocitų ir pacientų prognozės	30
2.5.3 Naviką infiltruojančių limfocitų nustatymas krūties navikuose	33
2.6. Naviko heterogeniškumas	36
2.6.1 Tarpnavikinis heterogeniškumas	36
2.6.2 Vidunavikinis heterogeniškumas	37
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA	39
3.1. Tyrimo strategija	39
3.2. Tiriamųjų imtis ir charakteristika	40
3.3. Tyrimo metodai	43

3.3.1	Krūties vėžio audinių paruošimas	43
3.3.2	Imunohistocheminiai tyrimai	44
3.3.3	Skaitmeninė vaizdo analizė ir krūties vėžio audinio klasifikavimas..	47
3.3.4	Kiekybinė imunohistocheminių biožymenų analizė	48
3.3.5	Krūties vėžio audinio dalijimas į šešiakampius elementus	51
3.3.6	Naviko ir stromos sąveikos krašto bei sąveikos zonos nustatymas....	53
3.3.7	CD8+ ląstelių tankio profilių ir imunogradiento rodiklių nustatymas	57
3.3.8	Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių nustatymas	60
3.3.9	Statistinė duomenų ir rezultatų analizė	62
4.	REZULTATAI.....	65
4.1.	Tinkamiausias sąveikos krašto ir sąveikos zonos plotis.....	65
4.2.	CD8+ ląstelių tankio rodiklių aprašomosios statistikos rezultatai	68
4.3.	CD8+ ląstelių tankio rodiklių tarpusavio sąsajos.....	70
4.4.	CD8+ ląstelių tankio rodiklių ryšių struktūra.....	70
4.5.	Imunogradiento rodiklių prognozinė vertė.....	72
4.6.	Standartinių krūties vėžio biožymenų skaitmeninės vaizdo analizės ir patologo įvertinimo rezultatų palyginimas	76
4.7.	Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių aprašomosios statistikos rezultatai	77
4.8.	Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių tarpusavio sąsajos	80
4.9.	Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių ryšių struktūra.....	81
4.10.	Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių prognozinė vertė	83
4.11.	Netiesinė priklausomybė tarp progesterono receptoriaus raiškos ir vidunavikinio heterogeniškumo	89
4.12.	Progesterono receptoriaus raiškos prognozinė vertė remiantis vidunavikinio heterogeniškumo savybėmis	90
5.	REZULTATŲ APTARIMAS	91

5.1. Sąveikos krašto ir sąveikos zonos nustatymo rezultatų aptarimas	91
5.2. Sąsajos tarp imunogradiento rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas	94
5.3. Sąsajos tarp imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių bei išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas.....	96
5.3.1 Sąsajos tarp imuninių atsaką apibūdinančių rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas.....	98
5.3.2 Sąsajos tarp hormonų receptorių rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas	99
5.3.3 Sąsajos tarp vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas	101
5.4. Tyrimo tęstinumas.....	102
IŠVADOS.....	104
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	105
PRIEDAI	135
PADĖKA.....	151
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS	152

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis (angl. *Ashman's D*)
CD8_IN_vid – CD8+ ląstelių imunonukryčio vidurkis
CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis
CD8_sn – CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis
CD8_vid – CD8+ ląstelių tankio vidurkis
CTL – CD8+ citotoksinės T ląstelės
DCIS – duktalinė karcinoma *in situ*
dIHC – dviguba imunohistochemija
ER – estrogenų receptorius
ER– – neigiama estrogenų receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo estrogenų receptoriaus raiškos
ER+ – teigiama estrogenų receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo estrogenų receptoriaus raišką
ER α/β – estrogeno receptoriaus α/β izoforma
f – fono klasės santykinis plotas
G – diferenciacijos laipsnis
HER1/2 – 1/2-asis žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius
HER2+ – teigiama 2-ojo žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo 2-ojo žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus raišką
hex – šešiakampis gardelės elementas
HIF1/2 α/β – 1/2-asis α/β hipoksijos indukuotas veiksnys
HR – hormonų receptorius
HR– – neigiama hormonų receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo estrogenų receptoriaus ir progesteronų receptoriaus raiškos
HR+ – teigiama hormonų receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo estrogenų receptoriaus ir progesteronų receptoriaus raišką
HRDK – hormonų receptorių teigiama duktalinė karcinoma
i – kintamojo išvestinė
IHC – imunohistochemija
IK – invazijos kraštas
IL-1/4/5/6/10/13/35 – 1/4/5/6/10/13/35-asis interleukinas
IN – imunonukrytis
JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos
KMO – Kaizerio–Mejerio–Olkino matas
KV – krūties vėžys
LCIS – lobulinė karcinoma *in situ*
M – išplitimas į tolimuosius organus

MC – masės centras
N – išplitimas į sritinius limfmazgius
n – naviko klasės santykinis plotas
NA – navikinis audinys arba navikinio audinio dalis
NIL – naviką infiltruojantys limfocitai
NŽ – natūrali žudikė (angl. *natural killer*)
p – santykinis plotas
PD-1 – 1-asis užprogramuotas ląstelių mirties baltymas
PD-L1/2 – 1/2-asis užprogramuotas ląstelių mirties baltymo ligandas
PgR – progesteronų receptoriai
PgR– – neigiama progesteronų receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo progesterono receptoriaus raiškos
PgR+ – teigiama progesteronų receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo progesterono receptoriaus raišką
PgR-A/B – progesteronų receptoriaus A/B izoforma
PR – pavojaus rizikos santykis (angl. *hazard ratio*)
S – stroma arba stromos audinio dalis
s – stromos klasės santykinis plotas
SATB1 – 1-asis savitas prie A ir T bazių porų besijungiantis baltymas
SATB1+CD8+ – SATB1 ir CD8 raišką vykdančios ląstelės
SATB1+CD8– – SATB1 raišką vykdančios ir CD8 nevykdančios ląstelės
SATB1–CD8+ – SATB1 raiškos nevykdančios ir CD8 vykdančios ląstelės
SK – sąveikos kraštas
SK_{1/3} – 1/3 šešiakampių gardelių elementų pločio sąveikos kraštas
SVA – skaitmeninė vaizdo analizė
SZ – sąveikos zona
SZ_{3/5/7/9} – 3/5/7/9 šešiakampių gardelių elementų pločio sąveikos zona
T – pirminis naviko dydis
TGF-β – β transformuojantis augimo veiksnys
TNF-α/β – α/β naviko nekrozės veiksnys
TNKV – trejopai neigiamas krūties vėžys
TNM – pirminio naviko dydžio, išplitimo į sritinius limfmazgius ir tolimųjų metastazių įvertinimo sistema
T_{reg} – T reguliacinės ląstelės
TS – tikėtinumumo santykis (angl. *likelihood ratio*)
VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys
vIHC – vienguba imunohistochemija

1. ĮVADAS

1.1. Tiriamojo darbo problema ir jos aktualumas

Krūties vėžys (KV) – vienas labiausiai paplitusių piktybinių navikų pasaulyje. Tai pagrindinė onkologinė moterų mirties priežastis¹⁻⁵. Pasaulio sveikatos organizacijos Tarptautinės navikų tyrimų agentūros duomenimis^{5,6}, 2018 m. pasaulyje diagnozuoti 2 088 849 nauji susirgimai KV, mirė 626 679 moterys. Sukaupta nemažai žinių apie KV biologiją, genetinius aspektus ir klinikinę gydymo patirtį, tačiau KV sergantys pacientai į prognozes grupes iki šiol skirstomi remiantis morfologiniais KV progresijos bruožais – dydžiu, išplitimu į limfmazgius ir tolimuosius organus, histologiniu diferenciacijos laipsniu bei standartinių KV prognozių ir predikcinių estrogenų (ER), progesteronų receptorių (PgR), 2-ojo žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus (HER2) ir Ki67 biožymenų raiškos įvertinimu naviko audinyje⁷⁻⁹. Pagrindiniai KV gydymo metodai: chirurginė operacija, endokrininė hormonų ir biologinė terapija, radioterapija ir chemoterapija¹⁰. Dėl KV heterogeniškumo net ir būdingus klinikinius ir patologinius požymius turinčių pacientų KV prognozė ir atsakas į gydymą yra labai skirtingi, todėl, siekiant pagerinti KV sergančių pacientų prognozę ir gydymo sprendimus, būtina atsižvelgti ir į kitus, iki šiol neakcentuotus aspektus, į tyrimą įtraukti naujus biožymenis.

Navikų biologijos tyrimų pažanga ne tik leido suprasti naviko karcinogenezės ir vystymosi procesus, bet ir suteikė pagrindą personalizuotoms terapijoms, kurių didžioji dalis yra nukreiptos prieš naviko ląsteles¹¹. Vis dėlto šių terapijų klinikinį naudingumą riboja didelis naviko ląstelių populiacijų heterogeniškumas ir netolydus pasiskirstymas individualiame navike¹². Pastarųjų metų tyrimai¹³⁻¹⁷ atskleidė, kad naviko mikroaplinka yra kur kas svarbesnė, negu buvo manyta iki šiol, – ji dalyvauja ląstelių epiteliniame ir mezenchiminiame virsme, skatina angiogenezę, naviko ląstelių išplitimą, imuninę infiltraciją, o išreguluotas imuninis atsakas ir ląstelių tarpusavio sąveikos skatina naviko progresiją ir terapijos atsparumą, taip veikdamos naviko gydymą ir prognozę. Taigi, galima teigti, kad naviko mikroaplinka yra kritinė naviko ląstelių „partnerė“¹⁸, ir kelti hipotezę, kad išsami naviko ląstelių ir mikroaplinkos profilių analizė naviko erdviniam kontekste gali atskleisti tarp naviko ir imuninės sistemos komponentų vykstančių sąveikų dinamiką bei suteikti ne tik prognozinę, bet ir predikcinę vertę. Vienas iš svarbiausių naviko mikroaplinkos elementų – naviką infiltruojantys limfocitai (NIL). Apie šių

limfocitų įtaką pacientų prognozei žinoma jau nuo XIX a.^{19, 20}, tačiau tik neseniai atlikti išsamūs tyrimai, įrodantys NIL klinikinę reikšmę^{21–23}.

Storosios žarnos navikų imunohistocheminiai (IHC) ir skaitmeninės vaizdo analizės (SVA) imuninių ląstelių tyrimai²² leido nustatyti, kad NIL sudėtis, ypač CD8+ ir CD3+ T ląstelės, tankis ir jų pasiskirstymas naviko audinyje (centre arba periferijoje), turi didelę prognozinę vertę. Nepaisant to, tiriant KV, NIL įvertinimas iki šiol nėra įdiegtas į kasdienę klinikinę praktiką^{24–26}, nors Tarptautinė imunoonkologinių biožymenų darbo grupė NIL įvertinimo rekomendacijas pateikė dar 2017 m.^{25, 26}. Remiantis šiomis gairėmis, NIL tyrimas turėtų būti atliekamas hematoksilinu ir eozinu dažytuose mėginiuose pusiau kiekybiniu būdu, nustatant erdvinis aspektus – 1 mm pločio invazijos kraštą (IK), kuris skiria navikinį audinį nuo aplinkinio stromos komponento^{25–27}. Rekomendacijomis siekta suvienodinti NIL tyrimus įvairiuose navikuose, tačiau, analizuojant naviko mikroaplinką pagal šias gaires, nėra galimybės įvertinti imuninių ląstelių sudėtį, kiekybinis ir erdvinis įvertinimas yra subjektyvus ir labai priklauso nuo vertintojo patirties. Dėl minėtų priežasčių, atliekant tyrimus^{22, 23, 28–31}, pasiūlyta taikyti IHC metodą, kuris leidžia ne tik nustatyti imuninio komponento fenotipą, bet ir apibūdinti naviką dvimatėje erdvėje. Taip gaunama daugiau informacijos apie biologines sąveikas naviko mikroaplinkos kontekste. Dviguba IHC šį metodą gali sustiprinti, nes suteikiama galimybė nustatyti ląstelės tipą ir jos biologines savybes^{32, 33}. Vis dėlto tyrimai^{28, 34}, leidžiantys įvertinti erdvinis aspektus – atskirti navikinio audinio regionus ir automatizuotu būdu nustatyti naviko ir stromos sąveikos zoną (SZ), iki šiol yra pavieniai. Gauti prieštaringi rezultatai, vertinant NIL ir KV sergančių pacientų prognozę^{29, 35–40}, ypač plačiausioje KV grupėje – hormonų receptorių teigiamose duktalinėse karcinomose (HRDK), rodo, kad NIL tyrimas pagal vizualaus įvertinimo mikroskopuojant rekomendacijas nėra pakankamai tikslus. Priešingai, NIL įvertinimas, taikant IHC ir SVA metodus, leistų gauti tikslius kiekybinius parametrus, tokius kaip konkrečių imuninių ląstelių skaičius, paviršiaus plotas ar kiti rodikliai. Be to, taikant šešiakampių gardelių analitiką ir erdvinės statistikos metodus, kai kurių tyrėjų darbuose^{41–43} rekomenduotus Ki67 heterogeniškumui įvertinti, būtų galima automatiškai vizualizuoti navikinio audinio komponentus, įvertinti žymenų erdvinį pasiskirstymą, o nustatytus esminius imuninį atsaką apibūdinančius rodiklius susieti su pacientų išgyvenamumo duomenimis.

Nepaisant pažangos matuojant imuninį atsaką, fundamentalus klausimas, kodėl dauguma navikų neturi žymaus imuninio atsako, lieka neatsakytas. Terapijos, paremtos imuninio atsako aktyvinimu, priklauso nuo NIL, tačiau dėl naviko ląstelių sintetinių įvairių baltymų (pavyzdžiui, 1-ojo

užprogramuoto ląstelių mirties baltymo ligando, toliau – PD-L1) naviko imunogeniškumas, nepaisant didelio NIL tankio, gali būti slopinamas⁴⁴⁻⁴⁶, o kuriamos imunoterapijos mažai efektyvios⁴⁷⁻⁵¹. Dėl šios priežasties išsamūs naviko ląstelių, įskaitant antigenų pateikimo, angiogenezės, proliferacijos bei kitų navikų patogenezės progresijos (naviko dydžio, išplitimo į limfmazgius ir kt.) požymių, imuninio atsako ir naviko erdvinės tekstūros, tyrimai ne tik geriau atskleistų naviko ir mikroaplinkos ląstelių sąveikas, bet ir leistų gauti tikslesnę informaciją apie HRDK pacientų prognozę.

1.2. Tyrimo tikslas

Įvertinti krūties vėžio progresijos požymių ir imuninio atsako sąsajas naviko mikroaplinkos erdviame kontekste.

1.3. Darbo uždaviniai

Tikslui įgyvendinti iškelti šie tyrimo uždaviniai:

1. Sukurti viengubos ir dvigubos imunohistochemijos tyrimo metodikas naviko ir jo mikroaplinkos žymenų raiškai įvertinti ir jas pritaikyti kiekybinei bei erdvinei skaitmeninei vaizdo analizei.
2. Sukurti skaitmeninės vaizdo analizės ir šešiakampių gardelių principais paremtą metodologiją krūties vėžio mikroaplinkos komponentams nustatyti, išskirti naviko ir stromos sąveikos zoną ir joje atlikti ląstelių erdvinio pasiskirstymo matavimus.
3. Optimizuoti naviko, jo mikroaplinkos, imuninio atsako ir biožymenų heterogeniškumo rodiklių rinkinius krūties vėžio patobiologiniams ir prognoziniams modeliams kurti.
4. Įvertinti sukurtų rodiklių rinkinių sąsajas su patologijos ir klinikos duomenimis bei prognozinę verte pacienčių, sergančių ankstyvosios stadijos hormonų receptorių teigiama duktaline karcinoma, imtyje.

1.4. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Sukurta krūties vėžio audinio tyrimo metodologija leidžia automatiškai nustatyti naviko ir stromos sąveikos zoną bei apskaičiuoti antinavikinį imuninį atsaką apibūdinančius imunogradiento rodiklius, kurie leidžia prognozuoti pacienčių, sergančių ankstyvosios stadijos hormonų receptorių teigiama duktaline karcinoma, bendrąjį išgyvenamumą.

2. Skaitmenine vaizdo analize pagrįstas integruotas Ki67, PgR ir CD8+SATB1+ imunohistochemijos modelis, nepriklausomai nuo klinikos ir patologijos parametrų, leidžia įvertinti pacienčių, sergančių hormonų receptorių teigiama duktaline karcinoma, prognozę. Šis modelis atskleidžia, kad Ki67 ir PgR raiškos vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai suteikia daugiau prognozinės informacijos negu šių biožymenų kiekybiniai įverčiai, o CD8+SATB1+ ląstelių tankis navike gali būti taikomas kaip aktyvaus imuninio atsako prieš naviką rodiklis.

1.5. Darbo naujumas ir reikšmė

1. *Naviko ir stromos sąveikos krašto (SK) ir SZ nustatymo metodologija.* Pritaikius SVA ir skaitmenizuoto KV audinio padalijimo į šešiakampius gardelių elementus metodus, šiame darbe automatiškai nustatytas naviko ir stromos SK bei SZ. SZ nustatymas intervalais (rangais) leido optimizuoti SZ plotį ir apskaičiuoti kiekybinius ir erdvinius imuninį atsaką apibūdinančius imunogradiento rodiklius ankstyvosios stadijos HRDK mėginiuose.

2. *Imunogradiento rodiklių prognozinė vertė.* Šiame darbe pirmą kartą nustatyta, kad ne tik CD8+ ląstelių tankis naviko dalyje, bet ir šių ląstelių gradientą į naviką apibūdinantis parametras – CD8+ ląstelių tankio masės centras – yra nepriklausomi geros prognozės rodikliai HRDK imtyje. Be to, nustatyta, kad agreguotas SZ CD8+ ląstelių imuninio atsako faktorius, kuris sujungia kiekybinio ir erdvinio imuninio atsako įvertinimo aspektus, yra nepriklausomas HRDK sergančių pacienčių bendrojo išgyvenamumo rodiklis, ypač vertinant ilgalaikę (>5 m.) prognozę.

3. *CD8+SATB1+ ląstelių biologinė ir prognozinė vertė.* Pritaikius SATB1 ir CD8 dvigubos IHC SVA, pirmą kartą nustatyta, kad plataus masto epigenetinio reguliatoriaus SATB1 prognozinis poveikis HRDK yra susijęs su vidunavikiniu CD8+SATB1+ ląstelių tankiu. Taip pat nustatyta, kad CD8+SATB1+ T ląstelės suteikia daugiau prognozinės informacijos negu kiekybinis CD8+ limfocitų įvertinimas. Tikėtina, kad SATB1 raiška CD8+ ląstelėse atspindi aktyvuotą imuninių ląstelių būklę.

4. *Netiesinis ryšys tarp PgR raiškos intensyvumo ir vidunavikinio heterogeniškumo bei PgR entropijos prognozinė vertė.* Empiriškai įrodyta netiesinė priklausomybė tarp PgR raiškos lygmens ir jo vidunavikinio heterogeniškumo (Haralicko entropijos) pirmą kartą atskleidžia, kad vidutinė (20–80 %) PgR raiška yra susijusi su geresne HRDK prognoze. Be to, PgR heterogeniškumo rodiklio prognozinė vertė yra didesnė negu

šio biožymens raiškos kiekybinis įvertis (PgR-teigiamų KV ląstelių dalis).

5. *SVA duomenimis pagrįstas integruotas prognozinis modelis*. Pirmą kartą, remiantis vien tik IHC SVA duomenimis, gautas integruotas prognozinis modelis, kuris pranoko standartinius KV klinikos ir patologijos parametrus bei atspindėjo tris biologiškai svarbius ir savarankiškus HRDK naviko požymius – PgR raiškos, KV proliferacijos intensyvumo ir naviko mikroaplinkos imuninio atsako.

1.6. Darbo aprobacija (publikacijos ir pranešimai)

Darbo rezultatai paskelbti recenzuojamuose tarptautiniuose mokslo leidiniuose, turinčiuose citavimo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science* (Filadelfija, JAV) duomenų bazėje, ir pristatyti Lietuvos ir užsienio mokslinėse konferencijose.

Publikacijos disertacijos tema (2):

1. Rasmusson A, **Žilėnaitė D**, Nestarenkaitė A, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Immunogradient indicators for anti-tumor response assessment by automated tumor-stroma interface zone detection. *Am J Pathol*. 2020; 190(6): 1309–1322. 2019 m. citavimo rodiklis (angl. *impact factor*) – 3,491.

2. **Žilėnaitė D**, Rasmusson A, Augulis R, Besusparis J, Laurinavičienė A, Plancoulaine B, Ostapenko V, Laurinavičius A. Independent Prognostic Value of Intratumoural Heterogeneity and Immune Response Features by Automated Digital Immunohistochemistry Analysis in Early Hormone Receptor-Positive Breast Carcinoma. *Front Oncol*. 2020; 10: 950. 2019 m. citavimo rodiklis – 4,848.

Žodiniai pranešimai disertacijos tema (3):

1. **Žilėnaitė D**. Potential role of SATB1 in anti-tumor immune response. *Innovative pathology*, 2018. Vilnius, Lietuva.

2. **Žilėnaitė D**. Skaitmeninės vaizdo analizės metodas naviko ir imuniteto sąsajoms tirti. *Patologijos technologijos*, 2018. Kaunas, Lietuva.

3. **Žilėnaitė D**, Rasmusson A, Augulis R, Laurinavičienė A, Laurinavičius A. Imuninio atsako įvertinimas skaitmeninės vaizdo analizės metodu esant duktalinei krūties karcinomai. *Biomedicininė diagnostika: mokslas ir praktika*, 2019. Vilnius, Lietuva.

Stendiniai pranešimai ir tezės, pateiktos konferencijose (5):

1. **Žilėnaitė D**, Rasmusson A, Nestarenkaitė A, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. The Immunogradient of CD8+ cell density in the tumour-stroma interface zone predicts overall survival of patients with hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. 25-asis tarptautinis navikų tyrimų ir onkologijos susitikimas, 2019. Roma, Italija.

2. Nestarenkaitė A, Rasmusson A, **Žilėnaitė D**, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Prognostic value of CD8 Immunogradient indicators in tumour-stroma interface zone of colorectal cancer. 25-asis tarptautinis navikų tyrimų ir onkologijos susitikimas, 2019. Roma, Italija.

3. **Žilėnaitė D**, Rasmusson A, Nestarenkaitė A, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. The Immunogradient of CD8+ cell density in the tumour-stroma interface zone predicts overall survival of patients with hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. 31-asis Europos patologų kongresas, 2019. Nica, Prancūzija.

4. Nestarenkaitė A, Rasmusson A, **Žilėnaitė D**, Augulis R, Laurinavičienė A, Ostapenko V, Poškus T, Laurinavičius A. Prognostic value of CD8 Immunogradient indicators in tumour-stroma interface zone of colorectal cancer. 31-asis Europos patologų kongresas, 2019. Nica, Prancūzija.

5. **Žilėnaitė D**, Rasmusson A, Augulis R, Laurinavičienė A, Laurinavičius A. Imuninio atsako įvertinimas skaitmeninės vaizdo analizės metodu duktalinėje krūties karcinomoje: [pranešimo santrauka]. *Laboratorinė medicina* 2019; 21(1): 40.

Patentai (1):

1. Rasmusson A, **Žilėnaitė D**, Nestarenkaitė A, Augulis R, Laurinavičius A. Automatizuotas naviko ir stromos sąsajos zonos nustatymas, skirtas naviko atsako įvertinimui naudojant imunogradientinius indikatorius (angl. *Automated Tumour-Stroma Interface Zone Detection for Anti-Tumour Response Assessment by Immunogradient Indicators*). Patentinės paraiškos Nr. LT 2019 509, pareiškėjas – Vilniaus universitetas. 2020-04-09 pateikta šio patento tarptautinė paraiška Pasaulio intelektinės nuosavybės organizacijos tarptautiniame biure (angl. *International Bureau of the World Intellectual Property Organization*), Nr. PCT/IB2020/053396.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Krūties vėžys pasaulyje ir Lietuvoje

Kaip jau minėta, KV – vienas iš dažniausių onkologinių susirgimų. Tai pagrindinė moterų mirties nuo piktybinių navikų priežastis¹⁻⁵. Pasaulio sveikatos organizacijos Tarptautinės navikų tyrimų agentūros duomenimis^{5,6}, 2018 m. diagnozuota 2,09 milijonų KV naujų susirgimų, kurie sudarė 23 proc. moterims diagnozuotų navikų atvejų. Sergamumas KV didėja. Skaičiuojama, kad nuo 1980 m. sergamumas kasmet išauga 3,1 proc.⁵². Pasaulyje ligos dažnis pasiskirstęs netolygiai, svyruoja nuo 19,3 atvejų 100 000 moterų Rytų Afrikoje iki 89,7 atvejų 100 000 moterų Vakarų Europoje⁵³. Didžiausias ligos paplitimas (80 atvejų 100 000 moterų) nustatytas ekonomiškai išvysčiusiose šalyse, išskyrus Japoniją, mažiausias (40 atvejų 100 000 moterų) – besivystančiose šalyse⁵³. Mokslinės literatūros duomenimis, ekonomiškai išvysčiusiose šalyse dažniau nustatomas ankstyvosios stadijos KV, o mažas ir vidutines pajamas gaunančiose šalyse – vėlyvesnių stadijų KV, kuris siejamas su blogesne paciento išgyvenamumo prognoze². Pasaulyje mirštamumas nuo KV siekia 28,7 mirtis 100 000 atvejų⁵⁴.

Remiantis Nacionalinio vėžio instituto Vėžio registro duomenimis, Lietuvoje 2009 m. diagnozuotas 1 521 naujas moterų KV atvejis, 2010 m. – 1 490, 2011 m. – 1 541, 2012 m. – 1 526⁵⁵. Pagal moterų mirčių nuo piktybinių navikų skaičių KV Lietuvoje yra pirmas pagal dažnį (15 proc. visų navikų atvejų), mirštamumas siekia 32 mirtis 100 000 atvejų⁵⁶.

2.2. Krūties vėžio rizikos veiksniai, genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai

KV yra daugiaveiksni liga, kuriai išsivystyti įtakos turi įvairūs rizikos veiksniai, tokie kaip vyresnis amžius (>50 m.), ankstyva menarchė (<12 m.), vėlyvas nėštumas (>30 m.), vėlyva menopauzė (>55 m.), nutukimas, nejudrus gyvenimo būdas, kontraceptinių tablečių ir alkoholio vartojimas, rūkymas, šeiminė anamnezė (paveldimi genetiniai veiksniai) ir įvairių dauginių genetinių pokyčių kaupimasis ląstelėse⁵⁷⁻⁵⁹. Tikslus šių rizikos veiksnių karcinogenezės mechanizmas nėra žinomas, tačiau nustatyta, kad dauguma jų reguliuoja hormonų, estradiolio ir progesterono, kurie svarbūs krūties audiniui augti ir vystytis, sintezę (žr. 2.3 skyrių)^{60, 61}.

KV karcinogenezę taip pat inicijuoja įvairių onkogenų ir jų slopiklių pokyčiai⁶²⁻⁶⁴. Esant ankstyvajai KV stadijai, mutacijų dažniausiai nustatoma

TP53 (41 proc. visų navikų atvejų), *PIK3CA* (30 %), *MYC* (20 %), *PTEN* (16 %), *CCND1* (16 %), *ERBB2* (13 %), *FGFR1* (11 %) ir *GATA3* (10 %) genuose^{63, 64}. Remiantis Vėžio genomo atlaso duomenimis⁶⁵, 45 proc. A liuminalinio tipo navikuose (žr. 2.4.2. poskyrį) nustatoma *PIK3CA* geno mutacijų, o trejopai neigiamuose KV (TNKV) (žr. 2.4.2. poskyrį) – somatinių *TP53* (82 proc. atvejų) ir *PIK3CA* (10 proc. atvejų) genų mutacijų⁶⁶. 90 proc. KV atvejų formuojasi sporadiškai, 10 proc. yra paveldimi (iš jų 5 proc. atvejų mutacijų yra *BRCA1*, 3 proc. – *BRCA2*, 2 proc. – *ATH*, *AHEK2*, *PTEN* ir kituose genuose^{67, 68}). Pagrindiniais ir svarbiausiais krūties ir kiaušidžių navikų vystymąsi skatinančiais genetiniais rizikos veiksniais laikomi du genai – *BRCA1* (esantis 17q21 genetiniame regione) ir *BRCA2* (esantis 13q13 genetiniame regione)^{67, 69, 70}, kurie dalyvauja DNR pažeidimų reparacijos, transkripcijos reguliavimo procesuose, palaiko genomo stabilumą ir vykdo ląstelės ciklo kontrolę⁶⁹.

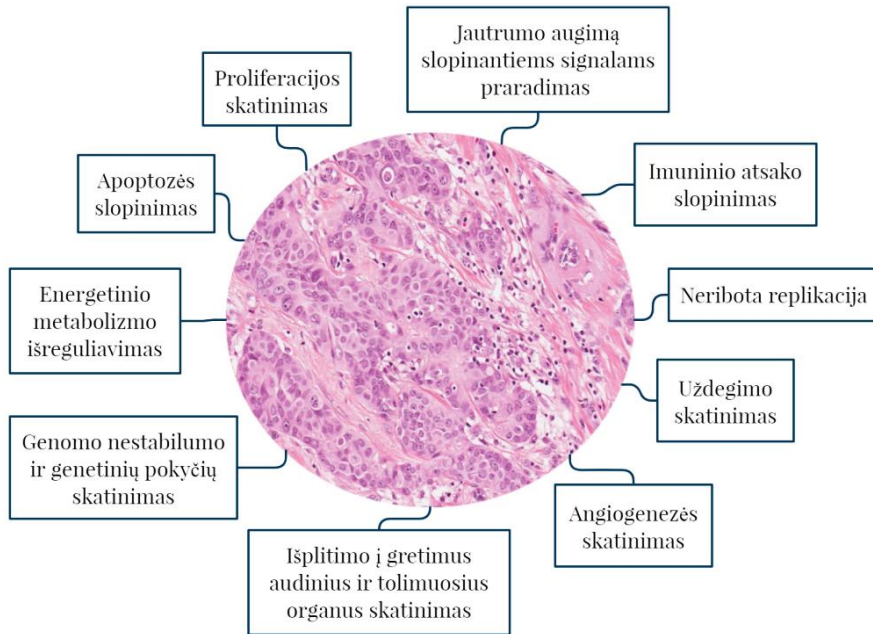
KV ląstelėms taip pat būdingi epigenetiniai pokyčiai – DNR metilinimo ir histonų modifikacijos, kurios išreguliuoja transkripcijos procesą⁷¹. Nustatyta, kad, sergant KV, *BRCA1* ir *TMS1* genai yra aktyviai metilinami⁷². ER, PgR ir androgenų receptorių genų metilinimas susijęs su agresyvesniu naviko fenotipu ir atsparumu endokrinei hormonų terapijai⁷³. Esant KV, taip pat nustatyti plataus masto epigenetinio reguliatoriaus **1-ojo savito prie A ir T bazių porų besijungiančio baltymo** (angl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*, toliau – **SATB1**) raiškos pokyčiai^{74–79}. Šis baltymas koordinuoja daugiau negu 1 000 genų veiklą⁷⁴, reguliuoja tris epigenetinius procesus: skatina chromatiną kompaktizaciją į erdvines kilpas^{80, 81}, sąveikauja su įvairiais transkripcijos reguliatoriais ir chromatiną modifikuojančiais fermentais⁸², keičia histonų acetilinimo ir metilinimo intensyvumą^{83, 84}. H. J. Han ir bendraautorių⁷⁴ tyrimo duomenimis, KV SATB1 sintezė didėja palaipsniui progresuojant navikui, o šio baltymo padidėjimas yra susijęs su padidėjusia HER2 baltymo raiška (HER2+), didesne KV stadija, aukštesniu diferenciacijos laipsniu ir išplitimu į limfmazgius. Nustatyta, kad SATB1 skatina agresyvių ląstelių fenotipą – keičia genų, kurie skatina ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, angiogenezę, sankibą (adheziją) ir ląstelių išplitimą^{74, 80–82}, raišką. Vis dėlto duomenys apie minėto žymens sintezės sąsajas su pacientų išgyvenamumu nėra vienareikšmiai – H. J. Han ir bendraautoriai⁷⁴ nustatė, kad padidėjęs SATB1 kiekis yra susijęs su trumpesniu pacientų išgyvenamumu, tačiau E. Iorns ir kt.⁷⁵ bei N. Patani ir kt.⁷⁷ sąsajų su trumpesniu išgyvenamumu statistiškai reikšmingai pagrįsti negalėjo. L. C. Hankeris ir bendraautoriai⁷⁹, ištyrę daugiau negu 2 000 KV mėginių, nustatė, kad SATB1 transkripcijos padidėjimas nėra susijęs su išgyvenamumo duomenimis ER sintezės

nevykdančiuose (ER-) mėginiuose, tačiau, tiriant ER sintezę vykdančius (ER+) KV mėginius, nustatyta, kad SATB1 padidėjimas yra susijęs su geresne prognoze. Priešingai, X. Liu ir kt.⁷⁶ įrodė, kad SATB1 yra nepriklausomas KV blogos prognozės veiksnys, o A. Laurinavičius ir bendraautoriai⁸⁵, tirdami HRDK mėginius, nustatė, kad didelis Ki67/SATB1 santykis yra blogos prognozės veiksnys. Nepaisant minėtų prieštaravimų, manoma, kad šis epigenetinis reguliatorius, koordinuojantis daugiau negu 10 proc. visų genų veiklos, yra labai svarbus KV prognozinis veiksnys⁷⁴⁻⁷⁹.

2.3. Krūties vėžio karcinogenezės mechanizmai

D. Hanahanas ir R. A. Weinbergas⁸⁶, analizuodami navikų karcinogenezės procesus, išskyrė šešias navikų savybes, kurios taip pat svarbios KV formuotis ir vystytis. Visų pirma, naviko ląstelėse aktyvinama proliferacija, naviko ląstelės dėl įvairių genų mutacijų praranda jautrumą jų augimą slopinantiems veiksniams, išvengia apoptozės, o aktyvius telomerazių veiklą, neribotai replikuojasi. Vėliau naviko ląstelės aktyvina angiogenezės procesą ir pradeda plisti į gretimus audinius ir tolimuosius organus⁸⁶.

2011 m. D. Hanahanas ir R. A. Weinbergas⁸⁷ naviko savybių sąrašą papildė ir nurodė, kad karcinogenezę taip pat skatina genomo nestabilumas, ląstelėse kaupiami genetiniai pokyčiai, sutrikęs energetinis metabolizmas, uždegiminis procesas ir imuninės sistemos, nukreiptos prieš naviką, slopinimas. Naviko karcinogenezę skatinančios savybės pateiktos 2.1 pav.



2.1 pav. Naviko karcinogenezę skatinančios savybės (parengta pagal D. Hanahaną ir R. A. Weinbergą⁸⁷)

Tikslus KV vystymosi mechanizmas nėra žinomas⁶⁵. Vis dėlto apie KV sukaupta nemažai molekulinio lygmens duomenų^{65, 88, 89}. Teigiama, kad šiems navikams būdingi kloninės evoliucijos ir naviko kamieninių ląstelių vystymosi modeliai – išgyvena tik geriausiai prisitaikiusios ląstelės, kurios toliau skatina karcinogenezę ir naviko progresavimą⁹⁰. Morfologiniu lygmeniu stebimas normalių liaukų virsmas į navikinį darinį⁹¹. Nustatyti du KV progresavimo ir vystymosi keliai, kurie daugiausia susiję su pakitusia ER raiška ir naviko diferenciacijos laipsniu^{90, 92, 93}.

Kaip jau minėta, pagrindiniu KV karcinogenezės procesą skatinančiu veiksmu laikomi steroidiniai hormonai – estrogenai, progesteronai ir kt.^{60, 61, 94, 95}. Nustatyta, kad estrogenai karcinogenezę skatina sąveikaudami su **ER**, kurie turi dvi skirtingas izoformas: alfa ($ER\alpha$) ir beta ($ER\beta$)^{96, 97}. Šie receptoriai labai panašūs, tačiau biologinės jų funkcijos skiriasi⁹⁷. Estrogenui prisijungus prie $ER\alpha$, aktyvinami įvairūs tarpląsteliniai signaliniai perdavimo keliai⁹⁶⁻⁹⁸, kurie skatina ne tik ląstelių proliferaciją, bet ir tarpląstelinio užpildo ir citoskeleto pokyčius. Visa tai leidžia naviko ląstelėms judėti ir migruoti⁹⁷. Dėl minėtų priežasčių ER raiškos padidėjimas siejamas su išplitimu į kaulus ir plaučius^{99, 100}. Taip pat nustatyta, kad padidėjęs estrogeno kiekis pasižymi genotoksinu efektu – skatina genetinių mutacijų dažnį ląstelėse^{96, 97}. Estrogeno metabolitas chinonas (angl. *quinone*) gali tiesiogiai jungtis su DNR ir formuoti savitus molekulinis junginius

(aduktus), o katecholis, kitas estrogeno metabolitas, yra susijęs su padidėjusiu reaktyviųjų deguonies formų, kurios skatina įvairias DNR modifikacijas, susidarymu⁹⁷. Sutrikus DNR taisymo mechanizmui ir neištaisius visų DNR pokyčių, formuojasi mutacijų turinčios ląstelės, kurios dar labiau skatina naviko vystymąsi ir progresavimą^{62–64, 96, 97}. Priešingai, ERβ siejamas su naviką slopinančiomis funkcijomis – slopina ląstelių proliferaciją ir judrumo potencialą⁹⁶. Šio receptoriaus raiška KV dažniausiai būna sumažėjusi⁹⁶.

Progesteronas – kiaušidžių steroidinis hormonas, kuris taip pat dalyvauja KV vystymosi procese¹⁰¹. Šis lipofilinis hormonas jungiasi su **PgR**, turinčiu dvi pagrindines izoformas: A (PgR-A) ir B (PgR-B), ir aktyvina įvairius tarpląstelinis signalo perdavimo kelius, kurie skatina ląstelių proliferaciją, augimą, išplitimo funkcijas ir reguliuoja genų transkripciją^{101–103}. PgR-A ir PgR-B yra beveik identiški, tačiau jų funkcijos skirtingos – PgR-B pasižymi stipresniu genų transkripciją aktyvinančiu efektu negu PgR-A^{102, 103}. Be to, A. M. Bamberger ir bendraautorių¹⁰⁴ atlikto tyrimo duomenimis, PgR-A raiškos padidėjimas, palyginti su PgR-B, yra susijęs su didesniu diferenciacijos laipsniu ir blogesne KV prognoze, todėl teigiama, kad PgR-A padidėjimas (padidėjęs PgR-A ir PgR-B santykis) skatina KV vystymąsi^{104, 105} ir išplitimą į kaulus ir plaučius¹⁰². Minėtina ir tai, kad PgR reguliuoja KV ląstelių heterogeniškumą kontroliuodamas krūties audinio kamienines ląsteles – padidėjusi PgR sintezė padidina kamieninių ląstelių koncentraciją iki 14 kartų^{106, 107} ir šias ląsteles aktyvina¹⁰⁸. Tikslus mechanizmas, kaip PgR reguliuoja naviko kamienines ląsteles, iki šiol nėra žinomas, tačiau nustatyta, kad padidėjusi PgR-A raiška yra tiesiogiai susijusi su padidėjusiu ląstelių, pasižyminčių naviką skatinančiomis savybėmis, ypač proliferacija ir gebėjimu atsinaujinti, skaičiumi¹⁰⁹.

Kitas svarbus karcinogenezę skatinantis veiksnys – **HER2**. Jis priklauso epidermio augimo veiksnio receptorių, kurie skatina epitelio ląstelių augimą, diferenciaciją ir angiogenezę, šeimai^{110–113}. HER2 baltymą koduoja *ERBB2* genas^{110–113}, padidėjusi jo raiška nustatoma 15–30 proc. KV atvejų (lemia padidėjusią HER2 sintezę ląstelės membranoje)^{110–113}. Nustatyta, kad, esant KV, taip pat pakinta HER2 receptoriaus giminingumas (angl. *affinity*) ligandams – receptoriai yra jautresni net ir mažoms epidermio augimo ir α transformuojančio augimo veiksnių dozėms¹¹³. Aktyvinus HER2 receptorių, aktyvinami tarpląsteliniai signaliniai perdavimo keliai, kurie skatina nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją, išgyvenamumą, sankibą, invaziją ir naviko ląstelių išplitimą^{110–113}.

Navikui intensyviai augant, ląstelėse mažėja deguonies kiekis^{114–116}. Esant hipoksijos sąlygoms, skatinama **1-ojo hipoksijos indukuoto veiksnio**

(HIF1, sudaro HIF1 α ir HIF1 β subvienetai) ir 2-ojo hipoksijos indukuoto veiksnio (HIF2, sudaro HIF2 α ir HIF1 β heterodimerai) sintezė, kuri aktyvina angiogenezės, kraujagyslinio tinklo formavimosi, procesą¹¹⁴⁻¹¹⁶. Hipoksijos sąlygas išgyvenančiose ląstelėse HIF1 α negali būti hidroksilintas ir suskaidytas, todėl jis kaupiasi navikinėse ląstelėse ir kartu su HIF2 koordinuoja genus, kurie skatina karcinogenezę – ląstelių išgyvenamumą, proliferaciją ir išplitimą¹¹⁵⁻¹¹⁷. Be to, HIF1 α aktyvina kraujagyslių endotelio augimo veiksnį (VEGF), kuris skatina angiogenezę ir glikolizės fermentų, užtikrinančių metabolinį naviko ląstelių prisitaikymą esant deguonies trūkumui, sintezę¹¹⁵⁻¹¹⁷. Nustatyta neigiama sąsaja tarp HIF1 α ir hormonų receptorių (HR) raiškos ir teigiama sąsaja su HER2 ir VEGF¹¹⁸. Padidėjusi hipoksijos veiksnio sintezė yra susijusi su didesniu proliferacijos intensyvumu ir diferenciacijos laipsniu, todėl HIF1 α ir HIF2 α siejami su KV progresija ir blogesne pacientų prognoze^{115, 118}. Be to, nustatyta, kad HIF1 sintezė taip pat skatina chemoterapijos ir radiologinės terapijos atsparumą¹¹⁵.

Naviko augimas taip pat tiesiogiai priklauso nuo kraujagyslinio tinklo, todėl naujų kraujagyslių formavimasis yra pagrindinis procesas, kuris užtikrina KV išplitimą¹¹⁹. Kaip jau minėta, angiogenezę skatina VEGF veiksnys, kurio padidėjimas aktyvina sankibos molekulių sintezę ir padidėjusį kraujagyslių pralaidumą^{119, 120}. Nustatyta, kad VEGF sintezės intensyvumas tiesiogiai susijęs su KV diferenciacijos laipsniu, neigiama HR raiška (HR–) ir HER2+^{119, 121, 122}.

2.4. Krūties vėžio diagnostika

KV nustčius ankstyvojoje stadijoje, pasiekama geresnio gydymo efektyvumo, mažėja intensyvaus gydymo poreikis ir KV sukeltų mirčių^{123, 124}.

Įtarus KV atvejį, atliekamas klinikinis krūtų ištyrimas (krūtų apžiūra, palpacija, pažasties ir viršraktikaulinės srities limfmazgių patikra), radiologinė diagnostika (mamografija, ultragarso ar kt. tyrimai) ir, siekiant morfologiškai patvirtinti diagnozę, atliekamas biopsijos tyrimas^{125, 126}.

2.4.1 TNM klasifikavimas ir krūties vėžio skirstymas pagal stadijas

Siekiant numatyti KV sergančių pacienčių prognozę ir parinkti gydymo strategiją, nustatoma KV stadija – taikoma pirminio naviko (T), sritinių limfmazgių (N) ir tolimųjų metastazių (M) išplitimo (TNM) įvertinimo sistema^{7, 8}. Skiriamos dvi TNM klasifikacijos – klinikinė ir pataloginė.

Klinikinė klasifikacija remiasi klinikinio krūtų tyrimo ir radiologinės diagnostikos radiniais^{7,8}, patologinė klasifikacija patvirtinama atlikus histologinį KV audinio tyrimą. Remiantis naujausiomis navikų skirstymo į stadijas rekomendacijomis (8 redakcija)¹²⁷, pirminiam navikui įvertinti taikomi tokie pat klinikiniai ir patologiniai kriterijai – įvertinamas didžiausias invazinio komponento dydis, tiesiogiai susijęs su ligos apimtimi. Skiriamos T kategorijos ir kriterijai pateikiami 1 priede¹²⁷.

Sritinių limfmazgių išplitimui įvertinti taikomi skirtingi klinikiniai ir patologiniai kriterijai. Klinikinio tyrimo metu nustatytas išplitimas į sritinius limfmazgius turi būti patvirtintas atliekant histologinį tyrimą. Skiriamos N kategorijos, klinikiniai ir patologiniai kriterijai pateikiami 2 priede¹²⁷.

Naviko išplitimui į gretimus organus nustatyti taikomas klinikinis įvertinimas, kuris gali būti patvirtintas atliekant metastazės histologinį tyrimą. Skiriamos trys naviko išplitimo kategorijos ir kriterijai (žr. 3 priedą)¹²⁷.

KV diferenciacijos laipsnis (G) nustatomas remiantis Elstono ir Ellis (Notingemo) vertinimo sistema. Šios sistemos pagrindą sudaro trys naviko savybės: naviko ląstelių, kurios formuoja tubules, procentinė dalis, naviko ląstelių branduolių atipija (variacija tarp ląstelių branduolio dydžio ir formos) ir mitozų skaičius¹²⁷. Kiekviena iš šių savybių vertinama trijų balų sistema, o šiuos balus sudėjus, nustatomas galutinis diferenciacijos laipsnis (žr. 4 priedą¹²⁷). Didesnis naviko diferenciacijos laipsnis siejamas su KV agresyvumu ir blogesne paciento prognoze^{2, 127}.

Įvertinus pirminį naviką, išplitimą į sritinius limfmazgius ir tolimuosius organus, KV grupuojamas į stadijas (KV grupavimas pagal klinικές ir patologines kategorijas pateikiamas 5 priede¹²⁷). Naujausiose navikų skirstymo į stadijas rekomendacijose (8 redakcija) KV rekomenduojama grupuoti ne tik pagal patologines TNM kategorijas, diferenciacijos laipsnį, bet ir atsižvelgus ir į ER, PgR ir HER2 baltymų raiškos rezultatus (žr. 2.4.3. poskyrį)¹²⁷. Šis rekomenduojamas KV grupavimas į stadijas pateikiamas 6 priede¹²⁷.

Nustatyta, kad pacientų, kurių KV stadija yra 0, 5-erių metų išgyvenamumo prognozė siekia 100 proc., esant I stadijai – 98,7 proc., II – apie 93 proc., III – 72 proc.^{128–130}. Jei KV plinta sistemiškai, paciento prognozė smarkiai blogėja. Esant IV stadijai, 5-erių metų išgyvenamumo prognozė siekia tik 22–27 proc.^{128–130}.

2.4.2 Krūties vėžio skirstymas pagal histologinius tipus

Remiantis 2019 m. Pasaulio sveikatos organizacijos klasifikacijos redakcija (5 redakcija)¹³¹, skiriamos invazinės ir neinvazinės KV formos. Neinvaziniam KV priskiriamos duktalinės karcinomos *in situ* (DCIS) ir lobulinės karcinomos *in situ* (LCIS)¹³¹.

DCIS – neinvazinė KV forma, kurią sudaro kloniškai proliferuojančios ir genetinių pokyčių turinčios piktybinės ląstelės, išsivysčiusios iš pieno latakėlių sienelės išklojančių epitelio ląstelių¹³². Pagal naviko ląstelių branduolių atipiją (polimorfizmą) ir esančią nekrozę skiriami mažo, vidutinio ir didelio piktybiškumo DCIS laipsniai¹³³. Pacientų, turinčių DCIS komponentą, prognozė priklauso nuo nustatyto pirminio naviko dydžio, piktybiškumo laipsnio, nekrozės buvimo ir naviko atstumo nuo rezekcijos krašto^{133, 134}. Minėtina, kad per 15 ar daugiau metų 14–53 proc. visų DCIS atvejų išsivysto į invazinį KV^{135, 136}.

LCIS – neinvazinė KV forma, kurią sudaro piktybinės ląstelės, išsivysčiusios iš pieno gaminančių skiltelių epitelio ląstelių^{137, 138}. Nustatyta, kad per 15 metų 26 proc. visų LCIS atvejų išsivysto į invazinį KV¹³⁸.

Invazinės karcinomos skirstomos į 19 skirtingų tipų (duktalines, lobulines karcinomas ir 17 kitų retų krūties karcinomos tipų), kurie susieti su ligos prognoze ir atsaku į gydymą¹³¹. Duktalinės karcinomos (kitaip – neklasifikuojamos duktalinės karcinomos) sudaro plačiausią navikų grupę – 70–75 proc. visų krūties karcinomų; jos neturi jokių savitų histologinių požymių^{2, 131}. Minėtam tipui priskiriami navikai, kurių mažiausiai 50 proc. naviko ploto sudaro duktalinę histologiją formuojančios ląstelės (jei užima mažesnę plotą (10–49 %), navikas laikomas mišriu^{139, 140}). Pacienčių, kurioms nustatytas duktalinės karcinomos tipas, 5-erių metų išgyvenamumas, ligai neatsinaujinant, siekia 87,4 proc.¹⁴¹.

Kitą gausią krūties karcinomų grupę (10–14 proc. KV atvejų) sudaro lobulinės karcinomos^{2, 131}. Pacienčių, kurioms nustatomas minėtas karcinomos tipas, prognozė dažniausiai būna tokia pati kaip ir sergančiųjų duktalinės krūties karcinoma; 5-erių metų išgyvenamumas, ligai neatsinaujinant, siekia beveik 86,8 proc.¹⁴¹.

Kiti krūties karcinomos tipai yra palyginti reti (sudaro 2–3 proc. visų krūties karcinomų)^{2, 131}. Minėtinės tubulinė, mucininė, kribriforminė ir kitos karcinomos^{2, 131}. Pacienčių, kurioms nustatyta tubulinė karcinoma, 5-erių metų išgyvenamumas, ligai neatsinaujinant, siekia 87,4 proc.¹⁴¹. Mucininėms karcinomoms būdinga intensyvi mucinų sintezė. Pacienčių, kurioms nustatyta minėta karcinoma, 5-erių metų išgyvenamumas, ligai neatsinaujinant, siekia 93 proc.¹⁴¹. Pacienčių, kurioms nustatyta

kribriforminė karcinoma, 5-erių metų išgyvenamumas, ligai neatsinaujinant, siekia 97,9–98,7 proc.¹⁴¹.

2.4.3 Krūties vėžio skirstymas pagal molekulinis biožymenis

2000 m. atlikus išsamų genų raiškos analizės tyrimą ir išanalizavus 1 753 genus, išskirti pagrindiniai KV genų raiškos klasteriai, kurie daugiausia susiję su *ER*, *PgR*, ląstelės proliferacijos ir *HER2* genais¹⁴². Šis tyrimas leido suskirstyti KV į keturis skirtingus tipus¹⁴². Vėliau atlikti analogiški tyrimai^{143–148} genų sąrašą sumažino iki 476 (šis sąrašas pavadintas KV „būdingų genų rinkiniu“¹⁴³). Siekiant geriau prognozuoti pacientų būklę ir jų atsaką į gydymą, KV buvo pasiūlyta skirstyti ne pagal genų, o pagal biožymenų raiškos rezultatus^{149–151}.

2005 m. D. M. Abd El-Rehim ir bendraautorai¹⁴⁹ įrodė, kad KV skirstymas pagal kombinuotą 25 skirtingų baltyminių biožymenų raiškos įvertinimą atitinka KV skirstymą pagal genų raiškos rezultatus. D. Soria ir kt.¹⁵¹, pritaikę hierarchinę klasterių analizę, sumažino minėtą skaičių iki 10 biožymenų, o 2011 m. J. Cuzickas ir bendraautorai¹⁵⁰ pasiūlė sujungti pusiau kiekybinį ER, PgR, Ki67 ir HER2 IHC įvertinimą į „IHC4 balą“, kuris kartu su klinikiniu įvertinimu suteikė panašios prognozinės informacijos kaip ir genų raiškos profiliavimo tyrimai, tokie kaip *Oncotype DX* (*Genomic Health Inc.*, Redvudas, JAV) ar *Prosigna* (*NanoString Technologies*, Sietlas, JAV)^{150, 152}. Taigi šiuo metu, remiantis ER, PgR, HER2 ir Ki67 biožymenų raiškos ypatumais, skiriami biologiniai KV tipai, kuriems būdingi skirtingi rizikos veiksniai, nevienodos naviko charakteristikos ir atsakas į gydymą^{143, 147, 148}.

Remiantis 2020 m. Amerikos klinikinės onkologijos draugijos ir Amerikos patologų kolegijos naujausiomis rekomendacijomis⁹, ER, PgR ir HER2 biožymenų raiškai įvertinti rekomenduojama pirmiausia taikyti IHC tyrimo metodą.

ER ir PgR raiška nustatoma įvertinus nusidažiusių branduolių procentinę dalį ir nusidažymo intensyvumą. Navikai priskiriami tam tikrai kategorijai⁹:

- 1) ER ar PgR raiška nevykdoma, jei tiriamame navike nustatyta mažiau negu 1 proc. raišką vykdančių naviko ląstelių,
- 2) ER ar PgR raiška vykdoma, jei tiriamame navike nustatyta daugiau negu 10 proc. vidutiniškai ar stipriai raišką vykdančių naviko ląstelių,
- 3) ER ar PgR raiška vykdoma silpnai, jei tiriamame navike nustatyta 1–10 proc. raišką vykdančių naviko ląstelių.

Didžiajai daliai (apie 75 proc.) pacientų, kuriems diagnozuotas KV, būdinga stipri ER raiška¹⁵³. Šiuo atveju navikai dažniausiai yra gerai

diferencijuoti, mažai agresyvūs, pastebima geresnė pacientų prognozė¹⁵⁴. Nustačius silpną ER raišką (1–10 proc. raišką vykdančių ląstelių), patologijos tyrimo diagnozę rekomenduojama papildyti komentaru, kad biologiniu aspektu šio tipo navikai yra panašesni į HR– ir taikytina hormonų terapija gali nesuteikti papildomos naudos⁹. Nepaisant to, esant ER+ atvejams, nustatoma ir PgR+ raiška (apie 75 proc.)⁹⁴. Ištyrus 571 KV sergančią pacientę, 91,8 proc. atvejų buvo nustatyta abiejų HR padidėjusi raiška (HR+), 6,9 proc. pacienčių buvo būdinga tik ER+ raiška, 1,3 proc. – tik PgR+¹⁵⁵. Taip pat nustatyta, kad pacientėms, kurių mėginiuose pastebėta tik ER ar tik PgR raiška, būdinga padidėjusi ligos atsinaujinimo rizika ir trumpesnis išgyvenamumas negu pacientėms, kurioms būdinga HR+¹⁵⁵. PgR+ dažniausiai nustatoma esant ER+, tačiau M. Dowsettas ir bendraautoriai¹⁵⁶ įrodė, kad pacientai, kurių mėginiuose buvo nustatyta tik PgR+, taip pat atsakė į hormonų terapiją. Tai iškelia ir įrodo PgR tyrimo svarbą. Pastebėta, kad ER ir PgR raiška nepasižymi stabiliu fenotipu – intensyvumas keičiasi vystantis KV arba kaip atsakas į endokrininį gydymą¹⁵⁷. Įrodyta, kad KV pacientus gydant tamoksifenu, tiek ER, tiek PgR raiška mažėja, o iki 50 proc. HR+ navikų visiškai praranda PgR raišką¹⁵⁸. Vis dėlto apie 30 proc. pacientų, kuriems būdinga ER+ ir kurių mėginiuose PgR raiška nevykdoma (PgR–), pasireiškia agresyvesnė ligos eiga^{158–160}. Šie pacientai pasižymi mažesniu atsaku ar net atsparumu tamoksifenui, palyginti su pacientais, kuriems būdinga HR+^{158–160}. Taip pat nustatyta, kad naviko ląstelės, kurios nustoja vykdyti PgR raišką, aktyvina kitus signalinius kelius arba receptorius (pavyzdžiui, HER1 arba HER2), skatinančius naviko ląstelių augimą ir sumažėjusį atsaką į hormonų terapiją, nepaisant vykdomos ER raiškos^{161–165}.

HER2 raiška nustatoma įvertinus ląstelių membranos nusidažymo intensyvumą ir šių ląstelių procentinę dalį. Navikai priskiriami tam tikrai kategorijai⁹:

- 1) HER2 reakcijos nėra, jei raišką vykdančių ląstelių nėra arba raiškos intensyvumas yra silpnas ir raišką vykdo mažiau negu 10 proc. naviko ląstelių,
- 2) HER2 reakcija neigiama (1+), jei ląstelių raiškos intensyvumas yra silpnas ir raišką vykdo daugiau negu 10 proc. naviko ląstelių,
- 3) HER2 reakcija ribinė (2+), jei ląstelių raiškos intensyvumas yra silpnas arba vidutinis ir raišką vykdo daugiau negu 10 proc. naviko ląstelių visoje membranoje arba ląstelių raiškos intensyvumas yra stiprus ir raišką vykdo mažiau negu 10 proc. naviko ląstelių visoje membranoje,
- 4) HER2 reakcija teigiama (3+), jei ląstelių raiškos intensyvumas yra stiprus ir raišką vykdo daugiau negu 10 proc. naviko ląstelių.

Jei, atlikus IHC tyrimą, nustatoma ribinė HER2 reakcija, atliekamas tikslinamasis tyrimas HER2 geno amplifikacijai patvirtinti arba paneigti, pavyzdžiui, taikomas fluorescencinės *in situ* arba chromogeninės *in situ* hibridizacijos tyrimo metodas⁹.

KV HER2 prognozinė vertė yra nevienareikšmė¹¹¹. Yra teigiama, kad HER2 pokyčiai susiję su blogesne KV prognoze, tačiau apžvalginis tyrimu¹⁶⁶, kurio metu įvertinti 106 tyrimų duomenys ir ištirta 39 730 pacientų, nustatyta, jog 12 proc. atvejų nepavyko įrodyti sąsajų tarp HER2 ir klinikinių duomenų. Vis dėlto tai labai svarbus predikcinis veiksnys biologinei terapijai, nukreiptai prieš HER2¹⁶⁷. Nustatyta, kad atsakas į terapiją vidutiniškai siekia 35 proc. atvejų (svyruoja nuo 12 proc. iki 68 proc.), o mirties rizika nuo KV sumažinama 34 proc. atvejų¹⁶⁷.

Tiriamas dar vienas predikcinis ir prognozinis KV biožymuo – **Ki67**^{168–170}. Šis baltymas sintetinas viso ląstelės ciklo metu, išskyrus G₀ fazę; jis atspindi naviko ląstelių proliferacijos intensyvumą¹⁷¹. Ki67 raiška vertinama pagal nusidažiusių ląstelių branduolių procentinę dalį¹⁶⁹. Remiantis Tarptautinės darbo grupės Ki67 krūties navikuose rekomendacijomis, Ki67 raišką siūloma vertinti viso analizuojamo naviko plote ir intensyviausioje šio žymens raiškos vietoje („karštajame taške“), būtina analizuoti mažiausiai 500–1 000 naviko ląstelių branduolių¹⁶⁹. Vis dėlto rekomenduojamos ribinės vertės kasmet keičiasi (plg.: 14 proc., 20 proc., 20–29 proc., ≤10 proc., 20–30 proc.^{169, 170, 172, 173}). Remiantis 2011 m. Sankt Galeno tarptautinės KV konferencijos rekomendacijomis, įvertinus Ki67 raišką vykdančių ląstelių procentinę dalį ir nustatius mažiau negu 14 proc. raišką vykdančių naviko ląstelių, naviką rekomenduojama laikyti mažai proliferuojančiu; jei nustatoma 15–30 proc. raišką vykdančių naviko ląstelių, – vidutiniškai proliferuojančiu; jei >30 proc., – intensyviai proliferuojančiu¹⁷⁰. Minėtina, kad didesnė Ki67 baltymo raiška susijusi su trumpesniu pacientų išgyvenamumu, tačiau navikai dažniau atsako į chemoterapiją¹⁷⁴. A. Bottini ir bendraautoriai¹⁷⁵ bei A. Makrisas ir kt.¹⁷⁶ nustatė, kad, atlikus chemoterapiją, Ki67 raiška dažniausiai sumažėja ir šis sumažėjimas yra reikšmingai susijęs su klinikiniu naviko atsaku į gydymą.

Remiantis ER, PgR, HER2 ir Ki67 raiškos rezultatais, KV skirstomas į penkis KV potipius: A liuminalinį, B liuminalinį, B liuminalinį ir HER2 teigiamą, HER2 teigiamą bei TNKV (2.1 lentelė)^{88, 142, 143}. A ir B liuminaliniai KV potipiai skiriasi tik proliferaciniu aktyvumu (pacienčių 5-erių metų išgyvenamumas siekia 80–85 proc.)¹⁷⁷. Minėtu atveju KV gydyti skiriama hormonų terapija¹⁰. B liuminaliniam ir HER2 teigiamam KV gydyti skiriama hormonų terapija ir papildoma biologinė terapija prieš HER2¹⁰. A, B bei B liuminalinis ir HER2 teigiamas KV potipiai sudaro 60–65 proc. visų

piktybinių KV atvejų². HER2 teigiamas KV potipis sudaro 15–20 proc. visų piktybinių KV atvejų, jam gydyti skiriama biologinė terapija prieš HER2¹⁰. TNKV potipis sudaro 15–20 proc. visų piktybinių KV atvejų². Minėtam KV gydyti skiriama chemoterapija ir (arba) spindulinis gydymas¹⁰.

2.1 lentelė. Krūties vėžio potipiai pagal molekulinį biožymenų raiškos rezultatus (parengta pagal S. M. Fragomeni ir kt.¹⁷⁸)

Krūties vėžio potipis	Molekulinį biožymenų raiška
A liuminalinis	ER+ ir/arba PgR+ HER2– Ki67 < 14 %
B liuminalinis	ER+ ir/arba PgR+ HER2– Ki67 ≥ 14 %
B liuminalinis ir HER2 teigiamas	ER+ ir/arba PgR+ HER2+ Ki67– arba Ki67+
HER2 teigiamas	ER– ir PgR– HER2+
Trejopai neigiamas	ER–, PgR– ir HER2– Ki67– arba Ki67+

ER– – neigiama estrogenų receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo estrogenų receptoriaus raiškos, ER+ – teigiama estrogenų receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo estrogenų receptoriaus raišką, PgR– – neigiama progesterono receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo progesterono receptoriaus raiškos, PgR+ – teigiama progesterono receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo progesterono receptoriaus raišką, HER2– – neigiama žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus reakcija, ląstelės nevykdo HER2 raiškos, HER2+ – teigiama žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo HER2 raišką, HER2+ – teigiama žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus reakcija, ląstelės vykdo HER2 raišką, Ki67– – neigiama Ki67 reakcija, ląstelės nevykdo Ki67 raiškos, Ki67+ – teigiama Ki67 reakcija, ląstelės vykdo Ki67 raišką.

2.5. Naviko mikroaplinka

Genetiniai veiksniai ir mechanizmai paaiškina daugelį KV progresavimo aspektų, tačiau tokios naviko savybės, kaip organizmo imuninis ir uždegiminis atsakas, angiogenezė ir medžiagų apykaitos veiksniai, vystosi naviko mikroaplinkoje⁸⁷. Daugelis tyrimų patvirtina^{179–183}, kad imuninės sistemos įvertinimas ne tik leidžia prognozuoti ligos eigą, navikų išplitimo ir KV atsinaujinimo riziką, bet ir parinkti gydymo strategiją, veikiančią imuninės sistemos komponentų aktyvumą ir funkcijas.

Naviko mikroaplinkoje sąveikauja proliferuojančios naviko ir įvairios šeimininko audinių ląstelės – fibroblastai, adipocitai, pericitai,

neuroendokrininės, endotelio, įgimto ir įgyto imuniteto ląstelės^{181, 183}. Šios ląstelės naviko mikroaplinkoje atlieka dvejopą vaidmenį: vienos iš jų slopina imunitetą ir taip netiesiogiai skatina naviko vystymąsi, kitos naikina navikines ląsteles^{181, 183–185}. Be to, naviko mikroaplinkai turi reikšmę aplinkos sąlygos, tokios kaip hipoksija, acidozė, padidėjęs intersticinis slėgis¹⁸⁶.

Navikui vystantis, į jį infiltruoja įvairios imuninės kilmės ląstelės, pirmiausia, įgimto imuniteto ląstelės – makrofagai, neutrofilai, dendritinės ląstelės, natūralios žudikės (NŽ)^{181, 183, 184}. Sutrikus audinių homeostazei, makrofagai pradeda sintetinti citokinus, chemokinus, metaloproteinazes, reaktyviasias deguonies formas ir skatina įgyto imuniteto imuninių ląstelių (CD4+ ir CD8+ T limfocitų, CD19+ ir CD20+ B limfocitų ir kitų ląstelių) infiltraciją į šią mikroaplinką^{184, 187, 188}. Tokiu būdu kuriama uždegiminė aplinka^{188–190}. Infiltravusios imuninės ląstelės skatina įvairių veiksnių, tokių kaip α naviko nekrozės veiksnio (TNF- α), β transformuojančio augimo veiksnio (TGF- β), VEGF, 1-ojo ir 6-ojo interleukinų (IL-1 ir IL-6), sintezę. Šie veiksniai aktyvina piktybinių ląstelių proliferaciją, išgyvenamumą, angiogenezę ir slopina antinavikinį imuninį atsaką^{188–190}.

Naviko mikroaplinkoje prasidėjęs patologinis procesas skatina aplinkinio audinio persitvarkymą – vyksta tarpląstelinio užpildo pokyčiai, keičiasi fibronektino, lizilo oksidazės ir I tipo kolageno sintezė, sukuriama palanki mikroaplinka naviko ląstelėms judėti ir plisti¹⁹¹. Sintetinos tarpląstelinio užpildo metaloproteinazės skatina TGF- β veiksnio sintezę, kuri aktyvina VEGF¹⁸⁸. Šio veiksnio sintezę taip pat aktyvina naviko mikroaplinkos sąlyga – hipoksija¹¹⁴. Susiformavus naujoms kraujagyslėms ne tik užtikrinamas deguonies ir maisto medžiagų tiekimas į naviką, bet ir atsiranda galimybė navikui išplisti į gretutinius audinius ar tolimuosius organus¹¹⁴. Taigi ankstyvojoje naviko stadijoje sintetinami veiksniai (TGF- β , γ interferonas, TNF- α) kuria uždegiminę mikroaplinką, kuri palanki navikui vystytis, o vėliau, navikui susiformavus, aktyviai prisideda prie navikinių ląstelių proliferacijos, išgyvenamumo ir išplitimo¹⁸⁹.

2.5.1 Krūties vėžys ir naviką infiltruojantys limfocitai

NIL – imuninį atsaką prieš naviką apibūdinantis mikroaplinkos komponentas, siejamas su geresne pacientų prognoze^{181, 182, 192}. Nustatyta, kad CD3+, CD4+, CD8+, FOXP3+ NIL sudėtis, tankis ir jų pasiskirstymas naviko audinyje turi klinikinę reikšmę tokiuose navikuose kaip melanoma, storosios žarnos, plaučių, šlapimo pūslės, prostatos, inkstų ir kepenų karcinomos^{179, 181, 193, 194}. Ilgą laiką manyta, kad KV nėra imonogeniškas, ypač palyginti su melanoma ar storosios žarnos navikais, tačiau išsamūs

imuninių ląstelių tyrimai atskleidė, kad didesnis NIL tankis KV atveju taip pat susijęs su geresniu pacientų atsaku į gydymą ir ilgesniu išgyvenamumu^{39, 195}.

NIL klinikinės savybės susijusios ne tik su limfocitų infiltracijos kiekiu, bet ir su infiltruojančių limfocitų fenotipu^{181, 182, 192, 196, 197}. Limfocitai skirstomi į B ir T ląsteles, kurios naviko mikroaplinkoje sudaro didžiąją imuninių ląstelių dalį^{181, 192, 194}. T ląstelės skirstomos į CD4+ T pagalbinės ląsteles, **CD8+ citotoksines T ląsteles (CTL)** ir CD4+CD25+FOXP3+ T reguliacines (T_{reg}) ląsteles^{181, 192, 194}.

CD4+ T pagalbinės ląstelės yra pagrindinės ląstelės, reguliuojančios imuninio atsako eigą^{181, 194}. CD4+ ląstelės diferencijuojamos į dvi populiacijas – 1 ir 2 tipo T pagalbinės ląsteles^{181, 194}. 1 tipo T pagalbinės ląstelės sintetina γ interferoną, IL-2 ir TNF- β ^{181, 194}. Šie citokinai skatina ląstelinį imuninį atsaką, ypač CTL aktyvumą, todėl 1 tipo T pagalbinių ląstelių padidėjimas siejamas su geresne paciento prognoze¹⁸¹. 2 tipo T pagalbinės ląstelės sintetina humoralinį atsaką skatinančius citokinus – IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ir kt.^{181, 194, 198}. Nustatyta, kad IL-10 slopina antigeno paruošimą ir pateikimą dendritinėms ląstelėms ir aktyvina T_{reg}¹⁹⁸, o IL-4 skatina antikūnų gamybą ir eozinofilų infiltraciją į naviką¹⁹⁹. 2 tipo T pagalbinių ląstelių citokinai slopina makrofagus ir ląstelinį imuninį atsaką^{181, 194}. Minėtina, kad T pagalbinių ląstelių citokinų sintezės balanso pokyčiai (nustatomas padidėjęs 2 tipo T pagalbinių ląstelių tankis)⁴⁵ pastebimi jau esant ankstyvosioms KV stadijoms. Be to, nustatyta, kad padidėjusi šių citokinų sintezė skatina KV išplitimą į limfmazgius ir kaulų čiulpus, todėl ji siejama su blogesne paciento išgyvenamumo prognoze ir padidėjusia ligos atsinaujinimo rizika^{200, 201}. T pagalbinių ląstelių citokinų sintezės balanso pokyčiai dažniau nustatomi ER– ir TNKV²⁰⁰.

Priešingai negu CD4+ ląstelės, kurios tik gamina citokinus, **CD8+ T ląstelės** naviko mikroaplinkoje veikia kaip efektoriniai, pačios naikina naviko ląsteles^{181, 194}. Tai vieni svarbiausių imuninės sistemos komponentų, pasižyminčių naviką slopinančiu imuniniu atsaku. CTL turi granules, kuriose saugomi perforinai ir granzimai^{181, 194}. Atpažinus naviko antigenus, skatinamas citotoksinis efektas – CTL granulės nukreipiamos į kontakto vietą, perforinai suardo navikinės ląstelės membraną, o granzimai aktyvuoja kaspazes, kurios skatina apoptozę ir DNR fragmentaciją^{181, 194}. Didesnis CTL kiekis naviko mikroaplinkoje siejamas su geresne paciento prognoze ir ilgesniu paciento išgyvenamumu, ligai neatsinaujinant¹⁸¹.

T_{reg} ląstelės pasižymi imunitetą slopinančiu poveikiu^{36, 194, 202–204}. Į naviko mikroaplinką šias ląsteles pritraukia makrofagai, sintetindami įvairius chemokinus^{204, 205}. T_{reg} ląstelės sintetina TGF- β , IL-10, IL-35, γ interferoną ir

kitus citokinus, kurie slopina ląstelinį imuninį atsaką, CTL proliferaciją ir jų funkcijas, palaiko B limfocitų dauginimąsi ir skatina uždegiminę mikroaplinką, palankią navikui augti^{36, 194, 197, 202–204}. KV mikroaplinkoje dažniausiai nustatomas T_{reg} ląstelių kiekio padidėjimas, kuris siejamas su trumpesniu pacientų išgyvenamumu^{178, 202, 203}.

Vystantis KV, imuninių ląstelių infiltracija palaiapsniui auga – prasidėjus duktalinei hiperplazijai, pastebima T ir B imuninių ląstelių infiltracija, kuri didėja esant DCIS ir ypač išauga invazinio KV metu²⁰⁶. Ištyrus 27 DCIS mėginius, nustatyta, kad 78 proc. atvejų limfocitų infiltratas buvo didesnis negu 5 proc.²⁰⁷. Be to, pastebėta, kad didesnis NIL kiekis dažniau nustatomas jaunesnio amžiaus pacientams ir trejopai neigiamuose DCIS mėginiuose²⁰⁷, o V. N. Kristensen ir bendraautoriai²⁰⁸ įrodė, kad didesnis T ląstelių kiekis yra susijęs su palankesne pacientų prognoze, esant DCIS.

Tiriant KV, padidėjusi imuninių ląstelių infiltracija nustatoma maždaug 50 proc. KV atvejų²⁰⁹. Jei NIL užima daugiau negu 40–60 proc. naviko ploto, laikoma, kad KV turi gausų infiltratą ir toks KV yra priskiriamas limfocitų gausiam KV tipui^{25, 209}. Šis tipas nustatomas 20 proc. atvejų, esant TNKV, 16 proc. atvejų, esant HER2+ KV, ir 6 proc. atvejų, esant HR+ raiškiai^{25, 210}. Taigi KV galima laikyti imunogenišku^{44, 209, 211}.

2.5.2 Sąsaja tarp naviką infiltruojančių limfocitų ir pacientų prognozės

Kaip jau minėta, didesnis NIL tankis susijęs su geresne KV sergančių pacientų išgyvenamumo prognoze ir atsaku į chemoterapiją^{39, 195, 212–214}. Sergant KV, didžiausią klinikinę naudą patiria pacientai, kurių mėginiuose nustatomas limfocitų gausus infiltratas^{195, 215}. Atlikus tyrimą¹⁹⁵, kurio metu tirti 1 058 KV mėginiai, nustatyta, kad pacienčių, kurioms KV buvo išplitęs lokaliai ir KV mėginiuose nenustatytas limfocitų gausus infiltratas, patologinis atsakas į gydymą siekė tik 7 proc., o pacienčių, kurių KV mėginiuose buvo gausu limfocitų, – 40 proc. Be to, ištyrus 1 334 KV sergančias pacientes, nustatyta, kad padidėjęs į naviką infiltruojančių CD8+ T ląstelių kiekis yra susijęs su geresniu klinikiniu atsaku ir ilgesniu išgyvenamumu²¹⁵. Vis dėlto klinikiniam tyrimams^{29, 35, 36} pastarųjų rezultatų atkartoti nepavyko – statistiškai reikšmingų sąsajų tarp įvairių tipų KV sergančių pacientų prognozės ir didesnio NIL kiekio nenustatyta. Nepaisant to, T_{reg} susietos su blogesne pacientų prognoze esant visų tipų KV. G. J. Bates ir bendraautoriai²⁰², ištyrę daugiau negu 200 KV mėginių, įrodė, kad, jei mėginyje yra nustatoma daugiau negu 15 FOXP3 raišką vykdančių ląstelių, KV yra linkęs atsinaujinti, o pacientų išgyvenamumo trukmė yra trumpesnė. Galima manyti, kad šie rezultatai įrodo, jog, net ir tiriant visus

KV tipus kartu, NIL sudėtis ir tankis turi įtakos klinikiniam rezultatui. Vis dėlto NIL klinikinis poveikis skirtinguose KV tipuose turėtų būti vertinamas atskirai²⁰⁹, nes skirtingose KV grupėse yra nevienodos atitinkamų imuninės kilmės ląstelių proporcijos²¹⁶.

Detalūs KV mikroaplinkos tyrimai atskleidė, kad ER+ navikuose didžiąją infiltrato dalį sudaro NŽ, neutrofilai, T_{reg}, makrofagai, putliosios ląstelės ir tik nedidelę dalį – CD8+, CD4+ ir B ląstelės^{195, 215–218}. ER–, HER2– ir TNKV atvejais nustatyta, kad šių navikų mikroaplinkoje vyrauja T_{reg}, makrofagai, putliosios ląstelės, mažesnę infiltrato dalį sudaro CD8+, CD4+ ir dendritinės ląstelės. HER2+ navikuose imuninį infiltratą sudaro dendritinės, putliosios ląstelės, T_{reg} ir neutrofilai^{216, 217}. Taip pat įrodyta, kad maždaug 60 proc. navikų, kuriuose nustatomas CD8+ T ląstelių gausus infiltratas, sudaro HER2+ ir TNKV atvejai ir tik 50 proc. HR+ atvejų imuniniame infiltrate vyrauja CTL²¹⁰.

HER2+ ir TNKV atvejais nustatyta, kad laipsniškas limfocitų kiekio didėjimas navike ir stromoje yra susijęs ne tik su geresne pacientų prognoze, bet ir atsaku į chemoterapiją^{37, 39, 219, 220}. Ištyrus 256 TNKV mėginius, įrodyta, kad laipsniškas NIL didėjimas kas 10 proc. yra susijęs su 17 proc. sumažėjusia ligos pasikartojimo rizika ir 27 proc. padidėjusiu pacientų išgyvenamumu³⁹; ištyrus 122 HER2+ navikus, nustatyta, kad laipsniškas limfocitų didėjimas stromoje kas 10 proc. yra susijęs su 18 proc. padidėjusiu pacientų išgyvenamumu³⁷. Vis dėlto didesnis CD8+ T ląstelių tankis su ilgesniu bendruoju pacientų išgyvenamumu susietas tiriant tik TNKV mėginius²⁹, bet ne HER2+ imtį, kurioje didesnis CD8+ T ląstelių tankis susietas tik su ilgesniu pacientų išgyvenamumu ligai neatsinaujinant²²¹.

HR+ ir HER2– duktalinių karcinomų NIL kiekio ir išgyvenamumo sąsajų rezultatai yra priešaringi^{29, 35–39}. Pavyzdžiui, M. V. Dieci ir bendraautoriai³⁷, U. Krishnamurti ir kt.³⁸ bei S. Loi ir kt.³⁹, vizualiu būdu ištyrę daugiau negu 1 700 HRDK mėginių (atitinkamai – 463, 187 ir 1 078 mėginius), statistiškai reikšmingo ryšio tarp NIL ir prognozės nenustatė, tačiau D. Krijgsman ir bendraautoriai⁴⁰, pritaikę SVA ir ištyrę 98 HRDK atvejus, nustatė tendenciją, kad didesnis CD8+ ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis naviko šerdyje ir IK (žr. 2.5.3. poskyrį) yra susiję su ilgesniu pacienčių išgyvenamumu. Nepaisant to, manoma, kad HRDK CTL kiekio sumažėjimas, palyginti su HER2+ ir TNKV, yra susijęs su ER+ raiška, kuri skatina 2 tipo T pagalbinių ląstelių kuriamą imuninę mikroaplinką^{222, 223}. Galima prielaida, kad HR+ navikai sintetina mažiau žmogaus audinių suderinamumo komplekso molekulių, kurios būtinos aktyviam antinavikinio imuniteto atsakui^{222, 223}. Šią hipotezę taip pat patvirtino T. O'Meara ir kt.²²⁴. Tyrejai, atlikę genų raiškos tyrimų rezultatų analizę, 697 ER+ ir 191 TNKV

mėginiuose nustatė, kad limfocitų gausiuose ER+ navikuose vyrauja su navikais susiję makrofagai (M2 tipas) ir putliosios ląstelės, o CTL infiltratas sudaro tik nedidelę dalį. Vis dėlto, atliekant minėtą tyrimą, nenustatyta, kad pacientų, kuriems būdingas limfocitų gausus ER+ navikas, išgyvenamumo prognozė statistiškai reikšmingai skirtųsi nuo pacientų, kurių mėginiuose nustatytas limfocitų gausus TNKV. Buvo įrodyta, kad limfocitų gausiuose ER+ navikuose CD8+ T ląstelės pasižymi sumažėjusiu citotoksinu efektyvumu ir mažesne perforino sinteze, todėl iškelta prielaida, kad padidėjusi TGF- β veiksmų sintezė ER+ navikuose išreguliuoja CTL funkcijas arba slopina CTL infiltraciją į naviką²²⁴. G. J. Bates ir bendraautoriai²⁰², ištyrę 148 HRDK mėginius, patvirtino, kad padidėjęs T_{reg} kiekis yra susijęs su blogesniu HRDK pacientų išgyvenamumu ir padidėjusia ligos atsinaujinimo rizika. Taigi minėti tyrimai ne tik patvirtina, kad net ir nedidelis NIL padidėjimas KV mėginiuose gali būti susijęs su ilgesniu pacientų išgyvenamumu ir mažesne ligos atsinaujinimo rizika^{39, 195}, bet ir leidžia daryti prielaidą, kad, nepriklausomai nuo KV tipo, pagal imuninių ląstelių kiekį ir sudėtį galima atrinkti tas pacientes, kurioms būtina taikyti agresyvesnę gydymo strategiją ar imuninę sistemą reguliuojantį gydymą (imunoterapiją)^{224, 225}.

Antra vertus, ne visuomet padidėjęs NIL kiekis yra susijęs su geresne paciento prognoze. Navikas imuninių atsaką slopina ir tiesiogiai sąveikaudamas su imuninėmis ląstelėmis^{44, 45}. Nustatyta, kad KV būdinga padidėjusi PD-L1 ir 2-ojo užprogramuoto ląstelių mirties baltymo ligandų (PD-L2) sintezė^{192, 226}. PD-L2 gali jungtis su aktyvuotų T, B, NŽ, dendritinių ląstelių, monocitų ar makrofagų paviršiuje sintetinamu užprogramuotu ląstelių mirties baltymu (PD-1)⁴⁶ ir slopinti atitinkamos imuninės ląstelės atsaką⁴⁶. Naviko ląstelės, pasitelkdamos šį signalinį kelią, taip pat reguliuoja CTL funkcijas – slopina ląstelių proliferaciją, augimą ir išgyvenamumą. Tokiu būdu naviko mikroaplinkoje skatinama CTL tolerancija ir slopinamas antinavikinis imuninis atsakas⁴⁶. Duktalinės krūties karcinomos atveju padidėjusi PD-L1 raiška dažniau nustatoma esant ER– ir didesniai CD8+ T ląstelių tankiui^{226–228}. Šio veiksmo sąsajos su KV pacientų prognoze nevienareikšmės²²⁹, tačiau tai svarbus predikcinis veiksnys terapijai, nukreiptai prieš PD-1 ar PD-L1^{47–51}. Vis dėlto tik nedidelei daliai (3–19 %) KV sergančių pacientų ši imunoterapija yra efektyvi^{47–51}. Išsamūs NIL tyrimai, esant KV, įrodė, kad CD8+ T ląstelės, net ir sintetinančios PD-1, gali atlikti citotoksinę funkciją. Kelinama prielaida, kad PD-1 veiklą gali reguliuoti ir kiti genetiniai ar epigenetiniai mechanizmai²³⁰.

Genų raiškos tyrimais nustatyta, kad SATB1 reguliuoja ne tik genus, skatinančius naviko ląstelių diferenciaciją, proliferaciją ar apoptozę, bet ir

maždaug 300 T ląstelių genų, sietinų su T ląstelių proliferacija, diferenciacija ir imuninio atsako funkcijomis^{231–233}. Nustatyta, kad pelių, kurios neturi SATB1 geno, T ląstelių vystymasis sutrikdomas esant CD4+CD8+ stadijai, taip užkertant kelią veiklioms CD4+ ar CD8+ T ląstelėms susiformuoti²³². T. L. Stephenas ir bendraautoriai²³⁴, tirdami peles, taip pat nustatė, kad SATB1 reguliuoja PD-1 baltymo sintezę: T ląstelėse sutelkia histonų deacetilazes ties *Pcdcl* genu, slopina šio geno raišką ir 40 kartų padidina PD-1 baltymo sintezę^{234, 235}, kuri ir slopina T ląstelių proliferacinį pajėgumą ir jų efektorines funkcijas²³⁴. S. Nüssing ir bendraautoriai²³⁶ SATB1 sintezės pokyčius nustatė žmogaus audiniuose (kraujyje, užkrūčio liaukoje, blužnyje, limfmazgiuose) ir pavirtino, kad SATB1 sintezės sumažėjimas skatina T ląstelių funkcijų sutrikimus. Remiantis šių tyrimų rezultatais, galima kelti hipotezę, kad SATB1 raiškos nustatymas naviko mikroaplinkoje gali būti svarbus tiriant T ląstelių funkcines savybes²³⁷.

2.5.3 Naviką infiltruojančių limfocitų nustatymas krūties navikuose

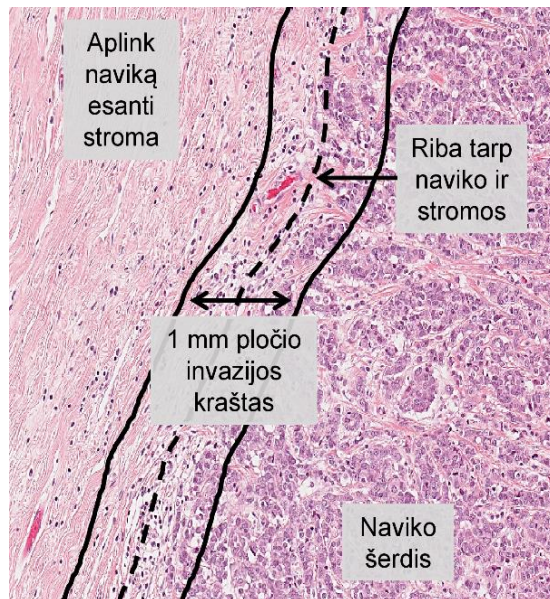
NIL įvertinimas tiriant KV histopatologinius mėginius iki šiol nėra įdiegtas į kasdienę klinikinę praktiką^{24–26}, tačiau 2017 m. Tarptautinė imunoonkologinių biožymenų darbo grupė parengė rekomendacijas^{25, 26}, standartizuojančias NIL įvertinimą įvairių tipų, taip pat ir KV, navikuose. Remiantis šia sistema, NIL turi būti tiriami analizuojant hematoksilinu ir eozinu dažytus mėginius, kurių paruošimas standartizuotas patologijos laboratorijose ir lengvai prieinamas^{25, 26}. Taikomi šie vertinimo kriterijai^{24–26}:

1. NIL vertinami tik invazinio naviko ribose. Pirmiausia nustatomas naviko ir stromos IK, kuris apibūdinamas kaip 1 mm pločio regionas, vienodu atstumu išplėstas į naviko ir stromos puses nuo naviko ir stromos ribos, skiriančios naviko šerdį nuo aplink naviką esančios stromos (2.2 pav.). Šiame regione esantys limfocitai taip pat įtraukiami į bendrąjį NIL įvertinimą, t. y. atskirai nevertinami, o imuninis infiltratas, esantis už IK ribų, DCIS komponentuose ar normaliose liaukose, nėra vertinamas. Nekrozės ir (ar) fibrozės plotai, artefaktai į vertinimo regioną taip pat neturi būti įtraukti.

2. Atskiriamos dvi limfocitų populiacijos – NIL, esantys stromos regione, ir NIL, esantys naviko šerdyje. KV atveju rekomenduojama vertinti tik stromoje esančius NIL. Atliekant vertinimą, turėtų būti skaičiuojamos tik mononuklearinės ląstelės – limfocitai ir plazmos ląstelės, bet ne granuliocitų infiltratas.

3. Nustatomas vidutinis NIL tankis, kuris išreiškiamas procentais, t. y. suskaičiuojamos visos mononuklearinės ląstelės stromoje, jų skaičius dalijamas iš stromos regiono ploto. Navikas priskiriamas atitinkamai kategorijai:

- a) imuninio infiltrato nėra arba jis minimalus, jei nustatyta 0–10 % NIL,
- b) vidutinis imuninis infiltratas, jei nustatyta 10–40 % NIL,
- c) gausus imuninis infiltratas, jei nustatyta 40–90 % NIL.



Naviko ir stromos riba skiria naviko šerdį nuo aplink naviką esančios stromos, žymima punktyrine linija. 1 mm pločio invazijos kraštas pažymėtas išsilenėmis linijomis.

2.2 pav. Ribos tarp naviko ir stromos bei invazijos krašto nustatymo pavyzdys (parengta pagal S. Hendry ir kt.^{25, 26})

Remiantis Tarptautinės imunoonkologinių biožymenų darbo grupės rekomendacijomis^{24–26}, NIL vertinami hematoksilinu ir eozinu dažytuose mėginiuose pusiau kiekybiniu būdu, tačiau šis metodas nepasižymi dideliu tikslumu ir rezultatų atkartojimu, nėra galimybės įvertinti imuninių ląstelių fenotipo (sudėties) ir erdvinio aspekto, o kiekybinis įvertinimas yra subjektyvus ir labai priklauso nuo vertintojo patirties^{25, 26, 238–240}. Minėtini siūlomi alternatyvūs metodai, visų pirma, pagrįsti IHC^{22, 25, 26, 28, 240}, kurie leidžia nustatyti konkrečias imunines ląsteles, pavyzdžiui, CTL, T pagalbinės ląsteles, T_{reg}, makrofagus ir dendritines ląsteles, pagal vieną ląstelių paviršiaus biožymenį arba taikant kelių ląstelių paviršiaus biožymenų IHC nustatymo būdą, pavyzdžiui, siekiant nustatyti mieloidinės

kilmės ląstelės^{23, 25, 26}. Rekomenduotini ir kiti alternatyvūs tyrimo būdai, pavyzdžiui, daugybė imunofluorescencija, daugybė IHC, naudojant fluorescencinėmis žymėmis žymėtus antikūnus (*NanoString Technologies*), informacinės ribonukleino rūgšties (iRNR) nustatymas ir kt.^{25, 26}. Svarbiausias šių technologijų bruožas – galimybė nustatyti imuninio komponento sudėtį^{22, 23, 25, 26, 28}.

Norint įvertinti NIL, taip pat svarbu tiksliai apibrėžti jų vietą navikiniame audinyje^{25, 26, 181}. Remiantis NIL įvertinimo rekomendacijomis, būtina ne tik atskirti naviko ir stromos regionus, bet ir aiškiai nustatyti IK²⁵⁻²⁷. 1986 m. J. R. Jassas ir bendraautoriai²⁴¹, tirdami tiesiosios žarnos karcinomos histomorfologinius prognozinis rodiklius, pasiūlė skirti du skirtingus IK tipus: stumiantįjį ir infiltracinį. Stumiantįjį IK galima nustatyti, kai navikas ir stromos komponentai yra lengvai atskiriami ir tarp jų matyti aiški riba. Infiltracinį IK nustatyti gana sudėtinga, nes šį IK tipą turintys navikai pasižymi netaisyklingu augimo modeliu, kai imuninis komponentas yra infiltravęs į naviko šerdį, nesant aiškių ribų^{241, 242}. Taikant NIL vertinimo rekomendacijas, į skirtingus naviko augimo modelius neatsižvelgiama, todėl galima teigti, kad rekomenduojamas IK apibrėžimas yra gana dviprasmis, nes nepaaiškina, kas yra IK, ypač infiltracinio modelio navikuose. Be to, siekiant IK nustatyti ar nubrėžti, reikia itin patyrusio patologo sprendimo²⁴³. Kaip alternatyvą vizualiam IK nustatyti, N. Harder ir bendraautoriai²⁸ pasiūlė automatinį IK nustatymo būdą, kuris remiasi naviko morfologinėmis savybėmis bei 18-ojo citokeratino ir p63 biožymenų raiškos rezultatais, leidžiančiais atskirti navikinį audinį nuo nenavikinio. Naviko ir stromos regionus atskyrę SVA būdu, tyrėjai išskyrė IK, kuris nuo automatiškai nustatytos naviko ir stromos ribos į naviko ir stromos regionus buvo nutolęs vienodu atstumu (112,5 μm)²⁸. Toks IK nustatymo būdas leido išvengti vertintojo šališkumo ir užtikrinti atsikartojančius tyrimo rezultatus.

SVA metodas taip pat rekomenduotas imuninėms ląstelėms tiksliai kiekybiškai suskaičiuoti ir erdviniam aspektams įvertinti^{22, 239}. Ši nauja audinio technologija, pagrįsta aukštos skiriamosios gebos skaitmeninio viso patologijos mikroskopinio vaizdo analize, leidžia gauti tikslius kiekybinius parametrus, tokius kaip ilgis, paviršiaus plotas, objektų skaičius, perimetras, atstumas iki artimiausio kaimyno ir kitas savybes, kurios negali būti tiksliai įvertintos vizualiai, bet gali būti išmatuotos, taikant SVA algoritmus²⁴⁴⁻²⁴⁶. Tokie metodai sukuria didžiulį kiekį duomenų, kurių nebegalima analizuoti tradiciniais statistiniais metodais, todėl, siekiant geriau įvertinti naviko žymenų erdvinį pasiskirstymą ir nustatyti esminius prognozinis rodiklius, naudojami gilaus mokymo ir kiti dirbtinių neuroninių tinklų modeliai²⁴⁴⁻²⁴⁸. Išsamūs storosios žarnos imuniteto tyrimai, taikant IHC ir SVA metodus,

leido nustatyti, kad CD3+ ir CD8+ NIL tankis ir jų pasiskirstymas naviko audinyje turi didelę prognozinę vertę²². Šis atradimas buvo perkeltas į kliniškai patvirtintą testą (*Immunoscore*, Paryžius, Prancūzija), kuris pasitvirtino kaip nepriklausomas prognozinis veiksnys, pranokstantis įprastinę TNM klasifikavimo sistemą²¹. Taigi nauji tyrimų būdai leidžia ne tik įvertinti infiltruojančių limfocitų fenotipą ar jų kiekį, bet ir erdviškai įvertinti žymenų pasiskirstymą naviko audinyje^{21–23}.

2.6. Naviko heterogeniškumas

Naviko heterogeniškumas (nevienalytiškumas) – naviko ląstelių, pasižyminčių skirtingų savybių ir požymių visuma, įvairovė. Tai naviko piktybiškumą apibūdinanti savybė^{249–251}.

Ląstelės gali skirtis morfologinėmis, genų raiškos, metabolizmo, judrumo, angiogenezės, proliferacijos, imunogeniškumo savybėmis ir išplitimo potencialu²⁵⁰. Skiriami du heterogeniškumo tipai: vidunavikinis ir tarpnavikinis heterogeniškumas^{251, 252}. Vidunavikinis heterogeniškumas pasireiškia dėl skirtingų ląstelių populiacijų navikiniame audinyje arba tarp pirminio naviko ir jo metastazių, o tarpnavikinis heterogeniškumas nustatomas tarp to paties histologinio tipo KV^{251, 252}. Nustatyta, kad heterogeniškumas turi įtakos ne tik KV diagnozei ar prognozei, bet ir gydymo strategijai parinkti²⁵¹ – neatsižvelgus į skirtingas ląstelių populiacijas, gali sumažėti terapijos efektyvumas ir paciento išgyvenamumo prognozės tikslumas²⁵³.

2.6.1 Tarpnavikinis heterogeniškumas

Tarpnavikinis heterogeniškumas skirstytinas į klinikinį, histologinį, biožymenų ir genetinį heterogeniškumą²⁵¹. Klinikinį ir histologinį tarpnavikinį heterogeniškumą geriausiai atspindi KV skirstymas pagal TNM klasifikavimo sistemą (žr. 2.4.1. poskyrį) ir histologinis klasifikavimas (žr. 2.4.2. poskyrį)^{127, 131, 251}. Šios klasifikacijos ne tik atspindi KV skirtumus – jos susijusios su pacientų išgyvenamumo prognoze ir gydymo strategijos parinkimu^{2, 7, 8, 127, 131}. Histologinį tarpnavikinį heterogeniškumą taip pat atspindi histologinis diferenciacijos laipsnis^{2, 127}. Nustatyta, kad skirtingą diferenciacijos laipsnį turintys KV atvejai smarkiai skiriasi ne tik proteominiu, bet ir genominiu bei transkriptominiu lygmeniu^{144, 149, 254}.

Biožymenų ir genetinį tarpnavikinį heterogeniškumą atspindi KV klasifikavimas pagal prognozinis ir predikcinius KV biožymenis (žr.

2.2. skyrių ir 2.4.3. poskyrių)^{9, 65, 67, 143, 147, 148}. KV biožymenų tarpnavikinį heterogeniškumą gali apibūdinti daugiau negu 1 000 skirtingų baltymų, pavyzdžiui, ląstelių augimą ir proliferaciją gali apibūdinti ne tik Ki67, bet ir survivinas bei 2-asis lipokalino baltymas, naviko išplitimą – p53 ar tarpląstelinio užpildo metaloproteinazės, imuninį atsaką – PD-L1 ir daugelis kitų biožymenų²⁵⁵. Genetinį tarpnavikinį heterogeniškumą atspindi įvairių genų raiškos pokyčiai (žr. 2.2. skyrių)^{9, 65, 67, 143, 147, 148}. Teigiama, kad genetinį heterogeniškumą nustelbia klinikinis ir molekulinis, tačiau genetinė įvairovė gali paaiškinti, kodėl pacientams, kuriems nustatytas tas pats histologinis ar molekulinis tipas ir taikoma tapati gydymo strategija, pasireiškia skirtingas klinikinis atsakas ir (ar) atsparumas terapijai²⁵⁶.

2.6.2 Vidunavikinis heterogeniškumas

Vidunavikinį heterogeniškumą galima suskirstyti į histologinį, biožymenų ir genetinį²⁵¹. Minėtini dar du skirtini tipai: erdvinis heterogeniškumas, kurį apibūdina ląstelių įvairovė navikiniame audinyje, ir heterogeniškumas laiko atžvilgiu (angl. *temporal heterogeneity*), kuris susiformuoja dėl besikeičiančių ląstelių, navikui progresuojant²⁵⁷.

Vidunavikinį erdvinį histologinį heterogeniškumą galima nustatyti ne tik pirminiame KV audinyje, bet ir atsižvelgiant į išplitimą į limfmazgius ar kitus organus²⁵¹. Vienas iš vidunavikinio erdvinio histologinio heterogeniškumo pavyzdžių – mišrusis KV, kurį sudaro dviejų skirtingų morfologinių komponentų ląstelės, pavyzdžiui, invazinės duktalinės ir mucininės karcinomos^{131, 251}. Heterogeniškumas laiko atžvilgiu formuojasi, pavyzdžiui, taikant gydymą, kurio metu vyksta ląstelių evoliucija: pirminio naviko ląstelės keičiasi, įgyja įvairių naujų savybių ir taip formuojasi ląstelių įvairovė navikiniame audinyje ar įvairovė išplitusių ląstelių atžvilgiu^{251, 258}.

Dabartinis KV gydymas priklauso nuo pirminio naviko histologinių, biožymenų raiškos ir molekulinųjų ypatybių, tačiau gydymo veiksmingumui įtakos gali turėti ir pakitusios morfologinės ir biožymenų raiškos savybės metastazėse^{10, 257}. Neatitikimų, tiriant ER raišką tarp pirminio naviko ir metastazių, nustatyta 33,6 proc., PgR – 32 proc., HER2 – 15,7 proc. atvejų²⁵⁹. Be to, nustatyta, kad moterims, kurioms buvo patvirtintas ER raiškos neatitikimas tarp pirminio naviko ir metastazių, mirties rizika padidėjo 48 proc.²⁵⁹. Šiandien dar nėra pakankamai duomenų, ar gydymas turėtų būti keičiamas keičiantis biožymenų raiškai, tačiau rekomenduojama ER, PgR ir HER2 raišką ištirti ir metastazėse²⁶⁰.

Reikia pastebėti, kad KV taip pat pasižymi nemažu vidunavikiniu genetiniu heterogeniškumu, kurį apibūdina įvairūs genetiniai pokyčiai,

skatinantys ląstelių funkcijų pasikeitimus, angiogenezę, naviko išplitimą ir kitus procesus^{257, 261, 262}. Nustatyta, kad vidunavikinis genetinis heterogeniškumas ypač būdingas *HER2* genui – 11–40 proc. KV atvejų turi nevienalytį geno pagausėjimą karcinomos ląstelėse^{263–266}. Manoma, kad dėl šios priežasties skirtingos ląstelių populiacijos lemia sumažėjusį atsaką į terapiją²⁶⁷ ir padidėjusią ligos atsinaujinimo riziką²⁶⁶.

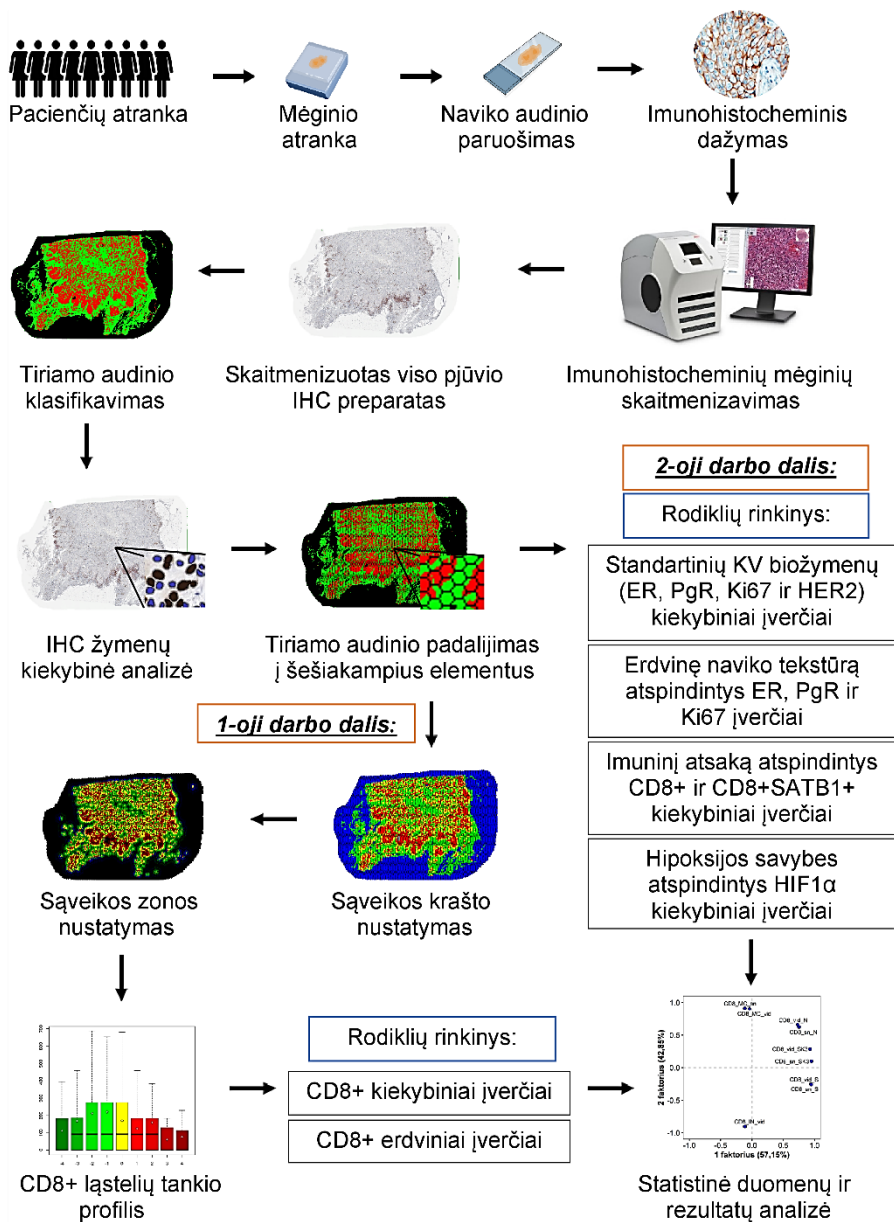
Vidunavikinį erdvinį biožymenų heterogeniškumą apibūdina biožymens raiškos nevienalytiškumas²⁵¹. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad ER, PgR ir *HER2* baltymų raiška KV audinyje yra nevienalytė^{263, 268–270}, tačiau, vertinant ER ar PgR raišką, Amerikos klinikinė onkologijos draugija ir Amerikos patologų kolegija rekomenduoja atsižvelgti tik į raišką vykdančių navikinių ląstelių procentinę dalį, nes nėra pakankamai duomenų apie biožymenų raiškos heterogeniškumo sąsajas su klinikiniais aspektais^{9, 271}. Vis dėlto, ištyrus 1 780 KV sergančių pacientų duomenis, įrodyta, kad vidunavikinis ER erdvinis heterogeniškumas yra nepriklausomas ilgalaikis prognozinis veiksnys, potencialiai galintis pakeisti pacienčių gydymo strategijos parinkimą, ypač esant A liuminalinio tipo navikams²⁷⁰. Manoma, kad ER erdvinis heterogeniškumas gali paaiškinti, kodėl net 50 proc. pacienčių, kurioms nustatoma ER+, hormonų terapija nėra efektyvi, o 25 proc. pacienčių išsivysto tolimosios metastazės^{270, 272, 273}.

Daug dėmesio taip pat skiriama *Ki67* biožymens raiškos heterogeniškumo tyrimams^{42, 43, 274–277}. Įrodyta, kad nevienalytė šio baltymo raiška yra pagrindinė priežastis, lemianti mažą vertintojų rezultatų atsikartojimą^{278, 279}. Iki šiol nėra vienos sistemos šio žymens raiškai įvertinti (keičiasi rekomenduojamos ribinės vertės (10–30 %)), nėra bendros nuomonės, kuris regionas turėtų būti vertinamas – visas tiriamas naviko plotas ar tik intensyviausia šio žymens raiškos vieta („karštasis taškas“)^{169, 170, 172, 173, 279, 280}. G. Stalhammaris ir bendraautoriai²⁸¹ nustatė, kad KV skirstymas į molekulinis KV tipus galėtų būti tikslesnis net 12 proc., jei histologinio tyrimo metu gydytojas patologas, vertindamas *Ki67* raišką, atsižvelgtų į SVA rezultatus – automatiškai nustatytą „karštąjį tašką“ ir *Ki67* procentinę dalį. Be to, taikant SVA ir šešiakampių gardelių principą, buvo įrodyta, kad vidunavikinis *Ki67* biožymens erdvinis heterogeniškumas yra prognoziškai svarbesnis negu šio biožymens raiška *per se*⁴². Taigi, norint įrodyti erdvinio heterogeniškumo svarbą navikiniame audinyje, būtina standartizuoti erdvinio heterogeniškumo nustatymo metodus ir technologijas^{169, 280}.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA

3.1. Tyrimo strategija

Disertacijos tyrimo strategija ir darbo modelis pateikiami 3.1 pav. Tyrimą sudarė 15 etapų. Pirmiausia retrospektyviam tyrimui atlikti atrinkta HRDK pacienčių imtis (n = 101), parinkti formaline fiksuoti ir parafinu impregnuoti naviko audiniai. Paruošti naviko pjūvio mėginiai nudažyti IHC metodais. Siekiant atlikti 7 biožymenų (ER, PgR, HER2, Ki67, CD8, SATB1 ir HIF1 α) SVA, visi IHC mėginiai skaitmenizuoti. Pasitelkus dirbtinio neuroninio tinklo pagrindu veikiančią krūties audinio klasifikatorių (*HALO AI tissue classifier*; *Indica Labs*, Koralis, JAV, žr. 3.3.3. poskyrį), KV audiniai suklasifikuoti į naviko epitelį, stromą ir fono klases, o sukūrus naviko ir stromos ląstelių segmentavimo ir atpažinimo SVA algoritmus, atliktas kiekybinis ir erdvinis biožymenų raiškos įvertinimas. Vėliau tiriamieji audiniai buvo padalyti į vienodo dydžio šešiakampius, kuriuose analizuoti SVA rezultatai. Automatiškai nustačius naviko ir stromos SZ, apskaičiuoti imuninio atsako parametrai, sukurtas imuninį atsaką vertinantis rodiklių rinkinys. Apskaičiuojant kompleksinį IHC biožymenų ir jų raiškos heterogeniškumo rodiklių rinkinį, atlikti KV ir jo mikroaplinkos ląstelių populiacijų kiekybiniai ir erdviniai tyrimai. Nustatyti rodikliai susieti su ligos patologija, klinika ir ankstyvosios stadijos HRDK pacienčių išgyvenamumo prognoze.



3.1 pav. Disertacijos tyrimo strategijos ir darbo modelio schema

3.2. Tiriamųjų imtis ir charakteristika

Į retrospektyvinį tyrimą įtraukta 2007–2009 m. Nacionaliniame vėžio institute gydyta 101 pacientė, kurioms Valstybiniame patologijos centre (VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filialas), tiriant chirurginės

operacijos būdu pašalintą naviką, buvo patvirtinta ankstyvosios stadijos (I ir II) HRDK. Tyrimams atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas 2017-09-12 Nr. 6B-17-189 (žr. 7 priedą). Iš visų pacienčių gautas informuoto asmens sutikimas dalyvauti biomediciniame tyrime, o surinktai biologinei medžiagai ir papildomiems biožymenų (CD8+) tyrimams atlikti užsitikrintas atleidimas nuo pareigos gauti informuoto asmens sutikimą.

Pacienčių klinikiniai ir patologiniai duomenys pateikti 3.1 lentelėje. Vidutinis pacienčių amžius – 58 m. (± 13 m., mediana – 59 m.), jauniausiai pacientei – 27 m., vyriausiai – 87 m. Pagal medianą pacientės suskirstytos į dvi amžiaus grupes: jaunesnių negu 59 m. amžiaus pacientų grupę sudarė 53 pacientės (52,5 %), vyresnių – 48 pacientės (47,5 %).

Vidutinis pacienčių stebėjimo laikotarpis – 121 mėnuo (nuo 17 iki 143 mėn., mediana – 135 mėn.). 5-erius metus išgyveno 93 pacientės (92,1 %), 10 metų laikotarpį – 77 pacientės (76,2 %).

Tiriant histologiškai, nustatyta, kad pagal pirminį naviką T1 grupę (naviko dydis – ≤ 2 cm) sudarė 55 pacientės (54,5 %), T2 grupę (naviko dydis – 2–5 cm) – 46 pacientės (45,5 %). Pagal išplitimą į sritinius limfmazgius 54 pacientės (53,5 %) sudarė N0 grupę (metastazių sritiniuose limfmazgiuose nenustatyta), 35 pacientės (34,7 %) – N1 grupę (nustatyta metastazių 1–3 sritiniuose limfmazgiuose), 9 pacientės (8,9 %) – N2 grupę (nustatyta metastazių 4–9 sritiniuose limfmazgiuose), 3 pacientės (3,0 %) – N3 grupę (nustatyta metastazių 10 ar daugiau sritinių limfmazgių). Tolimųjų metastazių (M0) neturėjo nė viena tyrime dalyvavusi pacientė. Pagal naviko diferenciacijos laipsnį 23 pacientės (22,8 %) skirtos į geros diferenciacijos grupę (G1), 47 pacientės (46,5 %) – į vidutinės diferenciacijos grupę, 31 pacientė (30,7 %) – į G3 grupę.

Atlikus chirurginę operaciją, pacientės gydytos 12 skirtingų terapijos būdų: 44 pacientėms taikyta hormonų terapija, chemoterapija ir radioterapija, 27 pacientėms – hormonų terapija ir radioterapija, 10 pacienčių – tik hormonų terapija, 7 pacientėms – chemoterapija ir radioterapija, 3 pacientėms – hormonų terapija ir chemoterapija, dar 10 pacienčių – kiti skirtingi terapijos būdai. Esant mažoms terapinio gydymo grupėms, biologinių žymenų predikcinė vertė disertacijoje neanalizuota.

3.1 lentelė. Pacienčių klinikiniai ir pataloginiai duomenys

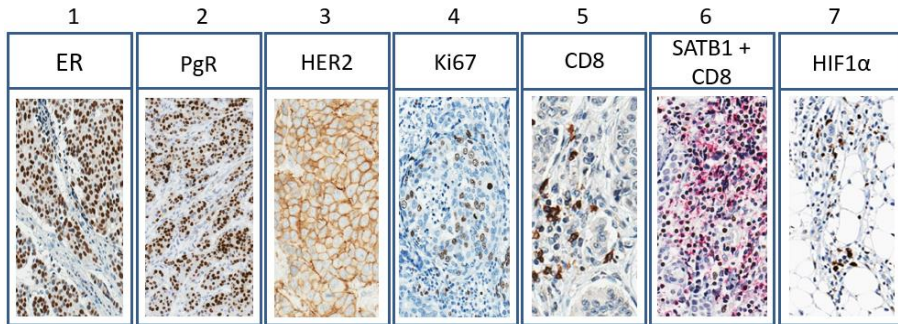
Pacienčių skaičius (procentas)	101 (100 %)
Pacienčių amžius, metai	
Vidurkis (\pm standartinis nuokrypis)	57,75 (\pm 12,68)
Mediana	59
Intervalas	27–87
Pacienčių amžiaus grupė, pacienčių skaičius (procentas)	
<59 m.	53 (52,5 %)
\geq 59 m.	48 (47,5 %)
Pacienčių stebėjimo laikotarpis, mėnesiai (procentas)	
Mediana	135
Intervalas	17–143
Mirčių skaičius, praėjus 5 m.	8 (7,9 %)
Mirčių skaičius, praėjus 10 m.	24 (23,8 %)
Naviko diferenciacijos laipsnis (G), pacienčių skaičius (procentas)	
G1	23 (22,8 %)
G2	47 (46,5 %)
G3	31 (30,7 %)
Pirminis navikas (T), pacienčių skaičius (procentas)	
T1	55 (54,5 %)
T2	46 (45,5 %)
T3	0
T4	0
Naviko išplitimas į limfmazgius (N), pacienčių skaičius (procentas)	
N0	54 (53,5 %)
N1	35 (34,7 %)
N2	9 (8,9 %)
N3	3 (3,0 %)
Naviko išplitimas į tolimuosius organus (M), pacienčių skaičius (procentas)	
M0	101 (100 %)
Gydymas, pacienčių skaičius (procentas)	
Endokrininė hormonų terapija	88 (87,1 %)
Chemoterapija	61 (60,4 %)
Radioterapija	85 (84,2 %)
Biologinė terapija prieš HER2	7 (6,9 %)

3.3. Tyrimo metodai

3.3.1 Krūties vėžio audinių paruošimas

Pagal naviko dydį ir likutinės tiriamosios medžiagos kiekį atrinkta po vieną 107 pacienčių formaline fiksuotą ir parafinu impregnuotą naviko audinį (bloką) tolesniems tyrimams atlikti. Minėtina, kad tiriamoji medžiaga atrinkta kartu su gydytoju patologu doc. dr. J. Besuspariu.

Tiriamoji medžiaga, panaudojant audinių mikrogardeles, buvo iširta anksčiau vykdytais tyrimais^{85, 282}. Atrinkti naviko audiniai panaudoti ruošiant po 7 serijinius 3 µm storio pjūvius tolesniems IHC dažymams. Mikrotomu atpjauti parafininiai navikų pjūviai uždėti ant teigiamai įelektrinto mikroskopinio stikliuko. Serijinių pjūvių seka ir analizuojamų biožymenų IHC dažymai pateikti 3.2 pav.



3.2 pav. Serijinių pjūvių seka ir analizuojamų biožymenų imunohistocheminiai dažymai

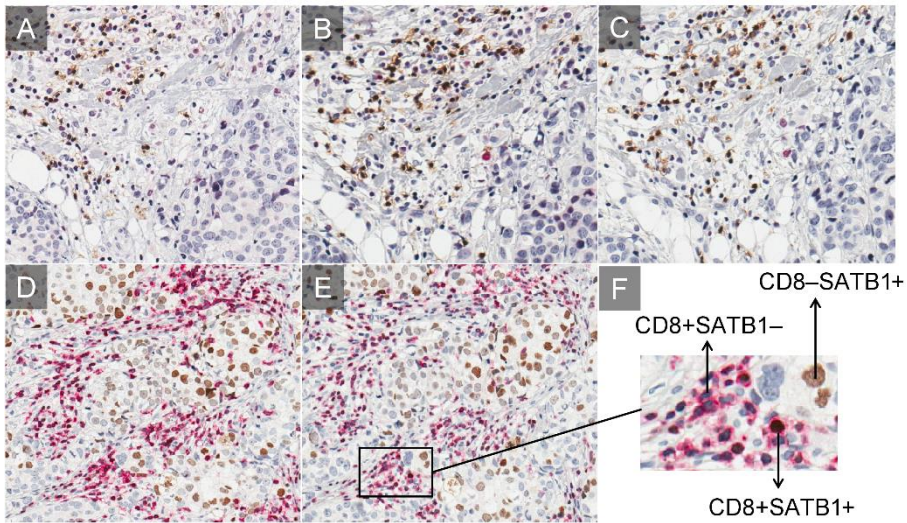
Atlikus visų šių atvejų IHC ir SVA, nustatyta, kad vidutinis naviko epitelio plotas siekė 37,52 mm² (\pm 28,10 mm², mediana – 28,67 mm², mažiausias plotas – 0,98 mm², didžiausias – 138,02 mm²).

Šešiais atvejais naviko plotas buvo mažesnis už 5-ąjį naviko plotų procentilį (5,93 mm²). Minėtus atvejus įvertinęs vizualiai, gydytojas patologas doc. dr. J. Besusparis patvirtino, jog analizuojamo invazinio naviko plotas yra per mažas išsamiems naviko ir jo mikroaplinkos tyrimams atlikti, todėl šie atvejai buvo pašalinti iš tolesnės analizės. Galutinę tiriamųjų imtį sudarė 101 HRDK pacientė.

3.3.2 Imunohistocheminiai tyrimai

ER, PgR, HER2, Ki67, CD8 ir HIF1 α raiškai nustatyti taikytas viengubos IHC (vIHC) metodas, kai vienos reakcijos metu išryškinamas vienas konkretus biožymuo. SATB1 ir CD8 raiškai nustatyti taikytas dvigubos IHC (dIHC) metodas, kai vienos reakcijos metu iš karto įvertinama dviejų IHC biožymenų raiška. Prieš IHC dažymo procedūrą vIHC ir dIHC protokolai buvo optimizuoti, keičiant antikūno skiedimą ir derinant antikūnų išryškinimo sistemas. Pagrindinis vertinimo kriterijus – vizualus tikslinio baltymo signalo ir foninio triukšmo intensyvumo įvertinimas. IHC protokolai taip pat turėjo būti pritaikyti SVA – net ir minimalus foninis triukšmas, analizuojant histologinį mėginį, turėjo būti pašalintas. Laikyta, kad protokolas tenkina reikalavimus, kai, vertinant vizualiai, tikslinio baltymo signalas buvo stiprus, fono intensyvumo iš viso nebuvo arba jis buvo minimalus.

dIHC reakcijos protokolas optimizuotas keičiant antikūnų skiedimo laipsnius ir derinant antikūnų išryškinimo sistemas. Pirmiausia, dIHC reakciją buvo bandyta optimizuoti naudojant antikūną prieš CD8 kaip pirminį biožymenį, kuriam išryškinti taikyta *ultraView Universal DAB Detection kit* sistema (Ventana, Tuksenas, JAV, baltymo raiška išryškinama ruda spalva), ir antikūną prieš SATB1 kaip antrinį biožymenį, kuriam išryškinti taikyta *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit* sistema (Ventana, baltymo raiška išryškinama raudona spalva). Dėl pernelyg intensyvaus raudonos spalvos foninio triukšmo ir nepakankamai stipraus SATB1 tikslinio signalo nepavyko protokolo optimizuoti, todėl antikūnai buvo sukeisti vietomis (pirminiu antikūnu naudotas SATB1, antriniu – CD8). Keičiant skiedimo laipsnius taip pat buvo sureguliuotas tikslinių signalų intensyvumas, siekiant aiškiai nustatyti viengubą raišką vykdančias ląsteles, t. y. ląsteles, kurios vykdo tik SATB1 (CD8–SATB1+) ar tik CD8 (CD8+SATB1–) baltymo raišką, ir dvigubas ląsteles, kurios vykdo CD8 ir SATB1 baltymų raišką (CD8+SATB1+). dIHC reakcijos optimizavimo procesas pateiktas 3.3 pav., optimalus protokolo pavyzdys – 3.3 pav. E ir F dalyse. Duomenys gauti SATB1 monokloninį antikūną skiedžiant santykiu 1:250 ir išryškinant ruda spalva, CD8 antikūną skiedžiant santykiu 1:1100 ir išryškinant raudona spalva.



(A–F) pateiktas dIHC protokolo optimizavimo procesas CD8 ir SATB1 raiškai nustatyti. (A, B, C) – dIHC reakcija, gauta išryškinant CD8 raišką vykdančias ląsteles ruda spalva, SATB1 – raudona, SATB1 ir CD8 raiškos nevykdančias ląsteles – mėlyna spalva. (A) – dIHC reakcija, gauta naudojant CD8 antikūną, kuris praskiestas santykiu 1:800, SATB1 – 1:400. Reakcijos rezultatas netinkamas – didelis raudonos spalvos foninis triukšmas, CD8 tikslinis signalas per stiprus. (B) – dIHC reakcija, gauta naudojant CD8 antikūną, kuris praskiestas santykiu 1:900, SATB1 – 1:500. Reakcijos rezultatas netinkamas – didelis raudonos spalvos foninis triukšmas, CD8 tikslinis signalas per stiprus. (C) – dIHC reakcija, gauta naudojant CD8 antikūną, kuris praskiestas santykiu 1:1000, SATB1 – 1:600. Reakcijos rezultatas netinkamas – SATB1 tikslinis signalas per silpnas. (D, E) – dIHC reakcija, gauta naudojant SATB1 antikūną, kuris išryškintas ruda spalva, ir CD8 antikūną, kuris išryškintas raudona spalva. (D) – dIHC reakcija, gauta naudojant SATB1 antikūną, kuris praskiestas santykiu 1:200, CD8 – 1:800. Reakcijos rezultatas netinkamas – CD8 tikslinis signalas (raudona spalva) per stiprus. (E, F) – dIHC reakcija, gauta naudojant SATB1 antikūną, kuris praskiestas santykiu 1:250, CD8 – 1:1100. Reakcijos rezultatas optimalus. (F) – remiantis optimaliu protokolu, galima tiksliai nustatyti raišką vykdančias ląsteles, t. y. ląsteles, kurios sintetina tik SATB1 (CD8–SATB1+), tik CD8 baltymą (CD8+SATB1–) ir dvigubą raišką vykdančias ląsteles, kurios sintetina CD8 ir SATB1 baltymus (CD8+SATB1+).

3.3 pav. Dvigubos imunohistocheminės reakcijos optimizavimo procesas CD8 ir SATB1 baltymų raiškai nustatyti

Optimizavus protokolus, atlikti vIHC ir dIHC dažymai, naudojant visiškai automatizuotą *Ventana BenchMark ULTRA* (Ventana Medical Systems, Tuksenas, JAV) dažymo sistemą. Įgyvendinti visi IHC etapai: deparafinizavimas, dehidratavimas, antigenų epitopų atkūrimas, titravimas ir dažymas. Prieš reakcijos pradžią paruošti viso pjūvio histologiniai mėginiai 40 min. buvo laikomi kambario temperatūroje (20 °C) ir 60 min. termostate (56 °C temperatūroje). Paskui pjūviai įdėti į dažymo automatą, kuriame

atliktas deparafinizavimas, naudojant *EZ prep solution* (Ventana) tirpalą. Antigenų epitopai atkurti 36 min. kaitinant 95 °C temperatūroje ir naudojant Ventana ląstelių kondicionavimo tirpalą (*CCI*, angl. *cell conditioning solution*), kurio pH – 8,5. vIHC atlikti naudoti šie antikūnai:

1) triušio monokloninis antikūnas prieš ER (SP1 klonas, Ventana, paruošto skiedimo),

2) triušio monokloninis antikūnas prieš PgR (1E2 klonas, Ventana, paruošto skiedimo),

3) triušio monokloninis antikūnas prieš HER2 (4B5 klonas, Ventana, paruošto skiedimo),

4) pelės monokloninis antikūnas prieš Ki67 (MIB-1 klonas, Dako (Glostrupas, Danija), skiedimas 1:200),

5) triušio monokloninis antikūnas prieš HIF1 α (EP118 klonas, Epitomics (San Mateo, JAV), skiedimas 1:200),

6) pelės monokloninis antikūnas prieš CD8 (C8/144B klonas, Dako, skiedimas 1:200).

Mėginiai inkubuoti savitu antikūnu 37 °C temperatūroje 32 min. ir išryškinti 36 °C temperatūroje 8 min., naudojant *ultraView Universal DAB Detection kit* sistemą (Ventana). Ląstelių branduoliai kontrastuoti Mejerio hematoksilinu. Pasibaigus dažymo procedūrai, histologiniai pjūviai išimti iš automatinės sistemos ir plauti švelniu indų plovimo detergentu. Vėliau histologiniai mėginiai dehidratuoti etilo alkoholyje ir izopropanolyje ir uždengti dengiamuoju stikleliu, naudojant *Biomount* medžiagą (Biognost, Zagrebas, Kroatija).

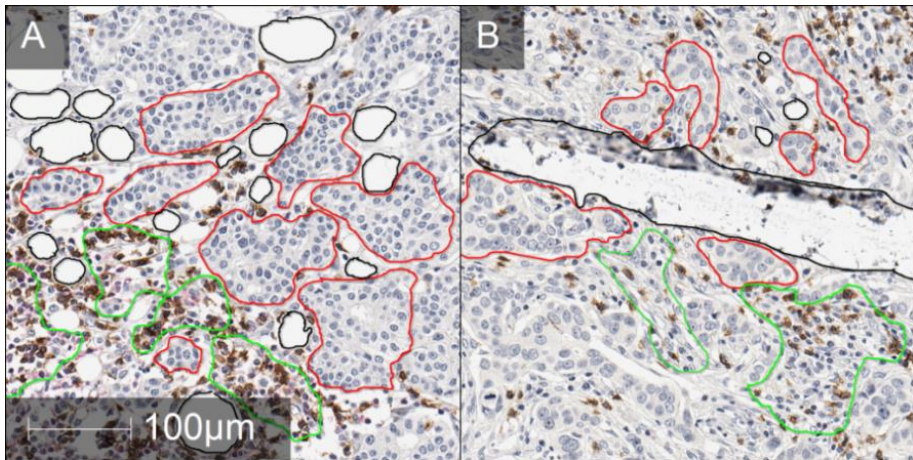
Atliekant SATB1 ir CD8 dIHC dažymą, mėginiai inkubuoti triušio monokloniniu antikūnu prieš SATB1 (SP287 klonas, Abcam (Kembridžas, Jungtinė Karalystė), skiesta santykiu 1:250) 37 °C temperatūroje 32 min. ir išryškinti, naudojant *ultraView Universal DAB Detection kit* sistemą. Pasibaigus šiai reakcijai, antigenų epitopai dar kartą atkurti kaitinant 95 °C temperatūroje 4 min. Vėliau mėginiai 37 °C temperatūroje 62 min. inkubuoti antriniu CD8 antikūnu (skiesta santykiu 1:1100), kuriam išryškinti naudota *ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit* (Ventana) sistema. Pasibaigus dIHC reakcijai, histologiniai pjūviai išimti iš automatinės sistemos, plauti švelniu indų plovimo detergentu. Ląstelių branduoliai kontrastuoti Mejerio hematoksilinu 37 °C temperatūroje 10 min. Vėliau histologiniai mėginiai praskalauti 37 mM amonio vandenyje, dehidratuoti etilo alkoholyje ir izopropanolyje ir uždengti dengiamuoju stikleliu, naudojant *Biomount* medžiagą.

3.3.3 Skaitmeninė vaizdo analizė ir krūties vėžio audinio klasifikavimas

Viso naviko pjūvio IHC mėginiai skaitmenizuoti *ScanScope XT Slide Scanner* objektinių stiklelių skeneriu (*Leica Aperio Technologies*, Vista, JAV), taikant 20x padidinimą, kuris atitiko 0,5 μm skiriamąją gebą.

SVA atlikta naudojant *HALO* programinės įrangos platformą (versija 3.0311.174, *Indica Labs*, Koralis, JAV). Dirbtinio neuroninio tinklo pagrindu veikiantis *HALO AI tissue classifier* (versija 1.2) modulis pritaikytas atpažinti ir atskirti skirtingus audinių komponentus: naviko epitelį, stromą, nekrozės, uždegimo, stiklo, suardytų audinių ir kitas artefaktų turinčias audinio struktūras. Minėti komponentai priskirti 3 skirtingoms klasėms: naviko epitelis – naviko klasei, stroma – stromos klasei, nekrozės, uždegimo, stiklo ir kitų artefaktų turinčios audinio struktūros (pavyzdžiui, navikinio audinio klostės, oro burbulai) – fono klasei.

Audinių klasifikavimo modulis pritaikytas skirtingoms audinio struktūroms atpažinti pagal 394 rankiniu būdu pažymėtų tikslinių audinio fragmentų tekstūrą ir pikselių spalvą: naviko klasei atpažinti pažymėtas 141, stromos klasei – 192, fono klasei – 61 audinio fragmentas (zona) (3.4 pav.). Naudoti skirtingų IHC dažymų (ER, CD8, HIF1 α bei SATB1 ir CD8 dIHC) ir skirtingos morfologijos ir diferenciacijos laipsnio 9 skaitmenizuoti KV audiniai. Audinio klasifikatorius paremtas 0,25 μm /pikseliui skiriamosios gebos taikymu ir nurodymu atskirti didesnius negu 1 000 μm^2 objektus. Tikslus audinio klasifikatorius sukurtas pasiekus 510 880 apmokymo ciklą, kai kryžminės entropijos (angl. *cross-entropy*) klaidos funkcija buvo mažesnė negu 0,01. Audinio klasifikatorius taip pat įvertintas analizuojant suklasifikuotus KV audinius vizualiai. Visų IHC dažymų KV audiniams klasifikuoti naudotas tas pats audinio klasifikatorius.

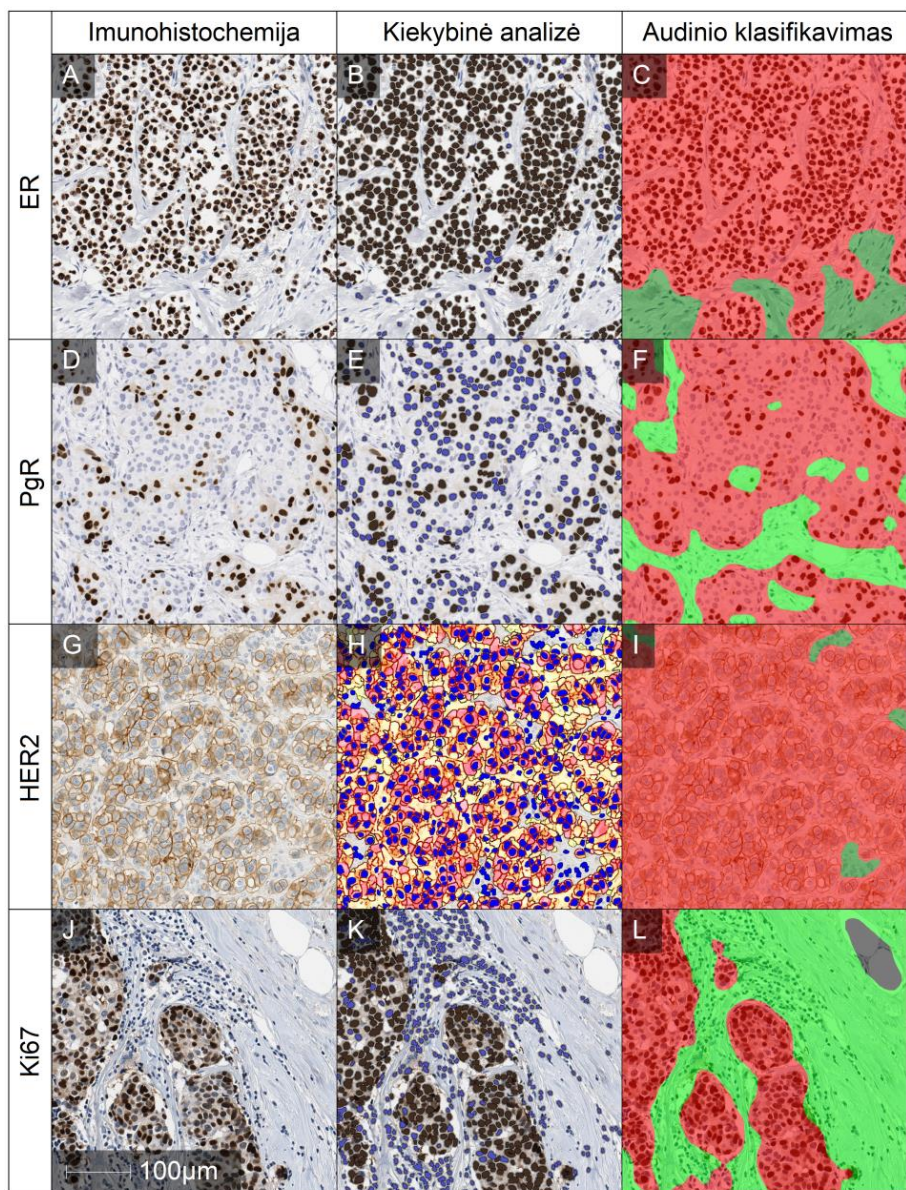


(A ir B) pateikti skaitmenizuoti CD8+ IHC vaizdai, kuriuose rankiniu būdu pažymėtos skirtingos audinio struktūros: raudona spalva – naviko epitelis, žalia – stroma, juoda – stiklas (A ir B) ir suardyto audinio struktūra (B).

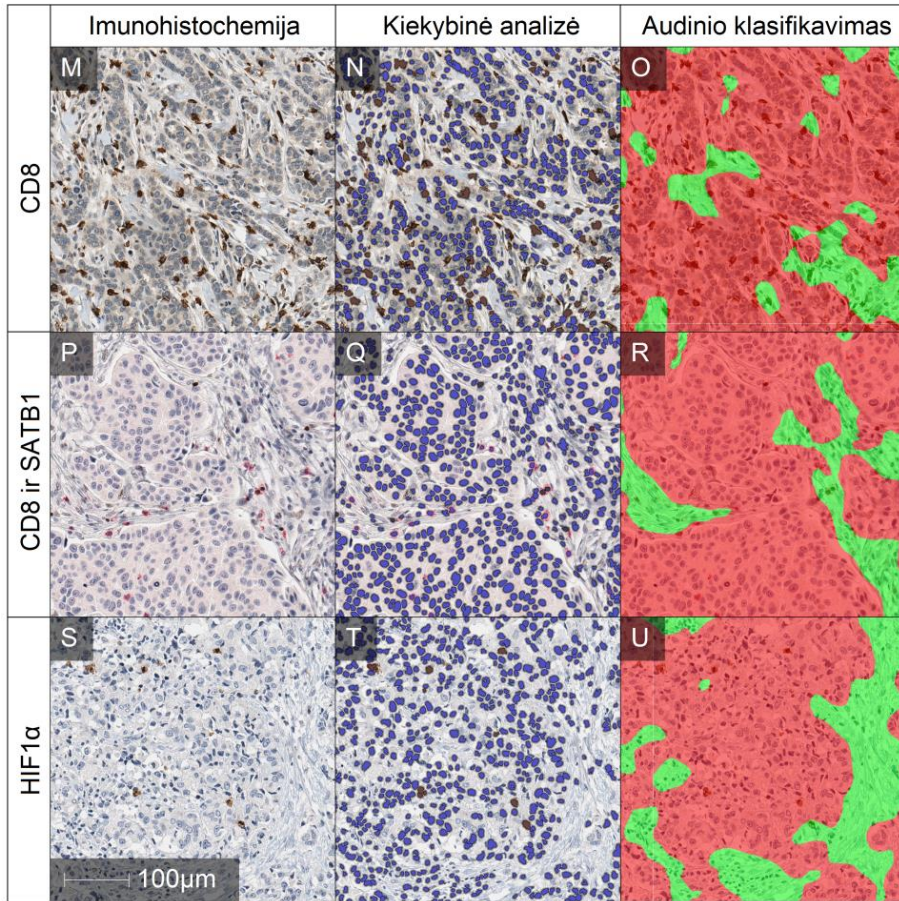
3.4 pav. Krūties vėžio audinio klasifikatoriui apmokyti panaudotos rankiniu būdu žymėtos skirtingos audinio struktūros

3.3.4 Kiekybinė imunohistocheminių biožymenų analizė

Siekiant įvertinti biožymens raiškos dalį skaitmenizuotuose IHC patologijos vaizduose, t. y. atlikti kiekybinę IHC biožymenų analizę, sukurti naviko ir stromos ląstelių segmentavimo ir atpažinimo SVA algoritmai. Branduolyje sintetiniams ER, PgR, Ki67 ir SATB1 baltymams, citoplazmoje sintetinamam CD8 bei branduolyje ir citoplazmoje sintetinamam HIF1 α nustatyti taikytas *HALO Multiplex IHC* algoritmas, membraninei HER2 baltymo raiškai – *HALO HER2* algoritmas (versija 1.1). Algoritmai sukalibruoti raišką vykdančioms ir nevykdančioms ląstelėms atpažinti, priskiriant atitinkamų ląstelių spalvų pikselius (pagal RGB spalvų maišymo sistemą) bei parenkant ląstelių atpažinimo parametrus – branduolių nustatymo jautrumą, kontrastą, optinį tankį, vientisumą, apvalumą, dydį ir ląstelių segmentavimo stiprumą. Naudojant kiekybinės analizės ir audinių klasifikavimo algoritmus, taip pat buvo sukurtas erdvinės analizės modulis, kuris leido ne tik nustatyti raišką vykdančias ar nevykdančias ląsteles ar jų procentinę dalį, bet ir įvertinti ląstelių populiacijų erdvinį pasiskirstymą naviko audinio mikroaplinkoje (naviko ir stromos dalyse). Šių analizių metu taip pat nustatytos tikslios ląstelių koordinatės tiriamajame audinyje. Kiekybinė analizė fono klasėje nebuvo atliekama. ER, PgR, HER2, Ki67, CD8, SATB1 ir CD8 bei HIF1 α IHC ir SVA rezultatų pavyzdžiai pateikti 3.5 pav.



tęsinys kitame puslapyje



ER IHC ir SVA rezultatai pateikti (A, B, C), PgR – (D, E, F), HER2 – (G, H, I), Ki67 – (J, K, L), CD8 – (M, N, O), SATB1 ir CD8 dIHC – (P, Q, R), HIF1α – (S, T, U). Kiekybinės analizės rezultatai pateikti (B, E, H, K, N, Q, T) – raiškos nevykdančios ląstelės žymimos mėlyna, raišką branduolyje vykdančios ląstelės – ruda spalvomis, atitinkamai ER – (B), PgR – (E), Ki67 – (K). HIF1α kiekybinės analizės rezultatas, analizuojant raišką tiek branduolyje, tiek citoplazmoje, pateiktas (T), analizuojant CD8 raišką citoplazmoje – (N). HER2 raišką vykdančios ląstelės suskirstytos pagal raiškos intensyvumą (H): jei raiška nėra vykdoma, ląstelės žymimos mėlyna spalva, geltona – jei HER2 baltymo raiška buvo silpna, oranžinė – jei raiška vidutinė, raudona – jei raiška buvo stipri. dIHC atveju (Q) SATB1 raišką vykdančios ląstelės žymimos ruda spalva, CD8+ ląstelės – raudona. SATB1 ir CD8 raiškos nevykdančios ląstelės – mėlyna spalva. (C, F, I, L, O, R, U) iliustruoja tiriamojo audinio klasifikavimą, taikant dirbtinio neuroninio tinklo pagrindu veikiančią audinio klasifikatorių. Šiuose pavyzdžiuose raudona spalva žymimas navikinis audinys, žalia – stromos audinys, juoda spalva – fono klasė.

3.5 pav. Imunohistochemijos, raišką vykdančių ir (arba) nevykdančių ląstelių kiekybinės analizės ir audinio klasifikavimo rezultatai

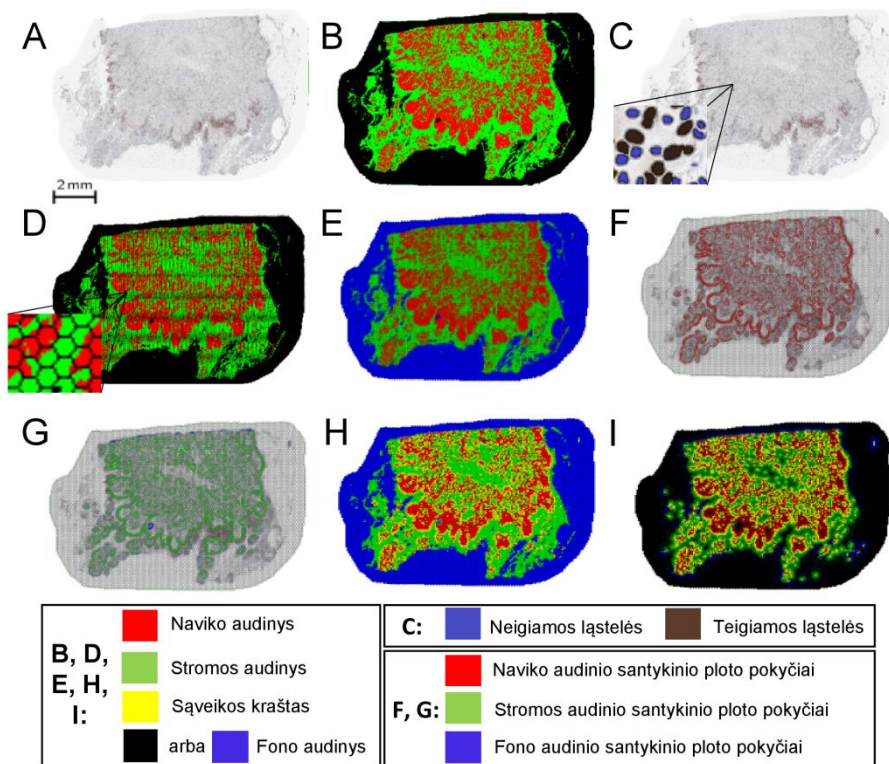
3.3.5 Krūties vėžio audinio dalijimas į šešiakampius elementus

Taikant B. Plancoulaine ir bendraautorių⁴³ sukurtą metodiką, IHC SVA rezultatai padalyti į vienodo dydžio šešiakampių gardelių elementus, kurie išdėstyti atsitiktine tvarka taip, kad apimtų visą analizuojamo naviko regioną ir nesikirstų su jokių kitų gardelės elementu. Šiuo būdu apdoroti SVA duomenys leido taikyti erdvinės analitikos metodus ir matematinės taisyklės naviko mikroaplinkos komponentams interpretuoti erdvėje. Siekiant automatiškai išskirti naviko ir stromos SK ir SZ, naudoti šešiakampiai, kurių kraštinės ilgis – 65 μm (skersmuo – 130 μm , plotas – 0,01 mm^2), o siekiant nustatyti IHC biožymenų raiškos heterogeniškumą KV audinyje, naudoti didesni elementai, kurių kraštinės ilgis – 257 μm (skersmuo – 514 μm , plotas – 0,17 mm^2). Naviko ir stromos SK nustatyti buvo naudojami mažesni šešiakampiai, siekiant gardelės elementuose užfiksuoti net ir minimalius audinio klasių santykinų plotų pokyčius.

3.6 pav. pateikiamas skaitmenizuoto CD8+ IHC KV naviko audinio pavyzdys. Tiriamoji medžiaga suklasifikuota į tris skirtingas audinio klases (B dalis), padalyta į vienodo dydžio šešiakampių gardelių elementus (D dalis). Toliau taikytas 3.3.6. poskyryje aprašytas automatinis naviko ir stromos SK bei SZ nustatymo metodas (D–I dalys).

Kiekviename elemente nustatyti ir (arba) apskaičiuoti įvairūs kintamieji:

- 1) naviko, stromos ir fono klasių santykiniai plotai (apskaičiuoti sudedant konkrečios klasės plotą kvadratiniais milimetrais kiekviename gardelės elemente ir padalijant iš visų klasių ploto kvadratiniais milimetrais sumos atitinkamame gardelės elemente),
- 2) ląstelių skaičius, procentas ir (arba) tankis,
- 3) informacija apie ląstelės tipą (vykdė konkretaus biožymens raišką ar jos nevykdė),
- 4) ląstelių koordinatės.



(A) – skaitmenizuotas CD8+ IHC vaizdas. (B) – KV audinys, SVA būdu suklasifikuotas į: naviko audinio klasę, kuri žymima raudona spalva, stromos klasę, kuri žymima žalia spalva, ir fono klasę, kuri žymima juoda spalva. (C) – KV audinys, kuriame SVA būdu atlikta kiekybinė analizė. CD8+ raiškos nevykdančios ląstelės žymimos mėlyna, raišką vykdančios ląstelės – ruda spalvomis. (D) – suklasifikuotas KV audinys, padalytas į vienodo dydžio šešiakampių gardelių elementus, kurių šoninė kraštinė – 65 μm ilgio. (E) – KV audinys, padalytas į vienodo dydžio šešiakampių ir suklasifikuotas pagal didžiausią naviko (žymimas raudona spalva), stromos (žymimas žalia spalva) ar fono (žymimas mėlyna spalva) audinio klasės santykinį plotą gardelės elemente. (F) – KV audinys, kurio šešiakampiuose apskaičiuoti staigūs naviko audinio klasės santykinio ploto pokyčiai (vaizduojami raudona spalva). (G) – KV audinys, kurio šešiakampiuose apskaičiuoti staigūs naviko audinio klasės santykinio ploto pokyčiai (atskirti naviko ir stromos (žalia spalva) bei naviko ir fono (mėlyna spalva) pokyčiai). (H) – KV audinys, kurio šešiakampiai perklasifikuoti į naviko (žymimi raudona spalva), stromos (žymimi žalia spalva), naviko ir stromos sąveikos krašto (SK) (žymimi geltona spalva) ir fono (žymimi mėlyna spalva) klases. (I) – KV audinys, kuriame automatiškai nustatyta 9 šešiakampių pločio sąveikos zona (SZ). 3 gardelių elementų pločio SK vaizduojamas geltona, 3 gardelių elementų pločio SZ stromos dalis – žalia, 3 gardelių elementų pločio SZ naviko dalis – raudona spalvomis.

3.6 pav. Naviko ir stromos sąveikos krašto ir sąveikos zonos nustatymo etapų skaitmenizuotam CD8+ imunohistochemijos krūties vėžio audiniui pavyzdys

3.3.6 Naviko ir stromos sąveikos krašto bei sąveikos zonos nustatymas

Tyrimui atlikti kartu su darbo grupės tyrėjais sukurtas naujas įrankis, gebantis, remiantis IHC skaitmenizuotu, suklasifikuotu ir į šešiakampių gardelių elementus padalytu KV audinio vaizdu, pagal aiškias matematinės taisyklės automatiškai išskirti naviko ir stromos SK, t. y. ribą tarp naviko ir stromos komponentų, ir nustatyti pasirinkto pločio naviko ir stromos SZ. Išradimui patentuoti pateikta patentinė paraiška Lietuvoje (Nr. LT 2019 509) ir tarptautinė patentinė paraiška (Nr. PCT/IB2020/053396). Metodas detaliai aprašytas straipsnyje²⁴³ (žr. Publikacijų sąrašą ir jų kopijas).

Siekiant nustatyti šešiakampius, kurie priklauso naviko ir stromos SK, t. y. elementus, kurie yra naviko ir stromos audinių perėjimo riboje, kiekviename šešiakampiamе gardelės elemente (hex) apskaičiuoti krūties audinio klasifikatoriaus atpažintų struktūrų, priskirtų tam tikroms klasėms, santykiniai plotai (p). Naviko (n), stromos (s) ir fono (f) klasių santykiniai plotai apskaičiuoti pagal 1, 2 ir 3 formules:

$$n_{hex} = \frac{NA_{hex}}{NA_{hex} + S_{hex} + F_{hex}}, \quad (1)$$

$$s_{hex} = \frac{S_{hex}}{NA_{hex} + S_{hex} + F_{hex}}, \quad (2)$$

$$f_{hex} = \frac{F_{hex}}{NA_{hex} + S_{hex} + F_{hex}}, \quad (3)$$

kai n, s ir f klasių santykinis plotas $\in [0; 1]$, $n_{hex} + s_{hex} + f_{hex} = 1$,

kur $NA/S/F_{hex}$ – naviko audinio / stromos / fono klasės plotas šešiakampiamе gardelės elemente, $n/s/f_{hex}$ – naviko / stromos / fono klasės santykinis plotas šešiakampiamе gardelės elemente.

Tuomet pagal didžiausią n, s ar f santykinį plotą šešiakampiai priskirti naviko, stromos arba fono audinio klasėms. 3.6 pav. E dalyje pateikiamas skaitmenizuoto KV audinio, padalyto į vienodo dydžio šešiakampių gardelių elementus ir suklasifikuoto pagal trijų skirtingų klasių (naviko, stromos ir fono) santykinius plotus, pavyzdys.

Vėliau nustatyti šešiakampiai, kuriuose vyko staigūs santykinų plotų pokyčiai pagal santykinio ploto geometrinio gradiento normą ($\nabla_p(hex)$). Šiai normai gauti pirmiausia apskaičiuotos santykinio ploto išvestinės (i) kiekvienai elemento geometrinei ašiai (x, y, z). Minėtos išvestinės žymėtos atitinkamai: i_x^p , i_y^p , arba i_z^p . Pavyzdžiui, 3.7 pav. pateiktam šešiakampiui

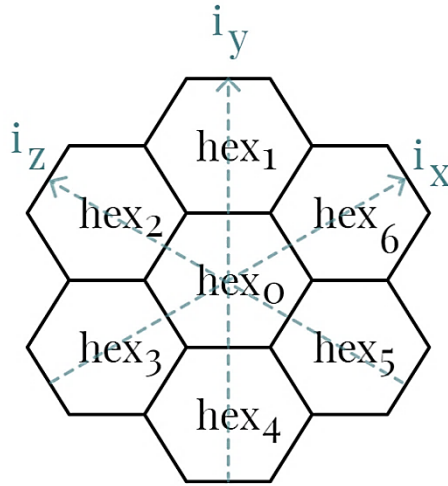
hex_0 naviko klasės santykinio ploto išvestinės apskaičiuotos taikant 4, 5 ir 6 formules:

$$i_x^n = hex_3^n - hex_6^n, \quad (4)$$

$$i_y^n = hex_4^n - hex_1^n, \quad (5)$$

$$i_z^n = hex_5^n - hex_2^n, \quad (6)$$

kur $i_{x/y/z}^n$ – naviko klasės santykinio ploto išvestinė gardelės elemento $x/y/z$ geometrinei ašiai, hex_{1-6}^n – naviko klasės santykinis plotas 1–6 šešiakampiame gardelės elemente.



3.7 pav. Šešiakampių gardelės elementų (hex) išvestinių (i) kiekvienai gardelės elemento ašiai (x, y, z) pavyzdys

Naviko klasės santykinio ploto pokyčio gradientas apskaičiuotas taikant 7 formulę (čia ir toliau hex praleidžiamas):

$$|\nabla_n| = \sqrt{(i_x^n)^2 + (i_y^n)^2 + (i_z^n)^2}, \quad (7)$$

kur ∇_n – naviko klasės santykinio ploto geometrinio gradiento norma, $i_{x/y/z}^n$ – naviko klasės santykinio ploto išvestinė šešiakampio gardelės elemento $x/y/z$ geometrinei ašiai. $|\nabla_n| \in [0; 1]$.

Taigi naviko klasės audinio geometrinio gradiento norma leido įvertinti visus naviko klasės santykinio ploto pokyčius analizuojamo audinio kiekviename gardelės elemente. 3.6 pav. F dalyje raudona spalva pavaizduotas didesnis negu 0,5 $|\nabla_n|$, atspindintis staigius naviko audinio santykinio ploto pokyčius analizuojamo konkretaus KV atvejo

šešiakampiuose elementuose. Pritaikyta naviko audinio gradiento normos formulė panaši į kitų autorių aprašytas gradiento skaičiavimo formules, taikomas šešiakampiuose gardelės elementuose^{283, 284}.

Taikant 7 formulę, galima automatiškai nustatyti SK, tačiau pagal apskaičiuotą naviko audinio gradiento normą nėra galimybės įvertinti, ar staigių santykinio ploto pokyčių atsirado dėl stromos audinio ar dėl pokyčių, kilusių dėl fono klasės gretimuose (kaimyniniuose) šešiakampiuose. Dėl šios priežasties pokyčiai naviko plote buvo suskirstyti į dvi dalis – naviko ir stromos bei naviko ir fono klasių sukeltus santykinio ploto pokyčius. Tai atlikta naviko audinio santykinio ploto pokyčio išvestinėms priskyrus svorius su stromos ir fono klasių santykiniais ploto pokyčiais, kurie apskaičiuoti pagal 8 ir 9 formules:

$${}_s i_x^n = i_x^n \frac{|i_x^s|}{|i_x^s| + |i_x^f|} \text{ ir} \quad (8)$$

$${}_f i_x^n = i_x^n \frac{|i_x^f|}{|i_x^s| + |i_x^f|}, \quad (9)$$

kur ${}_s i_x^n$ – naviko klasės santykinio ploto išvestinė gardelės elemento x geometrinei ašiai, pasvertai pagal stromos/fono klasės santykinio ploto pokytį, $i_x^{n/s/f}$ – naviko/stromos/fono klasės santykinio ploto išvestinė gardelės elemento x geometrinei ašiai.

Jei kuriame nors gardelės elemente fono klasės santykinis plotas kito minimaliai, buvo laikoma, kad naviko audinio santykinio ploto pokytis yra sukeltas gretimai esančio stromos audinio ploto pokyčių, ir atvirkščiai, nes ${}_s i_x^n + {}_f i_x^n = i_x^n$. Taip užtikrinta, kad jokia informacija šešiakampiame elemente nebus pridėta ar prarasta. Priskirti svoriai analogiškai apskaičiuoti išilgai y ir z geometrinių ašių, todėl bendras naviko audinio pokytis $|\nabla_n|$ suskirstytas į pokyčius, kilusius dėl stromos ir fono audinio sukeltų santykinio ploto pokyčių, ir apskaičiuotas taikant 10 formulę:

$$|\nabla_n| = |\nabla_n^s + \nabla_n^f|. \quad (10)$$

Naviko audinio pokyčiai, atsižvelgus į naviko ir stromos klasės pokyčius, apskaičiuoti taikant 11 formulę (pavaizduoti 3.6 pav. G dalyje žalia spalva):

$$|\nabla_n^s| = \sqrt{({}_s i_x^n)^2 + ({}_s i_y^n)^2 + ({}_s i_z^n)^2}. \quad (11)$$

Naviko audinio pokyčiai, atsižvelgus į fono klasės pokyčius, apskaičiuoti taikant 12 formulę (pavaizduoti 3.6 pav. G dalyje mėlyna spalva):

$$|\nabla_n^f| = \sqrt{({}_f i_x^n)^2 + ({}_f i_y^n)^2 + ({}_f i_z^n)^2}. \quad (12)$$

Apskaičiavus naviko audinio santykinio ploto pokyčius, šešiakampiai perklasifikuoti taip, kad priklausytų naviko, stromos, SK arba fono klasėms. Gardelės elementų klasifikavimas atliktas pagal naviko audinio normalizuotą gradientą, kuris priklausė intervalui $[0; 1]$ ir buvo taikytas kaip tikimybė šešiakampiui priklausyti SK. Gardelės elementai perklasifikuoti taikant šias taisykles:

a) nustatyti šešiakampiai, kuriuose pastebėta staigių naviko santykinio ploto pokyčių, tikrinant, ar $|\nabla_n| > 0,5$;

b) jei šešiakampiui galiojo minėta sąlyga, $|\nabla_n^s|$ ar $|\nabla_n^f|$ didesnė vertė lėmė, kuriai SK daliai priskirti šešiakampį elementą: naviko ir stromos SK ar naviko ir fono SK;

c) gardelės elementai, kurie neturėjo staigių pokyčių, aprašytų a taisyklėje, klasifikuoti į naviko, stromos ar fono klasę pagal didžiausią n , s ar f santykinį plotą, nes visa audinio santykinio ploto suma kiekviename elemente buvo lygi 1: $n + s + f = 1$, kur n, s ir $f \in [0; 1]$;

d) gardelės elementai naviko ir stromos SK taip pat buvo priskiriami, jei šešiakampiuose nebuvo nustatyta staigių pokyčių, tačiau buvo nustatytas panašus naviko ir stromos santykinis plotas, t. y. jei $|n - s| < 0,25$ (laikyta, kad gardelės elemente naviko ir stromos klasių santykinis plotas yra panašus).

Pagal aprašytas taisykles perklasifikuotų šešiakampių elementų pavyzdys pateikiamas 3.6 pav. H dalyje. Nustačius SK, apskaičiuotas kiekvieno šešiakampio gardelės elemento trumpiausias atstumas iki naviko ir stromos SK, taikant euklidinį atstumų tarp centro taškų principą. Nustačius atstumus nuo SK ir siekiant analizuoti biologinių žymenų pasiskirstymo gradientą SZ, elementai suskirstyti į rangus kiekvienoje audinio klasėje, t. y. išskirtos naviko ir stromos SZ pusės, remiantis bet kuriam šešiakampiui apskaičiuotais atstumais, taikant 13 formulę:

$rangas =$

$$\begin{cases} \text{jai šešiakampis priklauso naviko klasei, rangas} = \text{atstumas,} \\ \text{jai šešiakampis priklauso stromos klasei, rangas} = -\text{atstumas,} \\ \text{jai šešiakampis priklauso SK, rangas} = 0, \\ \text{kitu atveju šešiakampį gardelės elementą ignoruoti.} \end{cases} \quad (13)$$

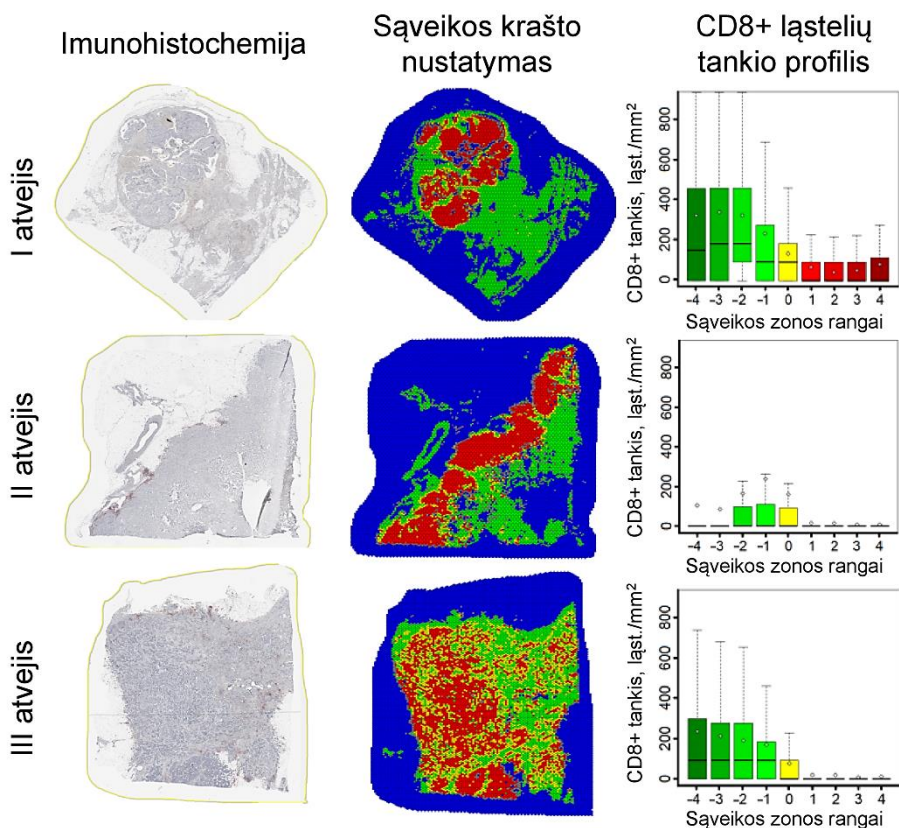
Tokiu būdu neigiamas ženklas buvo priskirtas atstumams SZ stromos pusėje, teigiamas ženklas – atstumams SZ naviko audinio pusėje, o SK – 0. Likusios audinių klasės, fonas ir elementai su naviko ir fono klasėmis į tolesnes analizes nebuvo įtrauktos.

Tolesniam imuninio atsako įvertinimui analizuoti buvo galima pasirinkti įvairaus ploto SZ, kurią galėjo sudaryti SK ir greta esantys naviko ir stromos audiniai. Be to, pagal rangus buvo galima pasirinkti analizuoti skirtingo pločio SK, pavyzdžiui, SK₁ (sudaro 0 rangas), SK₃ (sudaro –1, 0 ir 1 rangai) ir t. t.

KV audinyje įvertinti įvairaus pločio SK ir SZ (žr. 4.1. skyrių). Tolesnėms analizėms pasirinktas SK₃ ir SZ₉ (3.6 pav. I dalis). Gardelių elementai, kurie buvo nutolę toliau negu per 5 šešiakampius nuo SK, į tolesnę analizę nebuvo įtraukti.

3.3.7 CD8+ ląstelių tankio profilių ir imunogradiento rodiklių nustatymas

Nustačius SK ir SZ, apskaičiuoti kiekybiniai imuninį atsaką apibūdinantys kintamieji – CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis konkretaus SZ rango elementuose. CD8+ ląstelių tankis šešiakampyje apskaičiuotas pagal SVA ląstelių atpažinimo ir segmentavimo bei audinio klasifikatoriaus duomenis, t. y. CD8+ raišką vykdančių ląstelių skaičių (pagal nustatytas ląstelių koordinates) padalijus iš nustatyto naviko ir stromos audinio ploto atitinkamame gardelės elemente. Šie kintamieji sudarė kintamųjų duomenų skirstinį – CD8+ ląstelių tankio profilį, kuris atspindėjo imuninių ląstelių pasiskirstymą naviko audinyje ir paaiškino, kaip imuninių ląstelių tankiai ir jų standartiniai nuokrypiai skiriasi išilgai analizuojamos SZ. Taip pat, grupuojant skirtingus SZ rangus, apskaičiuoti kiekybiniai imuninį atsaką apibūdinantys kintamieji – CD8+ ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis naviko, SK ir SZ stromos dalyje. Trijų KV audinio CD8+ ląstelių tankio profilių pavyzdžiai pateikiami 3.8 pav.



Kairėje paveikslo pusėje pateikiami skaitmenizuoti KV CD8+ IHC vaizdai. Vidurinėje dalyje vaizduojami KV naviko audiniai, padalyti į šešiakampius gardelės elementus, kurie perklasifikuoti į stromos klasę (žymimi žalia spalva), naviko klasę (žymimi raudona spalva), fono klasę (žymimi mėlyna spalva) bei naviko ir stromos SK (žymimi geltona spalva). Dešinėje paveikslo pusėje pateikiami apskaičiuotų CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio profiliai tam tikro rango šešiakampės gardelės elementuose (vaizduojami stačiakampėse diagramose). CD8+ ląstelių tankio stačiakampės diagramos SZ stromos dalyje (nuo -4 iki -1 rango) vaizduojamos žalia, 0 range (SK) – geltona, SZ naviko dalyje (nuo 1 iki 4 rango) – raudona spalvomis.

3.8 pav. Trijų CD8+ imunohistochemijos, nustatyto sąveikos krašto ir apskaičiuotų CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio profilių pavyzdžiai

Naviko imuninį atsaką apibūdino šie **imunogradiiento rodikliai**:

1) kiekybiniai kintamieji:

a) CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis SZ stromos dalyje (šešiakampiuose gardelės elementuose, kurie nuo SK nutolę -4, -3 ir -2 atstumu),

b) CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis SK (šešiakampiuose gardelės elementuose, kurie sudarė -1, 0 ir 1 rangus),

c) CD8+ raišką vykdančių ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis SZ naviko dalyje (šešiakampiuose gardelės elementuose, kurie nuo SK nutolę 2, 3 ir 4 atstumu),

2)erdviniai, SZ CD8+ ląstelių tankio profilio kryptinės dispersijos (gradiento) savybes nuo stromos į naviką apibūdinantys kintamieji:

a) CD8+ ląstelių tankio masės centro (MC) vidurkis ir standartinis nuokrypis, kurie apibūdino CTL dispersiją SZ,

b) imunonuokryčio (IN) rodiklis, kuris apibūdino CD8+ ląstelių tankio dispersiją tarp -1 ir 1 rangų.

MC nusako koordinatę CD8+ ląstelių tankio profilio horizontalioje ašyje, pagal kurią galima įvertinti CD8+ ląstelių gradientą link naviko: jei MC vertė buvo teigiama, laikyta, kad CD8+ ląstelės infiltruoja į naviko dalį, ir atvirkščiai, jei neigiama, - CD8+ ląstelės telkiasi stromos dalyje. MC apskaičiuoti taikyta 14 formulė:

$$MC = \frac{\sum r_i r_i q(r_i)}{\sum r_i q(r_i)}, \quad (14)$$

kur r_i atitinka pasirinkto pločio naviko ir stromos SZ rangus (KV atveju, analizuojant SZ₉, r_i atitinka visus 9 rangus, nes $r_i \in [-4; 4]$), $q(r_i)$ žymi atitinkamame range apskaičiuotą kintamąjį - CD8+ ląstelių tankio vidurkį ar standartinį nuokrypį.

IN rodiklis apibūdina staigius CD8+ ląstelių tankio pokyčius analizuojant SK₃ ir CTL ląstelių tankio vidurkio santykį tarp -1 (stromos dalies) ir 1 (naviko audinio dalies) rangų. Analizuojant KV audinius, dažniausiai pastebėtas staigus tankio gradiento sumažėjimas (nuokrytis) į naviko šerdį, todėl rodiklis pavadintas IN, jam apskaičiuoti taikyta 15 formulė:

$$IN = \frac{q(r_{-1})}{q(r_1)}, \quad (15)$$

kur $q(r_{-1/1})$ žymi atitinkamame range (-1 arba 1) apskaičiuotą CD8+ ląstelių tankio vidurkį.

3.3.8 Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių nustatymas

Siekiant išanalizuoti 7 IHC biožymenų ir jų raiškos vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių tarpusavio sąsajas, apskaičiuotas rodiklių rinkinys, kurį kiekvienu atveju sudarė:

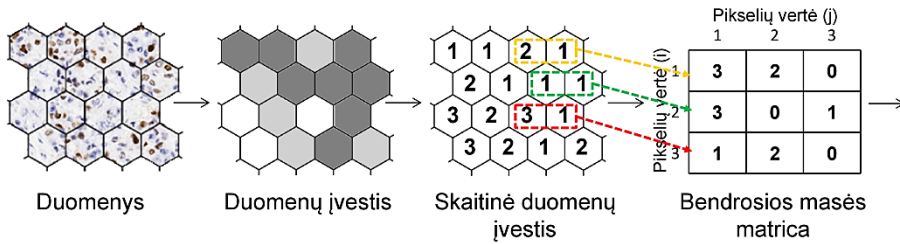
1) KV standartinių biožymenų (ER, PgR, Ki67 bei HER2 2+ ir 3+ raišką vykdančių ląstelių) kiekybiniai kintamieji – procentinė dalis naviko audinyje,

2) ER, PgR ir Ki67 vidunavikinį heterogeniškumą apibūdinantys kintamieji – erdvinės naviko tekstūros ir heterogeniškumo parametrai,

3) imuninio atsako savybes atspindintys kintamieji – CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankiai naviko ir stromos audiniuose,

4) hipoksijos savybes atspindintys kintamieji – HIF1 α raišką vykdančių ląstelių procentinė dalis naviko ir stromos audiniuose.

Metodika detalai aprašyta disertacijos autorės ir bendraautorėjų straipsnyje²³⁷ (žr. Publikacijų sąrašą ir jų kopijas). 1, 3 ir 4 rodikliai buvo gauti atlikus skaitmenizuotų IHC vaizdų audinio klasifikavimą ir kiekybinę analizę biožymens raiškos procentinei daliai naviko ir (arba) stromos audiniuose nustatyti. Tiriamojoje imtyje nustatyta maža HER2, CD8+, CD8+SATB1+ ir HIF1 α baltymų raiška, todėl heterogeniškumo kintamieji apskaičiuoti tik ER, PgR ir Ki67 biožymenims, taikant tyrimo metodiką, kuri detalai aprašyta mokslinėje literatūroje^{42, 43}. IHC biožymenų raiškos heterogeniškumo parametrą apskaičiuoti skaitmenizuoti IHC vaizdai padalyti į vienodo dydžio šešiakampius, kurių kraštinės ilgis – 257 μ m. Kiekviename elemente apskaičiuotas tiriamų biožymenų raišką vykdančių ir nevykdančių ląstelių skaičius ir jų procentinė dalis. Šešiakampiai, kuriuose buvo mažiau negu 50 ląstelių, laikyti nepakankamai informatyviais ir pašalinti iš tolesnės analizės. Nustatytos biožymenų procentinės dalys suskirstytos į dešimt intervalų (0–10 %, >10–20 % ir kt.), kuriais remiantis kiekvienam biožymeniui nustatyta bendrosios masės matrica (angl. *co-occurrence matrix*). Ši matrica panaudota erdvinės naviko Haralicko tekstūros rodikliams, tokiems kaip kontrastas, skirtingumas (angl. *dissimilarity*), entropija, energija ir homogeniškumas, apskaičiuoti (3.9 pav.), taikant mokslinėje literatūroje²⁸⁵ aprašytą metodiką ir formules.



Pikselių vertė (i)	Pikselių vertė (j)		
	1	2	3
1	0,25	0,17	0
2	0,25	0	0,08
3	0,08	0,17	0

Normalizuota bendrosios masės matrica ($d(i, j)$)

$$\text{Kontrastas} = \sum_{i,j} d(i,j) \times (i-j)^2$$

$$\text{Energija} = \sum_{i,j} d^2(i,j)$$

$$\text{Entropija} = \sum_{i,j} d(i,j) \times \log(d(i,j))$$

$$\text{Homogeniškumas} = \sum_{i,j} \frac{d(i,j)}{1 + (i-j)^2}$$

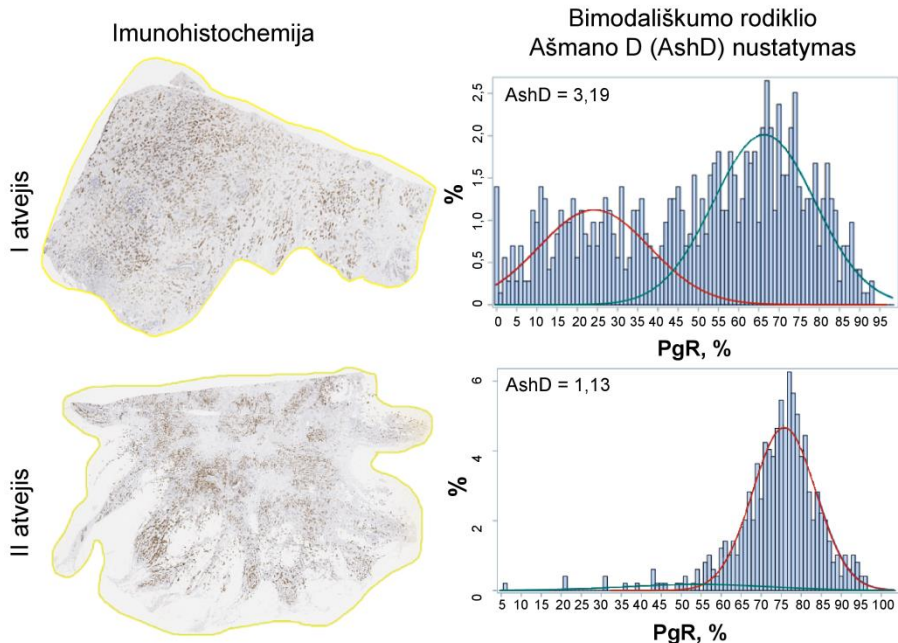
$$\text{Skirtingumas} = \sum_{i,j} d(i,j) \times \log(d(i,j))$$

Haralicko tekstūros rodikliai

Pateiktame pavyzdyje IHC vaizdas padalytas į vienodo dydžio šešiakampius gardelės elementus. Kiekviename elemente kiekybiškai įvertinta tiriamo biožymens raiška. Šiame 4×4 pikselių pavyzdyje duomenų įvestis (biožymens procentinė dalis) suskirstyta į tris skirtingus intervalus, kurie šešiakampiuose vaizduojami skirtingais atspalviais ir skirtingomis skaitinėmis išraiškomis. Šešiakampių elementų perėjimai suskaičiuoti ir paskirstyti bendrojoje masės matricoje, kuri pateiktame pavyzdyje dėl aiškumo apskaičiuota tik horizontalia kryptimi (matrica vėliau normalizuota). Haralicko tekstūros rodikliai (entropija, energija, kontrastas, skirtingumas ir homogeniškumas) apskaičiuoti pagal pateiktas formules.

3.9 pav. Erdvinių Haralicko tekstūros rodiklių apskaičiavimo pavyzdys (parengta pagal R. M. Haralicką²⁸⁵)

Vidunavikinis ER, PgR ir Ki67 pasiskirstymas KV audiniuose taip pat įvertintas apskaičiuojant Ašmano D bimodaliskumo rodiklį (angl. *Ashman's D*, toliau – AshD), remiantis dviejų paslėptų pasiskirstymų nustatymu, analizuojant šešiakampės gardelės elementų duomenų histogramas (3.10 pav.). Rodiklis apskaičiuotas taikant Gauso skirstinio mišinio modelių (angl. *Gaussian mixture models*)²⁸⁶ ir maksimalaus tikėtino (angl. *expectation-maximum*) algoritmus²⁸⁷. Jei nustatytas AshD rodiklis buvo didesnis negu 2, laikyta, kad tiriamajame KV audinyje tiriamo biožymens raiška heterogeniška (nevienalytė).



Kairėje paveikslo pusėje pateikiami skaitmenizuoti KV audinio PgR IHC vaizdai, dešinėje pusėje – PgR procentinės dalies šešiakampiuose gardelės elementuose histogramos, kuriomis remiantis I atveju nustatytas vidunavikinis PgR raiškos nevienalytiškumas (Ašmano D (AshD) bimodališkumo rodiklis siekė 3,19; histogramoje pastebėtos dvi Gauso skirstinio tikimybių tankio funkcijų kreivės (pažymėtos raudona ir žalia spalvomis)). II atveju PgR raiškos nevienalytiškumas nebuvo nustatytas (Ašmano D bimodališkumo rodiklis siekė 1,13).

3.10 pav. Dviejų krūties vėžio audinių ir progesterono receptoriaus (PgR) procentinės dalies šešiakampiuose gardelės elementuose histogramų pavyzdžiai

3.3.9 Statistinė duomenų ir rezultatų analizė

Naviką apibūdinančių žymenų ir heterogeniškumo įverčių rezultatai pateikti kaip raišką vykdančių ląstelių procento arba tankio, kuris gaunamas raišką vykdančių ląstelių skaičių padalijus iš tiriamojo audinio ploto kvadratiniais milimetrais (mm^2), aritmetinis vidurkis \pm standartinis nuokrypis bei mediana.

Analizuojant biožymenų raiškos rezultatus, nustatytas duomenų sklaidos nuokrypis, todėl analizei naudotos ne originalios, o kintamųjų verčių logaritmo transformacijos reikšmės (siekiama neapsunkinti teksto skaitymo, „log“ priešdėlis tekste, lentelėse ir paveiksluose nėra nurodomas). Atlikus transformaciją, duomenų sklaida atitiko normalųjį skirstinį, dispersijos tarp tiriamų grupių nesiskyrė (taikytas Welcho t kriterijus). Tolesnėms analizėms taikyti parametriniai tyrimo metodai. Kiekybinėms kintamųjų variacijoms

nustatyti naudotas dispersinės analizės metodas (angl. *one-way ANOVA*), taikant Bonferroni kriterijų poriniams palyginimams. Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė buvo mažesnė už 0,05, hipotezės kritinė sritis – dvipusė.

Kiekybinių dydžių porinėms sąsajoms įvertinti naudota Pirsono koreliacijos analizė. Kokybinių ir ranginių dydžių (amžiaus, pirminio naviko, išplitimo į limfmazgius, naviko diferenciacijos grupių) sąsajoms nustatyti naudota lentelių analizė, pritaikant χ^2 ir Fišerio tikslųjį kriterijų. Analizuojant HRDK mikroaplinkos ir erdvinio konteksto požymius bei atliekant daugialypę išgyvenamumo analizę, stipriai susiję ($r > 0,90$) kintamieji buvo pašalinti, siekiant išvengti daugialypiškumo (angl. *multicollinearity*) ar išskirtinumo (angl. *singularity*). Statistiškai reikšminga sąsaja nustatyta tuo atveju, jei p reikšmė buvo mažesnė už 0,05.

Daugiamatei kiekybinių ir erdvinų kintamųjų sąsajų analizei, remiantis moksline literatūra²⁸⁸, pritaikyta faktorinė analizė, leidusi gauti apibendrintus kintamuosius iš kelių ar keliolikos savo prasme panašių kintamųjų. Prieš atliekant faktorinę analizę, kintamųjų tinkamumas faktorinei analizei įvertintas taikant Kaizerio–Mejerio–Olkinio (KMO) matą: jei kintamojo KMO vertė buvo didesnė negu 0,5, laikyta, kad kintamasis yra tinkamas faktorinei analizei, jei mažesnė, – kintamasis faktorinėje analizėje gali neturėti prasmės^{288–290}. Pradiniams faktorių svoriams įvertinti taikyta pagrindinių komponentų analizė, o siekiant supaprastinti faktorių svorių matricos struktūrą, taikyta bendroji stačiakampė (angl. *orthogonal*) pradinių faktorių *varimax* transformacija (faktorių sukimas (rotacija)). Faktoriai išskirti pagal rotuotų faktorių krūvius (angl. *loadings*), remiantis tikrine reikšme (angl. *eigenvalue*), kuri buvo >1 .

Pacienčių stebėjimo pradžia – atliktos chirurginės KV operacijos data, stebėjimo pabaiga – 2019 m. birželio 30 d. Baigtinis taškas (įvykis) – paciento mirtis. Išgyvenamumo statistinei analizei atlikti taikyta Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo ir daugialypis Kokso regresijos metodai, naudojant klinikos, patologijos, kiekybinius ir erdvinus kintamųjų rinkinius. Šioms neparimetrinėms analizėms atlikti kintamųjų vertės turėjo būti suskirstytos, todėl buvo naudojamas atviros priegos įrankis *Cutoff Finder* (2.1 versija; *Charité* universitetas, Berlynas, Vokietija)²⁹¹, siekiant nustatyti žymens slenkstinę vertę, pagal kurią pacientės buvo suskirstytos į dvi prognozines grupes. Logranginis kriterijus taikytas siekiant nustatyti statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių.

Siekiant įvertinti išgyvenamumo funkcijas, esant skirtingoms kiekybinėms ir erdvinėms charakteristikoms, ir nustatyti nepriklausomus prognozinus kintamuosius, sukurti skirtingi daugybinių kintamųjų Kokso

regresijos modeliai (iš viso – 4 modeliai), kurie apėmė visus turimus duomenis apie pacientus. Analizuotas išgyvenamumo trukmės skirstinys aprašytas pavojaus rizikos santykiu (angl. *hazard ratio*, toliau – PR), kuris apskaičiuotas siekiant palyginti pacienčių bendrąjį išgyvenamumą (riziką patirti nepageidaujamą baigtį – mirtį) tiriamosiose grupėse tame pačiame laiko taške. Dėl riboto tiriamosios imties dydžio daugialypiams Kokso regresijos modeliams sukurti ir įvertinti reprezentatyvūs rodiklių rinkiniai buvo sudaryti taikant vieno paciento atidėjimo kryžminę patikrą (angl. *leave-one-out cross-validation*), remiantis mokslinėje literatūroje aprašytais metodais²⁹² (patikrinimas atliktas kaskart pašalinant po vieną atvejį, tokiu būdu analizė buvo pakartota 101 kartą su 100 pacientų rinkiniu). Sukurtų modelių prognozinė vertė ir (ar) statistinis reikšmingumas įvertintas remiantis χ^2 ir (arba) tikėtinumo santykiu (angl. *likelihood ratio*, toliau – TS)²⁹³.

Statistinė analizė atlikta SAS programiniu paketu (9.4 versija; SAS Institute Inc., Keris, JAV). Paveikslai parengti naudojant R programinį paketą (3.4.4 versija; R Development Core Team). Naviko ir stromos SK bei SZ nustatyti taikyta C++ (g++ 7.3.8) programavimo platforma, naudojant *libtiff* (5.2.4 versija (<https://www.libtiff.org>)) ir *Boost* (1.67 versija (<https://www.boost.org>)).

4. REZULTATAI

4.1. Tinkamiausias sąveikos krašto ir sąveikos zonos plotis

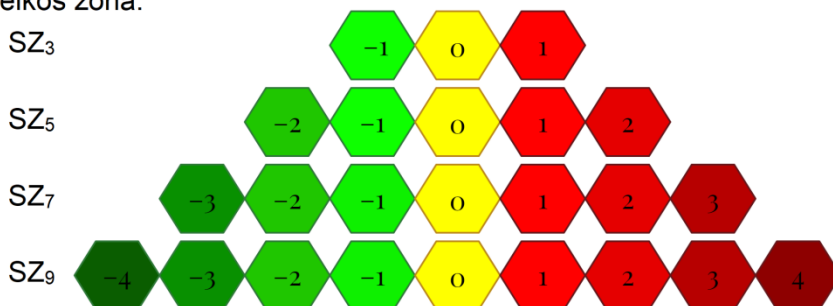
Automatiškai nustatčius SK, atlikta išsami suklasifikuotų ir į šešiakampių gardelių elementus padalytų KV audinių analizė, siekiant nustatyti maksimalų naviko ir stromos SZ plotį, kuriame galėtų būti apskaičiuotas imunogradiento rodiklių rinkinys. Nustatyta, kad visi analizuoti KV atvejai ($n = 101$) turėjo šešiakampius, kurie mažiausiai 3 elementų atstumu buvo nutolę nuo SK į naviko pusę. 4 rangų atstumas nuo SK į naviko pusę nustatytas 96 atvejais, 5-ių – 84 atvejais, 8-ių – mažiau negu pusę analizuojamų atvejų (43 atvejai), o didesnis negu 17-os rangų atstumas – tik vienu atveju (4.1 lentelė). Analizuojant šešiakampius stromos pusėje, nustatyta, kad visi tirti KV atvejai turėjo elementų, kurie buvo nutolę mažiausiai 7 šešiakampių atstumu į stromos pusę nuo SK. 8 rangų atstumas nuo SK į stromos pusę nustatytas 99 atvejais, 9-ių – 98 atvejais, o mažesnis negu 17-os rangų atstumas – mažiau negu 71 atveju (4.1 lentelė). Remiantis šiais rezultatais, daroma išvada, kad KV audiniuose SZ į naviko pusę daugiausia galėjo būti išplėsta 4 šešiakampių gardelių elementų atstumu nuo SK, t. y. SZ galėjo sudaryti 9 šešiakampiai elementai (SZ_9), nes naviko pusės zoną plečiant didesniu gardelių elementų skaičiumi šioje HRDK imtyje buvo galima prarasti daugiau negu 5 proc. tiriamųjų atvejų.

4.1 lentelė. Šešiakampių gardelės elementų atstumo (elementų rangų) nuo sąveikos krašto (SK) įvertinimas krūties vėžio audinyje ($n = 101$)

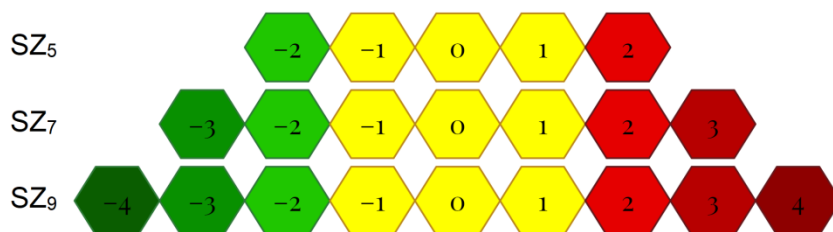
Stromos klasės elementų rangai	Atvejų skaičius	Naviko klasės elementų rangai	Atvejų skaičius
-1	101	1	101
-2	101	2	101
-3	101	3	101
-4	101	4	95
-5	101	5	83
-6	101	6	71
-7	101	7	59
-8	99	8	44
-9	98	9	25
-10	97	10	22
-11	94	11	6
-12	88	12	5
-13	86	13	7
-14	76	14	6
-15	77	15	5
-16	77	16	2
≤ -17	≤ 71	≥ 17	1

CD8+ ląstelių tankio rodikliams apskaičiuoti, įtraukiant 1–4 eilės rangų elementus abipus SK, iš viso gautos 4 skirtingos SZ kombinacijos (kai SZ sudarė 3 (SZ₃), 5 (SZ₅), 7 (SZ₇) ir 9 elementai (SZ₉)). Apskaičiuojamų imunogradiiento rodiklių vertėms įtakos turi ne tik naviko ir stromos regionų plotis, bet ir SK, todėl į analizę įtraukti dviejų skirtingų kombinacijų SK, kai šią zoną sudarė tik vieno rango elementai (SK₁), t. y. sudarė 0 rango elementai, arba 3 (SK₃), kuri sudarė –1, 0 ir 1 rango elementai. Taigi iš viso gautos 7 skirtingos SK ir SZ kombinacijos, galimos analizuoti HRDK imtyje (4.1 pav.).

Sąveikos zona:



Sąveikos kraštas – SK₁



Sąveikos kraštas – SK₃

Rangai tam tikro pločio SZ stromos dalyje vaizduojami žalia, SK – geltona, SZ naviko dalyje – raudona spalvomis.

4.1 pav. Įvairių pasirinktų plokščių naviko ir stromos sąveikos krašto (SK) ir sąveikos zonos (SZ) schema

Imunogradiiento rodikliai apskaičiuoti visose septyniuose išvardytose SK ir SZ kombinacijose. Siekta nustatyti tinkamiausią naviko ir stromos SK ir SZ plotį, kuriame gaunamas prognoziškai informatyviausias imuninį atsaką aprašantis rodiklių rinkinys. Atlikus vieno paciento atidėjimo kryžminį patikrinimą, įvertintas galutinio daugialypio Kokso regresijos modelio, naudojant klinikos, patologijos ir imuninį atsaką apibūdinančius rodiklius, pasikartojimas ir statistinis reikšmingumas (atrinkto modelio χ^2) (4.2 lentelė).

4.2 lentelė. Kryžminio patikrinimo rezultatai, analizuojant skirtingo pločio sąveikos kraštą (SK) ir sąveikos zoną (SZ) (n = 101)

SK ir SZ kombinacija	Daugialypį Kokso regresijos modelį sudarę kintamieji	Kokso regresijos modelio pasikartojimai	Kokso regresijos modelio χ^2	p vertė
SK ₁ ir SZ ₃	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_sn_SK CD8_vid_NA	62 kartus	5,69	0,02
SK ₁ ir SZ ₅	N grupė (N0 ir N1–3) CD8_sn_SK CD8_MC_sn	84 kartus	5,72	0,02
SK ₁ ir SZ ₇	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_vid_S CD8_MC_vid	85 kartus	5,09	0,02
SK ₁ ir SZ ₉	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_vid_NA	89 kartus	11,13	0,0009
SK ₃ ir SZ ₅	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_vid_NA	98 kartus	13,93	0,0002
SK ₃ ir SZ ₇	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_vid_NA CD8_MC_vid	59 kartus	5,34	0,02
SK ₃ ir SZ ₉	Amžiaus grupė pagal medianą N grupė (N0 ir N1–3) CD8_vid_NA CD8_MC_vid	98 kartus	14,25	0,0002

CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, CD8_vid ir CD8_sn – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: sąveikos krašte (SK) ir SZ naviko audinio dalyje (NA), N – išplitimas į sritinius limfmazgius.

Nustatyta, kad, analizuojant SK₁, kurį sudarė 0 rangas, ir 3, 5 ar 7 šešiakampių elementų pločio SZ, gauti statistiškai mažai patikimi rezultatai: modeliai atitinkamai pasikartėjo 62, 84 ir 85 kartus, jų χ^2 siekė tik 5,69 ($p = 0,02$), 5,72 ($p = 0,02$) ir 5,09 ($p = 0,02$). Padaryta prielaida, kad šių pločių SK ir SZ yra per siauros išsamiai naviko ir imuninių ląstelių analizei ar analizuojamos naviko, stromos ir SK dalys yra netinkamai išbalansuotos analizuojamose SZ. Analizuojant SK₁ ir SZ₉, modelis pasikartėjo 89 kartus,

jo χ^2 siekė 11,13 ($p = 0,0009$). Vis dėlto imuninį atsaką aprašančių rodiklių rinkiniai dažniausiai (98 kartus) pasikartojo analizuojant SK₃ ir SZ₅ bei SK₃ ir SZ₉ (atitinkamai χ^2 siekė 13,93 ($p = 0,0002$) ir 14,25 ($p = 0,0002$)). Remiantis šiuo rezultatu, toliau pasirinkta analizuoti SK₃, kuri sudarė –1, 0 ir 1 rangai, ir SZ₉, kurią sudarė tapatus (3) gardelių elementų skaičius SK atžvilgiu, t. y. SZ, kurią sudarė elementai, nutolę ne daugiau negu per 4 šešiakampius nuo SK 0 rango.

4.2. CD8+ ląstelių tankio rodiklių aprašomosios statistikos rezultatai

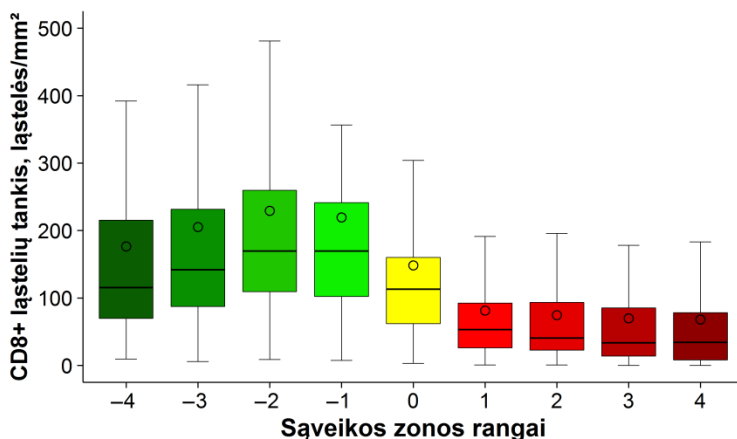
Nustačius tinkamiausią SK ir SZ plotį, apskaičiuoti imuninių ląstelių pasiskirstymo profiliai bei kiekybiniai ir erdviniai CD8+ ląstelių tankio kintamieji – imunogrado rodiklių rinkinys. Šio rinkinio aprašomosios statistikos rezultatai pateikti 4.3 lentelėje.

4.3 lentelė. CD8+ ląstelių, apskaičiuotų 3 šešiakampių elementų pločio sąveikos krašte (SK₃) ir 9 šešiakampių pločio sąveikos zonoje (SZ₉), tankio aprašomoji statistika (n = 101)

CD8+ ląstelių tankio rodiklis, ląstelės/mm ²	Vidurkis	Standart. nuokrypis	Mažiausia vertė	Didžiausia vertė	Mediana
CD8_MC_vid	–1,06	0,79	–2,54	1,26	–1,17
CD8_MC_sn	–1,17	0,54	–2,28	0,17	–1,25
CD8_IN_vid	4,57	5,35	0,39	42,22	3,27
CD8_vid_S	210,44	198,46	8,16	1 243,14	155,25
CD8_sn_S	368,52	233,33	42,26	1 237,32	317,36
CD8_vid_SK	148,81	164,94	4,65	1 135,39	110,01
CD8_sn_SK	259,68	158,85	28,40	846,14	213,80
CD8_vid_NA	71,41	84,97	0,52	451,36	39,85
CD8_sn_NA	116,85	87,96	7,23	509,79	96,92

CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: SZ₉ stromos dalyje (S), sąveikos krašte (SK₃) ir SZ₉ naviko audinio dalyje (NA).

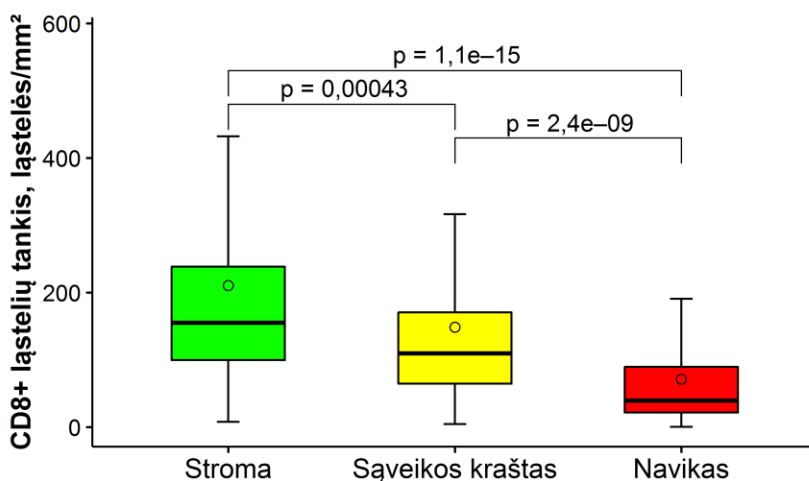
Atlikus visų atvejų CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymo ranguose analizę, nustatyta CD8+ ląstelių tankio mažėjimo tendencija SZ₉ naviko dalies atžvilgiu (4.3 lentelė ir 4.2 pav.).



CD8+ ląstelių tankio stačiakampės diagramos SZ stromos dalyje (-4, -3, -2 ir -1 ranguose) vaizduojamos žalia, stačiakampė diagrama SK (0 rangas) – geltona, stačiakampės diagramos SZ naviko dalyje (1, 2, 3 ir 4 rangai) – raudona spalvomis. Stačiakampio apatinė ir viršutinė kraštinės vaizduoja pirmą ir trečią kvartilius, stačiakampio viduryje esanti linija žymi medianą, rutuliukas – vidurkį. Vertikalios linijos viršutinis status brūkšnys žymi didžiausią CD8+ ląstelių tankio vertę, apatinis – mažiausią.

4.2 pav. CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymo ranguose stačiakampės diagramos (n = 101)

CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymo variacijai stromos, SK₃ ir naviko dalyse palyginti pritaikytas vieno faktoriaus dispersinės analizės metodas. Nustatytas netolydus CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymas SZ₉: didžiausias ir labiausiai išsisklaidęs tankis nustatytas SZ₉ stromos dalyje, mažiau gausus ir išsisklaidęs – SK₃, mažiausias ir mažiausiai išsisklaidęs – SZ₉ naviko dalyje ($p < 0,001$) (4.3 pav.).



Paveikslėlio tęsinys.

CD8+ ląstelių tankio reikšmių stačiakampė diagrama SZ_9 stromos dalyje vaizduojama žalia, SK_3 – geltona, SZ_9 naviko dalyje – raudona spalvomis. Stačiakampio apatinė ir viršutinė kraštinės vaizduoja pirmą ir trečią kvartilius, stačiakampio viduryje esanti linija žymi medianą, rutuliukas – vidurkį. Vertikalios linijos viršutinis status brūkšnyas žymi didžiausią CD8+ ląstelių tankio vertę, apatinis – mažiausią. Porinio palyginimo tarp konkrečių grupių (SZ audinio dalies) statistinio reikšmingumo (p) reikšmės pateiktos virš horizontalių linijų paveikslo viršuje.

4.3 pav. CD8+ ląstelių tankio pasiskirstymo stačiakampės diagramos sąveikos zonos stromos, sąveikos krašto ir sąveikos zonos naviko dalyse ($n = 101$)

4.3. CD8+ ląstelių tankio rodiklių tarpusavio sąsajos

Prieš atliekant faktorinę analizę, CD8+ ląstelių tankio kiekybinių ir erdvinių rodiklių tarpusavio sąsajos įvertintos taikant koreliacijų analizę (žr. 8 priedą). Analizuojami kintamieji tarpusavyje susiję. Mažiausias koreliacijos koeficientas nustatytas tarp CD8+ MC vidurkio ir CD8+ standartinio nuokrypio SZ_9 stromos dalyje ($r = -0,20$, $p = 0,04$), didžiausi koeficientai – tarp CD8+ tankio vidurkių ir standartinių nuokrypių SZ_9 stromos dalyje ($r = 0,96$, $p < 0,0001$), SK_3 ($r = 0,95$, $p < 0,0001$) ir SZ_9 naviko dalyse ($r = 0,98$, $p < 0,0001$).

4.4. CD8+ ląstelių tankio rodiklių ryšių struktūra

Daugiamatei kiekybinių kintamųjų sąsajų analizei ir ryšių struktūrai nustatyti taikyta faktorinė analizė ir faktorių bendroji stačiakampė *varimax* veiksmų rotacija. Prieš atliekant šią analizę, duomenų rinkinio tinkamumas įvertintas taikant KMO testą. Nustatyta, kad bendrasis visų kintamųjų stebėjimo tinkamumo matas – 0,74. Taip pat apskaičiuoti tinkamumo matai kiekvienam kintamajam, kurie pateikti 4.4 lentelėje: didžiausią KMO įvertį turėjo CD8+ ląstelių tankio standartinis nuokrypis SZ_9 naviko dalyje (0,84), mažiausią – CD8+ ląstelių tankio vidurkis SZ_9 stromos dalyje (0,65).

4.4 lentelė. Imunogradianto rodiklių tinkamumo (Kaizerio–Mejerio–Olkinio (KMO)) įverčiai ($n = 101$)

Imunogradianto rodiklis, ląstelės/mm ²	Tinkamumo (KMO) vertė
CD8_MC_vid	0,76
CD8_MC_sn	0,76
CD8_IN_vid	0,81
CD8_vid_S	0,65
CD8_sn_S	0,66

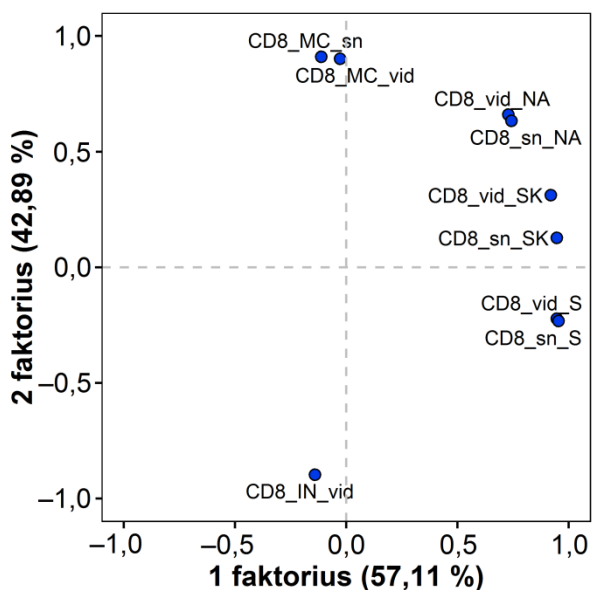
Lentelės tęsinys.

CD8_vid_SK	0,76
CD8_sn_SK	0,70
CD8_vid_NA	0,78
CD8_sn_NA	0,84

CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: *SZ₉* stromos dalyje (*S*), sąveikos krašte (*SK₃*) ir *SZ₉* naviko audinio dalyje (*NA*).

Atlikus faktoriinę analizę, pagal tikrines vertes išskirti du nepriklausomi CD8+ ląstelių tankio rodiklių faktoriai (1-ojo faktoriaus tikrinė vertė – 5,17, 2-ojo – 2,99). Šie faktoriai paaiškino 90,68 proc. duomenų rinkinio variacijų (rotuotų faktorių struktūra ir kiekvieno rodiklio įtaka duomenų rinkinio variacijoms pateikta 9 priede). 1 faktorius paaiškino 57,11 proc. duomenų rinkinio variacijų, 2 faktorius – 42,89 proc. Pirmojo ir antrojo faktorių rotuoti krūviai pavaizduoti 4.4 pav. Nustatyta, kad pirmąjį faktorių apibūdino *SZ₉* kiekybiniai rodikliai, t. y. CD8+ ląstelių tankio vidurkis ir standartinis nuokrypis *SZ₉* stromos, *SK₃* ir *SZ₉* naviko dalyse, todėl šis faktorius interpretuotas kaip *SZ* CD8+ tankio lygio faktorius ir toliau vadintas CD8+ tankio faktoriumi. Antrąjį faktorių apibūdino stipriai teigiami CD8+ ląstelių tankio *MC* vidurkio ir standartinio nuokrypio rodikliai bei stipriai neigiamas CD8+ ląstelių tankio *IN* rodiklis. Didesnės 2 faktoriaus vertės atspindėjo didėjančią CD8+ tankį į *SZ* naviko dalį, todėl 2 faktorius interpretuotas kaip *SZ* CD8+ tankio gradientas į naviką ir toliau vadintas CD8+ tankio gradiento faktoriumi.

Abu faktoriai aiškino svarbias ir nepriklausomas imuninio atsako savybes, tačiau, siekiant nustatyti šių faktorių prognozinę vertę, taip pat buvo apskaičiuota minėtų faktorių balų suma. Šis suminis faktorius aiškintas kaip agreguotas *SZ* CD8+ ląstelių imuninio atsako faktorius.



CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonukryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: SZ₉ stromos dalyje (S), sąveikos krašte (SK) ir SZ₉ naviko audinio dalyje (NA). 1 faktorius interpretuotas kaip SZ CD8+ tankio lygio faktorius, 2 faktorius – kaip SZ CD8+ tankio gradiento faktorius.

4.4 pav. 1-ojo ir 2-ojo rotuotų faktorių krūviai (n = 101)

4.5. Imunogradiento rodiklių prognozinė vertė

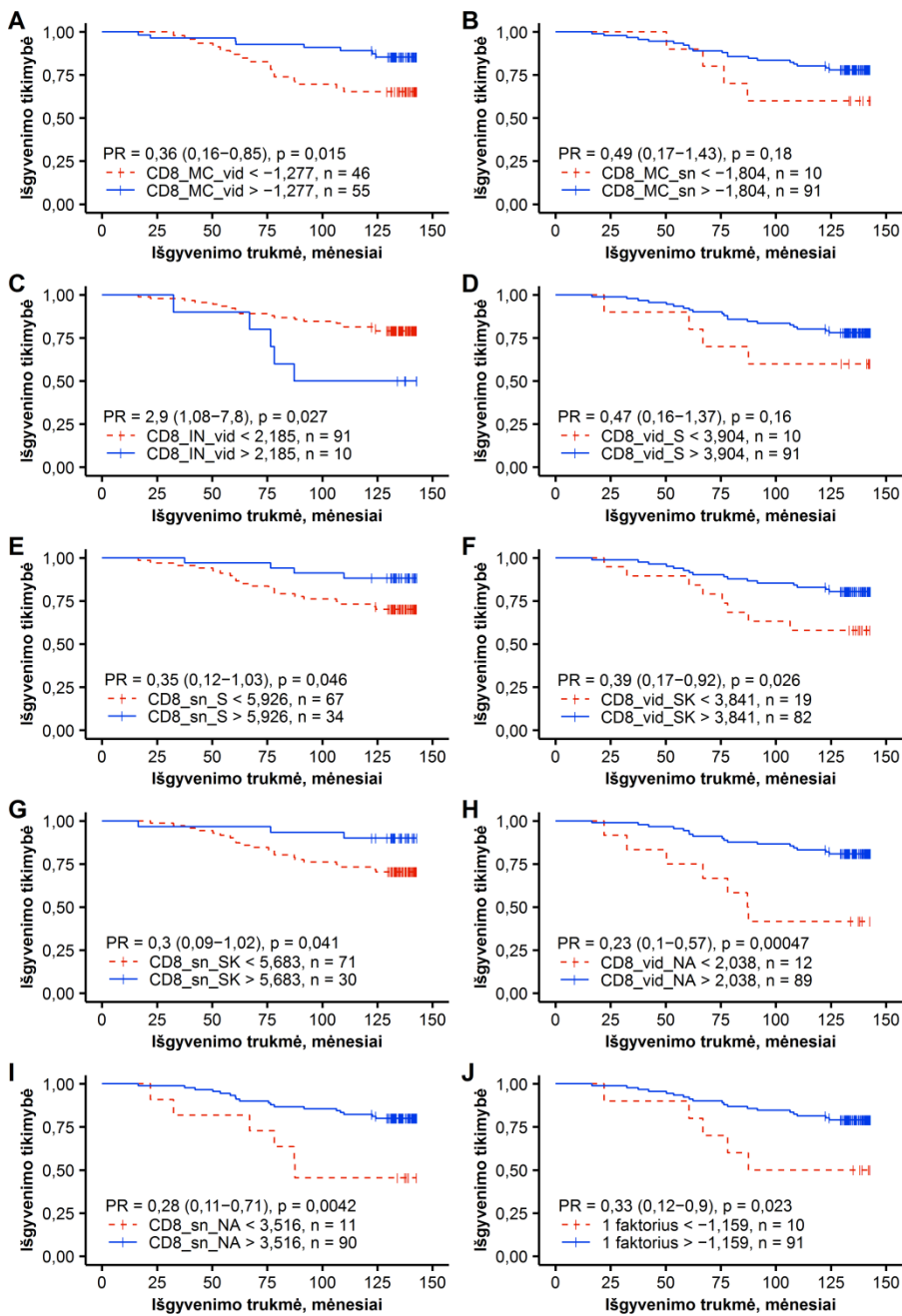
Naudojant klinikos, patologijos ir imuninį atsaką apibūdinančius rodiklius, atlikta vienalypė regresijos analizė pacienčių bendrajam išgyvenamumui prognozuoti. Regresijos analizės rezultatai, taikant logranginį testą, pateikti 4.5 lentelėje, Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės – 4.5 pav. Nustatyta, kad geresnė pacienčių išgyvenamumo prognozė susijusi su didesnėmis CD8+ MC vidurkio (4.5 pav. A dalis), CD8+ ląstelių tankio standartinio nuokrypio SZ₉ stromos dalyje (4.5 pav. E dalis), CD8+ ląstelių tankio vidurkio ir standartinio nuokrypio SK₃ (atitinkamai 4.5 pav. F ir G dalys) ir SZ₉ naviko dalyse (atitinkamai 4.5 pav. H ir I dalys) bei CD8+ tankio (1 faktorius, 4.5 pav. J dalis), CD8+ tankio gradiento (2 faktorius, 4.5 pav. K dalis) ir agreguoto SZ CD8+ ląstelių imuninio atsako faktorių (agreguotas faktorius, 4.5 pav. L dalis) rodiklių vertėmis. Statistiškai reikšmingų sąsajų tarp bendrojo pacienčių išgyvenamumo ir CD8+ MC standartinio nuokrypio (4.5 pav. B dalis), CD8+ ląstelių tankio vidurkio SZ₉ stromos dalyje (4.5 pav. D dalis), histologinio laipsnio, pirminio naviko dydžio, limfmazgių būklės nebuvo nustatyta (4.5 lentelė). Didesnės CD8+

ląstelių tankio IN rodiklio vertės (4.5 pav. C dalis) ir didesnis pacientės amžius buvo susiję su blogesniu išgyvenamumu (4.5 lentelė).

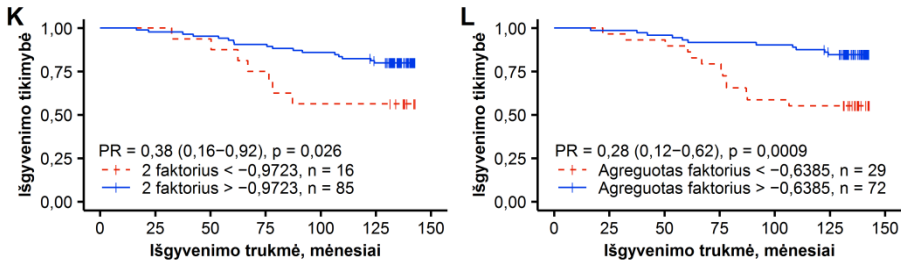
4.5 lentelė. Vienalypė regresijos analizė, taikant logranginį testą, pacienčių išgyvenamumo ir imunogradianto rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)

Imunogradianto rodiklis, ląstelės/mm²	Pavojaus rizika	95 % pasikliautinis intervalas	p vertė
CD8_MC_vid	0,36	0,16–0,85	0,015
CD8_MC_sn	0,49	0,17–1,43	0,18
CD8_IN_vid	2,90	1,08–7,80	0,027
CD8_vid_S	0,47	0,16–1,37	0,16
CD8_sn_S	0,35	0,12–1,03	0,046
CD8_vid_SK	0,39	0,17–0,92	0,026
CD8_sn_SK	0,30	0,09–1,02	0,041
CD8_vid_NA	0,23	0,10–0,57	0,0005
CD8_sd_NA	0,28	0,11–0,71	0,0042
CD8+ tankio faktorius	0,33	0,12–0,90	0,023
CD8+ gradiento faktorius	0,38	0,16–0,92	0,026
Agreguotas SZ CD8+ faktorius	0,28	0,12–0,62	0,0009
Klinikiniai ir patologiniai kintamieji			
Amžiaus grupė pagal medianą	2,45	1,05–5,73	0,039
T grupė (T1 ir T2)	0,99	0,45–2,22	0,986
N grupė (N0 ir N1–3)	2,17	0,95–4,97	0,07
G grupė (G1–2 ir G3)	1,20	0,52–2,81	0,67

CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: SZ₉ stromos dalyje (S), sąveikos krašte (SK) ir naviko audinio dalyje (NA), G – diferenciacijos laipsnis, T – pirminis naviko dydis, N – išplitimas į sritinius limfmazgius.



tęsinys kitame puslapyje



CD8_MC_vid – *CD8+* ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – *CD8+* ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: *SZ*₉ stromos dalyje (*S*), sąveikos krašte (*SK*) ir *SZ* naviko audinio dalyje (*NA*), 1-asis faktorius – *SZ* *CD8+* tankio faktorius, 2-asis faktorius – *SZ* *CD8+* gradiento faktorius, agreguotas faktorius – agreguotas *SZ* *CD8+* ląstelių imuninio atsako faktorius.

4.5 pav. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, taikant logranginį testą ir pavojaus riziką (PR), pacienčių išgyvenamumo ir imunogradiento rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)

Siekiant nustatyti nepriklausomus prognozinius kintamuosius, sukurti du daugialypiai Kokso regresijos modeliai (rezultatai pateikti 4.6 lentelėje). Daugialypiai Kokso regresijos modeliai patvirtinti taikant vieno paciento atidėjimo kryžminį patikrinimą: 1-asis modelis pasikartotojo 98 kartus, 2-asis modelis – 63 kartus.

4.6 lentelė. Daugialypė Kokso regresijos analizė, taikant logranginį testą, pacienčių išgyvenamumo ir imunogradiento rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)

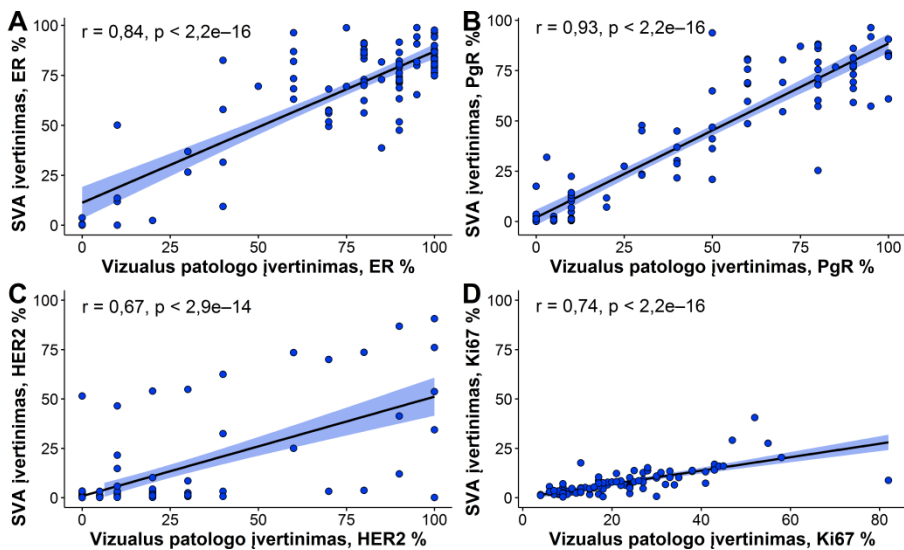
Rodiklis	Pavojaus rizika	95 % pasikliautinis intervalas	p vertė
1-asis modelis, TS – 24,63, p < 0,0001			
Amžiaus grupė pagal medianą	2,54	1,06–6,13	0,0374
N grupė (N0 ir N1–3)	3,60	1,42–9,12	0,007
<i>CD8_MC_vid</i>	0,39	0,16–0,94	0,0367
<i>CD8_vid_NA</i>	0,20	0,07–0,53	0,0014
2-asis modelis, TS – 14,32, p = 0,0008			
N grupė (N0 ir N1–3)	2,53	1,08–5,93	0,0319
Agreguotas <i>SZ</i> <i>CD8+</i> ląstelių imuninio atsako faktorius	0,28	0,12–0,62	0,0019

CD8_MC_vid – *CD8+* ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_vid_NA* – *CD8+* ląstelių vidurkis *SZ*₉ naviko dalyje, *N* – išplitimas į sritinius limfmazgius, *TS* – tikėtimumo santykis.

1-ajame modelyje naudotas imunogradiento rodiklių rinkinys, klinikiniai bei patologiniai kintamieji, 2-ajame modelyje – SZ CD8+ ląstelių tankio kiekybiniai ir erdviniai rodikliai pakeisti agreguoto SZ CD8+ faktoriaus įverčiu. Nustatyta, kad geresnė pacienčių išgyvenamumo prognozė susijusi su didesniu vidutiniu CD8+ MC ir didesniu CD8+ ląstelių tankiu SZ, naviko dalyje (4.6 lentelė, 1 modelis). Taip pat nustatyta SZ CD8+ tankio rodiklių prognozinė vertė, matuojant imuninių ląstelių tankio gradientą naviko aspektu ir jį derinant su absoliučiu CD8+ infiltrato tankiu, t. y. 2-ajame modelyje agreguotas SZ CD8+ ląstelių imuninio atsako faktorius nustatytas kaip nepriklausomas geros prognozės biožymuo. Išplitimas į limfmazgius nustatytas kaip nepriklausomas blogos prognozės veiksnys tiek 1-ajame (PR = 3,60, $p = 0,007$), tiek 2-ajame (PR = 2,53, $p = 0,0319$) modeliuose, vyresnis amžius (PR = 2,54, $p = 0,0374$) – 1-ajame modelyje. Abiejų modelių statistinis reikšmingumas, vertinant pagal TS, buvo patikimas: 1-ojo modelio – 24,63 ($p < 0,0001$), 2-ojo modelio – 14,32 ($p = 0,0008$) (4.6 lentelė).

4.6. Standartinių krūties vėžio biožymenų skaitmeninės vaizdo analizės ir patologo įvertinimo rezultatų palyginimas

Skaitmeninei IHC biožymenų kiekybinei ir erdvinei analizei atlikti taikyti branduolinis, citoplazminis ir membraninis SVA algoritmai. Siekiant sukalibruoti ląstelių segmentavimo ir atpažinimo algoritmus, standartinių KV biožymenų SVA rezultatai (ER, PgR, Ki67 ir HER2 2+ ir 3+ raišką vykdančių ląstelių procentinės dalys) palyginti su gydytojo patologo vizualaus įvertinimo rezultatais. Minėtina stipri sąsaja tarp SVA būdu nustatytų ER raišką vykdančių naviko ląstelių ir patologo vizualaus vertinimo procentinių dalių ($r = 0,84$, $p < 0,0001$), labai stipri sąsaja vertinant PgR ($r = 0,93$, $p < 0,0001$), vidutinė sąsaja analizuojant HER2 ląstelių, pasižyminčių nepertraukiamu membraniniu nusidažymu, procentines dalis ($r = 0,67$, $p < 0,001$) ir stipri sąsaja vertinant Ki67 ($r = 0,74$, $p < 0,0001$) (4.6 pav.).



(A) – sklaidos diagrama, vertinant ER procentinę dalį, nustatytą SVA būdu ir įvertinus patologui vizualiai, (B) – vertinant PgR, (C) – HER2, (D) – Ki67.

4.6 pav. Estrogeno receptoriaus (ER), progesterono receptoriaus (PgR), 2-ojo žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus (HER2) ir Ki67 biožymenų procentinių dalių, vertintų skaitmeninės vaizdo analizės (SVA) būdu ir patologo vizualiai, sklaidos diagramos (n = 101)

4.7. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių aprašomosios statistikos rezultatai

Atlikus IHC vaizdų SVA ir juos padalijus į atsitiktinai išsidėsčiusius šešiakampių gardelių elementus, apskaičiuoti 28 kiekybiniai IHC biožymenų ir jų raiškos heterogeniškumo rodikliai:

1) **standartinių KV biožymenų rodikliai naviko audinyje** – ER, PgR, Ki67 ir HER2 2+ ir 3+ raišką vykdančių ląstelių procentinės dalys,

2) **vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai:**

- a) ER, PgR ir Ki67 energija,
- b) ER, PgR ir Ki67 homogeniškumas,
- c) ER, PgR ir Ki67 entropija,
- d) ER, PgR ir Ki67 kontrastas,
- e) ER, PgR ir Ki67 skirtingumas,
- f) ER, PgR ir Ki67 AshD,

3) **imuninį atsaką apibūdinantys rodikliai** – CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankis naviko ir stromos audinyje,

4) **hipoksijos savybes atspindintys rodikliai** – HIF1 α raišką vykdančių ląstelių procentinė dalis naviko ir stromos audinyje.

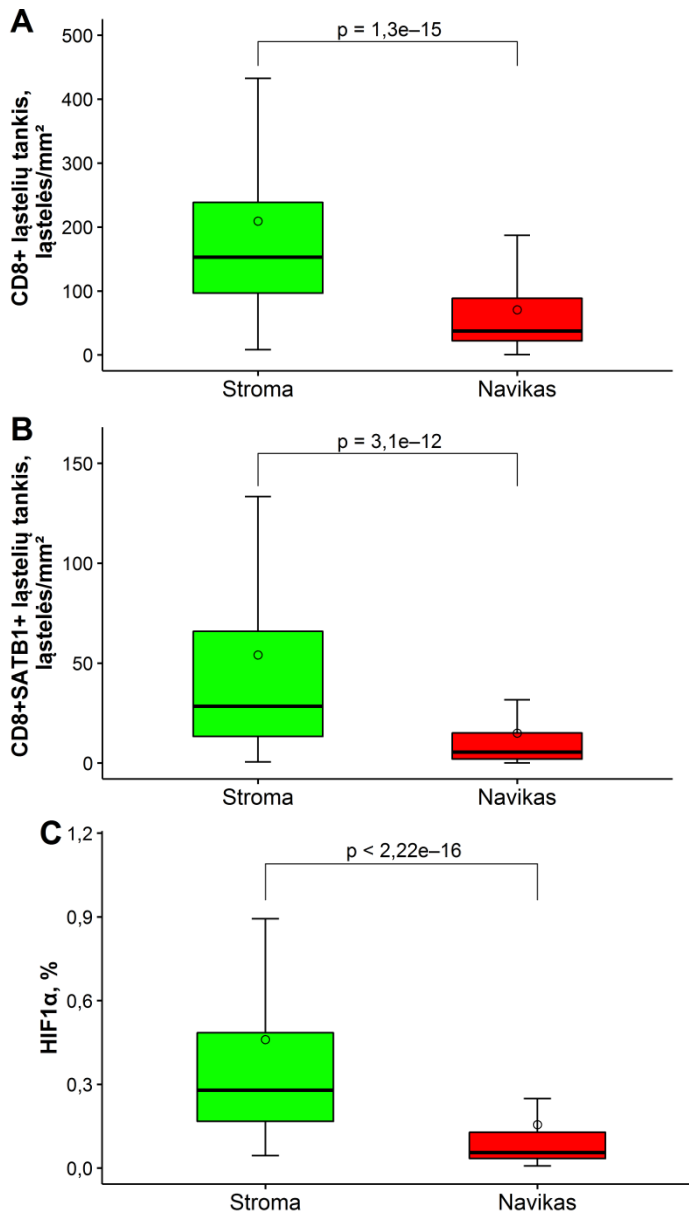
IHC biožymenų ir jų raiškos heterogeniškumo rodiklių reikšmių aprašomosios statistikos rezultatai pateikti 4.7 lentelėje.

4.7 lentelė. Standartinių krūties vėžio, vidunavikinio heterogeniškumo, imuninio atsako ir hipoksijos savybes atspindinčių biožymenų rodiklių aprašomoji statistika (n = 101)

Rodiklis	Vidurkis	Standart. nuokrypis	Mažiausia vertė	Didžiausia vertė	Mediana
Standartinių krūties vėžio biožymenų rodikliai					
ER%	68,85	25,93	0,03	98,82	78,68
PgR%	38,50	34,11	0,03	96,28	31,87
HER2%	10,53	22,20	0,002	90,62	0,64
Ki67%	7,21	6,46	0,39	40,53	5,36
Vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai					
ER_energija	0,24	0,28	0,02	1,00	0,14
ER_homogeniškumas	0,71	0,13	0,46	1,00	0,69
ER_entropija	3,48	1,53	0	6,00	3,67
ER_kontrastas	1,95	1,21	0	5,18	1,90
ER_skirtingumas	0,77	0,38	0	1,61	0,76
ER_AshD	3,36	9,24	0,82	93,12	1,86
PgR_energija	0,42	0,40	0,02	1,00	0,15
PgR_homogeniškumas	0,76	0,18	0,42	1,00	0,72
PgR_entropija	2,93	2,14	0	6,02	3,63
PgR_kontrastas	1,76	1,69	0	7,25	1,68
PgR_skirtingumas	0,65	0,53	0	1,87	0,78
PgR_AshD	2,30	2,03	0,15	14,41	1,86
Ki67_energija	0,66	0,31	0,05	1,00	0,72
Ki67_homogeniškumas	0,91	0,10	0,58	1,00	0,94
Ki67_entropija	1,13	1,10	0	4,80	0,87
Ki67_kontrastas	0,24	0,36	0	2,29	0,13
Ki67_skirtingumas	0,19	0,21	0	1,01	0,12
Ki67_AshD	2,08	1,30	0	7,05	1,71
Imuninio atsako rodikliai					
CD8_t_S	209,25	199,07	8,16	1 243,14	152,95
CD8_t_NA	70,72	85,03	0,52	451,36	37,39
CD8_SATB1_t_S	54,11	78,70	0,56	541,47	28,41
CD8_SATB1_t_NA	14,99	25,87	0	160,82	5,47
Hipoksijos savybes atspindintys rodikliai					
HIF1 α %_S	0,46	0,65	0,04	4,29	0,28
HIF1 α %_NA	0,16	0,37	0,01	3,16	0,06

AshD – Ašmano D bimodalizmo rodiklis, t – tankis, S – stromos audinys, NA – naviko audinys.

Pritaikius vieno faktoriaus dispersinės analizės metodą, nustatyta CD8+, CD8+SATB1+ ir HIF1 α ląstelių mažėjimo tendencija naviko dalies atžvilgiu: didesnis ir labiausiai išsisklaidęs CD8+, CD8+SATB1+ tankis bei HIF1 α ląstelių procentinė dalis stromos audinyje ir mažiau gausus ir išsisklaidęs CD8+, CD8+SATB1+ tankis bei HIF1 α ląstelių procentinė dalis naviko audinyje ($p < 0,0001$) (4.7 lentelė ir 4.7 pav.).



Paveikslėlio tęsinys.

CD8+ (A), CD8+SATB1+ (B) ląstelių tankio ir HIF1 α (C) ląstelių procentinės dalies stačiakampės diagramos stromos dalyje vaizduojamos žalia, naviko dalyje – raudona spalvomis. Stačiakampio apatinė ir viršutinė kraštinės vaizduoja pirmą ir trečią kvartilius, stačiakampio viduryje esanti linija žymi medianą, rutuliukas – vidurkį. Vertikalios linijos viršutinis status brūkšnyš žymi didžiausią ląstelių tankio ar procentinės dalies vertę, apatinis – mažiausią. Porinio palyginimo tarp grupių statistinio reikšmingumo (p) reikšmės pateiktos virš horizontalių linijų paveikslų viršutinėje dalyje.

4.7 pav. CD8+, CD8+SATB1+ ląstelių tankio ir HIF1 α ląstelių procentinės dalies pasiskirstymo naviko ir stromos audiniuose stačiakampės diagramos ($n = 101$)

4.8. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių tarpusavio sąsajos

Siekiant išvengti daugialypiškumo ar išskirtinumo faktoriškos ir daugialypėje išgyvenamumo analizėse, stipriai susiję ($r > 0,90$) kintamieji turėjo būti pašalinti, todėl IHC biožymenų ir heterogeniškumo kintamųjų tarpusavio sąsajoms nustatyti taikyta koreliacijų analizė. Pirmiausia įvertintos heterogeniškumo kintamųjų tarpusavio sąsajos (rezultatai pateikti 10 priede). Nustatyta, kad heterogeniškumo rodikliai tarpusavyje susiję, pavyzdžiui, tarp ER homogeniškumo ir energijos, ER homogeniškumo ir entropijos bei ER homogeniškumo ir skirtingumo nustatytos labai stiprios sąsajos (atitinkamai $r = 0,92$, $r = -0,98$ ir $r = -0,98$ ($p < 0,0001$)). Mažiausi koreliacijos koeficientai nustatyti tarp PgR, Ki67 AshD ir erdvinės naviko Haralicko tekstūros rodiklių. Kuriuos iš kintamųjų analizuoti toliau, nuspręsta remiantis vieno paciento atidėjimo kryžminės patikros rezultatais. Atliekant patikrinimą, naudoti skirtingi duomenų rinkiniai: klinikiniai ir patologiniai parametrai, standartinių KV biožymenų, imuninio atsako, hipoksijos savybės atspindintys bei heterogeniškumo rodikliai – ER, PgR ir Ki67 bimodališkumo rodiklis bei konkretus erdvinės naviko Haralicko tekstūros rodiklis (vieno paciento atidėjimo kryžminės patikros rezultatai pateikti 4.8 lentelėje). Nustatyta, kad, naudojant Haralicko tekstūros entropijos rodiklius, modelis pasikartojė dažniausiai (61 kartą) (modelio statistinis reikšmingumas buvo didžiausias, siekė 10,03 ($p = 0,0015$)). Remiantis šiuo rezultatu, tolesnėms analizėms pasirinkti naudoti ER, PgR ir Ki67 Haralicko tekstūros entropijos rodikliai.

4.8 lentelė. Kryžminio patikrinimo rezultatai, analizuojant imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklius (n = 101)

Haralicko tekstūros rodiklis	Daugialypį Kokso regresijos modelį sudarę kintamieji	Kokso regresijos modelio pasikartojimai	Kokso regresijos modelio χ^2	<i>p</i> vertė
Energija	CD8_t_NA	55	8,03	0,0016
	HIF1 α _S			
	Ki67_AshD			
	PgR_energija			
Homogeniškumas	N grupė (N0 ir N1–3)	56	8,12	0,0002
	CD8_t_S			
	Ki67_AshD			
	PgR_homogeniškumas			
Entropija	CD8_SATB1_t_NA	61	10,03	0,0015
	Ki67_AshD			
	PgR_entropija			
Kontrastas	CD8_SATB1_t_NA	51	9,74	0,0019
	Ki67_AshD			
	PgR_kontrastas			
Skirtingumas	CD8_t_NA	53	5,72	0,017
	HIF1 α _S			
	Ki67_skirtingumas			
	PgR_skirtingumas			

AshD – Ašmano *D* bimodališkumo rodiklis, *t* – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys, *N* – išplitimas į sritinius limfmazgius.

Sumažinus IHC biožymenų ir heterogeniškumo kintamųjų duomenų rinkinį iki 16 rodiklių, atlikta šių parametų tarpusavio sąsajų analizė (rezultatai pateikti 11 priede). Nustatyta, kad analizuojami kintamieji tarpusavyje susiję. Didžiausias koreliacijos koeficientas nustatytas tarp Ki67 raišką vykdančių ląstelių procentinės dalies ir Ki67 entropijos ($r = 0,84$, $p < 0,0001$) bei tarp CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankio stromos dalyje ($r = 0,82$, $p < 0,0001$). Silpnas ryšys nustatytas tarp PgR procentinės dalies ir Ki67 entropijos ($r = -0,20$, $p = 0,04$) bei tarp HIF1 α procentinės dalies stromos dalyje ir Ki67 entropijos ($r = 0,20$, $p = 0,04$) (11 priedas).

4.9. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių ryšių struktūra

Daugiamatei kiekybinių IHC biožymenų ir heterogeniškumo kintamųjų tarpusavio sąsajų analizei ir panašių reiškinių grupėms nustatyti taikyta

faktorinė analizė ir faktorių bendroji stačiakampė *varimax* veiksmų rotacija, naudojant standartinius KV biožymenų, imuninio atsako, hipoksijos savybes atspindinčius ir vidunavikinio heterogeniškumo (ER, PgR ir Ki67 AshD ir Haralicko tekstūros entropijos) rodiklius. Prieš atliekant šią analizę, kintamųjų tinkamumas įvertintas taikant KMO testą. Nustatyta, kad bendrasis visų kintamųjų tinkamumo matas – 0,6. Tinkamumo matai taip pat apskaičiuoti kiekvienam kintamajam (žr. 4.9 lentelę). Didžiausią KMO įvertį turėjo ER raišką vykdančių ląstelių procentinė dalis (0,74), mažiausią – ER Haralicko tekstūros entropijos rodiklis (0,3).

4.9 lentelė. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių tinkamumo (Kaizerio–Mejerio–Olkinio (KMO)) įverčiai (n = 101)

Rodiklis	Tinkamumo (KMO) vertė
ER%	0,74
PgR%	0,61
Ki67%	0,55
HER2%	0,72
ER_entropija	0,30
ER_AshD	0,31
PgR_entropija	0,54
PgR_AshD	0,73
Ki67_entropija	0,56
Ki67_AshD	0,50
CD8_t_S	0,60
CD8_t_NA	0,67
CD8_SATB1_t_S	0,60
CD8_SATB1_t_NA	0,59
HIF1a%_S	0,63
HIF1a%_NA	0,69

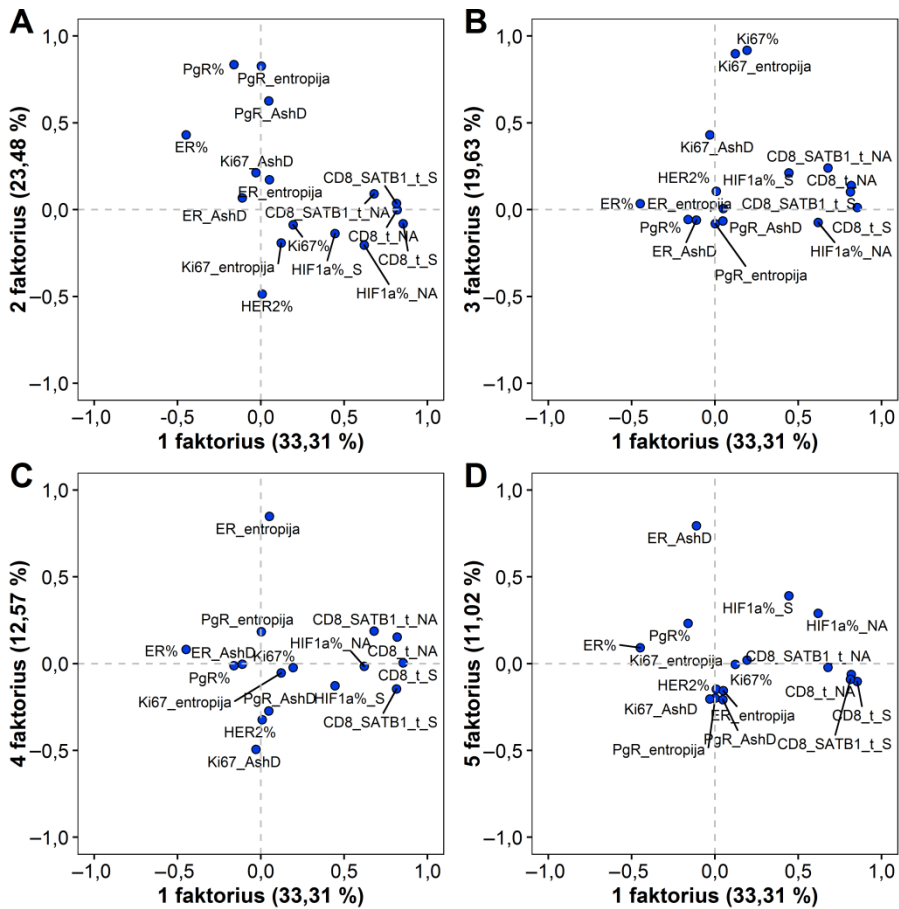
AshD – Ašmano D bimodaliteto rodiklis, *t* – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys.

Atsižvelgiant į faktorių tikrines vertes, išskirti penki nepriklausomi IHC biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių faktoriai (1-ojo faktoriaus tikrinė vertė – 3,93, 2-ojo – 2,28, 3-iojo – 1,78, 4-ojo – 1,13, 5-ojo – 1,09), kurie paaiškino 63,78 proc. duomenų rinkinio variacijų (rotuotų faktorių struktūra ir kiekvieno rodiklio įtaka duomenų rinkinio variacijoms pateikta 12 priede). 1-asis faktorius paaiškino 33,31 proc. duomenų rinkinio variacijų, 2-asis faktorius – 23,48 proc., 3-iasis faktorius – 19,63 proc., 4-asis faktorius – 12,57 proc., 5-asis faktorius – 11,02 proc. (1-ojo ir 2-ojo, 1-ojo ir 3-iojo, 1-ojo ir 4-ojo bei 1-ojo ir 5-ojo faktorių krūviai pavaizduoti 4.8 pav.).

Remiantis rotuotų faktorių krūviais, nustatyta, kad 1-ąjį faktorių apibūdino CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankiai naviko ir stromos audiniuose, 2-ąjį faktorių – PgR procentinė dalis naviko dalyje bei PgR vidunavikinio heterogeniškumo kintamieji – AshD ir entropijos rodikliai, 3-įjį faktorių – Ki67 procentinė dalis naviko dalyje bei Ki67 entropijos rodikliai, 4-ąjį faktorių – ER entropijos rodiklis, 5-ąjį faktorių – ER AshD rodiklis (žr. 12 priedą ir 4.8 pav.).

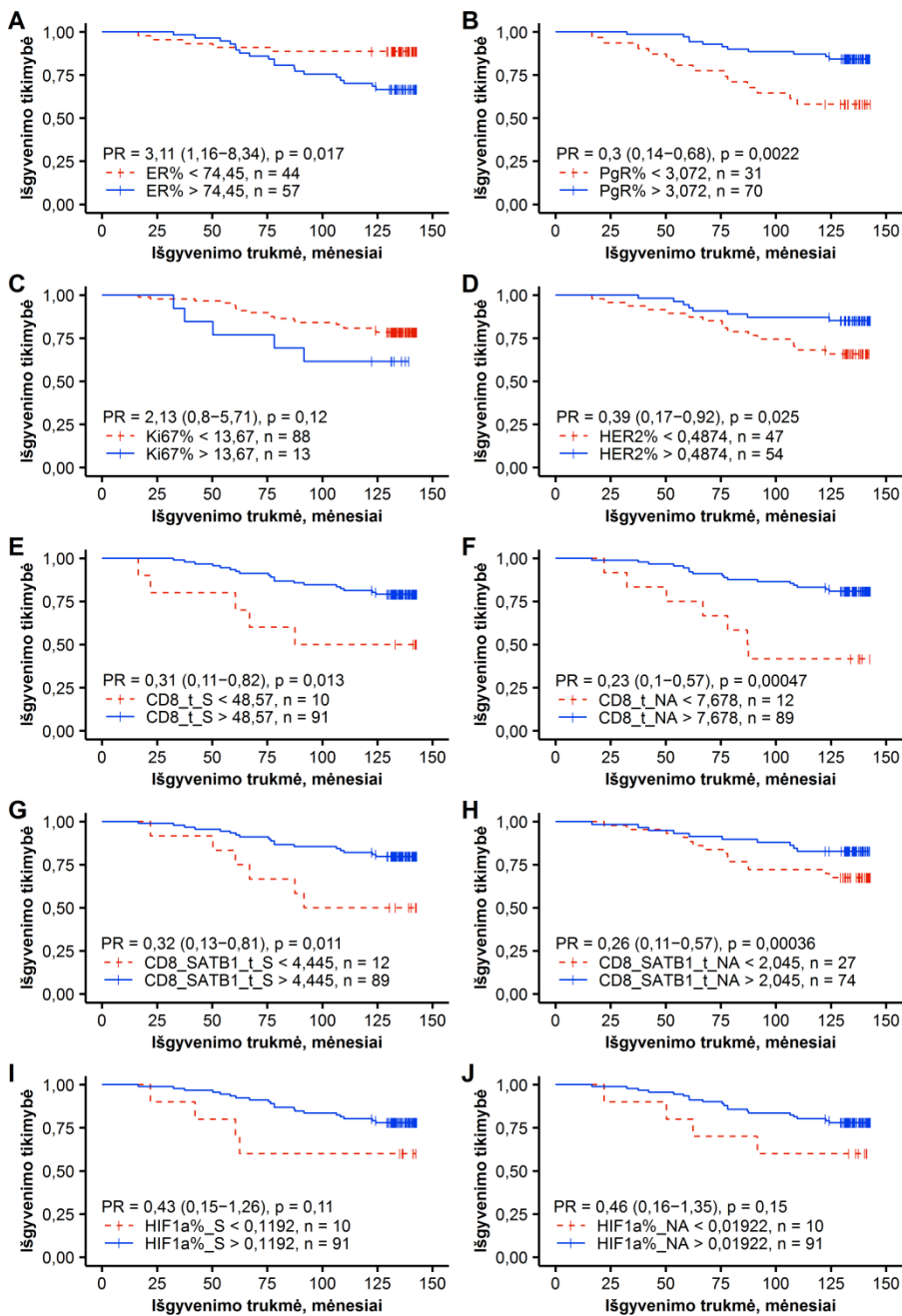
4.10. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių prognozinė vertė

Naudojant IHC biožymenų ir jų raiškos heterogeniškumo rodiklius, atlikta vienalypė regresijos analizė, taikant logranginį kriterijų, pacienčių bendrajam išgyvenamumui prognozuoti. Regresijos analizių rezultatai, taikant logranginį testą, pateikti 13 priede. Analizuojant sąsajas tarp pacienčių išgyvenamumo ir standartinių KV biožymenų, imuninio atsako ir hipoksijos savybes atspindinčių rodiklių, gautos Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės pateikiamos 4.9 pav., pacienčių išgyvenamumo ir biožymenų raiškos heterogeniškumo rodiklių kreivės – 4.10 pav.



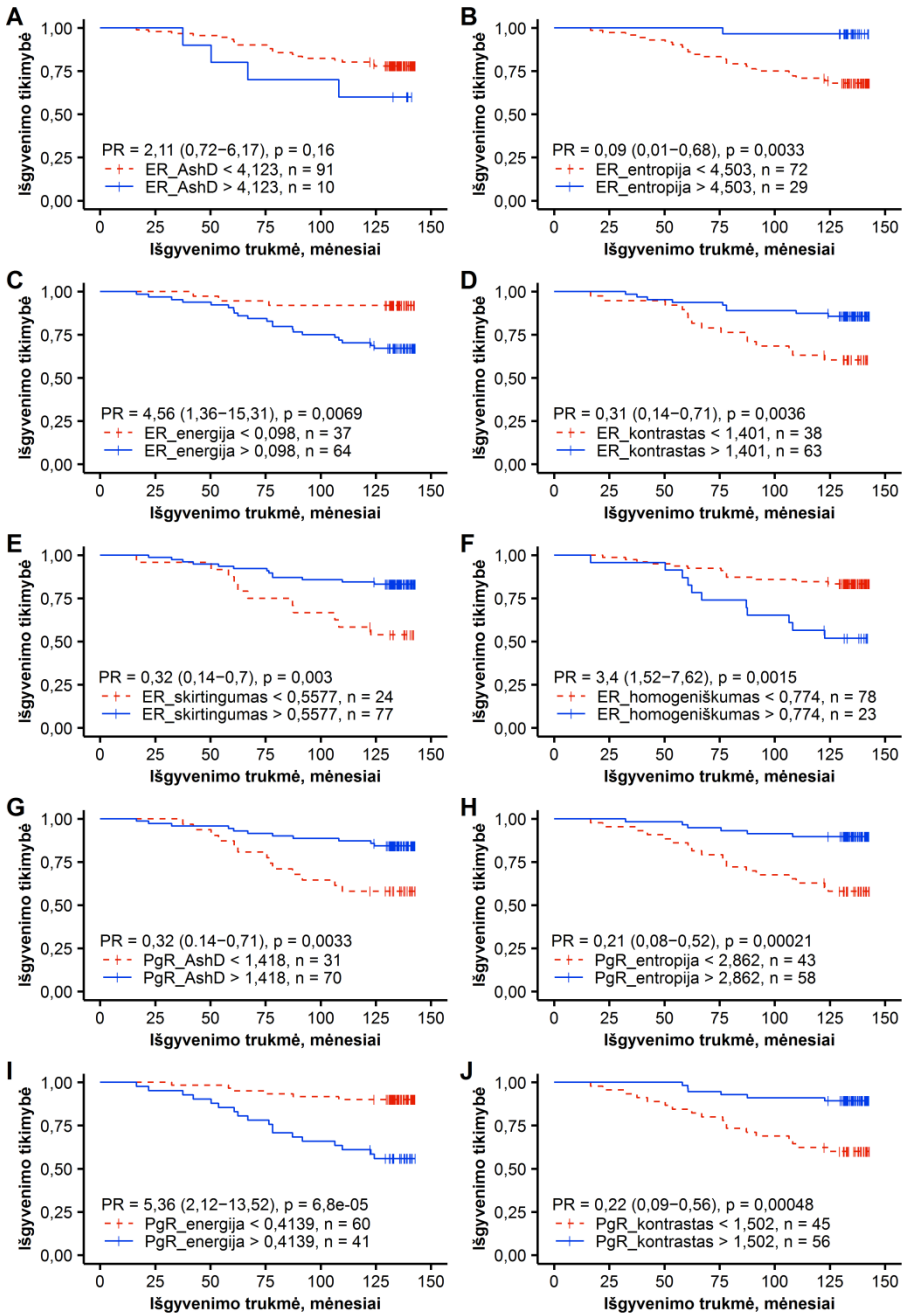
AshD – Ašmano *D* bimodalitškumo rodiklis, *t* – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys.

4.8 pav. 1-ojo ir 2-ojo (A), 1-ojo ir 3-ojo (B), 1-ojo ir 4-ojo (C), 1-ojo ir 5-ojo (D) rotuotų faktorių krūviai (n = 101)

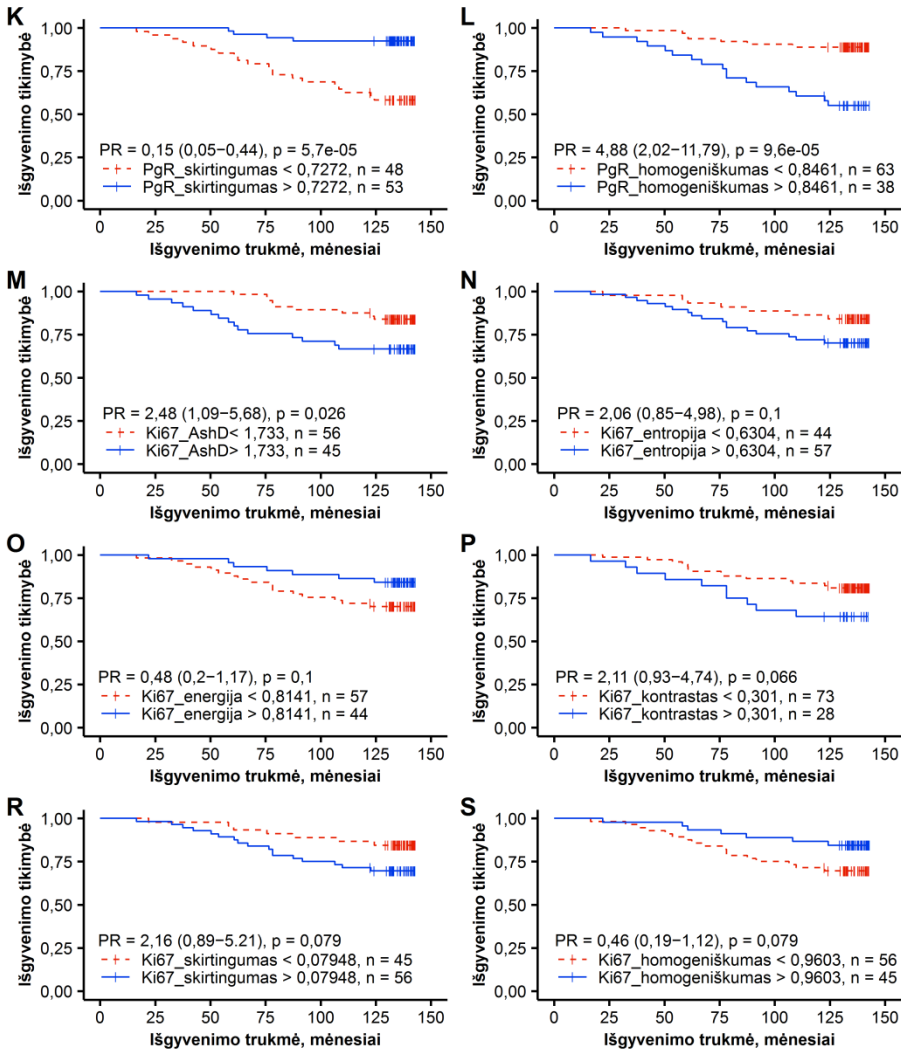


t – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys.

4.9 pav. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, taikant lograngingį testą ir pavojaus riziką (PR), pacienčių išgyvenamumo ir imunohistochemijos biožymenų rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)



tęsinys kitame puslapyje



AshD – *Ašmano D* bimodališkumo rodiklis.

4.10 pav. Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, taikant logranginį testą ir pavojaus riziką (PR), pacienčių išgyvenamumo ir imunohistochemijos biožymenų raiškos heterogeniškumo rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)

Nustatyta, kad geresnė pacienčių išgyvenamumo prognozė susijusi su didesnėmis PgR (4.9 pav. B dalis), HER2 procentinės dalies naviko audinyje (4.9 pav. D dalis), CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankio stromos audinyje (atitinkamai 4.9 pav. E ir G dalys), CD8+ ir CD8+SATB1+ ląstelių tankio naviko audinyje (atitinkamai 4.9 pav. F ir H dalys), ER ir PgR entropijos (atitinkamai 4.10 pav. B ir H dalys), ER ir PgR kontrasto (atitinkamai 4.10 pav. D ir J dalys), ER ir PgR skirtingumo (atitinkamai 4.10 pav. E ir K

dalys) ir PgR AshD (4.10 pav. G dalis) rodiklių vertėmis (13 priedas). Blogesnė pacienčių išgyvenamumo prognozė susijusi su didesnėmis ER (4.9 pav. A dalis), ER energijos ir ER homogeniškumo (atitinkamai 4.10 pav. C ir F dalys), PgR energijos ir homogeniškumo (atitinkamai 4.10 pav. I ir L dalys) rodiklių vertėmis (13 priedas). Statistiškai reikšmingų sąsajų tarp bendrojo pacienčių išgyvenamumo ir Ki67 (4.9 pav. C dalis), HIF1 α raiškos intensyvumo stromos ir naviko dalyse (atitinkamai 4.9 pav. I ir J dalys), ER AshD (4.10 pav. A dalis), Ki67 entropijos, energijos, kontrasto, skirtingumo ir homogeniškumo (atitinkamai 4.10 pav. N–S dalys) nebuvo nustatyta (13 priedas).

Siekiant nustatyti nepriklausomus prognozinis kintamuosius, sukurti du daugialypiai Kokso regresijos modeliai, naudojant patologinius ir klinikinius kintamuosius bei standartinius KV biožymenų, imuninio atsako, hipoksijos savybes atspindinčius ir vidunavikinio heterogeniškumo rodiklius (rezultatai pateikti 4.10 lentelėje). Daugialypiai Kokso regresijos modeliai patvirtinti, taikant vieno paciento atidėjimo kryžminį patikrinimą: 1-asis modelis pasikartojė 58 kartus, 2-asis modelis – 61 kartą.

4.10 lentelė. Daugialypė Kokso regresijos analizė, taikant logranginį testą, pacienčių išgyvenamumo ir imunohistocheminių biožymenų bei heterogeniškumo rodiklių sąsajoms nustatyti (n = 101)

Rodiklis	Pavojaus rizika	95 % pasikliautinis intervalas	p vertė
1-asis modelis, TS – 12,23, p = 0,0022			
N grupė (N0 ir N1–3)	2,30	1,01–5,28	0,0485
PgR%	0,29	0,13–0,66	0,0028
2-asis modelis, TS – 27,67, p < 0,0001			
CD8_SATB1_t_NA	0,30	0,13–0,67	0,0035
PgR_entropija	0,22	0,08–0,56	0,0015
Ki67_AshD	3,26	1,40–7,61	0,0062

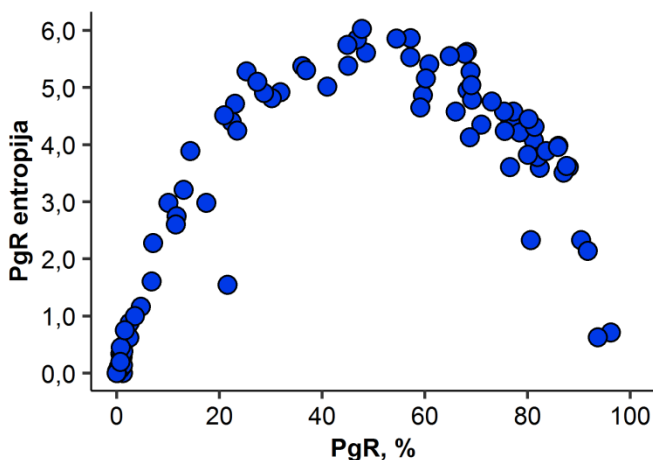
AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis, *t* – tankis, *NA* – naviko audinys, *N* – išplitimas į sritinius limfmazgius, *TS* – tikėtinumo santykis.

1-ajame modelyje naudoti tik standartiniai KV biožymenų kiekybiniai rodikliai – ER, PgR, HER2 ir Ki67 raiškos procentinės dalys naviko audinyje, klinikiniai ir patologiniai kintamieji – pacienčių amžiaus grupė, T, N ir diferenciacijos laipsnis (4.10 lentelė). Nustatyta, kad mažesnė PgR raiška ir naviko išplitimas į limfmazgius susiję su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu. 2-ajame modelyje, be klinikinių ir patologinių bei standartinių KV biožymenų rodiklių, taip pat naudoti imuninį atsaką, hipoksijos savybes ir vidunavikinį heterogeniškumą atspindintys rodikliai.

Atlikus šio modelio daugialypę regresijos analizę, nustatyta, kad 2-ojo modelio statistinis reikšmingumas, vertinant pagal TS, sustiprėjo nuo 12,23 iki 27,67, palyginti su 1-uoju modeliu. Be to, 2-ajame modelyje nustatytas nepriklausomas trijų rodiklių prognozinis reikšmingumas: didesnis CD8+SATB1+ ląstelių tankis naviko audinyje ir didesnė entropija (vidunavikinis heterogeniškumas) prognozavo ilgesnį pacienčių išgyvenamumą (atitinkamai $PR = 0,3$, $p = 0,004$ ir $PR = 0,22$, $p = 0,002$), o Ki67 raiškos bimodališkumas naviko audinyje numatė blogesnę pacienčių baigtį ($PR = 3,26$, $p = 0,006$).

4.11. Netiesinė priklausomybė tarp progesterono receptoriaus raiškos ir vidunavikinio heterogeniškumo

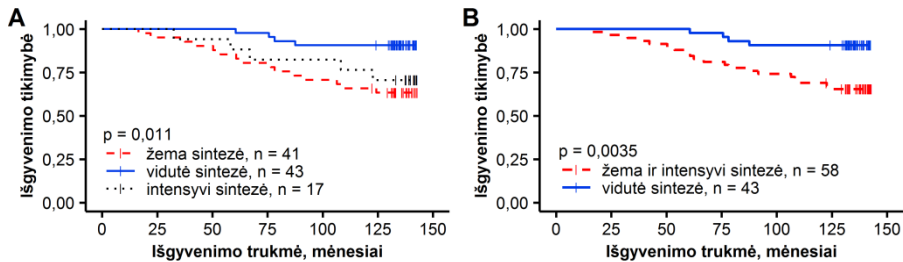
Netiesinė priklausomybė tarp PgR raiškos intensyvumo ir PgR vidunavikinio heterogeniškumo (entropijos) įrodyta empiriškai: aukšta PgR entropija nustatyta PgR raiškos intervale nuo 20 proc. iki 80 proc. (4.11 pav.). Nė vienas iš šių kintamųjų nebuvo reikšmingai susijęs su klinikiniais, patologiniais ar kitais IHC ir heterogeniškumo rodikliais (11 priedas): nustatyta silpna tiesinė sąsaja tarp PgR ir ER entropijos ($r = 0,31$, $p = 0,002$) bei tarp PgR entropijos ir HER2 raišką vykdančių ląstelių procentinės dalies ($r = -0,33$, $p = 0,001$).



4.11 pav. Netiesinė sąsaja tarp progesterono receptoriaus (PgR) procentinės dalies naviko audinyje ir vidunavikinio heterogeniškumo (entropijos) ($n = 101$)

4.12. Progesterono receptoriaus raiškos prognozinė vertė remiantis vidunavikinio heterogeniškumo savybėmis

Siekiant nustatyti netiesinės priklausomybės tarp PgR procentinės dalies naviko audinyje ir PgR entropijos įtaką pacienčių išgyvenamumui, pacientės suskirstytos į tris grupes. Išskirtos šios grupės: mažos PgR raiškos (mažiau negu 20 proc.) ir mažos entropijos, vidutinės PgR raiškos (nuo 20 proc. iki 80 proc.) ir aukštos entropijos, intensyvios PgR raiškos (didesnė kaip 80 proc.) ir mažos entropijos. Pacienčių, kurių navikuose nustatyta vidutinė PgR raiška (nuo 20 proc. iki 80 proc.), išgyvenamumo tikimybė buvo didžiausia – 91 proc. po 143 mėn. Esant intensyviai PgR raiškai (>80 %), išgyvenamumo tikimybė buvo vidutinė (71 %). Mažiausia (63 %) išgyvenamumo tikimybė nustatyta moterims, kurių navikuose PgR raiška buvo maža (<20 %) (4.12 pav.).



(A) – Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, analizuojant sąsają tarp pacienčių bendrojo išgyvenamumo ir žemos (mažiau negu 20 proc.), vidutinės (nuo 20 proc. iki 80 proc.) ir intensyvios (daugiau negu 80 proc.) PgR raiškos grupių, (B) – Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, analizuojant sąsają tarp pacienčių bendrojo išgyvenamumo ir žemos bei aukštos (mažiau negu 20 proc. ir daugiau negu 80 proc.) ir vidutinės (nuo 20 proc. iki 80 proc.) PgR raiškos grupių.

4.12 pav. Krūties vėžiu sergančių pacienčių Kaplano ir Mejerio išgyvenamumo kreivės, taikant logranginį testą ir pavojaus riziką (PR), pacienčių išgyvenamumo ir skirtingų progesterono receptoriaus procentinės dalies grupių sąsajoms nustatyti (n = 101)

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Sąveikos krašto ir sąveikos zonos nustatymo rezultatų aptarimas

Skaitmenizuotuose mikroskopiniuose patologijos vaizduose, pritaikius automatizuotą naviko ir stromos komponentų atskyrimo įrankį SK nustatyti ir SZ išskirti, apskaičiuoti imuninių ląstelių tankio profiliai bei nauji kiekybiniai ir erdviniai antinavikinį imuninį atsaką apibūdinantys rodikliai, kurie buvo susieti su pacienčių išgyvenamumo duomenimis. Taikant pasirinktą tyrimo metodą, SZ apibrėžta panašiai kaip ir kituose tyrimuose^{25, 26, 294–297}, tačiau ji buvo nustatyta visiškai automatizuotai, remiantis tik SVA duomenimis. Be to, SZ nustatyta intervalais, todėl imuninio atsako rodikliai apskaičiuoti taip, kad atspindėtų imuninio infiltrato gradientą nuo stromos į naviką arba kad atspindėtų rodiklių dispersiją konkrečioje SZ dalyje. Nustatytas erdvinis (CD8+ tankio poslinkis į naviko šerdį) ir kiekybinis (absoliutus CD8+ tankis navike) imunogradiento parametrai vertintini kaip nepriklausomi ankstyvosios stadijos HRDK sergančių pacienčių bendrojo išgyvenamumo rodikliai.

Tiriamąjį audinį padalijus į šešiakampius ir remiantis aiškiais matematinėmis taisyklėmis, skaitmenizuotuose IHC vaizduose automatiškai išskirtas naviko ir stromos SK – sąsajos tarp naviko ir stromos sritis, kuri matematiškai atitiko sąsajingumo (angl. *interfaceness*) tikimybę. Kitos šiuolaikinės SVA platformos, pavyzdžiui, *Indica Labs HALO* ir *QuPath* (Belfasto Karalienės universitetas, Šiaurės Airija), taip pat suteikia galimybę nustatyti fiksuoto pločio IK, tačiau jis automatiškai nustatomas tik tuo atveju, jei riba tarp naviko ir stromos (naviko kraštas) yra nubrėžiama rankiniu būdu kaip linija^{298, 299}. Kliniškai patvirtinto *Immunoscore* testo^{21, 22, 295} ir kitų imuninės sistemos profilavimo tyrimų^{296, 300–302} metodikos taip pat pagrįstos IK nustatymu, kai naviko kraštas yra nubrėžiamas rankiniu būdu. Toks IK nustatymas, kai naviko ir stromos riba vertinama vizualiai ir brėžiama rankiniu būdu, užima ne tik daug laiko, bet ir gali sukelti šališkumą tarp kelių vertintojų arba tarp vertintojo neišvengiamai kintančių nuomonių. Šie neatitikimai ypač tikėtini tiriant navikus, kuriems būdingas netaisyklingas (infiltratyvus) augimo modelis, ar mažos atsiskyrusios naviko sankaupos (angl. *tumour budding*)^{303, 304}, kai naviko ir stromos sąveikos sričių nėra galimybės aiškiai atskirti. Disertacijoje pristatyta SK ir SZ nustatymo metodologija ne tik visiškai nepriklausė nuo vizualaus įvertinimo, bet ir nebuvo paveikta infiltruojančio ir (arba) stumiančio naviko augimo modelio. SK, riba tarp naviko ir stromos, buvo nustatyta analizuojant SVA klasifikatoriaus duomenis šešiakampiuose, todėl

net ir pačiose infiltratyviausiose KV audinio vietose buvo galima išskirti naviko ir stromos SK ir vėliau jį išplėsti į tam tikro pasirinkto pločio SZ.

Disertacijoje pristatytas automatinis naviko ir stromos komponentų analitikos metodas taip pat leido reguliuoti SK ir SZ pločius bei erdvinį stromos, SK ir naviko dalių išdėstymą tiriamojame zonoje. SZ nustatymas rangais ir audinio suskirstymas į naviko ir stromos dalis sudarė galimybę apskaičiuoti SZ profilio rodiklius, kurie atspindėjo ne tik imuninių ląstelių tankį, bet ir imuninio infiltrato kryptines savybes – gradientą. Minėtina, kad skirtinguose moksliniuose tyrimuose^{294–297, 305} pateikiami ne tik įvairūs IK apibrėžimai, bet ir pasirenkama analizuoti įvairaus pločio regioną. Siekdama suvienodinti taikomas metodikas, 2017 m. Tarptautinė imuninių ir onkologinių biožymenų darbo grupė^{25, 26} IK apibrėžė J. Galono ir bendraautorių²⁹⁵ pasiūlyta definicija ir nurodė, kad regionu reikėtų laikyti 1 mm pločio sritį, kurios centras skiria naviko ir stromos audinius. Vėlesniais moksliniais tyrimais^{294, 296, 297, 305} įrodyta NIL tankio prognozė reikšmė tiriant siauresnio pločio IK. Pavyzdžiui, A. Lechneris ir bendraautoriai²⁹⁷, tirdami NIL galvos ir kaklo plokščių ląstelių karcinomose, taikė IK apibrėžimą, kai regiono plotas svyravo nuo 50 μm naviko dalyje iki 300 μm už naviko ribos. N. Bordry ir bendraautoriai²⁹⁴, tirdami pirminius melanomas navikus, IK apibrėžė kaip 400 μm pločio sritį tarp naviko ir dermos, o F. Hermitte²⁹⁶ – kaip sritį, kuri apima 360 μm stromos ir 360 μm naviko audinio gaubtinės ir tiesiosios žarnos naviko atvejais. A. Berthel ir kt.³⁰⁵, tirdami KV sergančių pacienčių mėginius, nustatė, kad NIL tankis 0–10 μm atstumu nuo rankiniu būdu nubrėžtos naviko ir stromos ribos yra pakankamas didesniai NIL skaičiui susieti su ilgesniu pacienčių išgyvenamumu. Nepaisant taikytų skirtingų IK apibrėžimų, šie rezultatai patvirtina J. Galono ir bendraautorių²⁹⁵ prielaidą, kad limfocitai, kurie glaudžiai kontaktuoja su naviko ląstelėmis, sukelia tiesioginį ir stiprų antinavikinį poveikį ir suteikia tikslesnę prognozinę vertę negu NIL, kurie įvertinti visame navike ar stromoje. Šiai hipotezei patvirtinti disertacijoje analizuojamoje HRDK imtyje taip pat buvo ištirti įvairūs analizės parametrai, keičiant šešiakampių elementų priskyrimo SK ir SZ taisykles bei analizuojant įvairaus pločio regionus. Nustatyta, kad, esant HRDK, imuninio atsako savybes apibūdinantys kiekybiniai ir erdviniai rodikliai turi būti apskaičiuoti pakankamai plačioje SZ srityje, kuri artima rekomenduojamam 1 mm pločio IK.

Moksliniuose tyrimuose^{28, 34} taip pat minima taikyta SVA, siekiant pagal naviko audinio morfologines savybes automatiškai nustatyti naviko ir stromos regionus bei apskaičiuoti naviko mikroaplinką apibūdinančius kiekybinius ir (ar) erdvinius rodiklius. N. Harder ir bendraautoriai²⁸, pritaikę

audinio fenomikos metodiką (angl. *tissue phenomics*) 90 pacientų prostatos mėginiuose, atliko išsamų imuninių biožymenų tyrimą ligos atsinaujinimui numatyti. Remdamiesi naviko morfologinėmis savybėmis bei 18-ojo citokeratino ir p63 biožymenų raiškos rezultatais, minėti tyrėjai automatiškai atskyrė 112,5 ir 225 μm pločio naviko mikroaplinkos zonas nuo automatiškai nustatytos ribos tarp naviko ir stromos. Kiekvienoje iš šių zonų, apskaičiavus CD3+, CD8+, CD34+, CD68+ ir CD163+ ląstelių tankį bei atstumus tarp ląstelių apibūdinančius rodiklius, nustatyta, kad CD8+ ir CD34+ ląstelių santykis automatiškai išskirtose zonose gali statistiškai reikšmingai numatyti prognozę. X. F. Li ir bendraautorai³⁴ 28 pacienčių TNKV mėginiuose, pritaikę SVA IK nustatyti, įvertino ne tik naviko mikroaplinką, bet ir CD8+ ląstelių infiltracijos į naviką erdvinius aspektus. Mokslininkai naudojo pancitokeratino fluorescencinį dažymą naviko ir stromos regionams atskirti, tačiau ribą tarp naviko ir stromos jie vis tiek nubrėžė rankiniu būdu ir tik vėliau ją automatiškai išplėtė į fiksuoto 500 μm pločio IK. Nepaisant taikyto rankinio būdo, IK buvo išmatuoti CD8+ ląstelių pikseliai ir įvertintas NIL judrumas, o sukūrus įvairius matematinius modelius, nustatyta, kad ne kolageno skaidulos, bet chemokinai užkerta kelią T limfocitams patekti į naviko šerdį.

Abiejuose aptartuose tyrimuose naviko ir stromos regionas buvo nustatytas ne pagal klasikinį Tarptautinės imuninių ir onkologinių biožymenų darbo grupės rekomenduojamą apibrėžimą, tačiau IK nustatytas labai panašiai, kaip ir šiame disertacijos darbe. Vis dėlto, žvelgiant į disertacijoje pristatyto tyrimo strategiją, galima teigti, kad SZ nustatymas buvo mažiau priklausomas nuo naviko augimo pobūdžio, tikslumo atpažįstant ir segmentuojant atskiras naviko ląsteles ir nereikalavo papildomų IHC dažymų naviko audinio komponentams atskirti. Antra vertus, SZ nebuvo nustatyta kaip fiksuoto pločio riba, o tiksliai atspindėjo trimates naviko ir stromos elementų sąsajas ir jų erdvinius aspektus dvimačiame patologijos vaizde. Dėl šių priežasčių pritaikyta metodologija buvo mažiau priklausoma nuo konkrečių naviko morfologinių savybių, jautresnė ir tikslesnė negu aptarti automatiniai ar pusiau automatiniai naviko ir stromos IK nustatymo metodai.

5.2. Sąsajos tarp imunogradianto rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas

Automatiškai nustatčius SK ir SZ, apskaičiuoti SZ CD8+ imuninių ląstelių tankio profiliai bei kiekybiniai CD8+ ląstelių tankio ir imuninių ląstelių erdvinis aspektus (CD8+ ląstelių gradientą į naviko dalį) apibūdinantys kintamieji, kurie buvo susieti su pacienčių išgyvenamumo duomenimis (4.5 pav., 4.5 ir 4.6 lentelės). Nustatyta, kad CD8+ ląstelių tankio *per se* rodikliai turi prognozinę vertę ankstyvosios stadijos HRDK sergančių pacienčių imtyje, pavyzdžiui, su geresne pacienčių prognoze susijęs CD8+ ląstelių tankio vidurkis SK₃ ir SZ₉ naviko dalyje. CD8+ ląstelių tankio vidurkis SZ₉ stromos dalyje taip pat atskleidžia tendenciją, kad didesnis CTL kiekis yra susijęs su geresne pacienčių prognoze, nors rezultatas buvo statistiškai nereikšmingas. Nepaisant to, pritaikius daugialypį Kokso regresijos modelį, nustatyta, kad CD8+ ląstelių absoliutusias tankis SZ₉ naviko dalyje yra nepriklausomas geros prognozės rodiklis, atsižvelgiant į amžiaus grupę, limfmazgių būklę ir CD8+ MC vidurkį (4.6 lentelė, 1-asis modelis). Šis rodiklis gali būti taikomas antinavikinio imuninio atsako biologinėms savybėms numatyti ankstyvosios stadijos HRDK mėginiuose.

Rodikliai, atspindintys CD8+ ląstelių SZ erdvinį poslinkį naviko atžvilgiu, atskleidė, kad CD8+ MC vidurkio rodiklis, kuris atspindėjo CD8+ ląstelių gradientą į naviko dalį, yra stipriai susijęs su geresniu HRDK pacienčių išgyvenamumu ir yra nepriklausomas geros prognozės duomuo Kokso regresijos modelyje, kuriame buvo analizuoti ir kiti SZ CD8+ ląstelių tankio rodikliai kartu su klinikiniais ir patologiniais kintamaisiais (4.6 lentelė, 1-asis modelis). Atitinkamai nustatyta, kad IN, kuris atspindėjo staigų CD8+ ląstelių tankio sumažėjimą tarp stromos ir naviko dalių, yra susijęs su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu. Šis parametras yra vienintelis iš imunogradianto rodiklių rinkinio, kuris nepriklausė nuo SZ pločio, todėl jis gali būti apskaičiuotas net ir siauriausioje SZ, t. y. zonoje, kurią sudaro trys šešiakampiai elementai. Tai leidžia kelti hipotezę, kad IN rodiklis gali suteikti papildomą prognozinę vertę, ypač tais atvejais, kai nėra galimybės nustatyti platesnę SZ, pavyzdžiui, kai analizuojamo naviko plotas yra labai mažas arba tirama biopsinė medžiaga. Taip pat nustatyta, kad rodikliai, kurie atspindėjo CD8+ ląstelių erdvinį poslinkį į naviko dalį, suteikė papildomą prognozinę vertę (plg. vertinamus tik CD8+ ląstelių tankio rodiklius) (4.6 lentelė, 1 ir 2 modeliai).

Atlikus faktorinę analizę, nustatyti du vidiniai, linijiniu požiūriu savarankiški variacijos veiksniai: CD8+ ląstelių tankis (1 faktorius) ir CTL poslinkis (gradientas) į naviko pusę (2 faktorius) (4.4 pav.). CD8+ tankio ir

gradiento faktoriai buvo reikšmingai susiję su geresniu pacienčių išgyvenamumu (4.5 pav. J ir K dalys). Be to, daugialypiu Kokso regresijos modeliu nustatyta, kad agreguotas SZ CD8+ faktorius, gautas sudėjus CD8+ tankio ir CD8+ gradiento faktorių įverčius, yra nepriklausomas ilgesnio išgyvenamumo prognozinis duomuo (4.6 lentelė, 2-asis modelis). Tai įrodė, kad, derinant imuninių ląstelių infiltrato absoliutų tankį bei erdvinis aspektus, galima ne tik tiksliau įvertinti naviko mikroaplinką, bet ir gauti papildomos prognozinės vertės tiriant antinavikinį imuninį atsaką apibūdinančius biologinius rodiklius.

Moksliniai tyrimai^{210, 306–308} patvirtina, kad, sergant ER–, HER2+ ir TNKV, didesnis NIL kiekis yra susijęs su geresne pacientų prognoze, tačiau, tiriant ER+ ir HER2– KV, nustatyti duomenys yra priešaringi^{31, 309}. Viename iš tyrimų³⁰⁹, analizuojant 12 439 KV mėginius, nebuvo nustatyta sąsaja tarp išgyvenamumo ir vizualiu būdu įvertinto CD8+ T ląstelių tankio. M. Sobralis-Leite ir bendraautoriai³¹, analizavę NIL, remdamiesi IHC ir SVA, ER+ KV, nustatė, kad CD8+ T ląstelių tankis susijęs su blogesniais klinikiniais KV sergančių pacienčių rezultatais ir *PIK3CA* geno mutacijomis. K. H. Lee ir kt.³¹⁰ nurodė, kad NIL gali turėti skirtingą prognozinį poveikį skirtinguose KV tipuose, tačiau šios hipotezės patvirtinti negalėjo – rezultatai buvo statistiškai nereikšmingi. Atliekant disertacijoje pristatomą tyrimą, analizuojant imunogradiento rodiklių rinkinį, HRDK sergančios pacientės ne tik buvo suskirstytos į prognozinės grupes, bet ir buvo nustatyta šių rodiklių ilgalaikė prognozinė vertė. Ypač ryškus nuo laiko priklausomas poveikis nustatytas tiriant agreguoto SZ CD8+ faktoriaus ir ankstyvosios stadijos HRDK sergančių pacienčių išgyvenamumo sąsajas. Daugiau negu 92 proc. pacienčių išgyveno 5-erius metus po atliktos operacijos. Praėjus 5-iems metams, pacienčių išgyvenamumas pradėjo ženkliai skirtis ir po 10 metų išgyvenamumas tarp aukšto ir žemo rodiklio grupių skyrėsi 32 proc. (4.5 pav. L dalis). Palankesnę tikimybę išgyventi turėjo pacientės, kurių mėginiuose buvo nustatytas aukštas imuninį atsaką apibūdinantis rodiklis (tikimybė išgyventi 10 metų laikotarpį siekė 87 proc.). Pacientėms, kurioms nustatytas žemas agreguoto SZ CD8+ faktoriaus įvertis, tikimybė išgyventi 10 metų laikotarpį siekė tik 55 proc. Taigi aptartas rezultatas pabrėžia minėto rodiklio potencialą numatyti ilgalaikę pacienčių, kurios serga palyginti gerai kontroliuojama liga, prognozę ir pabrėžia, kad antinavikinės imuninio atsako savybės, susijusios su pacienčių išgyvenamumu, gali būti nustatytos vertinant CD8+ limfocitus ir taikant naviko ir stromos SZ nustatymo metodiką. Remiantis šiuo rezultatu taip pat galima daryti prielaidą, kad tam tikru metu pritaikyta imunoterapija būtų naudinga

pacientėms, kurioms nustatytas HR+ KV bei mažas imuninis atsakas – absoliutus CD8+ tankis navike ir (arba) šių ląstelių gradientas į naviko šerdį.

5.3. Sąsajos tarp imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo rodiklių bei išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas

Sukurtas HRDK mikroaplinkos ir erdvinio konteksto požymių modelis, kurį sudarė klinikiniai, patologiniai, standartinių KV biožymenų (ER, PgR, HER2 ir Ki67), imuninį atsaką ir hipoksijos savybes apibūdinantys rodikliai, buvo susietas su išgyvenamumo parametrais (4.9 ir 4.10 pav., 13 priedas, 4.10 lentelė). Šis prognozinis modelis ne tik patvirtino disertacijos pirmos dalies rezultatus, kad HRDK naviko mikroaplinka yra biologiškai ir prognoziškai svarbus elementas, bet ir leido nustatyti, jog integruotas prognozinis modelis gali būti gautas remiantis vien tik IHC mėginių SVA duomenimis ir atspindėti tris biologinius HRDK požymius: PgR raiškos, proliferacijos intensyvumo ir naviko mikroaplinkos imuninio atsako (4.10 lentelė, 2-asis modelis). Reikia pastebėti, kad šie rodikliai pranoko KV standartinius klinikinius ir patologinius parametrus. Be to, nustatyta, kad vidunavikiniai PgR ir Ki67 raiškos heterogeniškumo rodikliai suteikia papildomos prognozinės vertės, palyginti su šių biožymenų kiekybiniais įverčiais, o pasitelkus Haralicko tekstūros ir bimodališkumo rodiklius vidunavikiniam biožymenų raiškos nevienalytiškumui apibūdinti, galima žymiai padidinti prognozinio modelio statistinį reikšmingumą (4.10 lentelė, 1-asis ir 2-asis modeliai). Disertacijoje taip pat įrodyta, kad vidunavikinis PgR heterogeniškumas ir CD8+SATB1+ ląstelių tankis navike yra ankstyvosios stadijos HRDK nepriklausomi geros prognozės rodikliai (atitinkamai PR = 0,22, $p = 0,0015$ ir PR = 0,3, $p = 0,0035$), kurie atskleidžia naujų įžvalgų apie KV biologiją ir heterogeniškumą.

Standartinių KV biožymenų SVA kiekybinius rezultatus palyginus su „auksiniu standartu“ laikomu vizualiu patologo įvertinimu, nustatyta, kad SVA rezultatai ir patologo įvertinimas statistiškai reikšmingai susiję. Mažiausias koreliacijos koeficientas nustatytas analizuojant HER2 baltymo raišką, didžiausias – analizuojant PgR (4.6 pav.). Minėtina, kad panašūs SVA sutapimo su vizualiu įvertinimu rezultatai pristatomi ir kitų tyrėjų darbuose^{311–316}, pavyzdžiui, M. R. Jakobsenas ir bendraautorai³¹¹ nustatė, kad, įvertinus HER2 raišką SVA ir vizualiu būdu, rezultatai sutapo 70,6 proc. (κ koeficientas siekė 0,67), o K. Arihiro ir kt.³¹² pristatytame tyrime nurodoma, kad, įvertinus Ki67 raišką SVA ir vizualiu būdu, koreliacijos koeficientas siekė 0,738 ($p < 0,01$). Taigi SVA ne tik suteikia

galimybę objektyviai apibūdinti konkretaus biožymens raišką, bet ir užtikrina atkuriamus IHC įvertinimo rezultatus bei, pritaikius šešiakampių gardelių metodiką, leidžia įvertinti vidunavikinį biožymens raiškos heterogeniškumą ir IHC biožymenų sąsajas.

Disertacijoje, atlikus išsamų 7 IHC biožymenų raiškos tyrimą viso pjūvio HRDK mėginiuose, apskaičiavus kiekybinius ir heterogeniškumą apibūdinančius rodiklius bei pritaikius faktorinę analizę, nustatyta reikšminga daugybinių IHC biožymenų ryšių struktūra, kuri suteikia naujų duomenų ir įžvalgų apie KV biologinius procesus (4.8 pav.). Remiantis rotuotų faktorių krūviais, nustatyta, kad tirti rodikliai formuoja 5 vidinius nepriklausomus variacijos veiksnius, tačiau statistiškai svarbiausią faktorių, kuris paaiškino didžiąją dalį (daugiau negu 33 proc.) biožymenų profilio variacijų, apibūdino CD8+ bei CD8+SATB1+ ląstelių tankis naviko ir stromos audiniuose. Šis faktorius, kurį galima vadinti KV imuninio atsako veiksmu, ne tik pabrėžia imuniteto biologinę svarbą HRDK mėginiuose, bet ir atskleidžia, kad egzistuoja stiprus ryšys tarp CD8+ bei CD8+SATB1+ ląstelių. Nustatyta sąsaja taip pat leidžia daryti prielaidą, kad epigenetinio kontrolės baltymo (SATB1) įvertinimas imuninės kilmės ląstelėse gali suteikti papildomos biologinės informacijos (toliau žr. 5.3.1. poskyrį). 2-ąjį nepriklausomą faktorių, kuris paaiškino kitą didelę dalį (~24 %) 7 IHC biožymenų profilio variacijos, sudarė PgR procentinė dalis naviko dalyje ir PgR vidunavikinį heterogeniškumą apibūdinantys rodikliai – PgR AshD ir entropija. Šis faktorius ne tik pabrėžia PgR rodiklio svarbą analizuojant HRDK mėginius, bet ir leidžia kelti hipotezę, kad tarp PgR kiekybinio įvertinimo ir nevienalytiškumo parametrų egzistuoja tiesioginis ryšys, galintis turėti įtakos pacientų išgyvenamumui (toliau žr. 5.3.3. poskyrį). 3-ąjį nepriklausomą faktorių, kuris paaiškino ~20 proc. tirtų biožymenų profilio variacijos, sudarė Ki67 procentinė dalis naviko dalyje bei Ki67 nevienalytiškumą apibūdinantis rodiklis – Ki67 Haralicko tekstūros entropija. Šis faktorius pabrėžia proliferaciją apibūdinančio biožymens svarbą HRDK ir, kaip ir 2-asis faktorius, nusako, kad tarp Ki67 kiekybinio įvertinimo ir heterogeniškumo parametro egzistuoja stiprus ryšys. 4-asis ir 5-asis faktoriai, kuriuos apibūdino ER entropijos ir AshD rodikliai, paaiškino likusią ~24 proc. IHC biožymenų variacijos dalį. Abu veiksniai nustatyti kaip nepriklausomi. Šie nevienalytiškumo rodikliai pabrėžia ER heterogeniškumo svarbą analizuojant HRDK mėginius.

5.3.1 Sąsajos tarp imuninį atsaką apibūdinančių rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas

Be kiekybinio ir erdvinio baltymų raiškos, heterogeniškumo ir naviko mikroaplinkos įvertinimo, disertacijoje taip pat analizuotas epigenetinio reguliavimo aspektas – tirtas plataus masto epigenetinis kontrolės baltymas (SATB1). Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad šio baltymo raiškos padidėjimas susijęs su agresyvesniu naviko fenotipu ir blogesne pacientų prognoze^{74, 80–82, 317}, tačiau, tiriant skirtingus navikus ir vertinant šio baltymo biologinę ir prognozinę reikšmes, nustatyti rezultatai yra nevienareikšmiai. S. Cai ir bendraautorai³¹⁸ bei H. J. Han ir kt.⁷⁴, atlikę išsamius SATB1 tyrimus, nustatė, kad pernelyg didelė SATB1 raiška yra susijusi su agresyviu KV fenotipu, tačiau E. Iorns ir bendraautorai⁷⁵ negalėjo pagrįsti, kad SATB1 skatina KV patogenezę, o C. I. Selinger ir kt.³¹⁹, tirdami plokščių ląstelių plaučių karcinomos mėginius, netgi įrodė, kad SATB1 sumažėjimas susijęs su blogesne prognoze. Vis dėlto dauguma tyrimų^{74, 75, 77, 79}, kuriuose analizuojama SATB1 sintezės pokyčių įtaka patogenezei, yra atlikti tiriant navikinių audinių ekstraktus, neišskiriant atskirų naviko audinio dalių. Šis aspektas ypač svarbus, turint omenyje, kad genų raiškos eksperimentai^{231–233} taip pat įrodo, jog SATB1 reguliuoja maždaug 300 T ląstelių genų. Atlikus išsamius pelių tyrimus, nustatyta, kad pelės, neturinčios SATB1, miršta vidutiniškai po trijų savaičių dėl imuninės funkcijos sutrikimo^{232, 320}. Be to, 2017 m. T. L. Stephenas ir bendraautorai²³⁴, tirdami pelių ląsteles, nustatė, kad SATB1 dalyvauja antinavikiniam imuniniame atsake, ir įrodė, jog sumažėjusi SATB1 sintezė T ląstelėse padidina PD-1 sintezę 40 kartų. Tai sutrikdo imuninių ląstelių proliferacinį pajėgumą ir jų efektorines funkcijas. Šie rezultatai leidžia kelti hipotezę, kad ankstesni tyrimai^{74, 75, 77, 79} galėjo būti netikslūs, ypač tie, kuriuose SATB1 sintezės pokyčiai analizuoti molekulinio lygmeniu, nesant galimybės atskirti naviko ir mikroaplinkos ląstelių. Dėl šios priežasties disertacijoje SATB1 raiška vertinta ne tik atsižvelgiant į atskiras navikinio audinio dalis, bet ir tiriant imuninės kilmės ląsteles.

Siekiant tiksliai įvertinti SATB1 pokyčius naviko ir mikroaplinkos ląstelėse, SATB1 ir CD8 baltymų raiškai nustatyti buvo įdiegta dIHC tyrimo metodika. Tiriant viso pjūvio mėginius ir atlikus SVA, ne tik patvirtintas ankstesnio tyrimo⁸⁵, kuriame tirtos tų pačių pacienčių mikrogardelės, rezultatas, jog didesnė SATB1 raiška yra prognoziškai svarbi, bet ir papildomai įrodyta, kad SATB1 prognozinis poveikis KV yra susijęs su vidunavikiniu CD8+SATB1+ ląstelių tankiu (4.10 lentelė, 2-asis modelis). Devyniais atvejais SATB1 raiška nustatyta ir naviko ląstelėse, tačiau to nepakako, siekiant įrodyti šio žymens sąsają su pacienčių išgyvenamumu

($PR = 0,19$, $p = 0,064$). Kita vertus, atlikus vienalybę regresijos analizę, matyti, kad CD8+ ląstelių tankis stromos ir naviko dalyse yra susijęs su geresne pacienčių prognoze, tačiau daugialypiame Kokso regresijos modelyje nepriklausomu geros prognozės rodikliu tapo CD8+SATB1+ ląstelių tankis naviko dalyje ($PR = 0,3$, $p = 0,0035$). Be to, tiriant CD8+SATB1+ ląstelių infiltrato prognozinę vertę, taip pat nustatyta, kad SATB1 dažniau sintetinamas stromos ląstelėse negu naviko audinyje (atitinkamai 26 % ir 21 %, $p < 0,0001$, 4.7 pav. B dalis). Taigi, remiantis šiais rezultatais, galima teigti, kad CD8+SATB1+ T ląstelės suteikia daugiau prognozinės informacijos negu kiekybinis CD8+ limfocitų įvertinimas. Daroma prielaida, kad SATB1 raiška CD8+ ląstelėse atspindi aktyvuotų imuninių ląstelių ypatybę, o CD8+SATB1+ tankis navike gali būti taikomas imuniniam atsakui ankstyvosios stadijos HRDK mėginiuose įvertinti.

5.3.2 Sąsajos tarp hormonų receptorių rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas

Jau kelis dešimtmečius, siekiant nustatyti paciento prognozę ir atsaką į hormonų terapiją, ER ir PgR raiškai įvertinti taikomas IHC tyrimas³²¹. Įprastai klinikinėje praktikoje IHC rezultatai vertinami kokybiškai ir tiriamieji mėginiai skiriami į neigiamus, silpnai teigiamus ar teigiamus navikus^{321–324}. Vis dėlto mokslinėje literatūroje aprašytais tyrimais^{321–324} įrodyta, kad papildomos prognozinės vertės gali suteikti ir kiekybinis ER ir PgR raiškos vertinimas. J. M. Bartlettas ir bendraautoriai³²² nustatė, kad ER ir PgR IHC raiškos kiekybinis įvertinimas leidžia numatyti ankstyvą ligos pasikartojimo riziką pacientams, kuriems nustatoma vidutinė HR raiška, palyginti su pacientais, kurių mėginiuose nustatoma didesnė negu 80–85 proc. ER ir didesnė negu 75 proc. PgR raiška. Minėti tyrėjai taip pat įrodė, kad pacientams, kuriems nustatyta didelė ER raiška, tikslingas gydymas eksemestanu³²².

Disertacijoje, pritaikius SVA ir kiekybiškai įvertinus ER ir PgR procentines dalis naviko ląstelėse, taip pat nustatyta, kad didesnė negu 74 proc. ER raiška yra susijusi su blogesne pacienčių prognoze, o didesnė negu 3 proc. PgR raiška leidžia numatyti ilgesnį pacienčių išgyvenamumą. Daugialypis Kokso regresijos modelis, kurį sudarė klinikiniai, patologiniai duomenys ir standartinių KV biožymenų procentinės dalys naviko audinyje, leido nustatyti nepriklausomą PgR prognozinę reikšmę ($PR = 0,29$, $p = 0,0028$), atsižvelgiant į limfmazgių būklę (4.10 lentelė, 1-asis modelis). Panašius rezultatus taip pat pateikė J. M. Bartlettas ir bendraautoriai³²² bei P. J. Lamy ir kt.³²³, kurie nustatė, kad didesnė PgR raiška yra susijusi su

geresne pacientų prognoze. C. A. Purdie ir bendraautorai³²⁵, ištyrę 1 283 pacientus, taip pat įrodė, kad didesnė PgR raiška yra nepriklausomos geros prognozės rodiklis ankstyvosios stadijos KV, atsižvelgiant į limfmazgių būklę, naviko dydį, diferenciacijos laipsnį ir ER raišką. Minėti tyrėjai padarė prielaidą, kad ER+ navikuose, kurie nėra išplitę į limfmazgius, PgR raiškos įvertinimas gali turėti daugiau prognozinės informacijos negu ER ar Ki67, t. y. leidžia nustatyti pacientės, kurioms prognozė yra kur kas blogesnė ir reikėtų taikyti agresyvesnę adjuvantinę terapiją³²⁵. Šiuos rezultatus patvirtina dar 1978 m. K. B. Horwitz ir W. L. McGuire³²⁶ bei 1981 m. W. C. Yu ir kt.³²⁷ atlikti tyrimai, kurie leido daryti prielaidą, kad padidėjusi PgR raiška ir funkcijos tiesiogiai priklauso nuo ER, o sumažėjusi PgR raiška yra susijusi su ER signalinio kelio funkcijos praradimu ir sumažėjusiu pacientų atsaku į hormonų terapiją. 2010 m. A. M. Thompsonas ir bendraautorai³²⁸ taip pat nustatė, kad, vystantis KV, net 26 proc. HR+ KV sergančių pacientų PgR raiška sumažėja ir jie tampa atsparūs taikomai hormonų terapijai, o pastebėjimas, kad HR+ navikai dažniausiai virsta PgR– po 6-erių metų (kai nutraukiama standartinė adjuvantinė endokrininė terapija), leidžia kelti hipotezę, jog hormonų terapijos pratęsimas (daugiau negu 5-erius metus) galėtų pailginti šių pacientų išgyvenamumo laikotarpį³²⁵. Nepaisant to, viename iš apžvalginių straipsnių³²¹, kuriame įvertinta 19 tyrimų ir išanalizuoti 30 754 KV mėginiai, nustatyta, kad aiškių įrodymų, leidžiančių teigti, jog kiekybiškai įvertinus ER ir (ar) PgR gaunama prognozinė ar predikcinė vertė, nėra. Vis tik siūloma neapsiriboti tik kokybinio įvertinimo rezultatais, kad onkologai nesąmoningai nepriimtų skirtingų gydymo sprendimų³²¹. Minėtini ir informacinės ribonukleino rūgšties (iRNR) bei IHC duomenimis pagrįsti moksliniai tyrimai^{329–333}, kuriais nustatyta, kad pacientų, kurių mėginiuose fiksuota maža ER raiška (1–10 %), prognozė nėra susijusi su ilgesniu išgyvenamumu ar atsaku į hormonų terapiją, palyginti su pacientais, kurių ER ir (ar) PgR raiška buvo didesnė negu 10 proc. Remiantis šiais duomenimis, Amerikos klinikinės onkologijos draugija ir Amerikos patologų kolegija, 2020 m. atnaujinusios ER ir PgR vertinimo gaires⁹, rekomendavo, nustačius silpną ER raišką (1–10 proc. raišką vykdančių ląstelių), patologijos tyrimo diagnozę papildyti komentaru, kad biologiniu aspektu tokio tipo navikai yra panašesni į HR– ir taikytina hormonų terapija gali nesuteikti papildomos naudos. Atkreiptinas dėmesys, kad gairėse neužsimenama, kaip užtikrinti atkuriamus IHC vertinimo rezultatus.

5.3.3 Sąsajos tarp vidunavikinio heterogeniškumo rodiklių ir išgyvenamumo duomenų rezultatų aptarimas

Šešiakampių gardelės elementų metodika, kuri ankstesniuose darbuose^{41–43} buvo pasiūlyta Ki67 heterogeniškumui įvertinti, disertacijoje taip pat buvo pritaikyta, siekiant apskaičiuoti ER, PgR ir Ki67 Haralicko tekstūros ir AshD bimodališkumo rodiklius. Analizuojant PgR heterogeniškumą, empiriškai įrodyta netiesinė priklausomybė tarp PgR raiškos intensyvumo naviko audinyje ir PgR Haralicko tekstūros entropijos rodiklio (4.11 pav.). Šią sąsają galima paaiškinti išgautų savybių pobūdžiu – mažesnis heterogeniškumas nustatomas mažos ir ypač intensyvios raiškos mėginiuose, tačiau netiesinės sąsajos svarbą pabrėžia rezultatas, kad PgR entropija yra geros prognozės rodiklis (4.10 pav. H dalis), kuris daugialypiame Kokso regresijos modelyje suteikė daugiau informacijos negu kiekybinis PgR raiškos įvertis *per se* (4.10 lentelė, 2-asis modelis). Minėtą rezultatą papildomai patvirtino pacienčių suskirstymas į tris ir dvi grupes pagal raiškos intensyvumą (4.12 pav.). Nustatyta, kad pacienčių, kurios buvo priskirtos prie mažos (nustatyta mažiau negu 20 proc. raišką vykdančių ląstelių) ir prie intensyvios (nustatyta daugiau negu 80 proc. raišką vykdančių ląstelių) raiškos grupių, prognozė buvo prastesnė negu pacienčių, kurios buvo priskirtos prie vidutinės raiškos grupės (nustatyta daugiau negu 20 proc., bet mažiau negu 80 proc. raišką vykdančių ląstelių) ($p = 0,0035$) (4.12 pav. B dalis). Ši netiesinė PgR raiškos ir heterogeniškumo rodiklių sąsajos biologinė reikšmė dar turi būti išanalizuota detaliau, tačiau ji patvirtina N. Andor ir bendraautorių³³⁴ nuostatą, kad „vidunavikinis heterogeniškumas yra universalus, nors galbūt netiesinis, prognozinis biožymuo“. Gautas rezultatas taip pat leidžia paaiškinti, kodėl tyrimuose^{321–325}, kuriais siekta nustatyti prognozinę ir (arba) predikcinę sąsają su kiekybiškai išmatuotais ER ir PgR, buvo gauti dviprasmiški rezultatai, nepaisant naudotų skirtingų metodikų ir (ar) ribinių verčių. Duomenų apie PgR vidunavikinį heterogeniškumą yra labai mažai, tačiau nustatyta, kad apie 29 proc. KV mėginių pasireiškia heterogeniška PgR raiška³³⁵ tiriant 0,6 mm diametro navikinio audinio mikrogardeles. Tik 88 proc. mikrogardelių atspindėjo tą patį PgR raiškos lygį, kaip ir tiriant visą KV audinį³³⁵, o tiriant 1 mm diametro mikrogardeles, rezultatai sutapo tik 67–90 proc.³³⁶. Daroma prielaida, kad dėl PgR heterogeniškos raiškos, tyrimuose neturėtų būti vertinama tik 50–100 naviko ląstelių ar audinių mikrogardelių, nes išauga tikimybė PgR raišką įvertinti klaidingai neigiamai³²⁵. Vis dėlto mokslinėje literatūroje aprašytuose tyrimuose^{325, 335, 336} sąsaja tarp PgR heterogeniškumo ir KV pacientų prognozės nebuvo vertinta.

Disertacijoje taip pat nustatyta nepriklausoma Ki67 vidunavikinio heterogeniškumo, įvertinto AshD bimodališkumo rodikliu, prognozinė vertė (4.10 lentelė, 2-asis modelis). Daugialypiaame Kokso regresijos modelyje Ki67 AshD rodiklis pranoko Ki67 kiekybinį įvertį *per se* ir buvo susietas su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu. Šis rezultatas, kurio pasiekta tiriant kitą pacienčių imtį, kitoje laboratorijoje dažytus IHC mėginius bei taikant šiek tiek skirtingus SVA (kitas audinio klasifikatorius ir kiti kiekybinės analizės parametrai) ir šešiakampių elementų parametrus (kitas šešiakampio gardelės elemento kraštinės ilgis), atkartoją anksčiau gautus⁴² tyrimo rezultatus ir patvirtino Ki67 AshD prognozinę vertę analizuojant KV mėginius. Ki67 bimodališkumo rodiklio nepriklausoma prognozinė vertė buvo patvirtinta papildomai atsižvelgus į PgR vidunavikinį heterogeniškumą ir imuninį atsaką apibūdančius rodiklius, kurie įtraukti į disertacijoje pristatytą HRDK sergančių pacienčių imties išsamų tyrimą.

Apibendrinant galima teigti, kad disertacijoje įrodyta, jog, taikant didelio efektyvumo, automatizuotą ir duomenimis pagrįstą naviko ir stromos SZ nustatymo būdą, mikroskopiniuose vaizduose galima išgauti naujus ir kliniškai naudingus antinavikinio imuninio atsako rodiklius. Pastarieji ne tik leido suskirstyti pacientes į geros ir blogos prognozės grupes, bet ir išryškino didesnę bendrojo išgyvenamumo tikimybę HRDK sergantiems pacientams, praėjus 5 metams po operacijos, analizuojant imuninio infiltrato erdvines savybes apibūdinančius imunogradiiento rodiklius. Antra vertus, sukūrus integruotą ir IHC vaizdais pagrįstą prognozės modelį, nustatyti trys nepriklausomi HRDK biologiniai požymiai: PgR raiškos, naviko proliferacijos ir naviko mikroaplinkos imuninio atsako. Nustatyta, kad SATB1 prognozinis poveikis KV yra susijęs su vidunavikiniu CD8+SATB1+ ląstelių tankiu, kuris yra nepriklausomas geros prognozės rodiklis ir galėtų būti taikomas kaip antinavikinio imuniteto biologinis žymuo. Minėtina, kad vidunavikiniai PgR ir Ki67 raiškos heterogeniškumo rodikliai yra informatyvesni negu šių biožymenų raiškos įverčiai, o didelis PgR ir mažas Ki67 vidunavikinis heterogeniškumas yra nepriklausomi geros prognozės rodikliai HRDK imtyje.

5.4. Tyrimo tęstinumas

Tyrimas atliktas su palyginti nedidele pacientų grupe, kuri pasižymėjo gana gera ligos eiga. Retrospektyviniai duomenys apie taikytus terapijos būdus neleido įvertinti nustatytų biologinių žymenų predikcinės vertės, todėl, siekiant patvirtinti naviko ir stromos SZ nustatymo, imunogradiiento rodiklių rinkinio, PgR ir Ki67 vidunavikinio heterogeniškumo ir imuninio

atsako, įvertinto tiriant CD8+ ir SATB1 biožymenis, metodologijos jautrumą ir prognozinę vertę, būtini tolesni didelio masto pacientų tyrimai, kurie būtų papildyti ilgalaikio stebėjimo ir taikomos terapijos duomenimis. Vis dėlto, atlikus tyrimą, gauti statistiškai reikšmingi prognoziniai modeliai, kurie įrodė SVA pritaikymo galimybes tiriant KV audinius, nudažytus IHC būdu, ir leido nustatyti HRDK sergančias pacientes, kurioms gresia trumpesnis išgyvenamumas, sergant palyginti gerai kontroliuojama liga.

IŠVADOS

1. Sukurtos SVA reikalavimus atitinkančios standartizuotos ER, PgR, HER2, Ki67, CD8 ir HIF1 α IHC procedūros.
2. SVA rezultatų šešiakampių gardelių analitika pagrįstas KV audinio mikroaplinkos tyrimo metodas leidžia automatizuotai nustatyti naviko ir stromos SZ ir joje apskaičiuoti CD8+ imuninių ląstelių tankio profilius ir antinavikinį imuninį atsaką apibūdinančius imunogrado rodiklius.
3. Ankstyvosios stadijos HRDK sergančių pacienčių imtyje nustatyta agreguoto SZ CD8+ imunogrado faktoriaus nepriklausoma teigiama prognozinė vertė. Šis rodiklis leidžia patikimai prognozuoti atokus (po 5 metų) pacienčių išgyvenamumo duomenis (atitinkamai 87 % ir 55 % išgyvenamumo tikimybės po 10 metų).
4. Sukurtas integruotas IHC biožymenų raiškos vidunavikinio heterogeniškumo ir antinavikinio imuninio atsako modelis, pagrįstas trimis IHC biožymenimis, apibūdinančiais HRDK biologinius požymius: imuninio atsako, PgR raiškos heterogeniškumo ir naviko proliferacijos heterogeniškumo. Šis modelis leidžia patikimai ir nepriklausomai nuo klinikinių ir patologijos parametrų įvertinti HRDK bendrojo išgyvenamumo prognozę. Reikšmingų sąsajų su patologijos, klinikos duomenimis nenustatyta.
5. CD8+SATB1+ ląstelių tankis navike (>2 ląstelės/mm²) yra nepriklausomas geros HRDK prognozės rodiklis, kuris gali būti vertinamas kaip aktyvaus imuninio atsako prieš naviką požymis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet* 2017, 389: 1134–1150.
- [2] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019, 5: 66.
- [3] Boyle D, McCourt C, Matchett K, Salto-Tellez M. Molecular and clinicopathological markers of prognosis in breast cancer. *Expert review of molecular diagnostics* 2013, 13: 481–498.
- [4] Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, Sarker M, Huong TT, Allemani C, Dvaladze A, Gralow J, Yeates K, Taylor C, Oomman N, Krishnan S, Sullivan R, Kombe D, Blas MM, Parham G, Kassami N, Conteh L. The global burden of women’s cancers: a grand challenge in global health. *Lancet* 2017, 389: 847–860.
- [5] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68: 394–424.
- [6] International Agency for Research on Cancer. Global cancer observatory – cancer fact sheets.
- [7] Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol* 2019, 49: 228–231.
- [8] Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* 2018, 472: 697–703.
- [9] Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Lakhani SR, Chavez-MacGregor M, Perlmutter J, Perou CM, Regan MM, Rimm DL, Symmans WF, Torlakovic EE, Varella L, Viale G, Weisberg TF, McShane LM, Wolff AC. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol* 2020: Jco1902309.
- [10] Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama* 2019, 321: 288–300.
- [11] Duffy MJ, Crown J. Companion Biomarkers: Paving the Pathway to Personalized Treatment for Cancer. *Clinical Chemistry* 2013, 59: 1447–1456.
- [12] Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *The New England Journal of Medicine* 2012, 366: 956–957.
- [13] Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2017, 17: 559–572.
- [14] Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol* 2015, 33: 445–474.
- [15] Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 2018, 18: 309–324.

- [16] Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 2010, 28: 4531–4538.
- [17] Erin N, Grahovac J, Brozovic A, Efferth T. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. *Drug Resistance Updates* 2020, 53: 100715.
- [18] Qi D, Wu E. Cancer prognosis: Considering tumor and its microenvironment as a whole. *EBioMedicine* 2019, 43: 28–29.
- [19] Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, Hoos A. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015, 14: 603–622.
- [20] Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *Journal of immunology research* 2016, 2016: 4273943.
- [21] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014, 232: 199–209.
- [22] Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012, 10: 205.
- [23] Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2005, 353: 2654–2666.
- [24] Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, van den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, Perez EA, Thompson EA, Symmans WF, Richardson AL, Brock J, Criscitiello C, Bailey H, Ignatiadis M, Floris G, Sparano J, Kos Z, Nielsen T, Rimm DL,

- Allison KH, Reis-Filho JS, Loibl S, Sotiriou C, Viale G, Badve S, Adams S, Willard-Gallo K, Loi S. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015, 26: 259–271.
- [25] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, van den Eynden G, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, Andre F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltnane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. 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: 235–251.
- [26] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, van den Eynden GGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltnane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C,

- Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. 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. *Advances in anatomic pathology* 2017, 24: 311–3 35.
- [27] Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, Church SE, Maby P, Vasaturo A, Angelova M, Fredriksen T, Mauger S, Waldner M, Berger A, Speicher MR, Pagès F, Valge-Archer V, Galon J: The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* 2016, 8: 327ra26.
- [28] Harder N, Athelougou M, Hessel H, Brieu N, Yigitsoy M, Zimmermann J, Baatz M, Buchner A, Stief CG, Kirchner T, Binnig G, Schmidt G, Huss R. Tissue Phenomics for prognostic biomarker discovery in low- and intermediate-risk prostate cancer. *Sci Rep* 2018, 8: 4470.
- [29] Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012, 14: R48.
- [30] Li H, Whitney J, Bera K, Gilmore H, Thorat MA, Badve S, Madabhushi A. Quantitative nuclear histomorphometric features are predictive of Oncotype DX risk categories in ductal carcinoma in situ: preliminary findings. *Breast cancer research* 2019, 21: 114.
- [31] Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M, Kruger DT, Beelen KJ, van der Noort V, van Vlierberghe RLP, Blok EJ, Giardiello D, Sanders J, van de Vijver K, Hurlings HM, Kuppen PJK, Linn SC, Schmidt MK, Kok M. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res* 2019, 21: 90.
- [32] Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006, 49: 411–424.
- [33] Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep* 2019, 14: 368–375.
- [34] Li XF, Gruosso T, Zuo DM, Omeroglu A, Meterissian S, Guiot MC, Salazar A, Park M, Levine H. Infiltration of CD8(+) T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer. *P Natl Acad Sci USA* 2019, 116: 3678–3687.
- [35] 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: 1107–1116.
- [36] Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, Kagara N, Maruyama N, Kim SJ, Noguchi S. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 136: 107–116.
- [37] Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delalogue S, Andre F, Goubar A. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol* 2015, 26: 1698–1704.
- [38] Krishnamurti U, Wetherilt CS, Yang J, Peng L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor-positive breast cancers. *Human pathology* 2017, 64: 7–12.
- [39] Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, Rouas G, Francis P, Crown JP, Hitre E, de Azambuja E, Quinaux E, Di Leo A, Michiels S, Piccart MJ, Sotiriou C. 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: 860–867.
- [40] Krijgsman D, Leeuwen MV, van der Ven J, Almeida V, Vlutters R, Halter D, Kuppen P, Velde CV, Wimberger-Friedl R. Quantitative whole slide assessment of tumor-infiltrating CD8-positive lymphocytes in ER-positive breast cancer in relation to clinical outcome. *IEEE J Biomed Health Inform* 2020, Pp.
- [41] Besusparis J, Plancoulaine B, Rasmusson A, Augulis R, Green AR, Ellis IO, Laurinaviciene A, Herlin P, Laurinavicius A. Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagn Pathol* 2016, 11: 82.
- [42] Laurinavicius A, Plancoulaine B, Rasmusson A, Besusparis J, Augulis R, Meskauskas R, Herlin P, Laurinaviciene A, Abdelhadi Muftah AA, Miligy I, Aleskandarany M, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Bimodality of intratumor Ki67 expression is an independent prognostic factor of overall survival in patients with invasive breast carcinoma. *Virchows Arch* 2016, 468: 493–502.
- [43] Plancoulaine B, Laurinaviciene A, Herlin P, Besusparis J, Meskauskas R, Baltrusaityte I, Iqbal Y, Laurinavicius A. A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Archiv* 2015, 467: 711–722.
- [44] Nagarajan D, McArdle SEB. Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines* 2018, 6.

- [45] Campbell MJ, Scott J, Maecker HT, Park JW, Esserman LJ. Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 91: 163–171.
- [46] Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, Sahebkar A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019, 234: 16824–16837.
- [47] Adams S, Card D, Zhao J, Karantza V, Aktan G. Abstract OT1-03-20: A phase 2 study of pembrolizumab (MK-3475) monotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086. *Cancer Research* 2016, 76: OT1-03-20-OT1-03-20.
- [48] Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau HT, Forero-Torres A, Boccia R, Lippman ME, Somer R, Smakal M, Emens LA, Hrinchenko B, Edenfield W, Gurtler J, von Heydebreck A, Grote HJ, Chin K, Hamilton EP. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat* 2018, 167: 671–686.
- [49] Emens LA, Braithe FS, Cassier P, Delord JP, Eder JP, Fassio M, Xiao Y, Wang Y, Molinero L, Chen DS, Krop I. Abstract 2859: Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Research* 2015, 75: 2859.
- [50] Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Puztai L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, Karantza V, Buisseret L. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol* 2016, 34: 2460–2467.
- [51] Rugo H, Delord JP, Im SA, Ott P, Piha-Paul S, Bedard P, Sachdev J, Le Tourneau C, van Brummelen E, Varga A, Saraf S, Pietrangelo D, Karantza V, Tan A. Abstract S5-07: Preliminary efficacy and safety of pembrolizumab (MK-3475) in patients with PD-L1–positive, estrogen receptor-positive (ER+)/HER2-negative advanced breast cancer enrolled in KEYNOTE-028. *Cancer Research* 2016, 76: S5-07-S5.
- [52] Bray F, Ferlay J, Laversanne M, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Pineros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R, Antoni S, Soerjomataram I, Forman D. Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer* 2015, 137: 2060-71.
- [53] Zaidi Z, Dib HA. Abstract 4191: The worldwide female breast cancer incidence and survival, 2018. *Cancer Research* 2019, 79: 4191.
- [54] Parkin DM, Fernandez LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 2006, 12 Suppl 1: S70–80.
- [55] Nacionalinio vėžio instituto Vėžio registras.
- [56] Gudavičienė D., Steponavičienė L., Lachej N. Krūties vėžys Lietuvoje. *Acta medica Lituanica* 2015, 22: 150–160.

- [57] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000, 321: 624–628.
- [58] Cancer CGoHFiB: Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2012, 13: 1141–1151.
- [59] Kaminska M, Ciszewski T, Lopacka-Szatan K, Miotla P, Staroslawska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 2015, 14: 196–202.
- [60] Ma H, Bernstein L, Ross RK, Ursin G. Hormone-related risk factors for breast cancer in women under age 50 years by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. *Breast Cancer Res* 2006, 8: R39.
- [61] Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Muti P, Overvad K, Peeters PH, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS, Vineis P. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol* 2013, 14: 1009–1019.
- [62] Santarpia L, Bottai G, Kelly CM, Györfy B, Székely B, Pusztai L. Deciphering and Targeting Oncogenic Mutations and Pathways in Breast Cancer. *The oncologist* 2016, 21: 1063–1078.
- [63] Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, Martincorena I, Alexandrov LB, Martin S, Wedge DC, van Loo P, Ju YS, Smid M, Brinkman AB, Morganella S, Aure MR, Lingjaerde OC, Langerod A, Ringner M, Ahn SM, Boyault S, Brock JE, Broeks A, Butler A, Desmedt C, Dirix L, Dronov S, Fatima A, Foekens JA, Gerstung M, Hooijer GK, Jang SJ, Jones DR, Kim HY, King TA, Krishnamurthy S, Lee HJ, Lee JY, Li Y, McLaren S, Menzies A, Mustonen V, O’Meara S, Pauporte I, Pivot X, Purdie CA, Raine K, Ramakrishnan K, Rodriguez-Gonzalez FG, Romieu G, Sieuwerts AM, Simpson PT, Shepherd R, Stebbings L, Stefansson OA, Teague J, Tommasi S, Treilleux I, van den Eynden GG, Vermeulen P, Vincent-Salomon A, Yates L, Caldas C, van’t Veer L, Tutt A, Knappskog S, Tan BK, Jonkers J, Borg A, Ueno NT, Sotiriou C, Viari A, Futreal PA, Campbell PJ, Span PN, van Laere S, Lakhani SR, Eyfjord JE, Thompson AM, Birney E, Stunnenberg HG, van de Vijver MJ, Martens JW, Borresen-Dale AL, Richardson AL, Kong G, Thomas G, Stratton MR. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016, 534: 47–54.

- [64] Yates LR, Desmedt C. Translational Genomics: Practical Applications of the Genomic Revolution in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2017, 23: 2630–2639.
- [65] Network CGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, 490: 61–70.
- [66] Lehmann BD, Pietenpol JA. Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *Breast* 2015, 24 Suppl 2: S36–40.
- [67] Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015, 26: 1291–1299.
- [68] Mehrgou A, Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran* 2016, 30: 369.
- [69] Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11: 138–148.
- [70] Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008, 40: 17–22.
- [71] Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2018, 51: 22–35.
- [72] Esteller M. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 2008, 358: 1148–1159.
- [73] Esteller M: Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003, 4: 351–358.
- [74] Han HJ, Russo J, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature* 2008, 452: 187–193.
- [75] Iorns E, Hnatyszyn HJ, Seo P, Clarke J, Ward T, Lippman M. The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2010, 102: 1284–1296.
- [76] Liu X, Zheng Y, Qiao C, Qv F, Wang J, Ding B, Sun Y, Wang Y. Expression of SATB1 and HER2 in breast cancer and the correlations with clinicopathologic characteristics. *Diagn Pathol* 2015, 10: 50.
- [77] Patani N, Jiang W, Mansel R, Newbold R, Mokbel K. The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 2009, 9: 18.
- [78] Zhang S, Gao X, Ma Y, Jiang J, Dai Z, Yin X, Min W, Hui W, Wang B. Expression and significance of SATB1 in the development of breast cancer. *Genet Mol Res* 2015, 14: 3309–3317.
- [79] Hanker LC, Karn T, Mavrova-Risteska L, Ruckhäberle E, Gaetje R, Holtrich U, Kaufmann M, Rody A, Wiegratz I. SATB1 gene expression and breast cancer prognosis. *Breast* 2011, 20: 309–313.

- [80] Galande S, Purbey PK, Notani D, Kumar PP. The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1. *Curr Opin Genet Dev* 2007, 17: 408–414.
- [81] Kohwi-Shigematsu T, Kohwi Y, Takahashi K, Richards HW, Ayers SD, Han HJ, Cai S. SATB1-mediated functional packaging of chromatin into loops. *Methods* 2012, 58: 243–254.
- [82] Kohwi-Shigematsu T, Poterlowicz K, Ordinario E, Han HJ, Botchkarev VA, Kohwi Y. Genome organizing function of SATB1 in tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2013, 23: 72–79.
- [83] Pavan Kumar P, Purbey PK, Sinha CK, Notani D, Limaye A, Jayani RS, Galande S. Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo. *Mol Cell* 2006, 22: 231–243.
- [84] Purbey PK, Singh S, Notani D, Kumar PP, Limaye AS, Galande S. Acetylation-dependent interaction of SATB1 and CtBP1 mediates transcriptional repression by SATB1. *Mol Cell Biol* 2009, 29: 1321–1337.
- [85] Laurinavicius A, Green AR, Laurinaviciene A, Smailyte G, Ostapenko V, Meskauskas R, Ellis IO. Ki67/SATB1 ratio is an independent prognostic factor of overall survival in patients with early hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. *Oncotarget* 2015, 6: 41134-45.
- [86] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100: 57–70.
- [87] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144: 646–674.
- [88] Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004, 40: 2667–2675.
- [89] Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *Embo J* 2013, 32: 617–628.
- [90] Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of Pathology* 2011, 223: 307–317.
- [91] Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res* 2005, 7: 171–179.
- [92] Sgroi DC. Preinvasive breast cancer. *Annual review of pathology* 2010, 5: 193–221.
- [93] Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchio C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 2010, 57: 171–192.
- [94] Hilton HN, Clarke CL, Graham JD. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2018, 466: 2–14.

- [95] Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Braz J Med Biol Res* 2018, 51: 1–7.
- [96] Saha Roy S, Vadlamudi RK. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer* 2012, 2012: 654698.
- [97] Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, Conaway M, Wang H, Korach KS, Bocchinfuso W, Santen R. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *International journal of cancer* 2010, 127: 1748–1757.
- [98] Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 2006, 7: 497–508.
- [99] Wang J, Jarrett J, Huang CC, Satcher RL, Jr., Levenson AS. Identification of estrogen-responsive genes involved in breast cancer metastases to the bone. *Clin Exp Metastasis* 2007, 24: 411–422.
- [100] Banka CL, Lund CV, Nguyen MT, Pakchoian AJ, Mueller BM, Eliceiri BP. Estrogen induces lung metastasis through a host compartment-specific response. *Cancer Res* 2006, 66: 3667–3672.
- [101] Lange CA, Yee D. Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond)* 2008, 4: 151–162.
- [102] Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002, 277: 5209–5218.
- [103] Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V, Charreau EH, de Kier Joffé EB, Schillaci R, Elizalde PV. Progestin Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and in Vivo Development of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Cytoplasmic Signaling Pathways. *Molecular Endocrinology* 2007, 21: 1335–1358.
- [104] Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte H, Löning T. Progesterone Receptor Isoforms, PR-B and PR-A, in Breast Cancer: Correlations with Clinicopathologic Tumor Parameters and Expression of AP-1 Factors. *Hormone research* 2000, 54: 32–37.
- [105] Rojas PA, May M, Sequeira GR, Elia A, Alvarez M, Martínez P, Gonzalez P, Hewitt S, He X, Perou CM, Molinolo A, Gibbons L, Abba MC, Gass H, Lanari C. Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogestin Responsiveness. *J Natl Cancer Inst* 2017, 109.
- [106] Asselin-Labat M, Vaillant F, Sheridan J, Pal B, Wu D, Simpson E, Yasuda H, Smyth G, Martin T, Lindeman G. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 2010, 465: 798–802.
- [107] Joshi PA, Jackson HW, Birstain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 2010, 465: 803–807.

- [108] Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414: 105–111.
- [109] Truong TH, Dwyer AR, Diep CH, Hu H, Hagen KM, Lange CA. Phosphorylated Progesterone Receptor Isoforms Mediate Opposing Stem Cell and Proliferative Breast Cancer Cell Fates. *Endocrinology* 2018, 160: 430–446.
- [110] Ishikawa T, Ichikawa Y, Shimizu D, Sasaki T, Tanabe M, Chishima T, Takabe K, Endo I. The role of HER-2 in Breast Cancer. *J Surg Sci* 2014, 2: 4–9.
- [111] Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol* 2014, 21: 100–107.
- [112] Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int* 2014, 2014: 852748.
- [113] Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 Duet in Mammary Development and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2008, 13: 215.
- [114] Semenza GL. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1863: 382–391.
- [115] Liu ZJ, Semenza GL, Zhang HF. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015, 16: 32–43.
- [116] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012, 33: 207–214.
- [117] Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2010, 20: 51–56.
- [118] Yamamoto Y, Ibusuki M, Okumura Y, Kawasoe T, Kai K, Iyama K, Iwase H. Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008, 110: 465–475.
- [119] Longatto Filho A, Lopes JM, Schmitt FC. Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol* 2010, 2010: 576384.
- [120] Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E, Lim ST, Tomar A, Tancioni I, Uryu S, Guan JL, Acevedo LM, Weis SM, Cheresch DA, Schlaepfer DD. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Developmental cell* 2012, 22: 146–157.
- [121] Fuckar D, Dekanić A, Stifter S, Mustać E, Krstulja M, Dobrića F, Jonjić N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol* 2006, 14: 49–55.
- [122] Alameddine RS, Otröck ZK, Awada A, Shamseddine A. Crosstalk between HER2 signaling and angiogenesis in breast cancer: molecular basis, clinical applications and challenges. *Curr Opin Oncol* 2013, 25: 313–324.

- [123] Migowski A. [Early detection of breast cancer and the interpretation of results of survival studies]. *Cien Saude Colet* 2015, 20: 1309.
- [124] Wang L. Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors (Basel)* 2017, 17: 1572.
- [125] Kharkwal S, Sameer, Mukherjee A. Triple test in carcinoma breast. *J Clin Diagn Res* 2014, 8: NC09–NC11.
- [126] Nigam M, Nigam B. Triple Assessment of Breast – Gold Standard in Mass Screening for Breast Cancer Diagnosis. *IOSR J Dent Med Sci (IOSR-JDMS)* 2013, 7: 1–7.
- [127] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. Chichester: John Wiley and Sons, 2017.
- [128] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019, 69: 363–385.
- [129] Noone A, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis D. *SEER cancer statistics review, 1975–2015*. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2018.
- [130] Rodriguez MA, Foxhall LE. *Handbook of Cancer Survivorship Care*. Springer Publishing Company, 2018.
- [131] Hoon Tan P, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R, Sapino A, Sasano H, Schnitt S, Sotiriou C, van Diest P, White VA, Lokuhetty D, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the breast. *Histopathology* 2020.
- [132] Pang JM, Gorringer KL, Fox SB. Ductal carcinoma in situ – update on risk assessment and management. *Histopathology* 2016, 68: 96–109.
- [133] Tsikitis VL, Chung MA. Biology of ductal carcinoma in situ classification based on biologic potential. *Am J Clin Oncol* 2006, 29: 305–310.
- [134] Gilleard O, Goodman A, Cooper M, Davies M, Dunn J. The significance of the Van Nuys prognostic index in the management of ductal carcinoma in situ. *World J Surg Oncol* 2008, 6: 61.
- [135] Erbas B, Provenzano E, Armes J, Gertig D. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 97: 135–144.
- [136] Sanders ME, Schuyler PA, Dupont WD, Page DL. The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer* 2005, 103: 2481–2484.
- [137] Dania V, Liu Y, Ademuyiwa F, Weber JD, Colditz GA. Associations of race and ethnicity with risk of developing invasive breast cancer after lobular carcinoma in situ. *Breast Cancer Research* 2019, 21: 120.
- [138] King TA, Pilewskie M, Muhsen S, Patil S, Mautner SK, Park A, Oskar S, Guerini-Rocco E, Boafu C, Gooch JC, De Brot M, Reis-Filho JS, Morrogh M, Andrade VP, Sakr RA, Morrow M. Lobular Carcinoma in Situ: A 29-Year Longitudinal Experience Evaluating

- Clinicopathologic Features and Breast Cancer Risk. *J Clin Oncol* 2015, 33: 3945–3952.
- [139] Rakha EA, Gill MS, El-Sayed ME, Khan MM, Hodi Z, Blamey RW, Evans AJ, Lee AH, Ellis IO. The biological and clinical characteristics of breast carcinoma with mixed ductal and lobular morphology. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 114: 243–250.
- [140] McCart Reed AE, Kutasovic JR, Nones K, Saunus JM, Da Silva L, Newell F, Kazakoff S, Melville L, Jayanthan J, Vargas AC, Reid LE, Beesley J, Chen XQ, Patch AM, Clouston D, Porter A, Evans E, Pearson JV, Chenevix-Trench G, Cummings MC, Waddell N, Lakhani SR, Simpson PT. Mixed ductal-lobular carcinomas: evidence for progression from ductal to lobular morphology. *The Journal of Pathology* 2018, 244: 460–468.
- [141] Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Mastropasqua MG, Luini A, Veronesi P, Intra M, Montagna E, Canello G, Cardillo A, Mazza M, Perri G, Iorfida M, Pruneri G, Goldhirsch A, Viale G. Outcome of special types of luminal breast cancer. *Ann Oncol* 2012, 23: 1428–1436.
- [142] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406: 747–752.
- [143] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98: 10869-74.
- [144] Sotiropoulos C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, Desmedt C, Larsimont D, Cardoso F, Peterse H, Nuyten D, Buyse M, van de Vijver MJ, Bergh J, Piccart M, Delorenzi M. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98: 262–272.
- [145] Andre F, Pusztai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2006, 3: 621–632.
- [146] Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, Damokosh A, Sneige N, Buchholz TA, Esteva FJ, Arun B, Cristofanilli M, Booser D, Rosales M, Valero V, Adams C, Hortobagyi GN, Symmans WF. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 2406–2415.

- [147] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002, 415: 530–536.
- [148] West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, Zuzan H, Olson JA, Jr., Marks JR, Nevins JR. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 11462-7.
- [149] Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, Macmillan D, Blamey RW, Ellis IO. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 2005, 116: 340–350.
- [150] Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29: 4273–4278.
- [151] Soria D, Garibaldi JM, Ambrogi F, Green AR, Powe D, Rakha E, Macmillan RD, Blamey RW, Ball G, Lisboa PJ, Etchells TA, Boracchi P, Biganzoli E, Ellis IO. A methodology to identify consensus classes from clustering algorithms applied to immunohistochemical data from breast cancer patients. *Comput Biol Med* 2010, 40: 318–330.
- [152] Bartlett JM, Bayani J, Marshall A, Dunn JA, Campbell A, Cunningham C, Sobol MS, Hall PS, Poole CJ, Cameron DA, Earl HM, Rea DW, Macpherson IR, Canney P, Francis A, McCabe C, Pinder SE, Hughes-Davies L, Makris A, Stein RC. Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. *J Natl Cancer Inst* 2016, 108.
- [153] Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat* 2002, 76: 27–36.
- [154] Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007, 9: R6.
- [155] Bae SY, Kim S, Lee JH, Lee HC, Lee SK, Kil WH, Kim SW, Lee JE, Nam SJ. Poor prognosis of single hormone receptor- positive breast cancer: similar outcome as triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2015, 15: 138.
- [156] Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in

- primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 2006, 17: 818–826.
- [157] Hull DF, 3rd, Clark GM, Osborne CK, Chamness GC, Knight WA, 3rd, McGuire WL. Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1983, 43: 413–416.
- [158] Gross GE, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1984, 44: 836–840.
- [159] Balleine RL, Earl MJ, Greenberg ML, Clarke CL. Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. *Br J Cancer* 1999, 79: 1564–1571.
- [160] Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, Nicholson RI, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007, 25: 4772–4778.
- [161] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96: 926–935.
- [162] Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95: 353–361.
- [163] Schafer JM, Bentrem DJ, Takei H, Gajdos C, Badve S, Jordan VC. A mechanism of drug resistance to tamoxifen in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002, 83: 75–83.
- [164] Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, Lee AV. Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol Endocrinol* 2003, 17: 575–588.
- [165] Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Nardulli AM. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol* 2004, 18: 521–532.
- [166] 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: 320–368.
- [167] Murphy CG, Modi S. HER2 breast cancer therapies: a review. *Biologics* 2009, 3: 289–301.
- [168] Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *The Breast* 2015, 24: S67–S72.

- [169] Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011, 103: 1656–1664.
- [170] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. 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. *Ann Oncol* 2011, 22: 1736–1747.
- [171] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010, 11: 174–183.
- [172] Untch M, Harbeck N, Huober J, von Minckwitz G, Gerber B, Kreipe HH, Liedtke C, Marschner N, Möbus V, Scheithauer H, Schneeweiss A, Thomssen C, Jackisch C, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, Fasching PA, Fehm T, Janni W, Lück HJ, Maass N, Scharl A, Loibl S. Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2015, 75: 556–565.
- [173] Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück HJ, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus – opinion of a german team of experts (Zurich 2013). *Breast Care (Basel)* 2013, 8: 221–229.
- [174] 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: 40–46.
- [175] Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, Brunelli A, Bolsi G, Allevi G, Generali D, Betri E, Bertoli G, Alquati P, Dogliotti L. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001, 85: 1106–1112.
- [176] Makris A, Powles T, Allred D, Ashley S, Trott P, Ormerod M, Dowsett M. Quantitative changes in cytological molecular markers during primary medical treatment of breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat* 1999, 53: 51–59.

- [177] Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005, 23(29): 7350–7360.
- [178] Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2018, 27: 95–120.
- [179] Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, Baras AS, Patel SS, Anders RA, Rimm DL, Cimino-Mathews A. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol* 2018, 31: 214–234.
- [180] Parra ER, Francisco-Cruz A, Wistuba II. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers (Basel)* 2019, 11.
- [181] Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 2012, 12: 298–306.
- [182] Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, Darcy PK, Loi S. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Medicine* 2015, 13: 202.
- [183] Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008, 27: 5904–5912.
- [184] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 2018, 32: 1267–1284.
- [185] Edechi CA, Ikeogu N, Uzonna JE, Myal Y. Regulation of Immunity in Breast Cancer. *Cancers* 2019, 11: 1080.
- [186] Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer* 2018, 18: 359–376.
- [187] Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 2015, 15: 731–744.
- [188] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010, 141: 52–67.
- [189] Landskron G, de la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014, 2014: 149185.
- [190] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007, 117: 1175–1183.
- [191] Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010, 46: 1181–1188.
- [192] Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer* 2017, 24: 3–15.

- [193] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420: 860–867.
- [194] Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J Leukoc Biol* 2019, 105: 243–255.
- [195] Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010, 28: 105–113.
- [196] Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 2015, 15: 405–414.
- [197] Tan AH, Goh SY, Wong SC, Lam KP. T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3. *J Biol Chem* 2008, 283: 128–136.
- [198] Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 2007, 70: 1–11.
- [199] Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992, 257: 548–551.
- [200] Hong CC, Yao S, McCann SE, Dolnick RY, Wallace PK, Gong Z, Quan L, Lee KP, Evans SS, Repasky EA, Edge SB, Ambrosone CB. Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2013, 139: 477–488.
- [201] Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, Asford C, Tindle S, Marches F, Gallegos M, Burton EC, Savino D, Hori T, Tanaka Y, Zurawski S, Zurawski G, Bover L, Liu YJ, Banchereau J, Palucka AK. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med* 2011, 208: 479–490.
- [202] Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. 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: 5373–5380.
- [203] Martinez LM, Robila V, Clark NM, Du W, Idowu MO, Rutkowski MR, Bos PD. Regulatory T Cells Control the Switch From in situ to Invasive Breast Cancer. *Front Immunol* 2019, 10: 1942.
- [204] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007, 8: 1353–1362.
- [205] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyoloji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73

- expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007, 204: 1257–1265.
- [206] Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol* 2006, 59: 972–977.
- [207] Thompson E, Taube JM, Elwood H, Sharma R, Meeker A, Warzecha HN, Argani P, Cimino-Mathews A, Emens LA. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol* 2016, 29: 249–258.
- [208] Kristensen VN, Vaske CJ, Ursini-Siegel J, van Loo P, Nordgard SH, Sachidanandam R, Sørli T, Wärnberg F, Haakensen VD, Helland Å, Naume B, Perou CM, Haussler D, Troyanskaya OG, Børresen-Dale AL. Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma in situ (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109: 2802–2807.
- [209] Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2016, 4: 59.
- [210] 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: 1354–1360.
- [211] Bayraktar S, Batoo S, Okuno S, Glück S. Immunotherapy in breast cancer. *J Carcinog* 2019, 18: 2.
- [212] Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016, 11: e0152500.
- [213] Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2014, 148: 467–476.
- [214] Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol* 2016, 18: 497–506.
- [215] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29: 1949–1955.
- [216] Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology. *Front Immunol* 2019, 10: 348.
- [217] Ali HR, Chlon L, Pharoah PDP, Markowitz F, Caldas C. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study. *PLoS Medicine* 2016, 13: e1002194-e.

- [218] Dieci MV, Griguolo G, Miglietta F, Guarneri V. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? *Cancer treatment reviews* 2016, 46: 9–19.
- [219] Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, Martino S, Wang M, Jones VE, Saphner TJ, Wolff AC, Wood WC, Davidson NE, Sledge GW, Sparano JA, Badve SS. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* 2014, 32: 2959–2966.
- [220] Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Desmedt C, Piccart MJ, Loibl S, Denkert C, Smyth MJ, Joensuu H, Sotiriou C. 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: 1544–1550.
- [221] Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Apetoh L, Rébé C, Martin F, Fumoleau P, Coudert B, Ghiringhelli F. T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. *Br J Cancer* 2011, 105: 366–371.
- [222] Jiang X, Ellison SJ, Alarid ET, Shapiro DJ. Interplay between the levels of estrogen and estrogen receptor controls the level of the granzyme inhibitor, proteinase inhibitor 9 and susceptibility to immune surveillance by natural killer cells. *Oncogene* 2007, 26: 4106–4114.
- [223] Mostafa AA, Codner D, Hirasawa K, Komatsu Y, Young MN, Steimle V, Drover S. Activation of ER α signaling differentially modulates IFN- γ induced HLA-class II expression in breast cancer cells. *PLoS One* 2014, 9: e87377.
- [224] O’Meara T, Marczyk M, Qing T, Yaghoobi V, Blenman K, Cole K, Pelekanou V, Rimm DL, Pusztai L. Immunological Differences Between Immune-Rich Estrogen Receptor – Positive and Immune-Rich Triple-Negative Breast Cancers. *JCO Precision Oncology* 2020: 767–779.
- [225] Marquez JP, Stanton SE, Disis ML. The antigenic repertoire of premalignant and high-risk lesions. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015, 8: 266–270.
- [226] Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, Xu H, Sharma R, Lecksell K, Cornish TC, Cuka N, Argani P, Emens LA. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Human pathology* 2016, 47: 52–63.
- [227] Cimino-Mathews A, Foote JB, Emens LA. Immune targeting in breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2015, 29: 375–385.
- [228] Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ,

- Alatrash G. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology research* 2014, 2: 361–370.
- [229] Li X, Li M, Lian Z, Zhu H, Kong L, Wang P, Yu J. Prognostic Role of Programmed Death Ligand-1 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Target Oncol* 2016, 11: 753–761.
- [230] Egelston CA, Avalos C, Tu TY, Simons DL, Jimenez G, Jung JY, Melstrom L, Margolin K, Yim JH, Kruper L, Mortimer J, Lee PP. Human breast tumor-infiltrating CD8(+) T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. *Nat Commun* 2018, 9: 4297.
- [231] Ahlfors H, Limaye A, Elo LL, Tuomela S, Burute M, Gottimukkala KV, Notani D, Rasool O, Galande S, Lahesmaa R. SATB1 dictates expression of multiple genes including IL-5 involved in human T helper cell differentiation. *Blood* 2010, 116: 1443–1453.
- [232] Alvarez JD, Yasui DH, Niida H, Joh T, Loh DY, Kohwi-Shigematsu T. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev* 2000, 14: 521–535.
- [233] Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity* 2013, 38: 1105–1115.
- [234] Stephen TL, Payne KK, Chaurio RA, Allegranza MJ, Zhu H, Perez-Sanz J, Perales-Puchalt A, Nguyen JM, Vara-Ailor AE, Eruslanov EB, Borowsky ME, Zhang R, Laufer TM, Conejo-Garcia JR. SATB1 Expression Governs Epigenetic Repression of PD-1 in Tumor-Reactive T Cells. *Immunity* 2017, 46: 51–64.
- [235] Nixon BG, Li MO. Satb1: Restraining PD1 and T Cell Exhaustion. *Immunity* 2017, 46: 3–5.
- [236] Nüssing S, Koay HF, Sant S, Loudovaris T, Mannering SI, Lappas M, d’Udekem Y, Konstantinov IE, Berzins SP, Rimmelzwaan GF, Turner SJ, Clemens EB, Godfrey DI, Nguyen TH, Kedzierska K. Divergent SATB1 expression across human life span and tissue compartments. *Immunology and cell biology* 2019, 97: 498–511.
- [237] Zilenaite D, Rasmusson A, Augulis R, Besusparis J, Laurinaviciene A, Plancoulaine B, Ostapenko V, Laurinavicius A. Independent Prognostic Value of Intratumoral Heterogeneity and Immune Response Features by Automated Digital Immunohistochemistry Analysis in Early Hormone Receptor-Positive Breast Carcinoma. *Frontiers in Oncology* 2020, 10.
- [238] Cabuk FK, Aktepe F, Kapucuoglu FN, Coban I, Sarsenov D, Ozmen V. Interobserver reproducibility of tumor-infiltrating lymphocyte evaluations in breast cancer. *Indian J Pathol Microbiol* 2018, 61: 181–186.
- [239] Väyrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S, Böhm JP, Tuomisto A, Mäkinen MJ. An improved image analysis method for cell counting lends

- credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2012, 460: 455–465.
- [240] Heindl A, Nawaz S, Yuan Y. Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology. *Lab Invest* 2015, 95: 377–384.
- [241] Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, Todd IP. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986, 10: 437–459.
- [242] Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987, 1: 1303–1306.
- [243] Rasmusson A, Zilenaite D, Nestarenkaite A, Augulis R, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Poskus T, Laurinavicius A. Immunogradient indicators for anti-tumor response assessment by automated tumor-stroma interface zone detection. *The American Journal of Pathology* 2020.
- [244] Madabhusi A. Digital pathology image analysis: opportunities and challenges. *Imaging Med* 2009, 1: 7–10.
- [245] Belsare A, Mushrif M. Histopathological image analysis using image processing techniques: An overview. *Signal & Image Processing* 2012, 3: 23.
- [246] Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Dasevicius D, Elie N, Plancoulaine B, Bor C, Herlin P. Digital image analysis in pathology: benefits and obligation. *Analytical cellular pathology* 2012, 35: 75–78.
- [247] Jiang J, Trundle P, Ren J. Medical image analysis with artificial neural networks. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 2010, 34: 617–631.
- [248] Kumar K, Thakur GSM. Advanced applications of neural networks and artificial intelligence: A review. *International journal of information technology and computer science* 2012, 4: 57.
- [249] Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 2013, 108: 479–485.
- [250] Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer* 2010, 1805: 105–117.
- [251] Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)* 2017, 4: 227.
- [252] Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2015, 21: 1258–1266.
- [253] Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, Eberhard DA, Young GD, Schmechel SC, Lange H. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest* 2012, 92: 1342–1357.
- [254] Natrajan R, Lambros MB, Rodríguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DS, Marchió C, Vatcheva R, Rayter S, Mahler-Araujo B,

- Fulford LG, Hungermann D, Mackay A, Grigoriadis A, Fenwick K, Tamber N, Hardisson D, Tutt A, Palacios J, Lord CJ, Buerger H, Ashworth A, Reis-Filho JS. Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 2711–2722.
- [255] Lee E, Moon A. Identification of Biomarkers for Breast Cancer Using Databases. *J Cancer Prev* 2016, 21: 235–242.
- [256] Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011, 378: 771–784.
- [257] Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, Soon-Shiong P, Ellsworth DL. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol* 2017, 64: 65–72.
- [258] Balko JM, Giltane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, Owens P, Sanders ME, Kuba MG, Sánchez V, Kurupi R, Moore PD, Pinto JA, Doimi FD, Gómez H, Horiuchi D, Goga A, Lehmann BD, Bauer JA, Pietenpol JA, Ross JS, Palmer GA, Yelensky R, Cronin M, Miller VA, Stephens PJ, Arteaga CL. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* 2014, 4: 232–245.
- [259] Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, Hatschek T, Skoog L, Bergh J. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol* 2012, 30: 2601–2608.
- [260] van Poznak C, Somerfield MR, Bast RC, Cristofanilli M, Goetz MP, Gonzalez-Angulo AM, Hicks DG, Hill EG, Liu MC, Lucas W, Mayer IA, Menzel RG, Symmans WF, Hayes DF, Harris LN. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2015, 33: 2695–2704.
- [261] Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012, 486: 346–352.
- [262] Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, Andersen JA, Heim S, Teixeira MR. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 102: 143–155.

- [263] Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010, 18: 433–441.
- [264] Murthy S, Sandhya D, Ahmed F, Goud K, Dayal M, Suseela K, Rajappa S. Assessment of HER2/Neu status by fluorescence *in situ* hybridization in immunohistochemistry-equivocal cases of invasive ductal carcinoma and aberrant signal patterns: A study at a tertiary cancer center. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2011, 54(3): 532–538.
- [265] Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. HER2 *in situ* hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014, 27: 4–18.
- [266] Ohlschlegel C, Zahel K, Kradolfer D, Hell M, Jochum W. HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2011, 64: 1112–1116.
- [267] 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: 177–182.
- [268] Davis BW, Zava DT, Locher GW, Goldhirsch A, Hartmann WH. Receptor heterogeneity of human breast cancer as measured by multiple intratumoral assays of estrogen and progesterone receptor. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984, 20: 375–382.
- [269] Chhieng DC, Frost AR, Niwas S, Weiss H, Grizzle WE, Beeken S. Intratumor heterogeneity of biomarker expression in breast carcinomas. *Biotech Histochem* 2004, 79: 25–36.
- [270] Lindström LS, Yau C, Czene K, Thompson CK, Hoadley KA, van't Veer LJ, Balassanian R, Bishop JW, Carpenter PM, Chen YY, Datnow B, Hasteh F, Krings G, Lin F, Zhang Y, Nordenskjöld B, Stål O, Benz CC, Fornander T, Borowsky AD, Esserman LJ. Intratumor Heterogeneity of the Estrogen Receptor and the Long-term Risk of Fatal Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2018, 110: 726–733.
- [271] Beca F, Polyak K. Intratumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016, 882: 169–189.
- [272] Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, Gianni L, Castiglione M, Gelber RD, Coates AS, Goldhirsch A. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol* 2016, 34: 927–935.
- [273] Sheppard VB, Faul LA, Luta G, Clapp JD, Yung RL, Wang JH, Kimmick G, Isaacs C, Tallarico M, Barry WT, Pitcher BN, Hudis C, Winer EP, Cohen HJ, Muss HB, Hurria A, Mandelblatt JS. Frailty and adherence to adjuvant hormonal therapy in older women with breast cancer: CALGB protocol 369901. *J Clin Oncol* 2014, 32: 2318–2327.

- [274] Fan M, He T, Zhang P, Zhang J, Li L. Heterogeneity of Diffusion – Weighted Imaging in Tumours and the Surrounding Stroma for Prediction of Ki-67 Proliferation Status in Breast Cancer. *Scientific Reports* 2017, 7: 2875.
- [275] Himuro T, Horimoto Y, Arakawa A, Tanabe M, Saito M. Ki67 Heterogeneity in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancers: Which Tumor Type Has the Most Heterogeneity? *Int J Surg Pathol* 2016, 24: 103–107.
- [276] Focke CM, Decker T, van Diest PJ. Intratumoral heterogeneity of Ki67 expression in early breast cancers exceeds variability between individual tumours. *Histopathology* 2016, 69: 849–861.
- [277] Aleskandarany M, Green A, Ashankyty I, Elmouna A, Diez-Rodriguez M, Nolan C, Ellis I, Rakha E. Impact of intratumoural heterogeneity on the assessment of Ki67 expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2016, 158.
- [278] Shui R, Yu B, Bi R, Yang F, Yang W. An interobserver reproducibility analysis of Ki67 visual assessment in breast cancer. *PLoS One* 2015, 10: e0125131.
- [279] Vörös A, Csörgő E, Nyári T, Cserni G. An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology* 2013, 80: 111–118.
- [280] 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: e0172031-e.
- [281] Stålhammar G, Fuentes Martinez N, Lippert M, Tobin NP, Møllholm I, Kis L, Rosin G, Rantalainen M, Pedersen L, Bergh J, Grunkin M, Hartman J. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol* 2016, 29: 318–329.
- [282] Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaite S, Lazutka J. Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol* 2012, 7: 27.
- [283] Coleman S, Scotney B, Gardiner B. Tri-directional Gradient Operators for Hexagonal Image Processing. *Journal of Visual Communication and Image Representation* 2016, 38.
- [284] Middleton L, Sivaswamy J. Edge detection in a hexagonal-image processing framework. *Image and Vision Computing* 2001, 19: 1071–1081.
- [285] Haralick RM. Statistical and structural approaches to texture. *Proceedings of the IEEE* 1979, 67: 786–804.
- [286] Xuan G, Zhang W, Chai P. EM algorithms of Gaussian mixture model and hidden Markov model. *Proceedings 2001 International Conference on Image Processing (Cat No 01CH37205): IEEE, 2001, pp. 145–148.*

- [287] Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 1977, 39: 1–22.
- [288] Samuels P. *Advice on Exploratory Factor Analysis*, 2017.
- [289] Kaiser HF. An index of factorial simplicity. *Psychometrika* 1974, 39: 31–36.
- [290] Hair J, Black W, Babin B, Anderson R, Tatham R. *Multivariate Data Analysis*. 6 ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006.
- [291] Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012, 7: e51862.
- [292] 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. *Computers in Biology and Medicine* 2015, 57: 123–129.
- [293] Parzen M, Lipsitz SR. A global goodness-of-fit statistic for Cox regression models. *Biometrics* 1999, 55: 580–584.
- [294] Bordry N, Broggi MAS, de Jonge K, Schaeuble K, Gannon PO, Foukas PG, Danenberg E, Romano E, Baumgaertner P, Fankhauser M, Wald N, Cagnon L, Abed-Maillard S, Hajjami HM, Murray T, Ioannidou K, Letovanec I, Yan P, Michielin O, Matter M, Swartz MA, Speiser DE. Lymphatic vessel density is associated with CD8(+) T cell infiltration and immunosuppressive factors in human melanoma. *Oncoimmunology* 2018, 7: e1462878.
- [295] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006, 313: 1960–1964.
- [296] Hermitte F. Biomarkers immune monitoring technology primer: Immunoscore® Colon. *J Immunother Cancer* 2016, 4: 57.
- [297] Lechner A, Schlosser H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, Zentis P, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Wennhold K, Garcia-Marquez M, Tharun L, Quaas A, Schauss A, Isensee J, Hucho T, Huebbers C, von Bergwelt-Baildon M, Beutner D. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017, 8: 44418-33.
- [298] Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017, 7: 16878.

- [299] Tunstall KL. Quantifying immune cell distribution in the tumor micro-environment using HALO® spatial analysis tools. 2016.
- [300] Kather JN, Suarez-Carmona M, Charoentong P, Weis CA, Hirsch D, Bankhead P, Horning M, Ferber D, Kel I, Herpel E, Schott S, Zornig I, Utikal J, Marx A, Gaiser T, Brenner H, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Jager D, Halama N. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* 2018, 7.
- [301] Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, Zimmermann J, Laffin B, Widmaier M, Rognoni L, Cardenes R, Schneider K, Boutrin A, Martin P, Zha J, Wiestler T. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer* 2018, 6: 20.
- [302] Eriksen AC, Andersen JB, Kristensson M, dePont Christensen R, Hansen TF, Kjaer-Frifeldt S, Sorensen FB. Computer-assisted stereology and automated image analysis for quantification of tumor infiltrating lymphocytes in colon cancer. *Diagn Pathol* 2017, 12: 65.
- [303] Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, Watanabe M. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008, 10: 41–47.
- [304] Weis SM, Cheresch DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011, 17: 1359–1370.
- [305] Berthel A, Zoernig I, Valous NA, Kahlert C, Klupp F, Ulrich A, Weitz J, Jaeger D, Halama N. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncoimmunology* 2017, 6: e1286436.
- [306] Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, Loi S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2016, 13: 228–241.
- [307] Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M, Inoue K, Fujii T, Horiguchi J, Shirabe K, Oyama T, Kuwano H. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett* 2019, 17: 2647–2656.
- [308] Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, de Azambuja E, Eidtmann H, Ellis CE, Baselga J, Piccart-Gebhart MJ, Michiels S, Bradbury I, Sotiriou C, Loi S. 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 Oncology* 2015, 1: 448–455.
- [309] Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, Earl HM, Poole CJ, Hiller L, Dunn JA, Bowden SJ, Twelves C, Bartlett JM, Mahmoud SM, Rakha E, Ellis IO, Liu S, Gao D, Nielsen TO, Pharoah PD, Caldas C. Association between CD8+ T-cell infiltration and

- breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol* 2014, 25: 1536–1543.
- [310] Lee KH, Kim EY, Yun JS, Park YL, Do SI, Chae SW, Park CH. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2018, 18: 938.
- [311] Jakobsen MR, Teerapakpinyo C, Shuangshoti S, Keelawat S. Comparison between digital image analysis and visual assessment of immunohistochemical HER2 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract* 2018, 214: 2087–2092.
- [312] Arihiro K, Oda M, Ohara M, Kadoya T, Osaki A, Nishisaka T, Shiroma N, Kobayashi Y. Comparison of visual assessment and image analysis in the evaluation of Ki-67 expression and their prognostic significance in immunohistochemically defined luminal breast carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2016, 46: 1081–1087.
- [313] Turashvili G, Leung S, Turbin D, Montgomery K, Gilks B, West R, Carrier M, Huntsman D, Aparicio S. Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): pathologist assessment compared to quantitative image analysis. *BMC cancer* 2009, 9: 165.
- [314] Kwon AY, Park HY, Hyeon J, Nam SJ, Kim SW, Lee JE, Yu JH, Lee SK, Cho SY, Cho EY. Practical approaches to automated digital image analysis of Ki-67 labeling index in 997 breast carcinomas and causes of discordance with visual assessment. *PLoS One* 2019, 14: e0212309.
- [315] Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, Irwin GW, Harkin DP, James JA, McQuaid S, Salto-Tellez M, Hamilton PW. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Laboratory Investigation* 2018, 98: 15–26.
- [316] Stalhammar G, Fuentes Martinez N, Lippert M, Tobin NP, Molholm I, Kis L, Rosin G, Rantalainen M, Pedersen L, Bergh J, Grunkin M, Hartman J. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol* 2016, 29: 318–329.
- [317] Glatzel-Plucinska N, Piotrowska A, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. The Role of SATB1 in Tumour Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2019, 20.
- [318] Cai S, Han HJ, Kohwi-Shigematsu T. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet* 2003, 34: 42–51.
- [319] Selinger CI, Cooper WA, Al-Sohaily S, Mladenova DN, Pangon L, Kennedy CW, McCaughan BC, Stirzaker C, Kohonen-Corish MR. Loss of special AT-rich binding protein 1 expression is a marker of poor survival in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011, 6: 1179–1189.

- [320] Kakugawa K, Kojo S, Tanaka H, Seo W, Endo TA, Kitagawa Y, Muroi S, Tenno M, Yasmin N, Kohwi Y, Sakaguchi S, Kowhi-Shigematsu T, Taniuchi I. Essential Roles of SATB1 in Specifying T Lymphocyte Subsets. *Cell Rep* 2017, 19: 1176–1188.
- [321] Noordhoek I, de Groot AF, Cohen D, Liefers GJ, Portielje JEA, Kroep JR. Higher ER load is not associated with better outcome in stage 1–3 breast cancer: a descriptive overview of quantitative HR analysis in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2019, 176: 27–36.
- [322] Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJ, Billingham LJ, Campbell FM, Grant M, Hasenburg A, Hille ET, Kay C, Kieback DG, Putter H, Markopoulos C, Kranenbarg EM, Mallon EA, Dirix L, Seynaeve C, Rea D. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol* 2011, 29: 1531–1538.
- [323] Lamy PJ, Pujol P, Thezenas S, Kramar A, Rouanet P, Guilleux F, Grenier J. Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2002, 76: 65–71.
- [324] Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, Easton DF, Sherman ME, Garcia-Closas M, Dowsett M, Pharoah PD. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol* 2019, 32: 1244–1256.
- [325] Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2014, 110: 565–572.
- [326] Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J Biol Chem* 1978, 253: 2223–2228.
- [327] Yu WC, Leung BS, Gao YL. Effects of 17 beta-estradiol on progesterone receptors and the uptake of thymidine in human breast cancer cell line CAMA-1. *Cancer Res* 1981, 41: 5004–5009.
- [328] Thompson AM, Jordan LB, Quinlan P, Anderson E, Skene A, Dewar JA, Purdie CA. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast Cancer Res* 2010, 12: R92.
- [329] Balduzzi A, Bagnardi V, Rotmensz N, Dellapasqua S, Montagna E, Cardillo A, Viale G, Veronesi P, Intra M, Luini A, Pruneri G, Mastropasqua G, Goldhirsch A, Colleoni M. Survival outcomes in breast cancer patients with low estrogen/progesterone receptor expression. *Clinical breast cancer* 2014, 14: 258–264.
- [330] Chen T, Zhang N, Moran MS, Su P, Haffty BG, Yang Q. Borderline ER-Positive Primary Breast Cancer Gains No Significant Survival

- Benefit From Endocrine Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical breast cancer* 2018, 18: 1–8.
- [331] Gloyeske NC, Dabbs DJ, Bhargava R. Low ER+ breast cancer: Is this a distinct group? *American journal of clinical pathology* 2014, 141: 697–701.
- [332] Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, Ueno NT, Zhang J, Shi W, Qi Y, Matsuoka J, Yang EJ, Hortobagyi GN, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L. Estrogen receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2012, 30: 729–734.
- [333] Raghav KP, Hernandez-Aya LF, Lei X, Chavez-Macgregor M, Meric-Bernstam F, Buchholz TA, Sahin A, Do KA, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Impact of low estrogen/progesterone receptor expression on survival outcomes in breast cancers previously classified as triple negative breast cancers. *Cancer* 2012, 118: 1498–1506.
- [334] Andor N, Graham TA, Jansen M, Xia LC, Aktipis CA, Petritsch C, Ji HP, Maley CC. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med* 2016, 22: 105–113.
- [335] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001, 159: 2249–2256.
- [336] Kyndi M, Sørensen FB, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen HM, Andersen J, Overgaard J. Tissue microarrays compared with whole sections and biochemical analyses. A subgroup analysis of DBCG 82 b&c. *Acta Oncol* 2008, 47: 591–599.

PRIEDAI

1 priedas. Klinikinės ir pataloginės pirminio naviko (T) kategorijos ir kriterijai

T kategorija	Klinikiniai ir pataloginiai T kriterijai
TX	Pirminis navikas negali būti nustatytas.
T0	Pirminio naviko nėra.
Tis (DCIS)	Nustatyta duktalinė <i>in situ</i> karcinoma.
Tis (Paget)	Nustatyta spenelio Pageto liga, kuri nėra susijusi su <i>in situ</i> karcinoma ir (arba) duktaline <i>in situ</i> karcinoma.
T1	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo ≤ 20 mm.
T1mi	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo ≤ 1 mm.
T1a	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo > 1 mm, bet ≤ 5 mm.
T1b	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo > 5 mm, bet ≤ 10 mm.
T1c	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo > 10 mm, bet ≤ 20 mm.
T2	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo > 20 mm, bet ≤ 50 mm.
T3	Nustatytas navikas, kurio didžiausias skersmuo > 50 mm.
T4	Nustatytas bet kokio dydžio navikas, kuris pažeidžia krūtinės ląstos sieną ir (arba) odą.
T4a	Nustatytas navikas, kuris plinta į krūtinės ląstos sieną, krūtinės raumenį ir į gilesnius audinius.
T4b	Nustatytas krūties odos išopėjimas ir (arba) odoje esantys satelitiniai naviko mazgeliai ir (arba) odos edema, tačiau uždegiminės karcinomos požymių nėra.
T4c	Nustatyti T4a ir T4b požymiai.
T4d	Nustatyta uždegiminė karcinoma.

2 priedas. Klinikinės ir pataloginės išplitimo į sritinius limfmazgius (N) kategorijos ir kriterijai

N kategorija	Klinikiniai kriterijai	Patologiniai kriterijai
NX	Įvertinti regioninių limfmazgių išplitimą nėra galimybių.	Įvertinti regioninių limfmazgių išplitimą nėra galimybių (pavyzdžiui, jie nepašalinti histologiniam tyrimui arba buvo pašalinti anksčiau).
N0	Išplitimo į sritinius limfmazgius nenustatyta.	Išplitimo į sritinius limfmazgius nenustatyta.
N0(i+)	–	Sritiniuose limfmazgiuose nustatyta mažesnė negu 0,2 mm navikinių ląstelių sankaupa.
N0(mol+)	–	Išplitimas į sritinius limfmazgius nenustatytas tiriant histologiškai, tačiau nustatytas atlikus molekulinis tyrimus.
N1	Nustatytas išplitimas į tos pačios pusės I, II lygio pažasties limfmazgius.	Nustatyta mikrometastazių arba 1–3 metastazės į pažasties limfmazgius arba išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius (kliniškai nepatvirtinta).
N1mi	Nustatyta mikrometastazių, mažesnių negu 2 mm, bet didesnių negu 0,2 mm.	Nustatyta mikrometastazių, mažesnių negu 2 mm, bet didesnių negu 0,2 mm.
N1a	–	Nustatytos 1–3 metastazės į pažasties limfmazgius, viena iš jų – didesnė negu 2 mm.
N1b	–	Nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius (kliniškai nepatvirtinta).
N1c	–	Nustatyti N1a ir N1b požymiai.
N2	Nustatytas išplitimas į tos pačios pusės I, II lygio pažasties limfmazgius, kurie suaugę tarpusavyje ar su kitomis struktūromis, arba išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius.	Nustatytos 4–9 metastazės į pažasties limfmazgius arba kliniškai nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius be metastazių į pažasties limfmazgius.
N2a	Nustatytas išplitimas į tos pačios pusės pažasties limfmazgius, kurie suaugę tarpusavyje arba su kitomis struktūromis.	Nustatytos 4–9 metastazės į pažasties limfmazgius, viena iš jų – didesnė negu 2 mm.
N2b	Nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius be metastazių į pažasties limfmazgius.	Kliniškai nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius (nebūtinai patvirtintas histologinio tyrimo metu), nesant išplitimo į pažasties limfmazgius.
N3	Nustatytas išplitimas į poraktikaulinį limfmazgį	Nustatyta 10 ar daugiau metastazių į pažasties limfmazgius arba į

Lentelės tęsinys.

	(III lygis), esant išplitimui į pažasties limfmazgius (I, II lygis) ar šio išplitimo nesant, arba nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius, esant išplitimui į pažasties limfmazgius, arba išplitimas į tos pačios pusės viršraktikaulinį limfmazgį, esant išplitimui į pažasties ar užkrūtinkaulio limfmazgį ar šio išplitimo nesant.	poraktikaulinį limfmazgį (III lygis) arba kliniškai nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius (nebūtinai patvirtintas histologinio tyrimo metu), esant išplitimui į pažasties limfmazgius, arba daugiau negu 3 metastazės į pažasties ir užkrūtinkaulio limfmazgius arba nustatytas išplitimas į tos pačios pusės viršraktikaulinį limfmazgį.
N3a	Nustatytas išplitimas į tos pačios pusės poraktikaulinį limfmazgį.	Nustatyta 10 ar daugiau metastazių į pažasties limfmazgius, viena iš jų – didesnė negu 2 mm, arba į poraktikaulinį limfmazgį (III lygis).
N3b	Nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio ir pažasties limfmazgius.	Kliniškai nustatytas išplitimas į užkrūtinkaulio limfmazgius (nebūtinai patvirtintas histologinio tyrimo metu), esant nustatytam išplitimui į vieną ar daugiau pažasties limfmazgių, arba daugiau negu 3 metastazės į pažasties ir užkrūtinkaulio limfmazgius.
N3c	Nustatytas išplitimas į viršraktikaulinį krūties limfmazgį.	Nustatytas išplitimas į tos pačios pusės viršraktikaulinį limfmazgį.

3 priedas. Klinikinės ir patloginės išplitimo į gretimus organus (M) kategorijos ir kriterijai

M kategorija	Klinikiniai ir patloginiai T kriterijai
M0	Tiriant kliniškai ar radiologiškai, tolimųjų metastazių nenustatyta.
M0(i+)	Tiriant kliniškai ar radiologiškai, tolimųjų metastazių nenustatyta, bet, tiriant mikroskopiškai ar taikant molekulinis tyrimus, nustatyta ne didesnių negu 0,2 mm navikinių ląstelių sankaupų ar cirkuliuojančių naviko ląstelių kraujyje, kaulų čiulpuose ar kituose audiniuose, išskyrus sritinius limfmazgius.
M1	Tiriant kliniškai ar radiologiškai ir (ar) patvirtinus histologiškai, nustatyta tolimųjų metastazių, didesnių negu 0,2 mm.

4 priedas. Krūties vēžio diferenciacijas laipsnio (G) kategorijas ir kritēriji

G kategorija	G kritēriji
GX	Naviko diferenciacijas laipsnis nezinoms.
G1	Gerai diferencijuots navikas (gauti 3–5 balai).
G2	Vidutiniškai diferencijuots navikas (gauti 6–7 balai).
G3	Blogai diferencijuots navikas (gauti 8–9 balai).
G4	Nediferencijuots navikas.

5 priedas. Krūties vėžio grupavimas į stadijas pagal pirminio naviko (T), išplitimo į sritinius limfmazgius (N) ir išplitimo į gretimus organus (M) kategorijas

Stadija	T kriterijus	N kriterijus	T kriterijus
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
IB	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
IIA	T1	N1	M0
IIA	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
IIB	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
IIIA	T1	N2	M0
IIIA	T2	N2	M0
IIIA	T3	N1	M0
IIIA	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIB	T4	N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
IIIC	Bet koks T	N3	M0
IV	Bet koks T	Bet koks N	M1

6 priedas. Krūties vėžio grupavimas į stadijas pagal pirminio naviko (T), išplitimo į sritinius limfmazgius (N) ir išplitimo į gretimus organus (M) kategorijas, diferenciacijos laipsnį bei estrogeno receptoriaus (ER), progesterono receptoriaus (PgR) ir 2-ojo žmogaus epidermio veiksnio receptoriaus (HER2) baltymų sintezės rezultatus

Stadija	TNM kriterijus	Diferenc. laipsnis	HER2 sintezė	ER sintezė	PgR sintezė	
0	Tis N0 M0	Bet koks	Bet kokia	Bet kokia	Bet kokia	
IA	T1 N0 M0 T0 N1mi M0 T1 N1mi N0	G1	Teigiama	Teigiama	Teigiama	
IA				Neigiama	Neigiama	
IA				Neigiama	Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IA					Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IA			Teigiama		Teigiama	
IA			Neigiama		Neigiama	
IA			G2	Teigiama	Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IA					Teigiama	Teigiama
IA				Neigiama	Teigiama	Teigiama
IA		Neigiama			Neigiama	
IA		Teigiama			Teigiama	
IB		G3	Teigiama	Teigiama	Teigiama	
IA				Neigiama	Neigiama	
IA				Neigiama	Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IA					Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IA			Teigiama		Teigiama	
IA			Neigiama		Neigiama	
IB			G1	Teigiama	Teigiama	Teigiama
IB					Neigiama	Neigiama
IB	Neigiama				Teigiama	Teigiama
IIA					Neigiama	Neigiama
IA		Teigiama			Teigiama	
IB		Neigiama			Neigiama	
IB		Teigiama		Teigiama	Teigiama	
IB				Neigiama	Neigiama	
IIA	G2			Teigiama	Teigiama	Teigiama
IA					Neigiama	Neigiama
IIA					Teigiama	Teigiama
IA				Neigiama	Teigiama	Teigiama
IIA		Neigiama	Neigiama			
IIA		Teigiama	Teigiama			
IIA	Neigiama	Neigiama				

Lentelės tęsinys.

IA			Teigiama	Teigiama
IIA			Teigiama	Neigiama
IIA			Neigiama	Teigiama
IIA				Neigiama
IB		G3		Teigiama
IIA			Teigiama	Neigiama
IIA			Neigiama	Teigiama
IIA				Neigiama
IA			Teigiama	Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IA		G1		Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IB			Teigiama	Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IB			Teigiama	Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IB			Teigiama	Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IB			Teigiama	Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIB				Neigiama
IIA		G3		Teigiama
IIB			Teigiama	Neigiama
IIB			Neigiama	Teigiama
IIIA				Neigiama
IB			Teigiama	Teigiama
IIIB			Teigiama	Neigiama
IIIA			Neigiama	Nustatyta
IIIA				Neigiama
IB		G1		Nustatyta
IIIA			Neigiama	Neigiama
IIIA	T0 N0 M0		Neigiama	Nustatyta
IIIA	T4 N1 M0			Neigiama
IB	T4 N2 M0		Teigiama	Teigiama
IIIA	T* N3 M0		Teigiama	Neigiama
IIIA			Neigiama	Teigiama
IIIA				Neigiama
IB		G2		Teigiama
IIIA			Teigiama	Neigiama
IIIA			Neigiama	Teigiama
IIIB				Neigiama

Lentelės tęsinys.

IIA				Teigiama	Teigiama
IIIA				Teigiama	Neigiama
IIIA					Neigiama
IIIA			G3		Neigiama
IIIB					Teigiama
IIIA				Neigiama	Neigiama
IIIA					Neigiama
IIIC					Neigiama
IIIA			G1		Teigiama
IIIB					Teigiama
IIIB				Teigiama	Neigiama
IIIB					Neigiama
IIIA				Neigiama	Teigiama
IIIB					Neigiama
IIIB					Teigiama
IIIB					Neigiama
IIIA			G2		Teigiama
IIIB	T4 N0 M0				Teigiama
IIIB	T4 N1 M0			Neigiama	Neigiama
IIIA	T4 N2 M0				Teigiama
IIIB	T* N3 M0			Neigiama	Neigiama
IIIB					Teigiama
IIIC					Neigiama
IIIB			G3		Teigiama
IIIB					Teigiama
IIIB				Teigiama	Teigiama
IIIB					Neigiama
IIIB				Neigiama	Neigiama
IIIB					Teigiama
IIIC					Neigiama
IIIC				Neigiama	Teigiama
IIIC					Neigiama
IV	T* N* M1	Bet koks	Bet kokia	Bet kokia	Bet kokia

* – bet koks

7 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas



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, <http://bioetika.sam.lt>
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

Aidai Laurinavičienei

2017-09-12 Nr. 6B-17-189

į Raštą el. paštu
kodas: 07-06-07

DĖL BIOMEDICININIO TYRIMO NR. 40

Susipažinę su Jūsų 2017 m. rugpjūčio 9 d. gautu prašymu dėl biomedicininio tyrimo „Molekulinių krūties vėžio žymenų vertė nustatant ligos eigos ir gydymo ypatumus“ (protokolo Nr. 40) informuojame, kad Lietuvos bioetikos komitetas neprieštarauja:

- protokolo (versija 1, 2017-06-19) naudojimui;
- tyrėjos Dovilės Žilėnaitės ir tyrėjo Mindaugo Morkūno dalyvavimui;
- atleidimui nuo informuoto asmens sutikimo gavimo papildomų žymenų nustatymui jau surinktai biologinei medžiagai;
- biomedicininio tyrimo pratęsimui iki 2020 m.;

Direktorius

Eugenijus Gefenas

8 priedas. Imunogradiento rodiklių tarpusavio sąsajų analizės rezultatai (koreliacijos koeficientas (r) ir *p* vertė)

Rodiklis	CD8_ MC_vid	CD8_ MC_sn	CD8_ IN_vid	CD8_ vid_S	CD8_ sn_S	CD8_ vid_SK	CD8_ sn_SK	CD8_ vid_NA	CD8_ sn_NA
CD8_ MC_vid	1								
CD8_ MC_sn	0,78 <0,0001	1							
CD8_ IN_vid	-0,71 <0,0001	-0,70 <0,0001	1						
CD8_ vid_S	-0,23 0,02	-0,28 0,004	0,06 0,52	1					
CD8_ sn_S	-0,20 0,04	-0,33 0,001	0,07 0,50	0,96 <0,0001	1				
CD8_ vid_SK	0,26 0,01	0,21 0,04	-0,38 0,0001	0,78 <0,0001	0,78 <0,0001	1			
CD8_ sn_SK	0,12 0,23	0,04 0,72	-0,20 0,05	0,82 <0,0001	0,86 <0,0001	0,95 <0,0001	1		
CD8_ vid_NA	0,55 <0,0001	0,49 <0,0001	-0,73 <0,0001	0,55 <0,0001	0,54 <0,0001	0,86 <0,0001	0,74 <0,0001	1	
CD8_ sn_NA	0,51 <0,0001	0,48 <0,0001	-0,69 <0,0001	0,56 <0,0001	0,56 <0,0001	0,85 <0,0001	0,75 <0,0001	0,98 <0,0001	1

CD8_MC_vid – CD8⁺ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8⁺ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: *SZ*₉ stromos dalyje (*S*), sąveikos krašte (*SK*₃) ir *SZ*₉ naviko audinio dalyje (*NA*). Žalia spalva paryškinti statistiškai reikšmingi koreliacijos koeficientai.

9 priedas. Rotuotų CD8+ ląstelių tankio faktorių struktūra

Imunogradianto rodiklis, ląstelės/mm²	1 faktorius	2 faktorius
CD8_MC_vid	-0,03	0,90
CD8_MC_sn	-0,11	0,91
CD8_IN_vid	-0,14	-0,90
CD8_vid_S	0,95	-0,22
CD8_sn_S	0,95	-0,23
CD8_vid_SK	0,92	0,31
CD8_sn_SK	0,95	0,13
CD8_vid_NA	0,73	0,66
CD8_sn_NA	0,74	0,63

CD8_MC_vid – CD8+ ląstelių masės centro vidurkis, *CD8_IN_vid* – imunonuokryčio vidurkis, *CD8_vid* ir *CD8_sn* – CD8+ ląstelių vidurkis ir standartinis nuokrypis atitinkamai: SZ₉ stromos dalyje (S), sąveikos krašte (SK₃) ir SZ₉ naviko audinio dalyje (NA).

10 priedas. Erdvinės naviko Haralicko tekstūros rodiklių tarpusavio sąsajų analizės rezultatai (koreliacijos koeficientas (r) ir *p* vertė)

Rodiklis	Energija	Homogeniškumas	Entropija	Kontrastas	Skirtingumas	AshD
ER						
Energija	1					
Homogeniškumas	0,92 <0,0001	1				
Entropija	-0,93 <0,0001	-0,98 <0,0001	1			
Kontrastas	-0,70 <0,0001	-0,85 <0,0001	0,84 <0,0001	1		
Skirtingumas	-0,86 <0,0001	-0,98 <0,0001	0,97 <0,0001	0,94 <0,0001	1	
AshD	0,01 0,88	0,04 0,72	-0,04 0,68	-0,09 0,36	-0,06 0,56	1
PgR						
Energija	1					
Homogeniškumas	0,97 <0,0001	1				
Entropija	-0,98 <0,0001	-0,99 <0,0001	1			
Kontrastas	-0,79 <0,0001	-0,88 <0,0001	0,85 <0,0001	1		
Skirtingumas	-0,92 <0,0001	-0,98 <0,0001	0,97 <0,0001	0,95 <0,0001	1	
AshD	-0,42 <0,0001	-0,40 <0,0001	0,41 <0,0001	0,34 0,0005	0,39 <0,0001	1
Ki67						
Energija	1					
Homogeniškumas	0,96 <0,0001	1				
Entropija	-0,97 <0,0001	-0,99 <0,0001	1			
Kontrastas	-0,76 <0,0001	-0,89 <0,0001	0,88 <0,0001	1		
Skirtingumas	-0,93 <0,0001	-0,99 <0,0001	0,98 <0,0001	0,94 <0,0001	1	
AshD	-0,22 0,03	-0,23 0,02	0,25 0,01	0,27 0,006	0,25 0,01	1

AshD – Ašmano *D* bimodališkumo rodiklis. Statistiškai reikšmingi koreliacijos koeficientai paryškinti žalia spalva.

11 priedas. Imunohistocheminių biožymenų ir heterogeniškumo kintamųjų rodiklių sąsajų analizės rezultatai (pateiktas koreliacijos koeficientas ir *p* vertė)

Rodiklis	ER%	PgR%	HER2%	Ki67%	CD8_t_S	CD8_t_NA	CD8_SATB1_t_S	CD8_SATB1_t_NA	HIF1a%_S	HIF1a%_NA	ER_entropija	ER_AshD	PgR_entropija	PgR_AshD	Ki67_entropija	Ki67_AshD
ER%	1															
PgR%	0,35 0,0003	1														
HER2%	-0,14 0,15	-0,33 0,001	1													
Ki67%	-0,10 0,32	-0,13 0,18	0,18 0,07	1												
CD8_t_S	-0,30 0,002	-0,23 0,02	0,05 0,62	0,23 0,02	1											
CD8_t_NA	-0,33 0,001	-0,17 0,08	0,02 0,82	0,24 0,02	0,64 <0,000 1	1										
CD8_SATB1_t_S	-0,27 0,007	-0,12 0,24	0,09 0,36	0,28 0,01	0,82 <0,000 1	0,54 <0,000 1	1									
CD8_SATB1_t_NA	-0,24 0,02	-0,06 0,54	-0,05 0,61	0,24 0,02	0,40 <0,000 1	0,69 <0,000 1	0,49 <0,0001	1								
HIF1a%_S	-0,14 0,17	-0,13 0,19	0,14 0,16	0,30 0,002	0,21 0,03	0,30 0,002	0,23 0,02	0,27 0,007	1							
HIF1a%_NA	-0,31 0,002	-0,19 0,06	0,01 0,90	0,11 0,29	0,47 <0,000 1	0,37 0,0002	0,33 0,001	0,21 0,03	0,46 <0,0001	1						
ER_entropija	0,13 0,21	0,07 0,51	-0,16 0,10	-0,01 0,89	0,08 0,44	0,12 0,25	-0,04 0,72	0,12 0,22	-0,12 0,24	0,03 0,79	1					
ER_AshD	0,07 0,46	0,19 0,06	-0,04 0,67	-0,08 0,43	-0,09 0,36	-0,09 0,40	-0,06 0,58	-0,06 0,54	-0,06 0,69	-0,04 0,68	1					
PgR_entropija	0,26 0,01	0,66 <0,0001	-0,33 0,001	-0,15 0,13	-0,08 0,45	0,02 0,85	-0,0003 0,99	0,01 0,91	-0,15 0,14	-0,18 0,07	0,31 0,002	-0,12 0,24	1			
PgR_AshD	0,11 0,26	0,37 0,0001	-0,14 0,16	-0,03 0,8	-0,04 0,73	-0,03 0,79	-0,0004 0,99	-0,004 0,97	-0,05 0,65	-0,1 0,31	0,01 0,92	-0,09 0,39	0,41 <0,0001	1		
Ki67_entropija	-0,23 0,02	-0,20 0,04	0,13 0,2	0,84 <0,000 1	0,15 0,13	0,19 0,06	0,19 0,06	0,22 0,03	0,20 0,04	0,08 0,44	-0,13 0,2	-0,09 0,36	-0,21 0,03	-0,11 0,28	1	
Ki67_AshD	0,11 0,25	0,03 0,76	0,05 0,64	0,27 0,01	-0,02 0,86	0,02 0,83	0,10 0,31	0,06 0,55	-0,05 0,61	-0,06 0,57	-0,21 0,04	-0,06 0,55	0,06 0,58	0,08 0,45	0,25 0,01	1

AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis, t – tankis, S – stromos audinys, NA – naviko audinys. Žalia spalva paryškinti statistiškai reikšmingi koreliacijos koeficientai.

12 priedas. Rotuotų standartinių krūties vėžio, vidunavikinio heterogeniškumo, imuninio atsako ir hipoksijos savybes atspindinčių biožymenų faktorių struktūra

Rodiklis	1	2	3	4	5
	faktorius	faktorius	faktorius	faktorius	faktorius
ER%	-0,45	0,43	0,03	0,08	0,09
PgR%	-0,16	0,84	-0,06	-0,01	0,23
Ki67%	0,19	-0,09	0,92	-0,02	0,02
HER2%	0,01	-0,49	0,11	-0,32	-0,15
CD8_t_NA	0,82	0,001	0,14	0,15	-0,06
CD8_t_S	0,85	-0,08	0,01	0,01	-0,10
CD8_SATB1_t_S	0,81	0,04	0,10	-0,15	-0,09
CD8_SATB1_t_NA	0,68	0,09	0,24	0,19	-0,02
HIF1a%_S	0,44	-0,14	0,21	-0,13	0,39
HIF1a%_NA	0,62	-0,20	-0,07	-0,02	0,29
ER_entropija	0,05	0,17	0,01	0,85	-0,16
ER_AshD	-0,11	0,07	-0,06	0,003	0,80
PgR_entropija	0,002	0,83	-0,08	0,18	-0,20
PgR_AshD	0,05	0,63	-0,07	-0,27	-0,21
Ki67_entropija	0,12	-0,19	0,90	-0,05	0,004
Ki67_AshD	-0,03	0,21	0,43	-0,49	-0,20

AshD – Ašmano *D* bimodališkumo rodiklis, *t* – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys.

13 priedas. Vienalypė regresijos analizė, taikant logranginį kriterijų pacienčių išgyvenamumui prognozuoti (n = 101)

Rodiklis	Pavojaus rizika	95 % pasikliautinis intervalas	p vertė	Slenkstinė vertė
Standartinių krūties vėžio biožymenų rodikliai				
ER%	3,11	1,16–8,34	0,017	74,45
PgR%	0,30	0,14–0,68	0,002	3,072
Ki67%	2,13	0,80–5,71	0,120	13,67
HER2%	0,39	0,17–0,92	0,025	0,4874
Vidunavikinio heterogeniškumo rodikliai				
ER_energija	4,56	1,36–15,31	0,007	0,098
ER_homogeniškumas	3,40	1,52–7,62	0,002	0,774
ER_entropija	0,09	0,01–0,68	0,003	4,503
ER_kontrastas	0,31	0,14–0,71	0,004	1,401
ER_skirtingumas	0,32	0,14–0,70	0,003	0,5577
ER_AshD	2,11	0,72–6,17	0,160	4,123
PgR_energija	5,36	2,12–13,52	<0,0001	0,4139
PgR_homogeniškumas	4,88	2,02–11,79	0,0001	0,8461
PgR_entropija	0,21	0,08–0,52	0,0002	2,862
PgR_kontrastas	0,22	0,09–0,56	0,0005	1,502
PgR_skirtingumas	0,15	0,05–0,44	<0,0001	0,7272
PgR_AshD	0,32	0,14–0,71	0,003	1,418
Ki67_energija	0,48	0,20–1,17	0,100	0,8141
Ki67_homogeniškumas	0,46	0,19–1,12	0,079	0,9603
Ki67_entropija	2,06	0,85–4,98	0,100	0,6304
Ki67_kontrastas	2,11	0,93–4,74	0,066	0,301
Ki67_skirtingumas	2,16	0,89–5,21	0,079	0,07948
Ki67_AshD	2,48	1,09–5,68	0,026	1,733
Imuninio atsako rodikliai				
CD8_t_S	0,31	0,11–0,82	0,013	48,57
CD8_t_NA	0,23	0,10–0,57	0,0005	7,678
CD8_SATB1_t_S	0,32	0,13–0,81	0,011	4,445
CD8_SATB1_t_NA	0,26	0,11–0,57	0,0004	2,045
Hipoksijos savybes atspindintys rodikliai				
HIF1 α %_S	0,43	0,15–1,26	0,11	0,1192
HIF1 α %_NA	0,46	0,16–1,35	0,15	0,01922

AshD – Ašmano D bimodališkumo rodiklis, *t* – tankis, *S* – stromos audinys, *NA* – naviko audinys.

PADĖKA

*„Didžiausias iššūkis gyvenime yra įveikti savo paties
(nusistatytas) ribas ir eiti taip toli, kaip niekada nebūtum nė
svajojęs.“*

PAUL GAUGUIN

Visų pirma, iš visos širdies noriu padėkoti prof. dr. Arvydui Laurinavičiui ir doc. dr. Aidai Laurinavičienei. Tik Jūs galėjote padėti man pasirinkti teisingą kryptį, o svarbiausia – neišklysti iš kelio. Ypač dėkoju už Jūsų vertingas pastabas ir neišsenkantį entuziazmą.

Visi, su kuriais susidūriau rašydama disertaciją, gali patvirtinti, kad bendraujant su manimi prireikė neįtikėtinai kantrybės, gebėjimo tikėti ir suprasti, jog doktorantas dirba nuolat, net kai, regis, mintimis būna išėjęs ar tiesiog įsispokojęs per langą. Tad noriu padėkoti visiems draugams, niekada nestokojusiems antgamtinio pakantumo, įkvėpusiems pasitikėjimo ir neapsakomai praturtinusiems mano gyvenimą.

Nuoširdžiai dėkoju visiems nepaprastiems Valstybinio patologijos centro kolegoms, kurie pasiūlė man savo draugystę ir pagalbą. Ypač ačiū imunohistochemijos ir mikrotomų merginoms, be kurių žinių ir neįkainojamos pagalbos šis darbas galbūt ir nebūtų išvydęs pasaulio šviesos. Atskirai noriu padėkoti doc. dr. Justinui Besuspariui už išsamias pirmąsias navikinio audinio pažinimo pamokas ir praktinius patarimus disertacijos rašymo klausimais. Dėkoju dr. Allanui Rasmussonui, tikram ekspertui, kurio užsispyrimo dėka turėjau galimybę išmokti rengti aukštos kokybės iliustracijas, mokslinius pranešimus ir straipsnius. Ačiū Renaldui Auguliui, tikram „stebukladariui“, kurio statistikos ir vaizdo analizių galimybės neribotos. Niekada nepamiršiu Tavo milžiniškos pagalbos rengiant šį darbą.

Galiausiai tariau ačiū beveik paskutinėms šiame sąrašė, bet toli gražu ne mano gyvenime: Enrikai, Daivai, Romualdai ir Vykai, kurios ant savo pečių nešė draugystės naštą. Negalėčiau prašyti Dievo geresnės palaikymo komandos, negu buvote Jūs.

Negaliu nepaminėti dar trijų nuostabių žmonių: Mamos, Tėčio ir Sesės, kurie darė viską, kas įmanoma, kad šį darbą parašyčiau. Esu Jums be galo dėkinga!

1-oji publikacija

IMMUNOGRADIENT INDICATORS FOR ANTITUMOR
RESPONSE ASSESSMENT BY AUTOMATED TUMOR-STROMA
INTERFACE ZONE DETECTION

Rasmusson A, Zilenaite D, Nestarenkaite A, Augulis R,
Laurinaviciene A, Ostapenko V, Poskus T, Laurinavicius A.

Am J Pathol, 2020; 190(6): 1309–1322.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.018>



MACHINE LEARNING, COMPUTATIONAL PATHOLOGY, AND BIOPHYSICAL IMAGING

Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection



Allan Rasmuson,^{*†} Dovile Zilenaite,^{*†} Ausrine Nestarenkaite,^{*†} Renaldas Augulis,^{*†} Aida Laurinaviciene,^{*†} Valerijus Ostapenko,[‡] Tomas Poskus,[§] and Arvydas Laurinavicius^{*†}

From the National Center of Pathology,^{*} Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Vilnius; the Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology,[†] Institute of Biomedical Sciences, and the Institute of Clinical Medicine,[‡] Faculty of Medicine, and the Institute of Biosciences,[§] Life Sciences Centre, and Vilnius University, Vilnius; and the National Cancer Institute,[§] Vilnius, Lithuania

Accepted for publication
January 28, 2020.

Address correspondence to
Allan Rasmuson, Ph.D.,
National Center of Pathology,
Affiliate of Vilnius University
Hospital Santaros Klinikos P.
Baublio str. 5, LT-08406 Vil-
nius, Lithuania. E-mail: allan.rasmuson@vpc.lt.

The distribution of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) within the tumor microenvironment provides strong prognostic value, which is increasingly important with the arrival of new immunotherapy modalities. Both visual and image analysis–based assays are developed to assess the immune contexture of the tumors. We propose an automated method based on grid subsampling of microscopy image analysis data to extract the tumor-stroma interface zone (IZ) of controlled width. The IZ is a ranking of tissue areas by their distance to the tumor edge, which is determined by a set of explicit rules. TIL density profiles across the IZ are used to compute a set of novel immunogradient indicators that reflect TIL gradient towards the tumor. We applied this method on CD8 immunohistochemistry images of surgically excised hormone receptor–positive breast and colorectal cancers to predict overall patient survival. In both cohorts, the immunogradient indicators enabled strong and independent prognostic stratification, outperforming clinical and pathologic variables. Patients with breast cancer with low immunogradient levels had a prominent decrease in survival probability 5 years after surgery. Our study provides proof of concept that data-driven, automated, operator-independent IZ sampling enables spatial immune response measurement in the tumor–host interaction frontline for prediction of disease outcomes. (*Am J Pathol* 2020, 190: 1309–1322; <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.018>)

One of the most prominent discoveries in modern genetics—analysis of the whole human genome sequence—has made it possible to determine specific genetic mutations associated with cancer. This determination has led to the definition of cancer as a cell disease caused by genetic mutations.^{1,2} Although genetic mechanisms explain many aspects of tumor progression, many hallmarks of cancer, including host immune and inflammatory response, angiogenesis, and metabolic disarrangements, evolve in the context of the tumor microenvironment (TME).³ In particular, a major driving force of local tumor–host tissue interactions are inflammatory and immune cell infiltrates. Solid tumors are infiltrated by both innate immunity cells (natural killer cells, macrophages, neutrophils, and phagocytes) and adaptive immunity cells (T lymphocytes, B lymphocytes, and dendritic cells).⁴ Recently, discoveries of

the mechanisms by which cancer cells inhibit host antitumor immune response and new immunomodulating therapies have shifted focus toward a search for antitumor immune response components and biomarkers.^{5,6}

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and their distributions within TME compartments have been reported as potential prognostic and predictive biomarkers in various types of cancer. Studies in clinical and experimental settings have revealed the prognostic role of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and FOXP3⁺ TILs in many types of solid human tumors,

Supported by European Social Fund project 09.3.3-LMT-K-712-01-0139 under grant agreement with the Research Council of Lithuania.

Disclosures: Vilnius University and A.L., A.R., D.Z., A.N., and R.A. submitted a Lithuanian patent (LT2019 509) for the invented immunogradient indicators.

such as melanoma, colorectal, breast, lung, bladder, prostate, renal, and hepatocellular carcinomas.^{5,7–10} Because TILs are represented by several subsets of T and B cells with complex interactions and roles, their assessment in the TME requires taking both functional and spatial aspects into account to understand their roles as major components of antitumor response.¹¹ A comprehensive study of colorectal cancer (CRC) immunome by Galon et al,¹² based on digital image analysis (DIA) of immunohistochemistry (IHC) slides, revealed that the densities of CD3⁺ and CD8⁺ TILs in the core tumor and the invasive margin (IM) correlate with the outcome of the disease. This discovery led to a clinically validated Immunoscore indicator, which was superior to the conventional TNM staging system.¹³ Recent studies have found prognostic and predictive value of high TIL infiltration in triple-negative and human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer (BC).^{14,15} Naturally, intratumoral T cells are considered an important cornerstone in the emerging concept of Immunogram—a comprehensive assessment of a patient’s antitumor response to guide immunotherapies in various cancers.^{16–18} The success of these studies has spawned into a search for novel image analytics methods, also benefiting from multiple immunofluorescence techniques, to develop combinatorial image biomarkers for colorectal, prostate, and renal cancer.^{19–21}

At the core of any method that aims to obtain a better understanding of tumor immune contexture is the task of quantifying the individual immune cell subtypes and their location relative to the tumor cells.^{8,22,23} The enumeration of immune cells in the TME implies not only accurate detection of the tumor and stroma regions but also a need for a clear and reproducible delineation of the IM.⁸ Regardless of whether visual or DIA methods for outlining the IM are applied, the definitions of the IM remain rather ambiguous. An early description of the IM configuration was proposed by Jass et al²⁴ in 1986, who studied histomorphologic prognostic indicators in rectal carcinoma and defined two different configurations of the IM: expansive (or pushing) and infiltrative. A pushing IM is identified visually when a clear delineation of the tumor and host tissue is possible during examination of the histologic slide. Tumors with an infiltrative IM configuration have a relatively irregular growth pattern in which it is difficult to delineate host tissue from tumor cell aggregates.^{24,25} Many other studies used the IM definition by Mlecnik et al²⁶: a 1-mm-wide area around the border separating the host tissue from malignant glands. However, this definition does not provide an explicit explanation of the border; it actually requires an expert’s judgment to manually draw it. This remains a source of bias because it leads to interobserver and intraobserver variance in tumors with irregular and highly infiltrative growth patterns, and it surely decreases the capacity of analysis, even if other analysis steps are automated. The only way to achieve a faster manual IM annotation is to simplify the IM shapes, which means leaving out the finer structural details. For instance, in the Immunoscore border, the stromal pathways within the

core tumor may not be included as part of the TME. Consequently, the informative power and clinical utility of TILs and other TME-context assays may be underachieved. Recently, Harder et al²⁰ applied a *tissue phenomics* approach to search for image-based biomarkers in their study of prostate cancer recurrence prediction. In particular, their DIA step used morphologic operations to automatically delineate tumor gland and stroma areas and subsequently sample the tumor border as a region reaching equally far to both tumor and stroma regions. Another recent study²⁷ proposed a data-driven method to discover immune contexture biomarkers; however, it included a manual step of tumor area delineation.

In this study, we present a novel set of immunogradient indicators based on a new method of automated grid-based extraction of the tumor-stroma interface zone (IZ). The method first identifies the tumor edge (TE) using a set of explicit rules based on IHC DIA data. Subsequently, the IZ is extracted and ranked by the distance around the TE to allow computing TIL density profiles across the IZ. The indicators, reflecting TIL density gravitation toward the tumor, were independent prognostic factors of better overall survival (OS) in patients with hormone receptor–positive BC and CRC

Materials and Methods

Study Population and Tumor Characteristics

This study was performed in BC and CRC cohorts. The BC cohort consisted of 102 patients diagnosed with early hormone receptor–positive invasive ductal breast carcinoma as described previously.^{28,29} Briefly, the patients were women aged 27 to 87 years (median age, 59 years) who underwent surgery in 2007 to 2009 at the National Cancer Institute of Lithuania and were investigated at the Lithuanian National Center of Pathology. The CRC specimens were obtained from 101 patients diagnosed with stage I to III of primary invasive adenocarcinoma and treated by surgical excision without preoperative therapy in 2010 at Vilnius University Hospital Santaros Clinics and investigated at the National Center of Pathology. The CRC cohort included 60 women and 41 men 45 to 89 years old (median age, 70 years). The clinicopathologic and follow-up characteristics of the BC and CRC patient cohorts are summarized in [Table 1](#).

The patient studies were approved by and performed in accordance with the guidelines stated by the Lithuanian Bioethics Committee (protocol number 40, April 26, 2007, update September 12, 2017, for the BC patient cohort; protocol numbers L-13-03/1 and L-13-03/2 for CRC patient cohort). Informed written consent was collected from all patients prior to inclusion in the study.

IHC

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was used for the study; tumor tissue samples that contained the maximum content of invasive tumor tissue (one formalin-fixed,

paraffin-embedded block per patient) were selected. The FFPE tissue sections were cut at 3- μm thickness and mounted on positively charged slides. IHC was performed by Roche Ventana BenchMark ULTRA automated slide stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Antibodies against cytotoxic T-cell marker CD8 (clone C8/144 B, Dako, Glostrup, Denmark; antibody dilution 1:400) was used followed by use of an ultraView Universal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems). The sections were counterstained with Mayer hematoxylin. Positive staining controls were performed in parallel using paraffin-embedded human tonsil tissue.

Image Acquisition and Analysis

The IHC slides were digitized at $\times 20$ magnification (0.5- μm resolution) using a ScanScope XT Slide Scanner (Leica Aperio Technologies, Vista, CA). DIA of the whole slide images was performed using HALO version 2.2.1870 (Indica Labs, Corrales, NM). Cancer-specific artificial intelligence tissue classifiers were trained using HALO AI module to segment tumor, stroma, and background (consisting of necrosis, artifacts, and glass) and tumor, stroma,

lymphoid follicles, necrosis, and background (consisting of glass and artifacts) in BC and CRC, respectively. Subsequently, the Multiplex IHC algorithm version 1.2 in HALO was used to detect and extract coordinates of cytoplasmic CD8⁺ cells. For quality assurance, all image analysis results were reviewed by a pathologist (A.Laurinavicius); three whole slide images were excluded because of the need to train a specific tissue classifier for the mucinous type of tumor histology. Examples of IHC and DIA analysis output images are presented in Figure 1, A and B.

TE Detection

The automated edge extraction uses the pixel-wise classification of the tissue by DIA (Figure 1, A and B). A hexagonal grid (hexagon side, 65 μm) is overlaid in a random position to subsample the DIA results (Figure 1C), as described in previous studies.^{28,29} Inside each hexagon, a set V of data variables (IHC-positive and IHC-negative cells counts and tissue class areas) is collected. For robustness to varying hexagon size, the method relies on area fractions inside the grid elements instead of absolute areas. Regardless of how many classes were identified by the classifier, only three area fractions are of interest here: tumor area fraction t , stroma area fraction s , and background area fraction b combined from the remaining classes extracted by DIA. Figure 1D illustrates area fractions (t , s , and b) as red, green, and blue, respectively.

For any grid hexagon, h , denote the lookup of data variable $v \in V$ as $v(h)$, for example, tumor area fraction as $t(h)$ or simply t when h is unambiguous. To identify hexagons with abrupt changes, the change in any $v \in V$ across the hexagonal grid is calculated using derivatives along the three hexagonal axes; d_v^x denotes derivative of variable v along axis x (at implicit hexagon h); for example, d_t^x is the change of tumor area fraction along x . Total change is given by the norm of the gradient $|\nabla_v(h)|$. Thus, the total change in tumor area fraction used for interface extraction is as follows (again omitting h):

$$|\nabla_t| = \sqrt{(d_t^x)^2 + (d_t^y)^2 + (d_t^z)^2}. \quad (1)$$

The numerical implementation of the hexagonal gradient is similar to the hexagonal gradients as calculated according to previous studies.^{30,31} However, whereas those methods used a linear combination among derivatives to optimize for computation speed, here all derivatives contribute to the gradient to maximize the level of detail extracted. In Figure 1E, $|\nabla_t|$ is overlaid in the red color channel and illustrates how it captures all changes of tumor.

For the extraction of the TE, only hexagons where the tumor area changes because of neighboring stroma regions are of interest. Thus, $|\nabla_t|$ is separated into a tumor-stroma part and a tumor-background part by weighting it with the relative changes in stroma and background area

Table 1 Patient and Tumor Clinicopathologic Characteristics

Characteristic	Breast cancer cohort	Colorectal cancer cohort
Patients, n	102	101
Age, years		
Median	59	70
Range	27–87	45–89
Sex, n (%)		
Female	102 (100)	60 (59.0)
Male	0	41 (41.0)
Follow-up, months		
Median	112	66
Range	17–121	2–75
Died, n (%)		
5-year follow-up	8 (7.8)	29 (28.7)
10-year follow-up	22 (21.6)	Not available
Histological grade, n (%)		
G1	23 (22.5)	5 (4.9)
G2	48 (47.1)	85 (84.2)
G3	31 (30.4)	11 (10.9)
Tumor invasion stage (pT), n (%)		
T1	56 (54.9)	5 (4.9)
T2	46 (45.1)	19 (18.8)
T3	0	62 (61.4)
T4	0	15 (14.9)
Lymph node metastasis status (pN), n (%)		
N0	55 (53.9)	57 (56.4)
N1	35 (34.3)	24 (23.8)
N2	9 (8.8)	19 (18.8)
N3	3 (2.9)	1 (1.0)

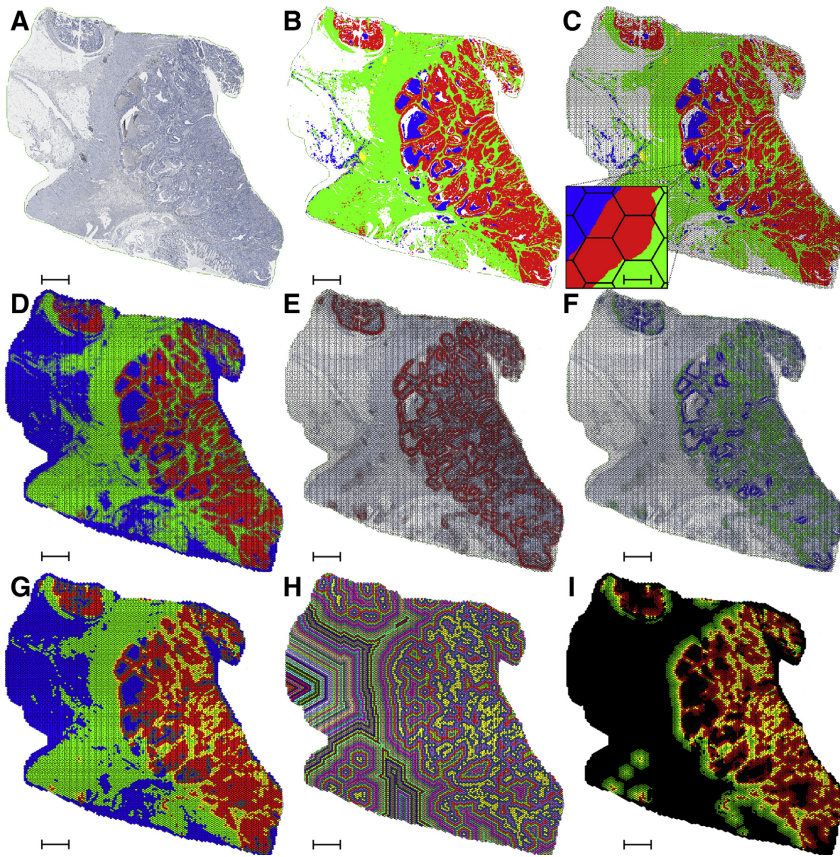


Figure 1 Tumor edge (TE) and interface zone (IZ) extraction steps. In general, tumor parts are red, stroma are green, and background is blue. **A:** Input whole slide image (colorectal cancer CD8⁺). **B:** Pixels classified by digital image analysis. **C:** Grid overlay; hexagon side length is 65 μm . **D:** Area fractions of tumor, stroma, and common background. **E:** Tumor changes (red). **F:** Tumor changes separated into tumor-stroma (green) and tumor-background (blue) changes. **G:** Extracted TE (yellow); gray is tumor-background interface, which is not part of TE. **H:** Random coloring of hexagonal distance to extracted edge (yellow). **I:** Tumor and stroma aspects of IZ nine hexagons wide (IZ₉). Total computation time for all steps is <2 hours. Scale bars: 2 mm (A–I); 65 μm (inset).

fractions. For d_x^t the relative changes in s and b are as follows:

$$s^{d_x^t} = d_x^t \frac{|d_x^t|}{\sum_{i \neq t} |d_x^i|} = d_x^t \frac{|d_x^t|}{|d_x^s| + |d_x^b|} \text{ and} \tag{2}$$

$$b^{d_x^t} = d_x^t \frac{|d_x^b|}{\sum_{i \neq t} |d_x^i|} = d_x^t \frac{|d_x^b|}{|d_x^s| + |d_x^b|}$$

The rationale is that if the amount of background area changes very little across some hexagons, any change in tumor area can be interpreted as being *caused* by change in stroma area and vice versa. Note that $s_x d_x^s + b_x d_x^b = d_x^t$ ensures

that no information is lost or added but merely separated. The separation weights are similar along y and z , and thus total change $|\nabla_t|$ can be separated by s and b :

$$|\nabla_t| = |\nabla_s^t + \nabla_b^t| \tag{3}$$

Figure 1F illustrates the separation of tumor changes into tumor-stroma and tumor-background changes on the hexagonal grid using

$$|\nabla_t| = \sqrt{(s_x d_x^t)^2 + (b_x d_x^t)^2} \tag{4}$$

as green and

$$|\nabla_i^b| = \sqrt{(\delta d_x^b)^2 + (\delta d_y^b)^2 + (\delta d_z^b)^2} \quad (5)$$

as blue.

To consistently classify the hexagons into tumor, stroma, background, TE, and tumor-background interface, the normalized tumor gradient, denoted $\nabla_i \in [0; 1]$, is used as a probability for whether a hexagon should be part of the TE. The complete set of steps for hexagon classification is as follows:

- i) Hexagons with abrupt changes in tumor area fraction are identified by testing if $\nabla_i > 0.5$. For all hexagons for which this is the case, the maximum of ∇_i^a and ∇_i^b will subsequently determine whether the hexagon is part of the TE or the tumor-background interface, respectively.
- ii) Hexagons not deemed part of the TE by step 1 are grouped into tumor, stroma, or background by the maximum of area fractions of t , s , and b because $t + s + b = 1$, where t, s , and $b \in [0; 1]$.
- iii) TE invasive regions are identified as hexagons classified as tumor or stroma in step 2 and where the tumor and stroma areas are of similar amount. Specifically, if $|t - s| < 0.25$ the hexagon is deemed part of the invasive areas of TE. Figure 1G shows the result of hexagon classification.

Tumor-Stroma IZ Extraction around the TE

Using a simple hexagonal distance transform, each hexagon's shortest distance to the extracted TE was computed. Figure 1H shows the hexagonal distances using a random color for each distance value. To identify the tumor and stroma aspects of the IZ, ranks are established. For any hexagon h ,

$$\text{rank}(h) \stackrel{\text{def}}{=} \begin{cases} \text{if class}(h) = \text{tumour}, & \text{rank} = \text{distance} \\ \text{if class}(h) = \text{stroma}, & \text{rank} = -\text{distance} \\ \text{if class}(h) = \text{TE}, & \text{rank} = 0 \\ \text{otherwise}, & \text{ignore hexagon } h \end{cases} \quad (6)$$

The extracted TE has rank 0; inside the tumor, the rank is simply the positive distance from TE, and in stroma, it is the negative distance. The remaining tissue classes (background and tumor-background) are not included in further analyses.

The IZ, now consisting of TE with adjacent tumor and stroma tissue, can be defined for different choices of width.

Here, IZ_w denotes IZ consisting of rank interval $[-\frac{w}{2}, \frac{w}{2}]$, where $[\]$ is rounding to nearest integer toward 0. Similarly, it is possible to define different widths of central TE by ranks. In this article only, $\text{TE} = \text{TE}_1$ consisting of r_0 and TE_3 consisting of ranks $[-1; 1]$ are relevant. Unless otherwise mentioned, TE refers to TE_1 . Figure 1I shows IZ_9 ; a nine-hexagon-wide IZ with tumor and stroma aspects labeled as red and green hexagons; their color intensity reflects distance to the yellow TE (with an implicit width of 1).

Computing Immunogradient Indicators in the IZ

Information about cell densities within and across the IZ can be computed by summarizing the hexagonal data values for each rank into rank quantities (Table 2). The rank quantities form a collective interface profile that reveals how cell densities (and other features) vary inside and across the IZ. Examples of CD8^+ cell density profiles are given for three tumors in Figure 2. An additional set of cases from both the BC and CRC cohorts illustrating the extracted IZ and immunogradient indicators in various tumor growth patterns and CD8^+ density profiles are included in Supplemental Figures S1–S12.

Table 2 Summary of Grid Data Variables, Rank Quantities, and Profile Indicators

Value	Formula	Statistical notation
Grid data variables		
Positive cell counts	Stain No.	CD8
Areas	$\text{Area} = \frac{\text{No. of pixels of tissue class}}{\text{pixels}/\mu\text{m}}$	T, S, and B
Area fractions	$\frac{\text{area of class}}{\text{hexagon area}}$	$t, s, \text{ and } b$
Cell density	$\frac{\text{No. of positive stains}}{T + S}$	CD8_d
Ranks and rank quantities		
r_i	Any rank in IZ of width w	$r_i \in \text{IZ}_9$ are $[r_{-4}, r_{-3}, \dots, r_3, r_4]$
$q(r_i)$	A statistic of hexagons in r_i	Simple q 's are mean and sd
	Mean of CD8 density in r_2	CD8_mean (r_2)
	Mean CD8 in tumor aspect	CD8_mean_T
Profile indicators		
CM	$\text{CM}(q) = \frac{\sum_i r_i q(r_i)}{\sum_i q(r_i)}$	CD8_CM_mean
ID	$\text{ID}(q) = q(r_{-1})/q(r_1)$	CD8_ID_mean

CM, center of mass; ID, immunodrop; IZ, interface zone.

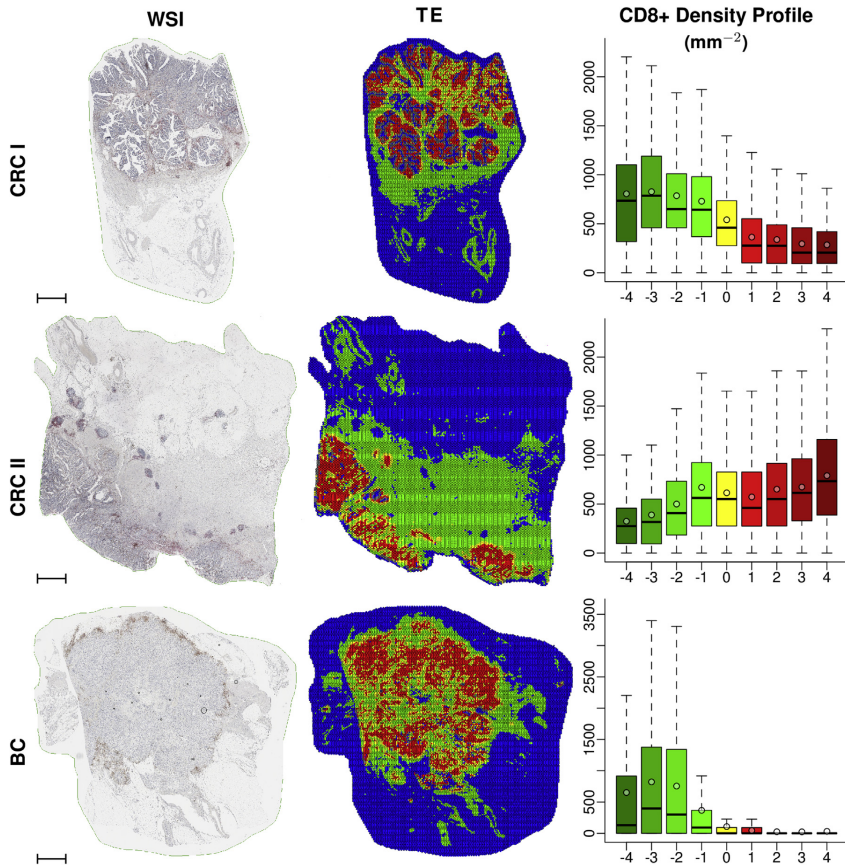


Figure 2 CD8 cell density profiles. Scanned whole slide images (WSIs) of stained tissue (left). Extracted tumor edge (TE) is in yellow, stroma is in green, tumor is in red, and background is in blue, which clearly illustrates the difficulties one would have to manually delineate an accurate margin around the tumor-stroma interface (center). Interface zone (IZ) for nine hexagons centered at the yellow TE (right). The box-whisker plot represents mean, median, and variance of the cell density within each of the ranks from -4 to 4 . The ranks are colored according to both tissue aspects and distance to TE. Hexagon side length was $65 \mu\text{m}$. BC, breast cancer; CRC, colorectal cancer. Scale bars = 2 mm .

To express the properties of directional variance (gradient) from stroma to tumor aspect, profile indicators can be calculated. Several indicators of cell density variance within and across the IZ were tested for statistical power to predict OS of the patients. Two cell density indicators were found to be the most powerful:

Center of Mass

Center of mass (CM) was calculated as follows:

$$CM(q) = \frac{\sum r_i q(r_i)}{\sum q(r_i)}, \tag{7}$$

where r_i indexes all ranks in the IZ, for example, $r_i \in [-4; 4]$ for IZ_9 , and $q(r_i)$ denotes choice of rank quantity, for example, mean of $CD8^+$ cell density. The CM calculates a coordinate along the horizontal axis under which one would have to support the profile for it to remain in perfect horizontal balance. Conversely, it can be understood as a measure of which part of the interface a biomarker gravitates (or has a positive gradient) toward.

ID

Immunodrop (ID) was calculated as follows:

$$ID(q) = \frac{q(r_{-1})}{q(r_1)} \quad (8)$$

This indicator represents abrupt change in the cell density in the immediate vicinity of the TE and is calculated as the ratio of the quantities in ranks -1 and 1 . Because an abrupt decrease in CD8⁺ cell density from rank -1 to rank 1 was frequently observed, the indicator was named *immunodrop*.

All data values v , rank quantities q , and profile indicators are summarized in Table 2. The total computation time for the image analysis of the whole slide images and the extraction of the TE and IZ for computation of the final indicators was less than 2 hours per case. Summary statistics of CM, ID, and IZ densities are presented in Table 3 for BC and CRC using IZ width of nine and three hexagons, respectively.

Statistical Analysis

After initial analyses, one CRC and five BC samples with tumor areas in the whole slide image $<4.5 \text{ mm}^2$ were found too small to extract sufficient IZ data; therefore, these cases were excluded from further analyses. The distributions of CD8⁺ cell counts and densities revealed left asymmetry; therefore, logarithm-transformed values were used for parametric statistics (for the sake of readability, the prefix log is not used in the text or graphs). Summary statistics and distribution analyses were performed with significance tests based on one-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc tests for pairwise comparisons, and a two-sided Welch *t*-test was used to compare homogeneity of variances. Factor analysis was performed using the factoring method of principal component analysis; factors were retained based on the threshold of the eigenvalue of 1. General orthomax rotation of the initial factors was performed. The software tool Cutoff Finder version 2.1 (Charité University, Berlin, Germany)³² was used to determine a cutoff value for each indicator to test univariate and multiple predictions of OS. The OS distributions for the

patients were estimated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used to assess the statistical significance of differences between the stratified groups.

Regression analysis of the OS data was performed using a Cox proportional hazards regression model obtained by a stepwise likelihood ratio test procedure to analyze the independent prognostic significance of TIL density indicators in the context of clinicopathologic variables. For both cohorts, the best representable subset of variables was found using leave-one-out cross-validation. To investigate the combined power of CD8 density and CD8 gradient variables, a second model was obtained by replacing the immunogradient CD8 variables with the aggregated IZ CD8⁺ cell response factor; see models 1 and 2 in Table 4.

The TE extraction and computation of hexagonal data variables were implemented in C++ (g++ 7.3.8), using libtiff version 5.2.4 (<https://www.libtiff.org>) and Boost version 1.67 (<https://www.boost.org>). SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) was used to perform statistical analyses. Plots were produced using R software version 3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Data tables with raw data and TE and immunogradient results are available for both the BC and CRC cohorts, including all subsampled hexagonal grids, extracted hexagonal variables, pathologic variables, and survival data. The tables can be downloaded from Vilnius University research storage (<https://www.midat.lt/action/resources/790c85e2-f6e5-4db3-9d55-69bb6527b6a3>, last accessed January 30, 2020).

Results

Summary Statistics of CD8⁺ Cell Density Indicators in the IZ

A total of 102 BC and 101 CRC samples were used to explore the prognostic power of the CD8⁺ cell densities in

Table 3 Summary Statistics of CD8 Density Indicators

Immunogradient indicators (CD8 ⁺ cell density, cells/mm ²)	BC			CRC		
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD
CD8_CM_mean	-1.06	-1.18	0.81	-0.38	-0.37	0.15
CD8_CM_sd	-1.16	-1.25	0.54	-0.30	-0.29	0.12
CD8_ID_mean	4.53	3.23	5.33	4.94	3.61	3.61
CD8_mean_S	208.52	154.10	198.42	251.67	210.81	216.35
CD8_sd_S	365.48	315.74	234.20	313.28	283.19	174.72
CD8_mean_TE	147.64	109.12	164.55	178.01	123.30	194.66
CD8_sd_TE	257.86	212.61	159.14	244.58	213.62	166.54
CD8_mean_T	71.13	39.93	84.60	93.74	49.11	137.14
CD8_sd_T	116.37	95.91	87.66	122.60	102.73	91.06

The interface zone (IZ) and tumor edge (TE) settings were IZ₉ (nine hexagons wide) and TE₃ (3 hexagons wide) for the breast cancer (BC) cohort and IZ₃ and TE₃ for the colorectal cancer (CRC) cohort. CD8_mean and CD8_sd are summarized in the stroma aspect (S), TE, and tumor (T) aspects, respectively. $n = 102$ BC; $n = 101$ CRC.

BC, breast cancer; CD8_CM_mean, center of mass for CD8 density by mean in ranks; CD8_CM_sd, center of mass for CD8 by variance in ranks; CD8_ID_mean, immunodrop of mean density; CRC, colorectal cancer.

Table 4 Multivariate Cox Proportional Hazards Regression Analysis with the CD8⁺ Cell Density (CD8) Indicators and Their Factor Scores in IZ₉ with TE₃ for the Cohort of Patients with BC and in IZ₃ with TE₁ for the Cohort of Patients with CRC

BC			CRC		
Model 1 (LR = 18.20, P = 0.0004)			Model 1 (LR = 22.54, P < 0.0001)		
	HR (95% CI)	P value		HR (95% CI)	P value
pN status (N0 vs N1–3)	2.61 (1.03–6.62)	0.0428	Age group by median	2.04 (1.15–4.09)	0.0453
CD8_CM_mean	0.33 (0.13–0.84)	0.0207	pT stage (T1–2 vs T3–4)	6.22 (1.48–26.21)	0.0128
CD8_mean_T	0.05 (0.01–0.28)	0.0005	CD8_CM_mean	0.39 (0.20–0.77)	0.0071
Model 2 (LR = 15.36, P = 0.0005)			Model 2 (LR = 21.58, P < 0.0001)		
pN status (N0 vs N1–3)	2.40 (1.01–5.72)	0.0488	Age group by median age	2.24 (1.12–4.50)	0.0235
Aggregated IZ CD8 ⁺ cell response factor	0.23 (0.1–0.53)	0.0007	pT stage (T1–2 vs T3–4) and aggregated IZ CD8 ⁺ cell response factor	5.25 (1.22–22.61) and 0.41 (0.19–0.87)	0.0260 and 0.0196

n = 102 BC; n = 101 CRC.

BC, breast cancer; CD8_CM_mean, center of mass for mean density; CD8_CM_sd, center of mass for density variance, CD8_ID_mean, immunodrop of mean CD8 density; CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio; IZ, interface zone (numbers indicate number of hexagons); LR, likelihood ratio; S, stroma; T, tumor; TE, tumor edge.

the stroma aspect, TE, and tumor aspect of the IZ and the density profiles across it. The density profile indicators included CM and ID. IZ widths of three, five, seven, and nine hexagons, indicated as IZ₃, IZ₅, IZ₇, and IZ₉, respectively, were tested with TE width of both 1 (TE₁) and 3 (TE₃). The most significant prognostic stratifications were achieved in IZ₉ with TE₃ for BC and in IZ₃ with TE₁ for the CRC samples. The relevant summary statistics of the indicators are presented in Table 3.

The distribution of CD8⁺ cells within the IZ was similar in both cancers: the densities were highest and most dispersed in the stroma aspect, less abundant and dispersed within the TE (both TE₁ and TE₃), and lowest and less dispersed in the tumor aspect of the IZ (P < 0.05) (Table 3). Importantly, in both patient cohorts, a trend of IZ CD8⁺ cell density decrease toward the tumor aspect was observed (Figure 3).

Factor Analysis of the IZ CD8⁺ Cell Density Indicators

Two orthogonally independent factors of IZ CD8⁺ cell density indicators were extracted for both the BC and CRC cohort (Figure 4). Altogether, the two factors explained 90.92% and 95.64% of the variance in the data set in BC and CRC, respectively, and the factor patterns were similar between the cohorts. Factor 1 was characterized by strong positive loadings of the variables that reflected the level of CD8⁺ density within all IZ aspects and was therefore interpreted as the IZ CD8⁺ density level factor, also referred to as CD8⁺ density factor. Factor 2 was characterized by strong positive loadings of CM for both means and SDs of the CD8⁺ densities and strong negative loading of the ID indicator and thus represents the CD8⁺ density change across the IZ. Higher values of factor 2 scores reflect increasing CD8⁺ densities toward the tumor aspect of the

interface; therefore, factor 2 can be interpreted as the IZ CD8⁺ density gradient, more specifically IZ CD8⁺ density gradient toward tumor, also referred to as CD8⁺ gradient factor. Because both factors may represent important (although independent) properties of the immune response, the sum of factor 1 and factor 2 scores were computed as aggregated IZ CD8⁺ cell response factor to test their combined prognostic power.

Prognostic Value of the IZ CD8⁺ Cell Density and Gradient Indicators

Patient OS probability stratifications based on univariate Kaplan-Meier analyses are presented in Figure 5, and prognostic models obtained by multiple Cox proportional hazards regression analyses are presented in Table 4. Two models were investigated for both cohorts: model 1 used the set of IZ CD8⁺ cell density indicators along with the clinicopathologic variables, and model 2 replaced the IZ CD8⁺ cell density indicators with the aggregated IZ CD8⁺ factor score. The models in both patient cohorts were essentially similar, but the indicators derived from a wider IZ₉ with TE₃ were more informative for the patients in the BC cohort, whereas a narrow IZ₃ with TE₁ provided better prognostic stratification of the patients in the CRC cohort. In the BC cohort, better OS was predicted by the CM for the CD8⁺ mean density and mean of the CD8⁺ density in the tumor aspect of the IZ (model 1) as well as the aggregated IZ CD8⁺ cell response factor (model 2) in the context of worse OS predicted by pN status. For the patients in the CRC cohort, model 1 included the CM for the CD8⁺ mean density indicator to predict better OS; in model 2, the aggregated IZ CD8⁺ cell response factor predicted better OS in the context of worse OS predicted by the patient age and pT status. Importantly, the models

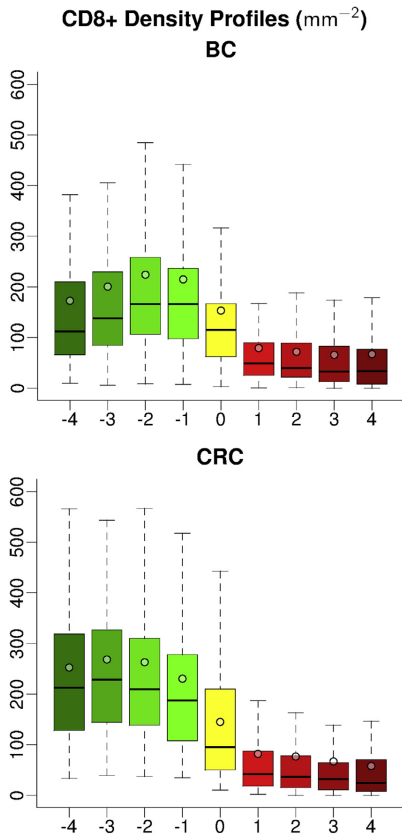


Figure 3 Overall CD8⁺ density profiles in the cohorts of patients with breast cancer (BC) and colorectal cancer (CRC). Box-whisker plots illustrate mean densities per square millimeter plotted against interface zone (IZ) ranks. The colors reflect stroma (green) and tumor (red) aspects of the nine-hexagon-wide IZ, and their intensity reflects the distance to the tumor edge (yellow). In the box plots, the upper and lower hinges indicate the 25th and 75th percentiles, the line indicates the median, and the dot indicates the mean value.

in both BC and CRC revealed strong independent prognostic value of the IZ CD8⁺ density indicators measuring the density gradient toward the tumor aspect alone or in combination with absolute density of CD8⁺ infiltrate in the IZ expressed as the aggregated IZ CD8⁺ cell response factor score.

Discussion

Our study found that automated detection of the tumor-stroma IZ in digital microscopy images of tumor tissues

with extraction of immune cell density profiles provides novel indicators to assess antitumor immune response in the very frontline of tumor-host interaction. Although the IZ in our method is similar to the concept of IM commonly used in pathology and defined in previous DIA studies,^{22,23,33–36} essential differences should be emphasized: i) the IZ detection is completely data driven and independent of arbitrary visual evaluation; ii) the transition from stroma to tumor is achieved by spatial ranks within the IZ, which enables computation of immune cell density

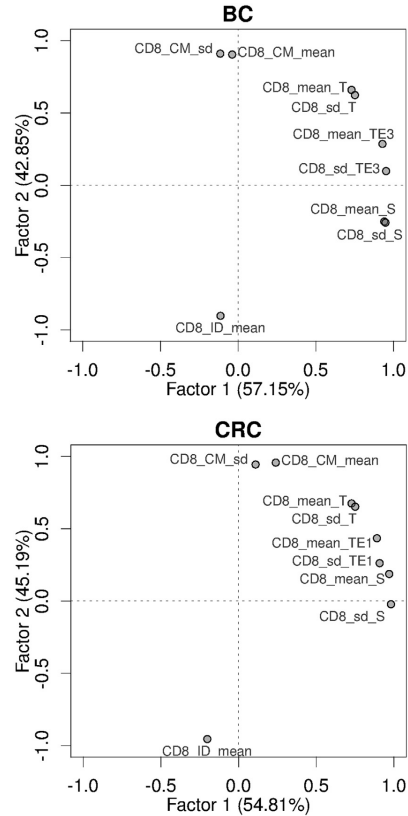


Figure 4 Rotated factor pattern of CD8⁺ cell density indicators for the breast cancer (BC) cohort with the nine-hexagon-wide interface zone (IZ₉) and three-hexagon-wide tumor edge (TE₃) (left) and the colorectal cancer (CRC) cohort using IZ₃ and TE₁ (right). Log-transformed indicators were used except for center of mass for mean density (CD8_CM_mean) and center of mass for density variance (CD8_CM_sd). Factor 1 was interpreted as the IZ CD8⁺ density level factor and factor 2 as IZ CD8⁺ density gradient factor. n = 102 BC; n = 101 CRC. CD8_ID_mean, immunodrop of mean density; CD8_mean_S, mean in stroma aspect of IZ (similar for tumor aspect T); CD8_sd_S, SD in stroma aspect of IZ (similar for tumor aspect T).

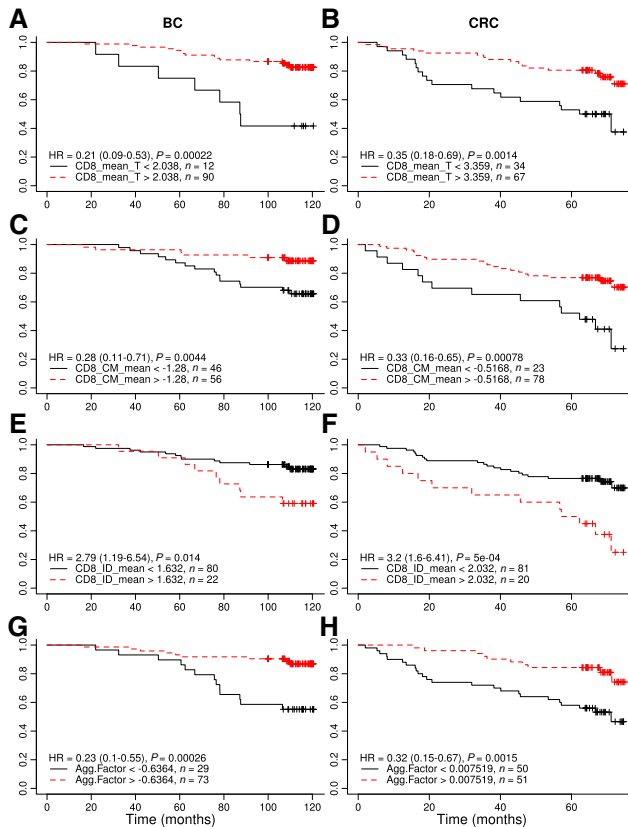


Figure 5 Kaplan-Meier survival curves representing the association of overall survival in the cohort of patients with breast cancer (BC) (left) and the cohort of patients with colorectal cancer (CRC) (right) with CD8⁺ cell density (CD8) indicators. Hazard ratio (HR) is shown with 95% CI in parentheses. **A** and **B**: Mean density in the tumor aspect (CD8_mean_T) of nine-hexagon-wide interface zone (IZ₉) or three-hexagon-wide interface zone (IZ₃), respectively. **C** and **D**: Center of mass for density (CD8_CM_mean) in IZ₉ or IZ₃, respectively. **E** and **F**: Immunodrop of density (CD8_ID_mean) in IZ₉ or IZ₃, respectively. **G** and **H**: Aggregated CD8⁺ cell response factor (Agg.Factor) scores in IZ₉ or IZ₃, respectively. All indicators are log-transformed, except CD8_CM_mean and Agg.Factor.

indicators across the IZ to reflect the stroma-to-tumor gradient of the infiltrates; and iii) the grid subsampling allows consideration of the variance of the indicators within each rank of the IZ. The set of immunogradient indicators provides strong and independent prognostic stratification in the BC and CRC patient cohorts. Importantly, the proposed method is flexible and can be adapted for various assays of inflammatory and immune response in tumor and nontumor pathology.

Our method uses systematic grid-based subsampling with explicit data-driven rules to extract and rank the tumor-stroma transition area from digital images of microscopy slides; in essence, the probability of interfacedness is computed. In comparison, current DIA platforms, for instance, Indica Labs HALO and QuPath (Queen's University, Belfast, Northern Ireland), only provide the option to select a fixed-width margin along a hand-drawn line around the region of interest.^{37,38} In addition, the

Immunoscore procedure presumably depends on a manual annotation of IM,^{12,13,33,36} and most immune profiling studies were based on manual delineation of IM from the core tumor.^{39–41} A manual IM annotation step is time-consuming and may cause bias because of inevitable intra-observer and interobserver variability. For example, manual IM delineation discrepancies are very likely in tumors with irregular growth patterns, including tumor budding features.^{42,43} In contrast, our approach is entirely data driven and independent of arbitrary visual evaluation. Instead of providing only a crude high-level outline between tumor and stroma regions or seeking to delicately delineate every tumor cell conglomerate, our method evaluates grid-subsampled tissue areas to represent the tumor-host interface and its spatial vicinity to the tumor or host aspect of the interface. Consequently, it is less dependent on a specific tumor growth pattern and captures the IZ in tumors with pushing and/or infiltrative IM, even in cases with very

Table 5 Univariate Kaplan-Meier Analysis with the CD8⁺ Cell Density (CD8) Indicators and Their Factor Scores in IZ₁ with TE₃ for the Cohort of Patients with BC and in IZ₃ with TE₁ for the Cohort of Patients with CRC,

IZ indicators and clinicopathologic variables	BC		CRC	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
CD8_CM_mean	0.28 (0.11–0.71)	0.0044	0.33 (0.16–0.65)	0.0008
CD8_CM_sd	0.39 (0.13–1.14)	0.0740	0.41 (0.20–0.81)	0.0077
CD8_mean_S	0.43 (0.15–1.27)	0.1200	0.11 (0.01–0.80)	0.0080
CD8_sd_S	0.40 (0.14–1.18)	0.0860	0.41 (0.20–0.86)	0.0140
CD8_mean_TE	0.38 (0.16–0.91)	0.0250	0.27 (0.09–0.76)	0.0076
CD8_sd_TE	0.34 (0.12–1.01)	0.0420	0.44 (0.21–0.93)	0.0260
CD8_mean_T	0.21 (0.09–0.53)	0.0002	0.35 (0.18–0.69)	0.0014
CD8_sd_T	0.26 (0.10–0.66)	0.0024	0.39 (0.20–0.76)	0.0044
CD8 ⁺ density factor	0.31 (0.11–0.84)	0.0140	0.43 (0.20–0.96)	0.0330
CD8 ⁺ gradient factor	0.34 (0.14–0.84)	0.0140	0.35 (0.18–0.70)	0.0018
Aggregated IZ CD8 factor	0.23 (0.10–0.55)	0.0003	0.32 (0.15–0.67)	0.0015
G stage (G1–2 vs G3)	1.40 (0.59–3.33)	0.4523	0.95 (0.85–1.06)	0.3379
T stage (T1–2 vs T3–4)	1.19 (0.52–2.75)	0.6786	6.47 (1.55–27.10)	0.0106
N status (N0 vs N1–3)	2.30 (0.97–5.49)	0.0598	1.01 (1.00–1.02)	0.0214
Age group by median age	2.63 (1.07–6.46)	0.0347	1.86 (0.93–3.71)	0.0793
Sex	Not applicable		1.56 (0.79–3.05)	0.1974

n = 102 BC; *n* = 101 CRC.

BC, breast cancer; CD8_CM_mean, center of mass for mean density; CD8_CM_sd, center of mass for density variance; CD8_ID_mean, immunodrop of mean CD8 density; CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio; IZ, interface zone (numbers indicate number of hexagons); S, stroma; T, tumor; TE, tumor edge.

irregular infiltrating growth patterns and budding phenomena.

Besides detecting the TE, the proposed method provides the important advantage of adjustable width of the IZ and spatial ranking the stroma and tumor aspects within the IZ. This method enables computation of IZ profile indicators, in particular immune cell density indicators that reflect directional properties (gradient) of the infiltrates. The flexibility in IZ ranking and compartmentalization of tissue aspects are of particular interest because the choice of IM width is not consistent throughout individual studies. The international immuno-oncology biomarkers working group defined IM as a region of 1-mm width centered on the border between tumor and immune cells as proposed by other investigators.^{22,23,33} Other studies reported prognostic significance of high TIL density for different widths of the IM region. For example, Lechner et al³⁴ used an IM that ranged from 50 μ m within the tumor to 300 μ m outside the tumor border in head and neck squamous cell carcinoma; Bordry et al³⁵ defined the IM as a tumor region of approximately 400- μ m width between the tumor and the reticular dermis in primary melanoma. Hermitte³⁶ defined the IM as a region with a span of 360 μ m into the healthy tissue and 360 μ m into the tumor in CRC. Another study found a survival benefit for patients with BC and high TIL densities within the 0- to 10- μ m distance from a manually outlined tumor border.⁴⁴ These findings suggest that only TIL in close contact with the tumor cells deliver direct and potent anti-tumor effects.³⁵ Consequently, TIL densities measured in narrow IM regions can provide more precise prognostic markers compared with those based on wider IM or global

tumor or stroma sampling. Our grid-based technique allows flexibility in analysis settings to adjust the resolution of tissue area sampling and IZ sampling width. We tested various analysis settings in our study with similar results. The best prognostic models were achieved with relatively wide IZ in BC and narrow IZ in CRC, which may be explained by the need to sample larger IZ in hormone receptor–positive BC with relatively sparse TILs to obtain sufficient data for the immunogradient indicators.

Several recent studies applied common DIA morphologic operations to automatically delineate tumor cell clusters and stroma. Harder et al²⁰ performed comprehensive screening of immune contexture signatures to predict disease recurrence in 90 patients with prostate cancer. They used morphologic operations to smoothen and dilate the tumor regions into the stroma. Subsequently, they defined the tumor border as a region that reaches equally far to the inside and outside of the tumor region (total width of 112.5 μ m) as well as two TME zones inside the stroma, effectively extracting three transition zones. A large set of density and distance indicators were computed for CD3⁺, CD8⁺, CD34⁺, CD68⁺, and CD163⁺ cells *within* each transition zone. Their best prognostic indicators expressed the ratio of different biomarkers within the transition zones (best candidate being the CD8/CD34 ratio); however, none of their selected significant indicators in prostate cancer represented a biomarker density profile across the transition zones (gradient) properties. Li et al⁴⁵ investigated spatial aspects of CD8⁺ cell infiltration into tumor cell clusters in 28 patients with triple-negative BC. Although they performed manual delineation of the IM, their study also

included an automated tumor cell boundary detection based on pan-cytokeratin fluorescence images. This method allowed them to measure CD8⁺ pixel ratios across the boundary to explore potential factors of TIL motility by mathematical modeling, and they concluded that chemokines rather than dense collagen fibers prevent TILs from entering the tumor cell clusters. In both studies, the tumor-stroma delineation within the TME goes beyond the classic IM concept, which is similar to our definition of the IZ. However, the IZ is based on grid-based subsampling of the relevant tissue classes and is less dependent on the individual tumor growth pattern and precision in segmenting individual tumor cells; also, it is not forced to be a ribbon of a fixed width in a two-dimensional image of an actual three-dimensional interface.

We explored the prognostic value of the immune cell density profiles in the IZ in the BC and CRC cohorts, which led to a set of immunogradient indicators that enabled strong and independent prognostic stratification in both patient cohorts. We tested various analysis settings to generate the most informative prognostic models for each of the cohorts and found that a relatively narrow IZ generated more powerful prognostic models for CRC, whereas BC benefited from broader IZ data collection. Remarkably, in both the BC and CRC cohorts, it was found that the indicators revealing a gravitation of CD8⁺ cells toward the tumor aspect within the IZ were independent predictors of better OS. In particular, the CM indicator, which cumulatively reflects the gradient of CD8⁺ cells toward the tumor within the IZ, was strongly associated with better OS in both patient cohorts. Similarly, the ID indicator, which reflects an abrupt decrease in CD8⁺ cell density in the tumor aspect of the IZ in the nearest vicinity of the TE, was associated with worse OS. By definition, the ID is independent of the width of the IZ because it always represents the narrowest (IZ₃) sampling. Therefore, this indicator may perform better in cases of low tumor content or core biopsy samples in which tumor aspect ranking can be limited.

The indicators that reflect the spatial shift of the IZ CD8⁺ cells toward the tumor revealed added prognostic value to the density of IZ CD8⁺ cells per se. TIL densities and their ratios in the global or remaining tumor and stroma areas were less informative (data not shown). Both IZ CD8⁺ density level and IZ CD8⁺ density gradient factor scores, although orthogonally independent, were significantly associated in univariate analyses with better OS in both the BC and CRC patients (Tables 4 and 5, and Figure 5, A–F). Furthermore, the aggregated IZ CD8⁺ cell response factor, obtained by the sum of the two factor scores, was an independent prognostic marker of OS in both patient cohorts. This finding indicates that combining absolute density and gradient aspects of the immune cell infiltrates across the IZ may provide added prognostic value of the image-based biomarker of antitumor immune response. Indeed, the aggregated IZ CD8⁺ factor allowed dichotomization of the patients with CRC into prognostic groups with 5-year OS probability of 82% and 58% (Figure 5H), which is similar to

the patients with CRC dichotomized by Immunoscore based on CD3 and CD8 IHC as reported by Pages et al.⁴⁶

Remarkably, a good prognostic stratification was achieved in early hormone receptor–positive BC, which is a relatively indolent disease without an established role for immune response. Furthermore, a prominent time-dependent effect was discovered in the prognostic stratification of the patients with BC (Figure 5): >92% of the patients were alive after 5 years from surgery in both groups. However, the OS curves diverged sharply at this inflection point to end at 87% and 55% OS probability after 10 years in the patients with high and low aggregated IZ CD8⁺ cell response factor scores, respectively. Of note, this time-dependent effect is revealed only with the gradient-type indicators (Figure 5, C, E, and G) but not in the stratification by the CD8⁺ cell mean density on tumor aspect of the IZ (Figure 5A). This finding emphasizes the potential of the immunogradient indicators, obtained from a surgical excision sample and stained for a single CD8⁺ IHC, to predict long-term prognosis of patients with this relatively well-managed disease. Furthermore, it implies that antitumor immune response properties, which potentially determine the long-term outcome of the disease, are encoded in the TME and captured by the immunogradient assay. A biologic interpretation of this phenomenon leads to the hypothesis that the individual immune response properties are established in the early stages of BC and are critical to reach full recovery without remaining dormant cancer cells under standard therapies. Subsequently, this finding raises the question of whether patients with hormone receptor–positive BC with low immunogradient scores could benefit from immunotherapy at some point.

In this study, we present proof of concept and a detailed description of a new method that provides prognostic value in two independent but relatively small patient cohorts. Large-scale studies are needed to further optimize the analysis settings and to establish clinical utility of the immunogradient indicators for various cancer types and prognostic tasks. In addition, direct, in-depth comparisons to existing methods should be performed in appropriately designed studies with all methods applied to the same patient cohorts.

In conclusion, our study demonstrates the potential of high-capacity, automated, and data-driven sampling of tumor-stroma interfaces in microscopy images to extract novel, clinically useful indicators of antitumor immune response. The IZ immunogradient enables strong and independent prognostic stratification of patients with BC and CRC, with prominent divergence of OS probability in patients with hormone receptor–positive BC 5 years after surgery.

Acknowledgments

A.R. and A.L. constructed the interface zone extraction rules; A.R., D.Z., and R.A. implemented the interface zone

extraction rules; A.R., D.Z., A.N., R.A., and A.L. performed statistical analyses; A.R., in collaboration with D.Z., A.N., and A.L., drafted essential parts of the manuscript; A.R., D.Z., A.N., V.O., T.P., and A.L. reviewed and edited the manuscript; all authors participated in conception and design of the study, data analysis, and critical revision and approval of the final manuscript.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.018>.

References

- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: The cancer genome. *Nature* 2009, 458:719–724
- Wong KM, Hudson TJ, McPherson JD: Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011, 12:407–430
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144:646–674
- Whiteside TL: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008, 27:5904–5912
- Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, Baras AS, Patel SS, Anders RA, Rimm DL, Cimino-Mathews A: Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol* 2018, 31:214–234
- Parra ER, Francisco-Cruz A, Wistuba IF: State-of-the-art of profiling immune contexture in the era of multiplexed staining and digital analysis to study paraffin tumor tissues. *Cancers (Basel)* 2019, 11: E247
- Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420: 860–867
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012, 12:298–306
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Amb S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC: Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000, 60:3333–3337
- Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A: T lymphocyte subsets in cancer immunity: friends or foes. *J Leukoc Biol* 2019, 105:243–255
- Rosenberg SA, Restifo NP: Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015, 348:62–68
- Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al: Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012, 10:205
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al: Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014, 232:199–209
- Jang N, Kwon HJ, Park MH, Kang SH, Bae YK: Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocyte density assessed using a standardized method based on molecular subtypes and adjuvant chemotherapy in invasive breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2018, 25:937–946
- Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budzies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, Pitzner BM, Kummel S, Engels K, Schneeweiss A, Hartmann A, Noske A, Fasching PA, Jackisch C, van Mackelenbergh M, Sinn P, Schem C, Hantusch C, Untch M, Loibl S: Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018, 19:40–50
- van Dijk N, Funt SA, Blank CU, Powles T, Rosenberg JE, van der Heijden MS: The cancer immunogram as a framework for personalized immunotherapy in urothelial cancer. *Eur Urol* 2019, 75:435–444
- Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, Hosoi A, Matsushita H, Morishita Y, Kashiwabara K, Takazawa M, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J: An immunogram for the cancer-immunity cycle: towards personalized immunotherapy of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2017, 12:791–803
- Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN: Cancer immunology: the "cancer immunogram". *Science* 2016, 352:658–660
- Guo C, Zhao H, Wang Y, Bai S, Yang Z, Wei F, Ren X: Prognostic value of the neo-immunoscore in renal cell carcinoma. *Front Oncol* 2019, 9:439
- Harder N, Athellogou M, Hessel H, Brieu N, Yigitsoy M, Zimmermann J, Baatz M, Buchner A, Stief CG, Kirchner T, Binnig G, Schmidt G, Huss R: Tissue phenomics for prognostic biomarker discovery in low- and intermediate-risk prostate cancer. *Sci Rep* 2018, 8:4470
- Nearchou IP, Lillard K, Gavriel CG, Ueno H, Harrison DJ, Caie PD: automated analysis of lymphocytic infiltration, tumor budding, and their spatial relationship improves prognostic accuracy in colorectal cancer. *Cancer Immunol Res* 2019, 7:609–620
- 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, 24:235–251
- 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 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, 24:311–335
- Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, Todd IP: The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986, 10:437–459
- Jass JR, Love SB, Northover JM: A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987, 1:1303–1306
- Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, Church SE, Maby P, Vasaturo A, Angelova M, Fredriksen T, Mauer S, Waldner M, Berger A, Speicher MR, Pages F, Valge-Archer V, Galon J: The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* 2016, 8:327ra26
- Schwen LO, Andersson E, Korski K, Weiss N, Haase S, Gaire F, Hahn HK, Homeyer A, Grimm O: Data-driven discovery of immune contexture biomarkers. *Front Oncol* 2018, 8:627
- Laurinavicius A, Green AR, Laurinaviciene A, Smalyte G, Ostapenko V, Meskauskas R, Ellis IO: Ki67/SATB1 ratio is an independent prognostic factor of overall survival in patients with early hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. *Oncotarget* 2015, 6:41134–41145
- Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaitis S, Lazutka J: Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol* 2012, 7:27
- Coleman S, Scotney B, Gardiner B: Tri-directional gradient operators for hexagonal image processing. *J Vis Commun Image Represent* 2016, 38:614–626
- Middleton L, Sivaswamy J: Edge detection in a hexagonal-image processing framework. *Image Vis Comput* 2001, 19:1071–1081

32. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C: Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012, 7:e51862
33. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindouh F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006, 313:1960–1964
34. Lechner A, Schlosser H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, Zentis P, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Wennhold K, Garcia-Marquez M, Tharun L, Quaas A, Schauss A, Isensee J, Hucho T, Huebbers C, von Bergwelt-Baildon M, Beutner D: Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017, 8:44418–44433
35. Bordry N, Broggi MAS, de Jonge K, Schaeuble K, Gannon PO, Foukas PG, Danenberg E, Romano E, Baumgaertner P, Fankhauser M, Wald N, Cagnon L, Abed-Maillard S, Hajjami HM, Murray T, Ioannidou K, Letovanec I, Yan P, Michielin O, Matter M, Swartz MA, Speiser DE: Lymphatic vessel density is associated with CD8(+) T cell infiltration and immunosuppressive factors in human melanoma. *Oncoimmunology* 2018, 7:e1462878
36. Hermitte F: Biomarkers immune monitoring technology primer: Immunoscore(R) Colon. *J Immunother Cancer* 2016, 4:57
37. Tunstall KL: Quantifying immune cell distribution in the tumor microenvironment using HALO® spatial analysis tools. *Indica Labs*, 2016
38. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW, QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017, 7:16878
39. Kather JN, Suarez-Carmona M, Charoentong P, Weis CA, Hirsch D, Bankhead P, Horning M, Ferber D, Kel I, Herpel E, Schott S, Zornig I, Utikal J, Marx A, Gaiser T, Brenner H, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Jager D, Halama N: Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* 2018, 7:e36967
40. Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, Zimmermann J, Laffin B, Widmaier M, Rognoni L, Cardenas R, Schneider K, Boutrin A, Martin P, Zha J, Wiestler T: Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer* 2018, 6:20
41. Eriksen AC, Andersen JB, Kristensson M, dePont Christensen R, Hansen TF, Kjaer-Frifeldt S, Sorensen FB: Computer-assisted stereology and automated image analysis for quantification of tumor infiltrating lymphocytes in colon cancer. *Diagn Pathol* 2017, 12:65
42. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, Watanabe M: Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008, 10:41–47
43. Weis CA, Kather JN, Melchers S, Al-Ahmdi H, Pollheimer MJ, Langner C, Gaiser T: Automatic evaluation of tumor budding in immunohistochemically stained colorectal carcinomas and correlation to clinical outcome. *Diagn Pathol* 2018, 13:64
44. Berthel A, Zoernig I, Valous NA, Kahlert C, Klupp F, Ulrich A, Weitz J, Jaeger D, Halama N: Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncoimmunology* 2017, 6:e1286436
45. Li XF, Grusso T, Zuo DM, Omeroglu A, Meterissian S, Guiot MC, Salazar A, Park M, Levine H: Infiltration of CD8(+) T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, 116:3678–3687
46. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al: International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018, 391:2128–2139

2-oji publikacija

INDEPENDENT PROGNOSTIC VALUE OF INTRATUMORAL HETEROGENEITY AND IMMUNE RESPONSE FEATURES BY AUTOMATED DIGITAL IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS IN EARLY HORMONE RECEPTOR-POSITIVE BREAST CARCINOMA

Zilenaite D, Rasmusson A, Augulis R, Besusparis J, Laurinaviciene A,
Plancoulaine B, Ostapenko V, Laurinavicius A.

Front. Oncol. 2020; 10: 950.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00950>



Independent Prognostic Value of Intratumoral Heterogeneity and Immune Response Features by Automated Digital Immunohistochemistry Analysis in Early Hormone Receptor-Positive Breast Carcinoma

OPEN ACCESS

Edited by:

Hazem Ghebeh,
King Faisal Specialist Hospital &
Research Centre, Saudi Arabia

Reviewed by:

Alessandro Igor Cavalcanti Leal,
Johns Hopkins Medicine,
United States
Elena Gershtein,
Russian Cancer Research Center NN
Blokhin, Russia

*Correspondence:

Dovile Zilenaite
dovile.zilenaite@vpc.lt

Specialty section:

This article was submitted to
Women's Cancer,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 23 February 2020

Accepted: 14 May 2020

Published: 16 June 2020

Citation:

Zilenaite D, Rasmusson A, Augulis R,
Besusparis J, Laurinaviciene A,
Plancoulaine B, Ostapenko V and
Laurinavicius A (2020) Independent
Prognostic Value of Intratumoral
Heterogeneity and Immune Response
Features by Automated Digital
Immunohistochemistry Analysis in
Early Hormone Receptor-Positive
Breast Carcinoma.
Front. Oncol. 10:950.
doi: 10.3389/fonc.2020.00950

Dovile Zilenaite^{1,2*}, Allan Rasmusson^{1,2}, Renaldas Augulis^{1,2}, Justinas Besusparis^{1,2},
Aida Laurinaviciene^{1,2}, Benoit Plancoulaine^{1,3}, Valerijus Ostapenko⁴ and
Arvydas Laurinavicius^{1,2}

¹ Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University, Vilnius, Lithuania, ² National Centre of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Vilnius, Lithuania, ³ ANTIPIE, Inserm (UMR 1086), Cancer Center F. Baclesse, Normandy University, Caen, France, ⁴ Department of Breast Surgery and Oncology, National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania

Immunohistochemistry (IHC) for ER, PR, HER2, and Ki67 is used to predict outcome and therapy response in breast cancer patients. The current IHC assessment, visual or digital, is based mostly on global biomarker expression levels in the tissue sample. In our study, we explored the prognostic value of digital image analysis of conventional breast cancer IHC biomarkers supplemented with their intratumoral heterogeneity and tissue immune response indicators. Surgically excised tumor samples from 101 female patients with hormone receptor-positive breast cancer (HRBC) were stained for ER, PR, HER2, Ki67, SATB1, CD8, and scanned at 20x. Digital image analysis was performed using the HALO™ platform. Subsequently, hexagonal tiling was used to compute intratumoral heterogeneity indicators for ER, PR and Ki67 expression. Multiple Cox regression analysis revealed three independent predictors of the patient's overall survival: Haralick's texture entropy of PR ($HR = 0.19$, $p = 0.0005$), Ki67 Ashman's D bimodality ($HR = 3.0$, $p = 0.01$), and CD8+SATB1+ cell density in tumor tissue ($HR = 0.32$, $p = 0.02$). Remarkably, the PR and Ki67 intratumoral heterogeneity indicators were prognostically more informative than the rates of their expression. In particular, a distinct non-linear relationship between the rate of PR expression and its intratumoral heterogeneity was observed and revealed a non-linear prognostic effect of PR expression. The independent prognostic significance of CD8+SATB1+ cells infiltrating the tumor could indicate their role in anti-tumor immunity. In conclusion, we suggest that prognostic modeling,

based entirely on the computational image-based IHC biomarkers, is possible in HRBC patients. The intratumoral heterogeneity and immune response indicators outperformed both conventional breast cancer IHC and clinicopathological variables while markedly increasing the power of the model.

Keywords: immunohistochemistry, digital pathology, breast cancer, intratumoral heterogeneity, progesterone receptor, Ki67, SATB1, immune response

INTRODUCTION

Gene expression profiling studies have identified several subtypes of breast cancer (BC) distinguished by the expression of hormone receptor, cell proliferation, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) genes (1–3). The subtypes have been associated with different biological behavior and different responses to treatment (4–6). The current clinical practice is mainly based on immunohistochemistry (IHC) for estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2, and Ki67. In fact, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the College of American Pathologists (CAP) guidelines, updated in 2020, recommended to continue the use of IHC of these biomarkers as the primary method to categorize BC cases, predict disease outcomes and guide treatment decisions (7, 8).

Combined IHC biomarkers have been proposed for better prognostic modeling of BC. In 2005, Abd El-Rehim et al. (9) demonstrated that combined multiple protein expression profiles from visual IHC assessment of 25 relevant biomarkers in tissue microarrays (TMA) might be used as an alternative to gene expression profiling methods. Subsequently, Soria et al. (10) applied hierarchical clustering to reduce this number to only 10 biomarkers. In 2011, Cuzick et al. (11) proposed to combine semi-quantitative scoring of ER, PR, Ki67 and HER2 IHC into an “IHC4 score”; further studies (11, 12) confirmed that the IHC4 score along with clinicopathological features provided similar prognostic information compared to gene expression profiling tests such as the Oncotype DX (Genomic Health Inc., Redwood City, CA) or Prosigna (NanoString Technologies, Seattle, WA). However, the IHC analyses were criticized for a lack of reliability and poor reproducibility (13–19).

Advances in digital image analysis (DIA) and computational pathology have opened new opportunities for more accurate and reproducible measurements (20–26). In 2002, Camp et al. (27) developed a set of algorithms for automated quantification of protein expression with pixel-based tissue segmentation using fluorescent labels for cytokeratin and α -catenin. They found that automated analysis of ER has better reproducibility and

higher significance of prognostic information than conventional pathologist-based scoring (27). Jakobsen et al. (28) compared visual HER2 IHC scoring with quantitative measurements by DIA and detected that automated analysis could significantly (67%) reduce the proportion of HER2 equivocal cases without affecting false-negative rate. Likewise, Stalhammar et al. (29) demonstrated that tumor subtyping by a combination of ER, PR, Ki67, and HER2 manual scores was prognostically and predictively inferior when compared to DIA of corresponding biomarkers and concluded that DIA is a robust, reproducible and less time-consuming alternative to the manual scoring in BC.

Besides the benefits of better accuracy and precision, indicators based on large scale data extraction by DIA enable application of more powerful statistical processing methods when combining the informative value of the various IHC markers (30). In 2015, Laurinavicius et al. (31) demonstrated independent prognostic power of special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) and Ki67 ratio in a study of 10 IHC markers in BC TMA obtained by automated DIA and multivariate statistical modeling of the data. In 2019, Abubakar et al. (32) reported that the IHC4 method retained its prognostic value when based on DIA quantification measurements; furthermore, a combined quantitative measure of biomarkers outperformed the conventional dichotomous IHC scoring in two independent BC patient cohorts (32).

DIA applications in IHC have also enabled new ways to measure intratumoral heterogeneity of the biomarker expression. In particular, the issue of Ki67 hotspot detection and assessment has been addressed by many investigators (15, 16, 22, 23, 33–35). Stalhammar et al. (29) showed that the error rate of a pathologist’s stratification into distinct BC subtypes based on visual assessment of Ki67 expression could be reduced by 12% using DIA with automated hotspot detection. However, a rigorous definition of hotspots has not been established: hotspots may vary in size, shape, number and difficult to ascertain in homogeneous cases (23, 36, 37). Conversely, intratumoral heterogeneity assessment, based on systematic hexagonal grid subsampling of the DIA data, is a clear statistical definition of heterogeneity and (34) revealed that Ki67 intratumoral heterogeneity was more prognostically important than its rate of expression *per se*.

Recent advances in cancer immunotherapy have opened new challenges in the search for reliable prognostic and predictive biomarkers of the antitumor immune response in the context of tumor microenvironment (TME) (38–42). Chronic inflammation properties, one of the hallmarks of cancer, have been shown to contribute to tumor initiation, progression, and

Abbreviations: ASCO, the American Society of Clinical Oncology; AshD, Ashman’s D; CAP, the College of American Pathologists; CI, confidence intervals; d, density; DIA, digital image analysis; ER, estrogen receptor; G, histological grade; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; HR, hazard ratio; HRBC, hormone receptor-positive breast cancer; IHC, immunohistochemistry; LR, likelihood ratio; OS, overall survival; PD-1, programmed death 1; PD-L1, programmed death-ligand 1; pN, lymph node metastasis status; PR, progesterone receptor; pT, tumor invasion stage; S, stroma compartment; SATB1, special AT-rich sequence-binding protein 1; T, tumor compartment; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes; TMA, tissue microarray; TME, tumor microenvironment.

metastasis (43–46). Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) have been associated with a better prognosis and clinical outcome (47–49). An abundance of CD3+, CD4+, CD8+, and CD45RO+ TIL has been reported to be a feature of efficient immune response in several cancers (48, 50–54). While a higher density of cytotoxic CD8+ T cells has been linked to a positive anti-tumor effect (55–59), the CD8+PD-1+ subset of TIL is associated with worse prognosis and therapy outcomes (60–63). This could be related to the interaction between programmed death 1 (PD-1) receptor and programmed death-ligand 1 (PD-L1) which leads to the impairment and exhaustion of TIL and inhibition of immune responses against tumor cells (60, 64). This has made the blockade of PD-1 or PD-L1 an important therapeutic approach in treating tumors (65–70). However, a rather low proportion of patients benefit from this immunotherapy (65–71). A comprehensive TIL study in BC has demonstrated that CD8+ T cells can retain cytolytic activity despite PD-1 expression and highlighted the need for a better understanding of how PD-1 pathway could induce T cell exhaustion (72). Recently, a link between PD-1, SATB1 and cancer immunity has been reported (73, 74) suggesting that SATB1 may be a novel biomarker for prediction of the functional properties of T cells in the TME.

In this study of hormone receptor-positive BC (HRBC), we explored the prognostic value of IHC, performed on full-face surgical excision slides, by combining DIA data from multiple IHC biomarkers, along with their intratumoral heterogeneity indicators and tissue immune response properties, in the context of conventional clinicopathologic variables. We found that the DIA IHC data alone generated the most significant prognostic model of the patient overall survival (OS), represented by three independent features: PR entropy, Ki67 bimodality, and CD8+SATB1+ cell density in the tumor tissue. Remarkably, the intratumoral heterogeneity indicators of PR and Ki67 were prognostically more informative than the rates of their expression. The independent prognostic role of CD8+SATB1+ TIL is suggestive of the potential utility of this biomarker in the context of cancer immunotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Tumor Characteristics

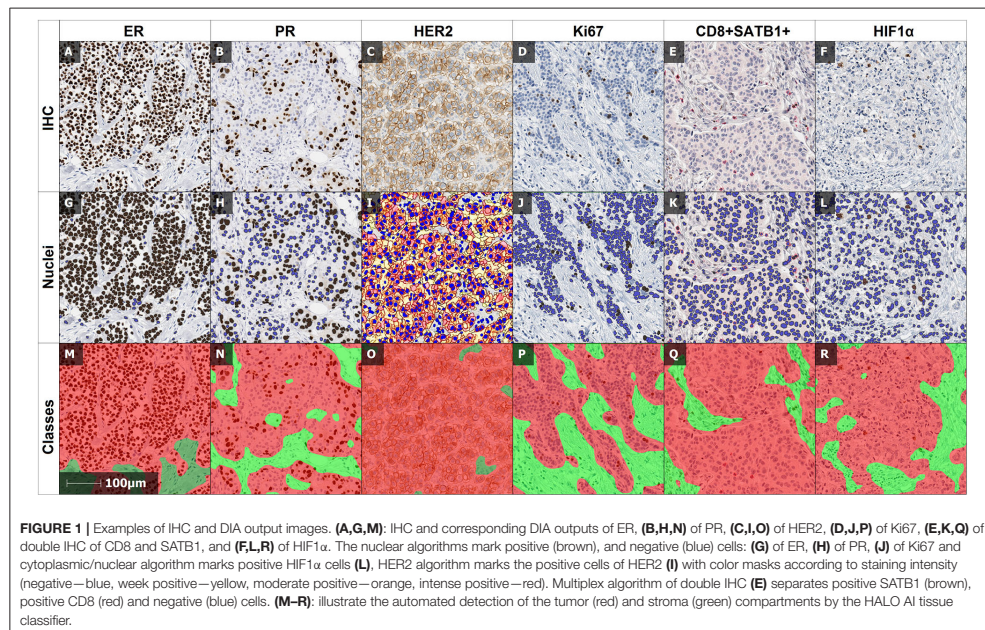
Surgically excised tumor samples from 101 patients with HRBC were used. The same patient cohort was investigated in the previous TMA studies (30, 31), with extended follow-up period now. Briefly, the patients were treated at the National Cancer Institute (Vilnius, Lithuania) and tested at the National Center of Pathology (Vilnius, Lithuania) from 2007 to 2009. The OS follow-up period ranges from 17 to 143 months, with a median of 135 months. The demographic, clinicopathological and follow-up characteristics of the patient cohort are summarized in **Table 1**. The study was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (reference number: 40, date 2007-04-26, updated 2017-09-12). Informed written consent was obtained from all patients before study entry.

TABLE 1 | Patient and tumor clinicopathologic parameters.

Clinicopathologic parameters	
Patients	101 (100%)
Age, years	
Median	59
Range	27–87
Sex	
Female	101 (100%)
Male	0
Follow up, months	
Median	135
Range	17–143
Deceased	24 (23.8%)
Histological grade (G)	
G1	23 (22.8%)
G2	47 (46.5%)
G3	31 (30.7%)
Tumor invasion stage (pT)	
T1	55 (54.5%)
T2	46 (45.5%)
T3	0
T4	0
Lymph node metastasis status (pN)	
N0	54 (53.5%)
N1	35 (34.6%)
N2	9 (8.9%)
N3	3 (3.0%)
Treatment	
Hormone therapy	88 (87.1%)
Chemotherapy	61 (60.4%)
Radiotherapy	85 (84.2%)
Trastuzumab therapy	7 (6.9%)

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded full-face sections of surgically excised tumors were cut 3 µm thick and mounted on positively charged slides (six sections per case). A Roche Ventana BenchMark ULTRA automated staining system (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) was used to perform the IHC staining. ER, PR, HER2, Ki67, HIF1α, and SATB1 were detected using the ultraView Universal DAB Detection kit, and CD8 was visualized using the ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). IHC was performed using ready-to-use antibodies for ER, PR, HER2 (SP1, 1E2, 4B5, respectively, Ventana (Tucson, Arizona, USA), Ki67 (MIB-1, DAKO (Glostrup, Denmark), dilution 1:200), HIF1α (EP118, Epitomics (San Mateo, USA), dilution 1:200) and double IHC for SATB1 (SP287, Abcam (Cambridge, United Kingdom), dilution 1:250) and CD8 (C8/144B, DAKO, dilution 1:1100). The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.



Digital Image Acquisition and Analysis

The IHC slides were scanned with a ScanScope XT Slide Scanner (Leica Aperio Technologies, Vista, CA, USA) at 20 \times objective magnification (0.5 μ m pixel resolution). DIA was performed with the HALO software (version 3.0311.174; Indica Labs, Corrales, New Mexico, United States): the HALO AI tissue classifier was trained to segment tumor tissue, stroma, and background (consisting of necrosis, artifacts, and glass); HALO Multiplex IHC algorithm (version 1.2) was used to detect and extract coordinates of nuclear ER, PR, Ki67, SATB1, and cytoplasmic CD8 and HIF1 α positive cells, while HALO HER2 algorithm (version 1.1) was used for HER2 positive cells. Examples of IHC and DIA analysis output images are presented in **Figure 1**.

Computation of IHC Indicators

The set of IHC indicators used in the prognostic models included: (1) per-case global quantities (percentages of ER, PR, Ki67 positive cells and HER2 2+ and 3+ in the tumor compartment), (2) intratumoral heterogeneity of ER, PR, and Ki67 positivity, (3) immune response properties represented by the densities of CD8+ and CD8+SATB1+ cells in tumor and stroma compartments, and (4) hypoxia-inducible properties represented by the percentage of HIF1 α positive cells in tumor and stroma compartments.

Indicator sets 1, 3 and 4 were readily extracted from the HALO DIA data for each digitized slide. The intratumoral

heterogeneity indicators were computed using the hexagonal tiling methodology as previously reported (30, 31, 35). Briefly, the HALO DIA data were subsampled by a randomly positioned hexagonal grid (hexagon side length 257 μ m). Based on the cell coordinates obtained by the DIA, the number of positive and negative cells of all biomarkers were counted inside each hexagon. Hexagons containing fewer than 50 cells were regarded as insufficient sampling and discarded from further analyses. Since low expression and low dynamic range was observed for HER2, CD8+, CD8+SATB1+, and HIF1 α , no heterogeneity indicators were extracted for these biomarkers and were instead quantified in the stroma and/or tumor compartment. The percentages of ER, PR, and Ki67 were calculated for each hexagon, and subsequently ranked linearly into ten intervals (0–10%, >10–20%, etc.) for computation of a co-occurrence matrix. Heterogeneity markers were extracted from the co-occurrence matrix as Haralick's texture indicators (contrast, dissimilarity, entropy, energy, homogeneity). The bimodality indicator Ashman's D (AshD) was computed for the intratumoral distributions of ER, PR and Ki67 expression in the hexagonal grids as described in detail previously (31).

Statistical Methods

Summary statistics and distribution analyses were performed with significance tests based on one-way ANOVA. Bonferroni's *post hoc* test and Welch's *t*-tests were used for pairwise and

homogeneity of variances comparisons, respectively. Fisher's exact test was used to determine the associations between categorical variables. Highly correlated ($r > 0.90$) indicators were eliminated to avoid multicollinearity or singularity in multivariate survival analysis. Due to a limited cohort size overfitting was minimized by leave-one-out cross-validation (75), the most frequent variable subsets were further tested in the survival prediction models. Subsequently, a factor analysis was performed for seven IHC biomarkers with factors retained based on an eigenvalue > 1 ; orthogonal varimax rotation of the initial factors was used. A cut-off value for each indicator was determined by Cutoff Finder software (Charité University, Berlin, Germany) (76) to test univariate OS predictions. The OS distributions were estimated using the Kaplan–Meier

method followed by log-rank testing to assess the statistical significance of differences between the stratified groups. Cox proportional hazards analysis was performed to test independent prognostic significance of the IHC indicators in the context of clinicopathologic variables. Statistical analyses were performed using SAS (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). The statistical significance level was set at $p < 0.05$. Plots were produced using R (version 3.4.4).

RESULTS

Summary Statistics

Summary statistics of the IHC indicators are presented in **Supplementary Table 1**. Of note, one-way ANOVA and

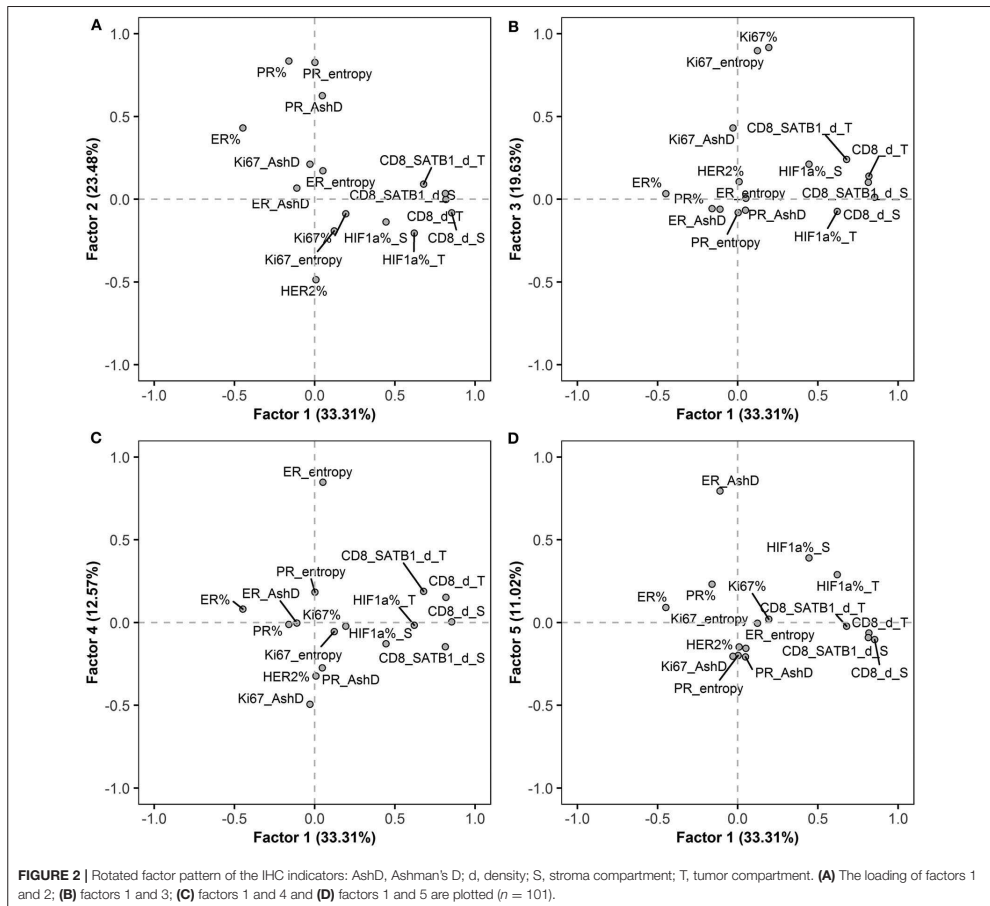


TABLE 2 | Kaplan-Meier estimates using log-rank test for overall survival in relation to IHC, intratumoral heterogeneity and clinicopathologic indicators.

	Univariate regression analysis			Intratumoral heterogeneity indicators			
	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	
Conventional breast cancer indicators							
ER%	3.11	1.16–8.34	0.017	ER_energy	4.56	1.36–15.31	0.007
PR%	0.30	0.14–0.68	0.002	ER_homogeneity	3.40	1.52–7.62	0.002
Ki67%	2.13	0.80–5.71	0.120	ER_entropy	0.09	0.01–0.68	0.003
HER2%	0.39	0.17–0.92	0.025	ER_contrast	0.31	0.14–0.71	0.004
Immune response indicators							
CD8_d_S	0.31	0.11–0.82	0.013	ER_dissimilarity	0.32	0.14–0.70	0.003
CD8_d_T	0.23	0.10–0.57	0.0005	ER_AshD	2.11	0.72–6.17	0.160
CD8_SATB1_d_S	0.32	0.13–0.81	0.011	PR_energy	5.36	2.12–13.52	<0.0001
CD8_SATB1_d_T	0.26	0.11–0.57	0.0004	PR_homogeneity	4.88	2.02–11.79	0.0001
Hypoxia-inducible indicators							
HIF1 α _S	0.43	0.15–1.26	0.11	PR_entropy	0.21	0.08–0.52	0.0002
HIF1 α _T	0.46	0.16–1.35	0.15	PR_contrast	0.22	0.09–0.56	0.0005
Clinicopathological variables							
G stage (G1–2 vs. G3)	1.20	0.52–2.81	0.670	PR_dissimilarity	0.15	0.05–0.44	<0.0001
T stage (T1 vs. T2)	0.99	0.45–2.22	0.986	PR_AshD	0.32	0.14–0.71	0.003
N status (N0 vs. N1–3)	2.17	0.95–4.97	0.07	Ki67_energy	0.48	0.20–1.17	0.100
Age (\leq 59 vs. $>$ 59)	2.45	1.05–5.73	0.039	Ki67_homogeneity	0.46	0.19–1.12	0.079
–	–	–	–	Ki67_entropy	2.06	0.85–4.98	0.100
				Ki67_contrast	2.11	0.93–4.74	0.066
				Ki67_dissimilarity	2.16	0.89–5.21	0.079
				Ki67_AshD	2.48	1.09–5.68	0.026

AshD, Ashman's D; d, density; S, stroma compartment; T, tumor compartment; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Bonferroni's *post hoc* test of immune response and hypoxia-inducible indicators showed that the percentage of HIF1 α and density of CD8+ and CD8+SATB1+ were significantly higher in stroma than in the tumor compartment ($p < 0.0001$) (data not shown).

Factor Analysis of IHC Indicators

To explore inherent correlations between the IHC indicators, a factor analysis was performed for a set of conventional BC, immune response, hypoxia-inducible and intratumoral heterogeneity (ER, PR and Ki67 AshD bimodality and Haralick's texture entropy) indicators. Five orthogonally independent factors were extracted, the rotated factor loadings are presented in **Supplementary Table 2** and the pattern of five factors is plotted in **Figure 2**. Factor 1 was characterized by strong loadings of CD8+ and CD8+SATB1+ cell densities within the tumor and stroma compartments, factor 2 by the percentage of PR, PR AshD and entropy indicators; factor 3 by the percentage of Ki67 and Ki67 entropy indicators; factor 4 by ER entropy and factor 5 by ER bimodality. Altogether, the five factors explained 64% of the variance in the dataset and indicated orthogonally independent latent factors governing the variation of IHC indicators.

Prognostic Value of IHC and Clinicopathologic Indicators in Univariate Analyses

Kaplan-Meier survival analyses with hazard ratio (HR) and log-rank test were performed to estimate the prognostic potential of the IHC and clinicopathologic indicators. The main results

are summarized in **Table 2**; the results in their entirety are presented in **Supplementary Figure 1**. Higher PR and HER2 expression in the tumor tissue, CD8+ and CD8+SATB1+ cell densities in the stroma and tumor tissue, ER and PR entropy, contrast, dissimilarity and PR AshD are associated with higher OS probabilities. Worse OS is associated with higher ER, ER and PR energy, homogeneity and Ki67 AshD. No significant stratifications were obtained for the Ki67 and HIF1 α expression, histological grade, T stage, lymph node status, ER AshD, Ki67 energy, homogeneity, entropy, contrast and dissimilarity. Higher patient age at the time of surgery was associated with worse OS ($HR = 2.45, p = 0.039$).

Independent Predictors of OS

The independent prognostic value of the global IHC biomarker expression rates, their intratumoral heterogeneity, and immune response indicators was tested by multivariate Cox regression analysis, including conventional clinicopathologic characteristics (**Table 3**). To estimate the added prognostic value of the novel IHC indicators, the analyses were performed in 2 datasets: Model 1 was generated from a subset consisting of the age group, pathology characteristics (pT, pN status and histological grade) and the global IHC DIA indicators (ER, PR, HER2 and Ki67 expression rates in the tumor compartment). Model 2 was obtained by supplementing the data set with the intratumoral heterogeneity and immune response indicators (**Table 3**). Model 1 revealed two independent factors of worse OS—lower PR expression and lymph node involvement. Model 2 showed a remarkable increase of the statistical power likelihood ratio

TABLE 3 | Statistics of multivariate Cox regression analyses for correlation of IHC, intratumoral heterogeneity and immune response indicators with overall survival.

Multivariate regression analysis			
	HR	95% CI	p-value
Model 1 (LR: 12.23, $p = 0.0022$)			
N status (N0 vs. N1–3)	2.30	1.01–5.28	0.0485
PR%	0.29	0.13–0.66	0.0028
Model 2 (LR: 27.67, $p < 0.0001$)			
CD8_SATB1_d_T	0.30	0.13–0.67	0.0035
PR_entropy	0.22	0.08–0.56	0.0015
Ki67_AshD	3.26	1.40–7.61	0.0062

AshD, Ashman's D; d, density; T, tumor compartment; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; LR, likelihood ratio.

(LR), 27.67 compared to 12.23 of Model 1 based exclusively on three novel IHC indicators: better OS was predicted by higher CD8+SATB1+ cell density in the tumor compartment and higher entropy (intratumoral heterogeneity) of PR expression; worse OS was predicted by the bimodality (AshD) of Ki67 expression in the tumor tissue. Prognostic stratifications for these indicators are presented in Figure 3.

Nonlinear Relationship Between PR Expression and Its Intratumoral Heterogeneity

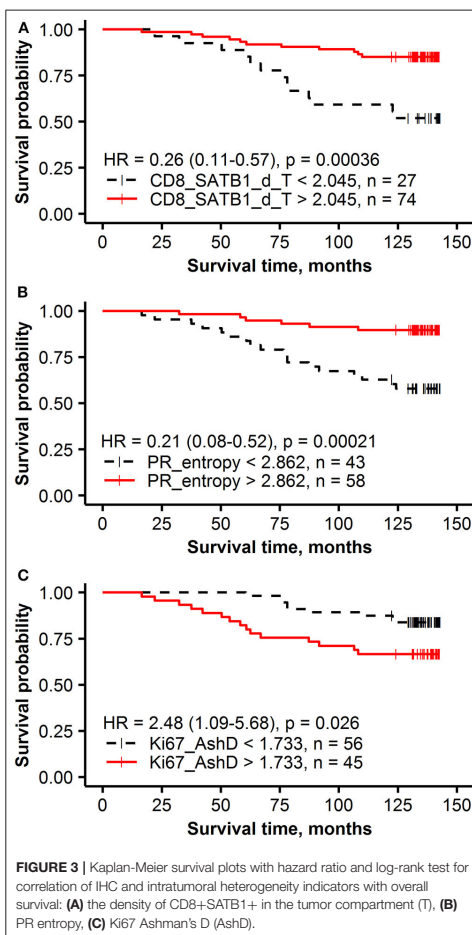
A non-linear relationship between the rate of PR expression and its intratumoral heterogeneity (entropy) was detected: high PR entropy was observed within the PR expression range from 20 to 80% (Figure 4). Importantly, neither of these two variables were significantly associated with other patient or tumor characteristics (data not shown). Of note, only a weak linear correlation between ER entropy and PR entropy was found ($r = 0.31, p = 0.0017$).

Prognostic Value of PR Expression Rates Revealed by Its Heterogeneity Property

To investigate the impact the non-linear relationship between PR expression rate and its intratumoral heterogeneity has on the prognostic stratification, the patients were stratified into three groups: low expression (<20%) low entropy, moderate expression (20–80%) high entropy and high expression (higher than 80%) low entropy. Tumors with moderate expression of PR (20–80%) were associated with the best OS (91% OS probability after 143 months), followed by high (>80%) expression (71% OS) and low (<20%) expression (63% OS) (Figures 5A,B).

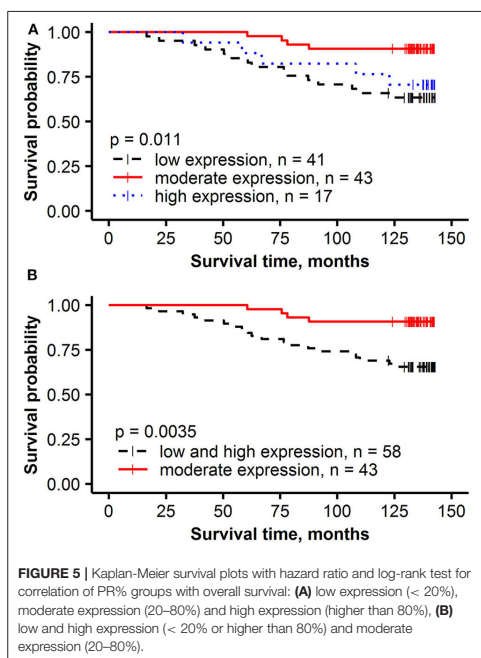
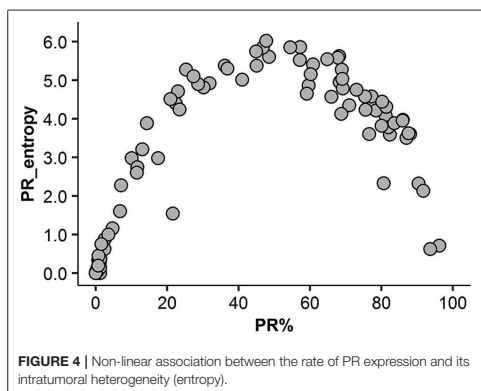
DISCUSSION

Our study demonstrates the benefits of combined IHC image-based biomarker prognostic modeling and is important in several aspects: (1) the multidimensional IHC prognostic model was achieved solely from the IHC DIA data and reflected three biologic features of HRBC (PR expression, proliferation rate,



immune response) and outperformed standard clinicopathologic parameters in the dataset tested; (2) intratumoral heterogeneity indicators of PR and Ki67 expression were prognostically more informative than the rates of their expression; (3) supplementing the IHC DIA results with intratumoral heterogeneity analytics markedly increased the power of the prognostic model. Overall, the study demonstrated for the first time independent prognostic value of intratumoral PR heterogeneity and intratumoral CD8+SATB1+ cell density in early HRBC.

The study was performed on full-face surgical excision sections and essentially confirms and extends the findings of a previous study based on TMA with automated IHC DIA in the same patient cohort with a shorter follow-up period (31). It



also confirms the positive prognostic value of SATB1 expression in the tumor tissue as reported previously (31). However, by adding the CD8 marker to the study, we find more specifically that the prognostic impact of SATB1 is related to the density of intratumoral CD8+SATB1+ cells. Although the expression of SATB1 alone could be noted in some cancer cells in a few cases, it was not sufficient to obtain its prognostic value (data not shown). On the other hand, the density of CD8+ cells in tumor

compartment revealed positive prognostic value ($HR = 0.23, p = 0.00047$); however, it was outperformed by CD8+SATB1+ in the multivariate prognostic model ($HR = 0.30, p = 0.0035$).

The biological and prognostic significance of SATB1 expression in malignancies remains controversial. Studies by Cai et al. (77) and Han et al. (78) revealed that SATB1 regulates the expression of more than 1,000 genes which are predominantly associated with cell adhesion, proliferation, cell cycle invasion, migration and apoptosis and confirmed that overexpression of SATB1 is associated with aggressive BC phenotype. In contrast to these studies, Iorns et al. (79) reported that SATB1 transcript levels acquired no function in BC pathogenesis, while Selinger et al. (80) demonstrated that the loss of SATB1 is associated with a worse prognosis in lung squamous cell carcinoma. Gene expression experiments have confirmed that SATB1 regulates around 300 of T cell genes (81–83) and initial studies have indicated that SATB1 might play a vital role in anti-tumor T cell responses (74, 84). Stephen et al. (74) demonstrated in mouse models that SATB1 regulates T cell exhaustion marker PD-1, T-cell proliferative capacity and effector function. They have shown that decreased expression of SATB1 leads to a 40-fold increased expression of PD-1 and impaired anti-tumor immunity. Temporal SATB1 expression changes were noted by Nüssing et al. (84) in human tissue samples (blood, thymus, spleen, lymph nodes) supporting the notion that downregulation of SATB1 may lead to T cell dysfunction. In our study, besides the independent prognostic value of tumoral CD8+SATB1+ cell infiltrates, we found that SATB1 was more frequently expressed in CD8+ cells in stroma than in tumor tissue (26 and 21%, $p < 0.0001$, respectively). We suggest, therefore, that our findings further support the hypothesis that SATB1 expression can be a feature of activated CD8+ cells and may serve as a potential immune response biomarker in malignancies.

The role of TIL has been investigated in BC and association with better prognosis was demonstrated in ER-negative, HER2-positive and triple-negative breast tumors (85–88). However, contradicting findings on the clinical relevance of TIL have been reported in ER-positive and HER2-negative cancer (85, 89–91). A large study (89) of 12,439 BC patients, found no association between survival and manually quantified CD8+ T cells while Sobral-Leite et al. (92), who analyzed TIL based on IHC and DIA, detected that CD8+ T cells were associated with worse clinical outcome and *PIK3CA* mutations in ER-positive BC. Lee et al. (93) also indicated that TIL might have a different prognostic impact across BC subtypes, although their study results were not statistically significant. Our study, based on DIA, retrieved the prognostic value of both stromal and tumoral CD8+ lymphocytes ($HR = 0.31, p = 0.013$ and $HR = 0.23, p = 0.00047$, respectively) in univariate analyses and tumoral CD8+ lymphocytes ($HR = 0.39, p = 0.04$) in multiple Cox regression model (not shown); however, tumoral CD8+SATB1+ cells further increased the prognostic power (Table 3).

IHC for ER and PR has been used for decades now to predict the patient's outcome and response to hormonal therapy (94). Routine clinical practices are generally based on the qualitative status of the IHC expression and categorize samples into negative, weakly positive or positive tumors, although some

studies have demonstrated an additional prognostic value of quantitative assessment of ER or PR expression (32, 94–96). In particular, Barlet et al. (95) showed that ER and PR IHC by visual scoring predicted a higher risk of early relapse in hormone receptor-moderate compared to hormone receptor-rich patients (>80–85% for ER, >75% for PR) and demonstrated that patients with a high rate of ER expression might get additional benefit from exemestane. In our study, we found that >74% expression of ER was associated with worse prognosis ($HR = 3.11, p = 0.017$) while expression of PR >3% predicted better OS ($HR = 0.30, p = 0.002$). Before including the intratumor heterogeneity indicators, we found an independent beneficial prognostic value of PR expression rate in the context of lymph node status (Table 3, Model 1). Similar results were reported by Barlet et al. (95) and Lamy et al. (96), who found the higher PR expression rate was a significant indicator of better prognosis. Nevertheless, a recent overview (94) of 19 studies, which collectively involved 30,754 BC patients, concluded that there is no clear evidence for quantitatively assessed ER and PR as neither prognostic nor predictive marker. Furthermore, they suggested that information on the hormone receptor status beyond “positive” or “negative” should no longer be reported to prevent oncologists subconsciously making different treatment decisions. International studies (97–101) based on the mRNA or IHC data have found that tumors with low expression of ER (1–10%) do not have a significant prognostic impact on survival and benefit from hormonal therapy compared to patients with high ER expression ($\geq 10\%$). Based on this data, ASCO and CAP recently updated the guideline for ER and PR testing (7) and recommended to report the borderline ER-positive cases (1–10% positive cells) with the additional comment that biologically this type of tumors is more similar to ER-negative cancer and the potential benefit of hormonal therapy is unclear (7). However, a strategy on how to ensure reproducible results of the IHC scoring was not suggested.

Intratumor heterogeneity of PR expression was first measured by Haralick's texture indicators in the present study based on hexagonal grid sampling developed previously for Ki67 studies and subsequently also by AshD bimodality indicator (33–35). This novel data revealed a non-linear relationship between the ratio of PR expression in the tumor tissue and its Haralick's texture entropy (Figure 4). This finding could be explained by the nature of the features extracted (less heterogeneity is observed at the low-minimal and high-diffuse end of the range of expression) and has been reported previously for Ki67 (35). However, the importance of this relationship is highlighted by the finding that PR heterogeneity was an independent predictor of better OS ($HR = 0.21, p = 0.00021$) rather than the rate of PR expression *per se*. This is further supported by the prognostic stratification of our patients revealing that lower than 20% and higher than 80% rate of PR expression was associated with worse OS while moderate PR expression (>20% and <80%) was associated with better OS ($p = 0.0035$). While the biological meaning of this non-linearity in the prognostic effect of PR expression remains to be elucidated, it supports the notion that “intratumor heterogeneity is universal, although perhaps non-linear prognostic biomarker” (102). This phenomenon may also explain ambiguous results of

the previous efforts to quantify hormone receptor expression for prognostic and predictive modeling with various methodologies and cut-off values.

Bimodality of Ki67 intratumoral distribution, expressed by the AshD indicator, has been reported previously (34) to provide an independent prediction of worse OS and outperforming the rate of Ki67 *per se* in multiple prognostic models. Our current study, performed on a different patient cohort, with IHC slides stained in another laboratory and with the application of slightly different DIA and hexagonal grid analysis settings, provides independent evidence to support this phenomenon. Furthermore, we confirm the independent prognostic role of Ki67 bimodality in the context of PR intratumor heterogeneity, TIL, and clinicopathologic features included in this study of HRBC ($HR = 3.26, p = 0.0062$).

Our study does contain some limitations. Firstly, it is based on a relatively small patient cohort with a rather benign course of the disease. Secondly, the retrospective data available about therapy modes did not allow exploring the predictive value of the biomarkers. Nevertheless, we were able to achieve independent prognostic models as a proof-of-concept for computational image-based tissue pathology biomarkers generated from IHC slides. Importantly, the models enabled identification of patients at risk of worse OS in this relatively well-managed disease entity. Of course, large-scale studies with long-term follow-up and therapy data are needed to further validate our findings.

In conclusion, we present a multi-dimensional digital IHC prognostic model for early HRBC, based on three independent cancer pathobiology hallmarks—ssPR expression, proliferation, and immune response. The study revealed that subvisual intratumor heterogeneity indicators of PR and Ki67 expression were more prognostically informative than the rates of their expression. Intratumoral CD8+SATB1+ cell density predicted better OS and could potentially serve as a specific biomarker of anti-tumor immunity. Remarkably, the final prognostic model did not require any other clinicopathologic parameters besides the automatically extracted comprehensive IHC DIA indicators.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Lithuanian Bioethics Committee. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DZ, AR, JB, RA, AiL, BP, VO, and ArL participated in the conception and design of the study. DZ and AiL participated in tumor sample collection and IHC staining. DZ and RA

performed digital image and statistical analyses. JB carried out the Ki67 digital analysis. DZ in collaboration with AR and ArL, participated in the interpretation of the results and drafted essential parts of the manuscript. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This project had received funding from the European Social Fund, project No. 09.3.3-LMT-K-712-01-0139 under grant agreement with the Research Council of Lithuania.

REFERENCES

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. (2000) 406:747–52. doi: 10.1038/35021093
- Güler EN. Gene expression profiling in breast cancer and its effect on therapy selection in early-stage breast cancer. *Eur J Breast Health*. (2017) 13:168–74. doi: 10.5152/ejbh.2017.3636
- Bao T, Davidson NE. Gene expression profiling of breast cancer. *Adv Surg*. (2008) 42:249–60. doi: 10.1016/j.yasu.2008.03.002
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2001) 98:10869–74. doi: 10.1073/pnas.191367098
- West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2001) 98:11462–7. doi: 10.1073/pnas.201162998
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. (2002) 415:530–6. doi: 10.1038/415530a
- 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) 38:1346–66. doi: 10.1200/JCO.19.02309
- 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) 24:2206–23. doi: 10.1093/annonc/mdt303
- Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. (2005) 116:340–50. doi: 10.1002/ijc.21004
- Soria D, Garibaldi JM, Ambrogio F, Green AR, Powe D, Rakha E, et al. A methodology to identify consensus classes from clustering algorithms applied to immunohistochemical data from breast cancer patients. *Comput Biol Med*. (2010) 40:318–30. doi: 10.1016/j.compbiomed.2010.01.003
- Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the genomic health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. (2011) 29:4273–8. doi: 10.1200/JCO.2010.31.2835
- Bartlett JM, Bayani J, Marshall A, Dunn JA, Campbell A, Cunningham C, et al. Comparing breast cancer multiparameter tests in the OPTIMA pre-trial: no test is more equal than the others. *J Natl Cancer Inst*. (2016) 108:djw050. doi: 10.1093/jnci/djw050
- Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG. Recommendations for improved standardization of

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Richard Levenson, Kuang-Yu Jen and Michael Shribak for their support and assistance with this project.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00950/full#supplementary-material>

- immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. (2007) 15:124–33. doi: 10.1097/PAI.0b013e31804c7283
- Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol*. (2000) 53:125–30. doi: 10.1136/jcp.53.2.125
- Mikami Y, Ueno T, Yoshimura K, Tsuda H, Kurosumi M, Masuda S, et al. Interobserver concordance of Ki67 labeling index in breast cancer: Japan breast cancer research group Ki67 ring study. *Cancer Sci*. (2013) 104:1539–43. doi: 10.1111/cas.12245
- Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. (2013) 105:1897–906. doi: 10.1093/jnci/djt306
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. (2010) 134:907–22. doi: 10.1043/1543-2165.134.7.e48
- 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) 131:18–43. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2775
- de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. (2007) 96:1504–13. doi: 10.1038/sj.bj.6603756
- Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Dasevicius D, Elie N, Plancoulaine B, Bor C, et al. Digital image analysis in pathology: benefits and obligation. *Anal Cell Pathol*. (2012) 35:75–8. doi: 10.1155/2012/243416
- Robertson S, Azizpour H, Smith K, Hartman J. Digital image analysis in breast pathology—from image processing techniques to artificial intelligence. *Transl Res*. (2018) 194:19–35. doi: 10.1016/j.trsl.2017.10.010
- Laurinavicius A, Plancoulaine B, Laurinaviciene A, Herlin P, Meskauskas R, Baltusaityte I, et al. A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res*. (2014) 16:R35. doi: 10.1186/bcr3639
- Wang YX, Wang YY, Yang CG, Bu H, Yang WT, Wang L, et al. An interobserver reproducibility analysis of size-set semiautomatic counting for Ki67 assessment in breast cancer. *Breast*. (2019) 49:225–32. doi: 10.1016/j.breast.2019.12.009
- Aeffner F, Zarella MD, Buchbinder N, Bui MM, Goodman MR, Hartman DJ, et al. Introduction to digital image analysis in whole-slide imaging: a white paper from the digital pathology association. *J Pathol Inform*. (2019) 10:9. doi: 10.4103/jpi.jpi_82_18
- Rimm DL, Leung SCY, McShane LM, Bai Y, Bane AL, Bartlett JMS, et al. An international multicenter study to evaluate reproducibility of automated scoring for assessment of Ki67 in breast cancer. *Modern Pathol*. (2019) 32:59–69. doi: 10.1038/s41379-018-0109-4

26. Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Meskauskas R, Baltrusaityte I, Besusparis J, Herlin P, et al. Automated image analysis enables accurate enumeration of the Ki-67 labelling index of breast cancer. *Virchows Arch.* (2013) 463:101.
27. Camp RL, Chung GG, Rimm DL. Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nat Med.* (2002) 8:1323–7. doi: 10.1038/nm791
28. Jakobsen MR, Teerapakpinoy C, Shuangshoti S, Keelawat S. Comparison between digital image analysis and visual assessment of immunohistochemical HER2 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract.* (2018) 214:2087–92. doi: 10.1016/j.prp.2018.10.015
29. 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) 29:318–29. doi: 10.1038/modpathol.2016.34
30. Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaitis S, Lazutka J. Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol.* (2012) 7:27. doi: 10.1186/1746-1596-7-27
31. Laurinavicius A, Green AR, Laurinaviciene A, Smailyte G, Ostapenko V, Meskauskas R, et al. Ki67/SATB1 ratio is an independent prognostic factor of overall survival in patients with early hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma. *Oncotarget.* (2015) 6:41134–45. doi: 10.18632/oncotarget.5838
32. Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, et al. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and Ki67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol.* (2019) 32:1244–56. doi: 10.1038/s41379-019-0270-4
33. Besusparis J, Plancoulaïne B, Rasmusson A, Augulis R, Green AR, Ellis IO, et al. Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagn Pathol.* (2016) 11:82. doi: 10.1186/s13000-016-0525-z
34. Laurinavicius A, Plancoulaïne 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) 468:493–502. doi: 10.1007/s00428-016-1907-z
35. Plancoulaïne 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) 467:711–22. doi: 10.1007/s00428-015-1865-x
36. 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:e0172031. doi: 10.1371/journal.pone.0172031
37. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* (2011) 103:1656–64. doi: 10.1093/jnci/djr393
38. van Dijk N, Funt SA, Blank CU, Powles T, Rosenberg JE, van der Heijden MS. The cancer immunogram as a framework for personalized immunotherapy in urothelial cancer. *Eur Urol.* (2019) 75:435–44. doi: 10.1016/j.eururo.2018.09.022
39. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. Cancer immunology. The “cancer immunogram”. *Science.* (2016) 352:658–60. doi: 10.1126/science.aaf2834
40. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, et al. An immunogram for the cancer-immunity cycle: towards personalized immunotherapy of lung cancer. *J Thorac Oncol.* (2017) 12:791–803. doi: 10.1016/j.jtho.2017.01.005
41. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* (2012) 10:205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205
42. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* (2014) 232:199–209. doi: 10.1002/path.4287
43. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* (2011) 144:646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
44. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* (2013) 13:759–71. doi: 10.1038/nrc3611
45. Palucka AK, Coussens LM. The basis of oncimmunology. *Cell.* (2016) 164:1233–47. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.049
46. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DE, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* (2018) 24:541–50. doi: 10.1038/s41591-018-0014-x
47. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* (2002) 420:860–7. doi: 10.1038/nature01322
48. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* (2012) 12:298–306. doi: 10.1038/nrc3245
49. Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathol.* (2018) 31:214–34. doi: 10.1038/modpathol.2017.156
50. Chraa D, Naim A, Olive D, Badou A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: friends or foes. *J Leukoc Biol.* (2019) 105:243–55. doi: 10.1002/JLB.MR0318-097R
51. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslauer M, Tosolini M, Bindea G, et al. *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* (2009) 27:5944–51. doi: 10.1200/JCO.2008.19.6147
52. 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) 19:40–50. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
53. Castaneda CA, Mittendorf E, Casavilca S, Wu Y, Castillo M, Arboleda P, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *World J Clin Oncol.* (2016) 7:387–94. doi: 10.5306/wjco.v7.i5.387
54. Li J, Wang J, Chen R, Bai Y, Lu X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget.* (2017) 8:15621–31. doi: 10.18632/oncotarget.14919
55. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol.* (2010) 22:223–30. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.005
56. Kmiecik J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger PO, et al. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol.* (2013) 264:71–83. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.08.013
57. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* (2007) 67:354–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3388
58. 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:e95475. doi: 10.1371/journal.pone.0095475
59. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* (2006) 313:1960–4. doi: 10.1126/science.1129139
60. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* (2009) 114:1537–44. doi: 10.1182/blood-2008-12-195792
61. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol.* (2007) 81:9249–58. doi: 10.1128/JVI.00409-07
62. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, et al. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable

- breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* (2014) 63:395–406. doi: 10.1007/s00262-014-1519-x
63. Shindo Y, Hazama S, Tsunedomi R, Suzuki N, Nagano H. Novel biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *Cancers.* (2019) 11:1223. doi: 10.3390/cancers11091223
 64. Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SF, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.* (2016) 47:78–84. doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.006
 65. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* (2016) 375:1823–33. doi: 10.1056/NEJMoa1606774
 66. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology.* (2016) 69:25–34. doi: 10.1111/his.12904
 67. Shin J, Chung JH, Kim SH, Lee KS, Suh KJ, Lee JY, et al. Effect of Platinum-based chemotherapy on PD-L1 expression on tumor cells in non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat.* (2019) 51:1086–97. doi: 10.4143/crt.2018.537
 68. Chen Q, Li T, Yue W. Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *Onco Targets Ther.* (2018) 11:4673–83. doi: 10.2147/OTT.S168313
 69. Sun WY, Lee YK, Koo JS. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *J Transl Med.* (2016) 14:173. doi: 10.1186/s12967-016-0925-6
 70. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* (2015) 373:1627–39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643
 71. Santini FC, Hellmann MD. PD-1/PD-L1 axis in lung cancer. *Cancer J.* (2018) 24:15–9. doi: 10.1097/PPO.0000000000000300
 72. Egelston CA, Avalos C, Tu TY, Simons DL, Jimenez G, Jung JY, et al. Human breast tumor-infiltrating CD8(+) T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. *Nat Commun.* (2018) 9:4297. doi: 10.1038/s41467-018-06653-9
 73. Nixon BG, Li MO. Satb1: restraining PD1 and T cell exhaustion. *Immunity.* (2017) 46:3–5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.002
 74. Stephen TL, Payne KK, Chaurio RA, Allegranza MJ, Zhu H, Perez-Sanz J, et al. SATB1 expression governs epigenetic repression of PD-1 in tumor-reactive T cells. *Immunity.* (2017) 46:51–64. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.015
 75. 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. doi: 10.1016/j.combiomed.2014.11.015
 76. Budzies 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:e51862. doi: 10.1371/journal.pone.0051862
 77. Cai S, Han HJ, Kohwi-Shigematsu T. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet.* (2003) 34:42–51. doi: 10.1038/ng1146
 78. Han HJ, Russo J, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 reprograms gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature.* (2008) 452:187–93. doi: 10.1038/nature06781
 79. Iorns E, Hnatyszyn HJ, Seo P, Clarke J, Ward T, Lippman M. The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* (2010) 102:1284–96. doi: 10.1093/jnci/djq243
 80. Selinger CI, Cooper WA, Al-Sohaily S, Mladenova DN, Pangon L, Kennedy CW, et al. Loss of special AT-rich binding protein 1 expression is a marker of poor survival in lung cancer. *J Thorac Oncol.* (2011) 6:1179–89. doi: 10.1097/JTO.0b013e31821b4ce0
 81. Ahlfors H, Limaye A, Elo LL, Tuomela S, Burute M, Gottimukkala KV, et al. SATB1 dictates expression of multiple genes including IL-5 involved in human T helper cell differentiation. *Blood.* (2010) 116:1443–53. doi: 10.1182/blood-2009-11-252205
 82. Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincaid PW, et al. The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity.* (2013) 38:1105–15. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.014
 83. Alvarez JD, Yasui DH, Nida H, Joh T, Loh DY, Kohwi-Shigematsu T. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev.* (2000) 14:521–35. doi: 10.1101/gad.14.5.521
 84. Nussing S, Koay HF, Sant S, Loudovaris T, Mannering SI, Lappas M, et al. Divergent SATB1 expression across human life span and tissue compartments. *Immunol Cell Biol.* (2019) 97:498–511. doi: 10.1111/imcb.12233
 85. 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) 2:1354–60. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1061
 86. 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) 13:228–41. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.215
 87. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosomi M, Inoue K, Fujii T, Horiguchi J, et al. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett.* (2019) 17:2647–56. doi: 10.3892/ol.2019.9938
 88. 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) 1:448–55. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0830
 89. 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) 25:1536–43. doi: 10.1093/annonc/mdu191
 90. 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) 58:1107–16. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03846.x
 91. Ahn SG, Cha YJ, Bae SJ, Yoon C, Lee HW, Jeong J. Comparisons of tumor-infiltrating lymphocyte levels and the 21-gene recurrence score in ER-positive/HER2-negative breast cancer. *BMC Cancer.* (2018) 18:320. doi: 10.1186/s12885-018-4228-6
 92. 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) 21:90. doi: 10.1186/s13058-019-1176-2
 93. Lee KH, Kim EY, Yun JS, Park YL, Do SI, Chae SW, et al. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer.* (2018) 18:938. doi: 10.1186/s12885-018-4832-5
 94. Noordhoek L, de Groot AF, Cohen D, Liefers GJ, Portielje JEA, Kroep JR. Higher ER load is not associated with better outcome in stage 1–3 breast cancer: a descriptive overview of quantitative HR analysis in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* (2019) 176:27–36. doi: 10.1007/s10549-019-05233-9
 95. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJ, Billingham LJ, Campbell FM, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the tamoxifen and exemestane adjuvant multinational trial. *J Clin Oncol.* (2011) 29:1531–8. doi: 10.1200/JCO.2010.30.3677
 96. Lamy PJ, Pujol P, Thezenas S, Kramar A, Rouanet P, Guilleux F, et al. Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat.* (2002) 76:65–71. doi: 10.1023/A:1020228620173
 97. Raghav KP, Hernandez-Aya LF, Lei X, Chavez-Macgregor M, Meric-Bernstam F, Buchholz TA, et al. Impact of low estrogen/progesterone receptor expression on survival outcomes in breast cancers previously classified as triple negative breast cancers. *Cancer.* (2012) 118:1498–506. doi: 10.1002/cncr.26431
 98. Chen T, Zhang N, Moran MS, Su P, Haffty BG, Yang Q. Borderline ER-positive primary breast cancer gains no significant survival benefit from endocrine therapy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Breast Cancer.* (2018) 18:1–8. doi: 10.1016/j.clbc.2017.06.005
 99. Balduzzi A, Bagnardi V, Rotmensz N, Dellapasqua S, Montagna E, Cardillo A, et al. Survival outcomes in breast cancer patients with low

- estrogen/progesterone receptor expression. *Clin Breast Cancer*. (2014) 14:258–64. doi: 10.1016/j.clbc.2013.10.019
100. Gloyeske NC, Dabbs DJ, Bhargava R. Low ER+ breast cancer: Is this a distinct group? *Am J Clin Pathol*. (2014) 141:697–701. doi: 10.1309/AJCP34CYSATWFDPQ
101. Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, et al. Estrogen receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. (2012) 30:729–34. doi: 10.1200/JCO.2011.36.2574
102. Andor N, Graham TA, Jansen M, Xia LC, Aktipis CA, Petritsch C, et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med*. (2016) 22:105–13. doi: 10.1038/nm.3984

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Zilenaite, Rasmuson, Augulis, Besusparis, Laurinaviciene, Plancoulaine, Ostapenko and Laurinavicius. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.