

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2019 509** (51) Int. Cl. (2020.01): **G06T 7/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2019-04-09**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-10-26**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Arvydas LAURINAVIČIUS, LT
Allan RASMUSSEN, DK
Aušrinė NESTARENKAITĖ, LT
Dovilė ŽILĖNAITĖ, LT
Renaldas AUGULIS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai”,
LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Automatizuotas naviko ir stromos sąsajos zonos nustatymas, skirtas naviko
atsako įvertinimui naudojant imunogradientinius indikatorius**

(57) Referatas:

Išradimas skirtas automatiškai nustatyti naviko-stromos sąveikos zoną (SZ) naudojant mikroskopinių vaizdų analizės duomenis. Pirmiausia yra išskiriamas naviko kraštas, taikant aiškias taisykles gardelės elementais padalintose audinio zonose; tuomet skirtingo kontroliuojamo ploto SZ yra pasirenkama ir suskirstoma į rangus pagal atstumą nuo naviko krašto tam, kad būtų galima apskaičiuoti naviką infiltruojančių limfocitų (NIL) tankio profilius visoje SZ. Remiantis šiais duomenimis, apskaičiuojami nauji imunogradientiniai rodikliai, atspindintys NIL „gravitaciją“ naviko link. Šį metodą pritaikėme CD8 imunohistochemijos būdu nudažytiems vaizdams, gautiems tiriant chirurgiškai pašalintus krūties ir storosios žarnos navikus siekiant prognozuoti bendrą paciento išgyvenimą. Abiejose pacientų grupėse, nustatyta stipri ir nepriklausoma imunogradientinių rodiklių prognozinė vertė, kuri pranoksta šiuo metu esančių metodų rezultatus. Tai leidžia daryti išvadą, kad, duomenimis pagrįstas, automatizuotas, nepriklausomas nuo operatoriaus, SZ nustatymas leidžia atlikti erdvinis imuninio atsako matavimus naviko-šeimininko sąveikos fronto linijoje, siekiant prognozuoti ligos ir gydymo rezultatus.

Automatizuotas naviko ir stromos sąsajos zonos nustatymas, skirtas naviko atsako įvertinimui naudojant imunogradientinius indikatorius

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su naviko ir stromos sąveikos zonos (SZ) nustatymo būdu ir imunogradientiniais rodikliais, kurie gali būti naudojami navikais sergančių pacientų išgyvenimo prognozei nustatyti.

Technikos lygis

Vienas pagrindinių šiuolaikinės genetikos atradimų – viso žmogaus genomo sekos analizė – susiejo konkrečias genetines mutacijas su naviko vystymusi. Tai formavo naviko koncepciją kaip ląstelių ligą, kurią sukelia genetinės mutacijos [1, 2]. Nors genetiniai mechanizmai paaiškina daugelį naviko progresavimo aspektų, daugelis naviko požymių, įskaitant šeimininko imuninį ir uždegiminį atsaką, angiogenezę ir metabolinius veiksnius, išsivysto naviko mikroaplinkos (NMA) kontekste [3]. Ypač svarbi naviko-šeimininko audinių sąveikos varomoji jėga yra uždegiminis ir imuninių ląstelių infiltratas. Solidinius navikus infiltruoja tiek įgimtos (ląstelės natūralios žudikės, makrofagai, neutrofilai, fagocitai), tiek įgytos imuninės kilmės ląstelės (T limfocitai, B limfocitai ir dendritinės ląstelės) [4]. Supratus mechanizmus, kuriais naviko ląstelės gali slopinti šeimininko priešnavikinį imuninį atsaką, ir sukūrus naujas imunoterapijos priemones, galinčias aktyvinti imuninės sistemos atsaką, tyrinėjimų dėmesys persikėlė į priešnavikinio imuninio atsako komponentų ir biožymenų paiešką bei tyrimus [5, 6].

Naviką infiltruojantys limfocitai (NIL) ir jų pasiskirstymas tam tikrame NMA aspekte, yra laikomi prognostiniais ir predikciniais biožymenimis įvairiuose navikų tipuose. Atlikus klinikinius ir eksperimentinius tyrimus, CD3+, CD4+, CD8+ ir FOXP3+ NIL buvo susieti su prognoze vertė tokiuose navikuose, kaip melanoma, storosios žarnos, krūties, plaučių, šlapimo pūslės, prostatos, inkstų ar kepenų ląstelių karcinoma [5, 7-10]. Nors NIL galima apibūdinti sąveikomis ir vaidmeniu tarp T ir B ląstelių, tačiau siekiant įvertinti NMA ir suprasti priešnavikinį atsaką, būtina atsižvelgti ne tik į funkcinius, bet erdvinius aspektus [11]. Galon et al. atlikęs išsamius storosios žarnos naviko (SŽV) imunomo tyrimus (Galon et al 2012), kurie buvo paremti imunohistocheminiais (IHC) bei skaitmeninės vaizdo analizės (SVA) metodais, nustatė, kad ne tik CD3+ ir CD8+ NIL sudėtis, bet ir jų pasiskirstymas navike bei invazijos riboje (IR) koreliuoja su ligos prognoze. Šiai dienai, šis atradimas jau perkeltas į kliniškai patvirtintą *Immunoscore®* indikatorių, kuris pasitvirtino, kaip

nepriklausomas prognozės veiksnys, pranokstantis įprastinę naviko, limfmazgių ir metastazių (TNM) klasifikavimo sistemą [13]. Be to, naujausi tyrimai atskleidė, kad NIL turi didelę prognozinę ir predikcinę vertę esant trigubai neigiamam ir žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorių 2 (HER2) teigiamam krūties navikui (KN) [14, 15]. Vidunavikinės T ląstelės yra laikomos naujos imunogramos koncepcijos kertiniu akmeniu ir leidžia atlikti išsamų paciento priešnavikinio atsako įvertinimą, kuriuo remiantis galima parinkti imunoterapiją įvairiuose navikų tipuose [16-18].

Bet kurio metodo, kuriuo siekiama įvertinti naviko imuninį kontekstą, tikslas – nustatyti imuninių ląstelių kiekį ir jų lokalizaciją lyginant su naviko ląstelėmis [8, 19, 20]. Imuninių ląstelių, esančių NMA, skaičiavimas yra susijęs ne tik su tikslu naviko ir stromos regionų nustatymu, bet ir būtinybe aiškiai ir atkartojamai apibrėžti IR [8]. Nepriklausomai nuo to, ar IR nustatyti yra taikomi vizualūs ar SVA metodai, IR apibrėžimai yra nevienareikšmiški. 1986 m. Jass [21] pasiūlė IR apibrėžimą, tiriant histomorfologinius prognostinius rodiklius tiesiosios žarnos karcinomoje, ir apibūdino dvi skirtingas IR konfigūracijas – ekspansyviąją (arba stumiančią) ir infiltracinę. Stumiančioji IR nustatoma vizualiai, kai histologinio mikropreparato tyrimo metu galima nustatyti aiškią naviko ir imuninio infiltrato ribą. Navikai, turintys infiltracinę IR konfigūraciją, turi santykinai netaisyklingą augimo modelį, kuriame sunku atskirti naviko ir imuninio infiltrato agregatus [21, 22]. Daugelis kitų tyrimų naudoja IR apibrėžimą, kurį pasiūlė Galon et al. [23] ir IR apibrėžia kaip 1 mm pločio regioną aplink naviko ir stromos kraštą. Vis dėlto, remiantis šiuo apibrėžimu nėra aišku kas yra naviko kraštas (NK). Be to, norint pritaikyti šį apibrėžimą būtina, kad ekspertas nuspręstų, kur yra NK ir rankiniu būdu jį nubrėžtų. Tad esant netaisyklingam ir infiltruojančiam naviko augimo modeliui, toks IR nustatymo būdas kelia ne tik abejonių dėl šališkumo, bet ir gali sukelti ekspertų tarpusavio variaciją. Tokiu būdu, yra sumažinamas tyrimo tikslumas ir pajėgumas, net jei kiti analizės etapai yra automatizuoti. Dėl šios priežasties tyrimai, kurie taiko šį apibrėžimą IR nustatyti, gali sukurti nepakankamą NIL ir kitų NMA įvertinimo tyrimų informacinę galią ir klinikinę naudą. 2018 m. Harder ir kt. [24] taip pat pritaikė *audinių fenomikos* metodą, siekiant atrasti SVA pagrįstus biožymenis, kurie leistų prognozuoti prostatos navikų atkrytį. Šiame darbe SVA etapas buvo pagrįstas morfologinėmis savybėmis nustatant naviko ir stromos regionus bei automatiškai išskiriant NK kaip regioną vienodai nutolusį į naviką ir stromą. Kitas neseniai atliktas tyrimas [25] pasiūlė duomenų pagrindu pagrįstą metodiką, skirtą nustatyti imuninės aplinkos konteksto biožymenis, tačiau šiam tikslui pasiekti taikė rankinį (vizualų) naviko ir stromos regiono nustatymo etapą.

Šiame išradime pristatome naują imunogradiento rodiklių rinkinį, apskaičiuotą automatizuotu būdu išskirtoje naviko ir stromos SZ. Būdas pirmiausia nustato NK, naudojant aiškias taisykles, pagrįstas IHC ir SVA duomenimis. Vėliau nustatoma SZ kaip tam tikro atstumo regionas esantis aplink NK, apskaičiuojami NIL tankio profiliai visoje SZ. Nustatyta, kad rodikliai, apibūdinantys poslinkį/gradientą į naviko pusę prognozuoja hormonų receptorių teigiamų KN ir SŽN pacientų bendrą išgyvenimą (BI).

Trumpas išradimo aprašymas

Sistemos išvestis yra įverčiai, apskaičiuoti naudojant imunogradientinius rodiklius, ir įverčiai, kurie leidžia numatyti paciento išgyvenimo laiką.

Imunogradientinių rodiklių skaičiavimo sistemos įvestis yra: i) informacija, kuris pikselis priklauso kuriai audinio ar audinio mikroskopinio preparato klasei, ir ii) kiekvienos audinyje atpažintos ląstelės koordinatės bei informacija apie ląstelės tipą.

Siekiant gauti įvesties duomenis, reikalingas naviko audinys, kuris gali būti gautas, pavyzdžiui, po jo chirurginio pašalinimo. Po to, apdorojus tiriamą navikinį audinį, jis yra supjaustomas pjūviais, kurie naudojami dažymo procedūrai atlikti taikant, pavyzdžiui, IHC arba imunofluorescencijos metodą. Tikslus pjūvio storis ir dažymo metodas priklauso nuo naviko audinio tipo, pavyzdžiui, KN ir SŽN gali būti naudojamas 3 µm storio formaline fiksuotas parafine impregnuotas pjūvis atpjautas ant teigiamo krūvio stiklo, kuris dažomas IHC metodu naudojant antikūnus prieš citotoksines T ląsteles (CD8), kuris po to kontrastuojamas hematoksilinu. Tuomet atliekama SVA naudojant nudažytą audinio mėginį, kuris, pavyzdžiui, yra nuskenuojamas 20x padidiniu naudojant šviesinį mikroskopą. Aprašyta tyrimo metodika taip pat gali būti taikoma kitiems navikų tipams, pavyzdžiui, plaučių, inkstų, kepenų ląstelių navikams, melanomai. Be to, panašus būdas gali būti taikomas ne tik navikų patologijoje, bet ir, pavyzdžiui, nustatant uždegiminių ląstelių ir fibrozės tankio profilius kepenų skiltelėse siekiant įvertinti ligos aktyvumą, hepatito chroniškumą ir kepenų cirozę.

Klasifikavimo įvesties duomenys pikselių lygmenyje gali būti sukurti naudojant išorinius SVA įrankius. Sukurtas naujas skaitmeninis vaizdas turi tas pačias vaizdo charakteristikas (dydį, skiriamąją gebą, pikselių dydį), tačiau šiame vaizde kiekvienas pikselis atitinka nustatytą audinio klasę, o ne spalvą, kuri matoma mikroskopu. Bet koks baigtinis pikselių klasių skaičius yra naudojami kaip įvesties duomenys ir tai gali būti, pavyzdžiui, naviko, stromos, nekrozės ar artefaktų (pavyzdžiui, audinių raukšlės, peilio suardytas audinys, dengiamosios terpės likučiai (klijai) ar kt.) klasės. Pavyzdžiui, HALO programinė įranga

(versija 2.2.1870; „Indica Labs“, Corrales, New Mexico, JAV) naudoja neuronų tinklais paremtą klasifikatorių, kuris gali būti apmokytas siekiant nustatyti navikui būdingus audinius, tokius kaip naviką, stromą, limfinius folikulus, artefaktus ir regionus, tokius kaip, pavyzdžiui, nekrozės, audinių raukšlių ar kai nėra audinio ar patį mikroskopijos stiklą.

Išoriniai SVA įrankiai taip pat gali būti naudojami siekiant nustatyti kitus įvesties duomenis – ląstelių koordinates ir jų tipą dominančiame skaitmeniniame vaizde.

Skaičiuojant SZ, t.y. regioną, kuriame sąveikauja dvi ar daugiau audinių klasės, sistema pirmiausia nustato siaurą sąveikos kraštą (SK), kuris vėliau yra išplečiamas į SZ. Tad norint atlikti naviko prognozavimą, metodas pirmiausia suranda NK, kuris vėliau yra išplečiamas į naviko/stromos SZ.

Pirmasis būdo etapas – suklasifikuotų pikselių sudalinimas į vienodo dydžio gardelės elementus išdėstytus taip, kad jie apimtų visą regioną ir nesikirstų su jokia kitu gardelės elementu. Įprastą gardelės tinklėlį sudaro gardelės elementai, tokie kaip kvadratai, stačiakampiai, šešiakampiai arba bet kurios kitos formos daugiakampiai. Nustatant SZ, pirmenybė yra teikiama šešiakampiams gardelės elementams, nes jie optimaliai atspindi turinio pokyčius visomis kryptimis.

Kiekviename gardelės elemente gaunamas kintamųjų duomenų rinkinys. Šį rinkinį sudaro (bet jo neapriboja): visų pikselio klasių santykinis plotas, kiek ląstelių ir kuriam ląstelių tipui jos priklauso konkrečiame gardelės elemente. Santykinis plotas apskaičiuojamas sudedant konkrečios klasės plotus kiekviename gardelės elemente, pikseliais arba kvadratiniais tam tikro mato vienetais, ir padalijant iš visų gardelės elementų naudojant tą patį pasirinktą ploto vienetą. Pavyzdžiui, naviko tyrimo atveju, pageidautina, kad būtų trys santykiniai plotai, naviko, stromos ir fono, kurių sudarytų visos kitos (ne naviko ir stromos) pikselių klasės. Visų santykinių plotų dydžiai svyruoja nuo 0 iki 1 ir kiekviename gardelės elemente santykinio ploto suma yra lygi 1. Naudojant ląstelių skaičių ir santykinį plotą kiekviename gardelės elemente, galima apskaičiuoti ląstelių tankį, kuris gali būti apskaičiuotas naudojant skirtingus ląstelės tipų ir santykinio ploto derinius. Pavyzdžiui, nustatant naviko/stromos SZ, kintamųjų duomenų rinkinį turėtų sudaryti naviko ir stromos audinių klasių santykiniai plotai bei bendras fono klasės, apimančios visų likusių audinių klasių pikselių, santykinis plotas.

Taikant santykinius plotus, metodas pirmiausia nustato SK įvertinant dviejų tipų informaciją: i) staigius santykinių plotų pokyčius gardelės elementuose ii) invazijos sritis, kuriose dominančių klasių turinys yra panašaus tankio. Siekiant nustatyti staigius pokyčius, metodas apskaičiuoja audinio klasės plotų geometrinio gradiento normas kiekvienoje šešiakampėje gardelėje. Geometrinio gradiento norma apskaičiuoja visus pokyčius kiekvienoje audinio

klasėje, tačiau nėra atsižvelgiama į skirtingų audinio klasių sukeltus pokyčius gretimose gardelės elementuose. Pavyzdžiui, gradiento norma apskaičiuoja visus naviko ploto pokyčius, bet konkrečiai neišskiria naviko/stromos ir naviko/fono pokyčių. Tai svarbu, nes naviko/stromos SZ neturėtų priklausyti nuo naviko/fono pokyčių. Norint atskirti gradiento normą, metodas atskirai vertina kiekvieną išvestinę išilgai gardelės elementų ašių ir apskaičiuoja svorio sąlygas naviko plotui, remdamasis santykiniais pokyčiais kitose audinio klasėse pagal šias ašis. Pavyzdžiui, analizuojant naviko, stromos ir fono klases bei jų išvestines išilgai x ašies, naviko ploto išvestinė yra suskaičiuojama pagal absoliučią stromos išvestinę, padalytą iš absoliučios stromos ir absoliutaus fono išvestinių sumos. Panašiai apskaičiuojama naviko ploto išvestinė išilgai likusių gardelės elementų ašių, kuri yra suskaičiuojama pagal absoliučią fono klasės išvestinę, padalytą iš absoliučios stromos ir absoliutaus fono išvestinių sumos. Tai suskirsto naviko ploto išvestinę į dvi dalis: vieną dalį, suskaičiuotą pagal santykinius stromos pokyčius ir kitą dalį, kuri yra suskaičiuota pagal bendrus fono klasių pokyčius. Tai atlikus visoms gardelių elementų ašims, gradiento norma yra išskiriama į dvi įvertintas (pasvertas) gradientų normas; vieną, kuri atitinka naviko išvestinės vektorių įvertintą (pasvertą) pagal stromą, ir kitą, įvertintą (pasvertą) pagal foną. Visi trys gradientai yra svarbūs norint teisingai nustatyti NK, tuo tarpu likę gardelių elementai yra perklasifikuojami į atitinkamas audinio klases ir sąveikos elementus.

Pavyzdžiui, norint išskirti naviko-stromos SZ, veiksmai atliekami šia pageidaujama eilės tvarka:

1. Jei naviko gradiento norma yra didesnė už pageidaujamą/pasirinktą slenkstinę vertę, laikoma, kad gardelės elementas turi staigius pokyčius; arba kitaip sakant jis yra NK.

- a. Staigūs pokyčiai, nustatyti naviko gradiento normos, apima visas audinio klases, esančias šalia naviko. Vis dėlto svarbu atskirti, kurios tai audinio klasės, nes NK atveju tik staigūs pokyčiai tarp naviko/stromos klasių turi būti priskirti NK, o pokyčiai tarp naviko/fono klasių neturi būti vertinami atliekant tolimesnę analizę. Audinių klasių porą, kuri sukėlė staigius pokyčius, galima nustatyti atliekant pasvertų/įvertintų gradientų normų palyginimą, pavyzdžiui, vertinant pagal maksimalų. Jei didžiausia norma yra sukurta naviko įvertinto (pasverto) pagal stromos gradientą, gardelės elementas yra laikomas NK dalimi; kitu atveju yra ignoruojamas.

2. Gardelės elementai, kurie nepriskiriami NK, yra suklasifikuojami į tam tikras audinio klases pagal pasirinktą audinio klasių santykinį plotą įvertį, pavyzdžiui, kadangi viename

gardelės elemente visų audinio klasių santykinų plotų suma lygi 1, pasirenkamas klasifikavimo įvertis gali būti didžiausias santykinis plotas.

3. Gardelės elementai, priklausantys vienai iš tikslinių klasių, t.y. naviko ir stromos klasėms, su panašaus dydžio naviko ir stromos audinių santykiniais plotais priskiriami NK invazyviam komponentui. Pavyzdžiui, jeigu absoliutus naviko ir stromos audinių santykinų plotų skirtumas yra mažesnis nei parinkta slenkstinė vertė, laikoma, kad gardelės elementai turi panašius naviko ir stromos audinių plotus ir yra NK dalis.

Atliekant 1, 2 ir 3 veiksmus, visi gardelės elementai suklasifikuojami į NK arba kitą audinių sąveikos klasę, kuri neanalizuojama. Pavyzdžiui, kiekvienas skaitmeninį navikinio audinio vaizdą dengiančios gardelės elementas gali būti priskiriamas naviko, stromos, fono, NK (apima naviko/stromos pokyčius) klasėms arba naviko/fono „krašto“ klasei, kuri neįtraukiama į naviko/stromos SZ analizę. Aukščiau aprašyti veiksmai gali būti pritaikyti ir nenavikinei patologijai, pavyzdžiui, normalaus ir/ar ne-neoplastinio epitelio ir stromos audinių sąveikos zonos nustatymui.

Teoriškai, parenkamas gardelės elemento dydis gali būti nuo vieno pikselio iki viso analizuojamo regiono ploto dydžio. Parinkus gardelės elementus, kurių dydis yra artimas vienam pikseliui, SZ nustatymui gali būti panaudoti tiksliai pikselio lygmens požymiai (t.y. neįtraukiami invazyvūs regionai kaip aukščiau aprašytame 3 veiksmė), tuo tarpu labai dideli gardelės elementai neleidžia įvertinti pokyčių tokiu tikslumu, kuris reikalingas NK nustatyti. Taigi, gardelės elementų dydis priklausys nuo taikymo ir išgaunamos informacijos detalumo, reikalingo NK nustatymui. Naviko/stromos SZ nustatymui vėžio audinyje buvo pasirinkta šešiakampių su $65\mu\text{m}$ ilgio šonine kraštine gardelė, kurios dėka įtraukiami tiek staigūs pokyčiai, tiek audinio klasifikavimas ir invazyvūs regionai, nustatomi aukščiau aprašytais 1-3 veiksmiais.

Nustačius NK, toliau metodas įvertina kiekvieno gardelės elemento trumpiausią atstumą iki NK. Tokiu būdu gardelės elementai gali būti suskirstomi į rangus kiekvienoje audinio klasėje pagal atstumą nuo NK. Galiausiai išskiriama SZ, nufiltruojant gardelės elementus, kurie nuo centrinės NK ribos yra toliau nei pasirinktas atstumas (rangas). Pavyzdžiui, galima pasirinkti šešiakampių elementus, kurie nutolę netoliau kaip per 5 šešiakampius nuo NK. Pabrėžtina, kad jeigu kuri audinių klasė sudaro „siaurus“ regionus, tik esamas audinys įtraukiamas į SZ, o gretimi audiniai nėra „verčiami“ būti SZ dalimi.

Svarbi šio veiksmo savybė ta, kad SZ kiekvienas pasirenkamas rangas kiekvienoje audinio klasėje, t.y. 1-as rangas 2-oje audinio klasėje, apims grupę gardelės elementų. Taigi, visuose audinio-rango deriniuose išgaunami duomenų kintamųjų skirstiniai. Šie skirstiniai gali būti lyginami statistiniais metodais ar bendrinant pagrindinius požymius, pavyzdžiui, vidurkius ir standartinius nuokrypius.

Visų pirma, parenkant audinio klasių porą SZ nustatymui, rangai gali būti sudaromi priskiriant neigiamą ženklą vienos iš klasių atstumams. Pavyzdžiui, tais atvejais, kai analizuojama naviko-stromos SZ, neigiamas ženklas gali būti priskiriamas stromos klasės atstumams. Sudedant gardelės elementų duomenų kintamuosius kiekviename range, galima įvertinti, kaip ląstelės ir/ar ląstelių tankiai pasiskirsto apjungtame rangų profilyje, kuris, pavyzdžiui, apima rangus nuo - 4 stromoje, NK rangą 0 ir apima 1 - 4 rangus navike.

Nustačius SZ, suskirsčius ją į rangus pagal atstumus nuo NK ir sudėjus duomenų kintamuosius kiekvienam audinio-rango derinyje, galima apskaičiuoti SZ profilių rodiklius. Galima naudoti daugelį rodiklių tipų, bet navikinių audinių atveju, kai išskiriama naviko-stromos SZ, du rodikliai buvo stipriausi pacientų išgyvenamumo prognostiniai veiksniai.

Masės centro (MC) rodiklis: naudojamas fizikoje, apskaičiuoja tikslią koordinatę (rangą), ties kuria turi būti paremiamas SZ profilis tam, kad jis liktų pusiausvyroje. Priešingu atveju, profilis palinks į SZ stromos ar naviko pusę. Skaičiuojant, kintamųjų vertės ranguose padauginamos iš rangų eilės ir sudedamos, tuomet padalinama iš kintamųjų verčių ranguose sumos.

Imunonukryčio (IN) rodiklis: tai kintamųjų verčių ranguose -1 ir 1 santykis. Jis parodo ar rango kintamųjų vertės nukrypusios į SZ stromos ar naviko pusę, tik žymiai siauresniame intervale.

MC ir IN yra tinkami vėžio atveju, kadangi jie aprašo CD8 tankio profilių ypatumus individualiuose navikuose. Skirtingi rodikliai gali būti tinkami skirtingų vėžių atvejais. Tai parodyta faktorine analize KV ir SŽV imtyse. Atskiri atvejai gali būti sugrupuojami pagal jų individualius MC ir/ar IN įverčius ir/ar juos atitinkančių faktorių įverčius. Be to, metodo statistinei galiai padidinti SZ profilio rodikliai gali būti apjungiami, taikant aprašomąją kintamųjų pasiskirstymo SZ gardelės elementuose statistiką. Pavyzdžiui, vėžio atveju, integruoto SZ CD8 faktoriaus įvertis, apskaičiuotas sudedant dviejų faktorių, aprašančių CD8 tankį ir CD8 tankio „gradientą link naviko“, įverčius, buvo stipriausias bendro pacientų išgyvenamumo prognostinis veiksnys tiek KV, tiek SŽV atveju. Šio metodo pranašumas yra tas, kad pagal imunogradientinius rodiklius vėžiu sergančių pacientų imtys sugrupuojamos

naudojant tik vieno žymens (CD8) imunohistocheminį dažymą, lyginant su metodais, kuriems reikalingas mažiausiai dviejų žymenų dažymas.

Kitas metodo pranašumas parodytas hormonų receptorių KV sergančių pacientų imtyje pastebėjus nuo laiko priklausomą prognostinį efektą, kuris buvo būdingas grupuojant imtį pagal SZ gradientinius rodiklius, bet ne CD8 ląstelių vidutinį tankį SZ naviko dalyje. Šie duomenys patvirtina, kad imunogradientiniai rodikliai turi pranašumą lyginant su kitais esamais priešnavikinio imuninio atsako patologijos vaizduose vertinimo metodais. Rodiklių pavadinimai gali būti keičiami priklausomai nuo analizės paskirties, kuri gali būti susijusi ne tik su audinio imuninio atsako vertinimu.

Brėžinių aprašymas

1 paveikslas. SŽV audinio CD8 IHC mėginio viso pjūvio vaizdas, konvertuotas į juodą ir baltą. Tai yra pavyzdys skaitmeninio vaizdo, kuris gaunamas iš SŽV mėginio, kuris analizei šviesiniu mikroskopu nudažomas IHC.

2 paveikslas. SŽV audinio vaizdas, išoriniu įrankiu suklasifikuotas pikselio tikslumu. Juodai balti raštai vaizduoja 5 skirtingas audinio klases ir tai, kaip pikselio lygmens audinio klasifikavimo rezultatai išoriniais SVA įrankiais gali būti perkelti į vaizdą, kuriame audinio klasės vaizduojamos skirtingais intensyvumais.

3 paveikslas. Klasifikavimo vaizdas padengtas gardele. Padidintas vaizdo fragmentas rodo šešiakampių gardelės elementus dengiančius fono, naviko ir stromos klases ir kaip gardelė padengia klasifikavimo vaizdą atsitiktine padėtimi. Pateiktame pavyzdyje, gardelės elementai yra šešiakampiai su 65 μm ilgio šonine kraštine.

4 paveikslas. Naviko, stromos audinių ir fono santykinų plotų apjungimas gardelės elementuose. Šviesesni elementai susideda daugiausiai iš stromos, tamsūs elementai - daugiausiai iš fono, tarpiniuose pilkuose elementuose vyrauja daugiausia stroma. Tai rodo, kaip suklasifikuoto audinio santykiniai plotai apjungiami į klasių pogrupius. Naudojamos tik naviko ir stromos klasės, kitos audinio klasės yra priskiriamos fono klasei.

5 paveikslas. Naviko pokyčiai gardelėje nustatant NK pavaizduoti tamsiais gardelės elementais. Jis rodo naviko pokyčius gardelėje, apskaičiuotus pagal naviko santykinų plotų geometrinio gradiento normą.

6 paveikslas. Naviko audinio suskirstymo į naviko/stromos pokyčius ir naviko/fono pokyčius rezultatas. Naviko pokyčiai suskirstyti į naviko/stromos (vidutiniškai pilka) ir

naviko/fono (tamsesnis atspalvis) klases. Tamsus naviko/fono kraštas nėra naviko/stromos krašto dalis ir nenaudojamas nustatant SZ.

7 paveikslas. Šešiakampių klasifikavimo į audinio tipus ir naviko kraštą (NK) rezultatai.

Gardelės elementai pergrupuojami į naviko krašto (NK, šviesiausi elementai), stromos (antri pagal šviesumą elementai), naviko (antri pagal tamsumą elementai), fono (tamsiausi elementai) arba naviko/fono (vidutinis intensyvumas) klases.

8 paveikslas. Trumpiausių atstumų iki nustatyto NK apskaičiavimo kiekvienam šešiakampiui rezultatai. Šešiakampių atstumai iki NK (balti elementai). Kiekvienas spalvos intensyvumas atitinka tam tikrą atstumo vertę.

9 paveikslas. 9 šešiakampių pločio sąveikos zona. NK apima šviesiausius gardelės elementus, šviesesni intensyvumai atitinka SZ naviko dalį, o tamsesni intensyvumai atitinka SZ stromos dalį. Tamsiausi gardelės elementai nėra SZ dalis. SZ gaunama apjungiant gardelės elementų audinio klasę su jos rangu pagal atstumą iki NK.

10 paveikslas. CD8+ tankių profiliai KV ir SŽV imtyse.

11 paveikslas. SZ CD8 ląstelių tankio profilių individualiais KV ir SŽV atvejais pavyzdžiai. Skirtingi pilki atspalviai atitinka skirtingas gardelės elementų klases po klasifikavimo (vidurinis stulpelis).

12 paveikslas. Faktorių grafikai, atskleidžiantys vienodus modelius KV ir SŽV imtyse. Faktorių 1 ir faktorių 2 gaunami faktorinei analizei naudojant tankio profilių rodiklius SŽV ir KV imtyse.

13 paveikslas. Kaplano ir Mejerio kreivės išgyvenamumo pagal tankio profilių rodiklius prognozei.

Detalus išradimo aprašymas

Dažymo ir mikroskopijos procedūros atliktos su 3 µm storio FFPI KV ir SŽV audinių pjūviais padengtais ant teigiamai įkrautų mikroskopinių stiklų (gali būti naudojami ir kitokie mikroskopiniai stiklai). IHC atlikta naudojant Roche Ventana BenchMark ULTRA automatu (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). Naudoti antikūnai prieš citotoksinių T ląstelių žymenį CD8 (klonas C8/144B, DAKO; antikūno skiedimas 1:400), taikyta ultraView Universal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) detekcijos sistema. IHC pjūviai buvo dažomi Mejerio hematokslinu. IHC preparatai buvo skaitmenizuojami skenuojant x20 objektyvo padidiniu (0.5 µm rezoliucija) su ScanScope

XT stiklų skeneriu (Leica Aperio Technologies, Vista, CA, USA) (1 paveikslas). Metodui gali būti naudojamos bet kokios rankinės ar automatinės IHC, imunofluorescencijos, ar kitos mikroskopijos dažymo ir vaizdinimo technikos, kurios suteikia informacijos apie navikinio audinio struktūras ir tikslinius žymenis erdviniam šių struktūrų kontekste.

2-ame paveiksle pateikiamas skaitmeninis vaizdas, kuriame kiekvienas pikselis vaizduojamas tam tikra spalva pagal priskirtą audinio klasę pateiktą 1-ame paveiksle. Ši informacija yra viena iš dviejų įvesties informacijų, reikalingų sąveikos zonos nustatymo metodui. 2-as paveikslas iliustruoja kaip ši informacija gali būti panaudota sąveikos zonos nustatymui skaitmeniniame vaizde, tačiau bet kokia audinio klasės informacija pikselio tikslumu, t.y. visuma regiono koordinatų, susietų su tam tikra klase, bus irgi tinkama. Klasifikavimo metodas nėra susijęs su sąveikos zonos nustatymu; klasifikavimas gali būti atliktas su bet kuriais SVA įrankiais.

2-ame paveiksle pateikiamas vaizdas buvo gautas naudojant SVA programą HALO (versija 2.2.1870; Indica Labs, Corrales, New Mexico, United States). Vėžio tipui specifiniai HALO AI audinių klasifikatoriai buvo apmokyti atpažinti naviko, stromos ir fono (sudaryto iš nekrozės, artefaktų ir stiklo) bei naviko, stromos, limfoidinių folikulų, nekrozės ir fono (sudaryto iš stiklo ir artefaktų) klases KV ir SŽV atvejais, atitinkamai.

Antroji metodo įvesties informacija yra tikslinių ląstelių/struktūrų koordinatės, saugomos bet kuria skaitmenine forma, t.y. tekstiniuose failuose, skaičiuoklėse, duomenų bazėse ir kt. CD8 teigiamų ląstelių nustatymui ir koordinatų išgavimui KV ir SŽV imtyse buvo naudotas HALO Multiplex IHC algoritmas. Duomenys buvo nuskaityti iš duomenų bazės.

3-as paveikslas vaizduoja kaip pikselio lygmens audinio klasifikavimas yra suskirstomas naudojant įprastą gardelės tinklėlį, kuriame nustatomas NK ir SZ. 2-ame paveiksle pateiktas automatinis pikselio lygmens audinio klasifikavimo rezultatas, išgautas automatine SVA, buvo padengtas gardelės tinkleliu atsitiktine padėtimi. Gardelės elementai gali būti kvadratai, trikampiai, šešiakampiai ar kiti poligonai, kuriais galima pilnai padengti analizuojamą regioną. Pageidautina naudoti šešiakampę gardelę, kadangi ji tinkamiausia aprašyti pokyčius visomis kryptimis. Pasirinktas gardelės elementų dydis turi būti pakankamai mažas tam, kad įvertinti sąveikos zonos pokyčius, tačiau pakankamai didelis tam, kad aptikti infiltratyvius regionus. 3-ame paveiksle SVA rezultatai suskirstomi šešiakampių (šoninė kraštinė 65 μ m ilgio) gardele, kuri padengiama atsitiktine padėtimi. Gardelės tipas ir dydis gali būti parinktas pagal audinio tipą, patologiją, biožymens sintezės lygį ar pasiskirstymo pobūdį.

4-as paveikslas apibendrina surinktų santykinų plotų duomenis. Apskritai, kintamųjų rinkinys V surenkamas kiekviename gardelės elemente. Sąveikos zonos nustatymui, kintamieji turi

apimti tiek skirtingų audinio klasių plotus, tiek aptiktų ląstelių skaičius kaip antrąją įvesties informacijos dalį. Dėl šešiakampių dydžio variavimo, vietoj absoliučių plotų naudojami santykiniai kiekvienos regiono klasės plotai gardelės elementuose.

Nepriklausomai nuo to, kiek regiono klasių buvo suklasifikuota pikselių lygmenyje, naudojami tik trys ploto santykiai: naviko ploto santykis t , stromos ploto santykis s ir fono ploto b santykis, kuris yra gautas sujungus likusias SVA klases. Bet kuriam šešiakampiui h , priklauso elementas $v \in V$ ir yra žymima kaip $v(h)$; naviko ploto santykis yra $t(h)$, arba t , kai h yra nedviprasmiškas. 3-as paveikslas vaizduoja šešiakampio plotų santykius (t , s , b) atitinkančius raudoną, žalią ir mėlyną spalvas.

5-as paveikslas vaizduoja apskaičiuotus staigius ploto pokyčius vienai audinio klasei, šiuo atveju naviko klasei. Bet kokio $v \in V$ pokytis šešiakampėje gardelėje yra apskaičiuotas panaudojus geometrinę normą $|\nabla_v(h)|$, kuri gauta apskaičiavus išvestines kiekvienai gardelės elemento ašiai, pvz. trys šešiakampio ašys (x , y , z); d_x^v – žymi v kintamojo išvestinę išilgai x ašies (šešiakampis h), todėl d_x^t yra naviko ploto santykio pokytis išilgai x ašies. Bendras pokytis gali būti apskaičiuotas panaudojus gradiento normą. Taigi, bendras naviko ploto santykio pokytis yra naudojamas sąsajos gavimui:

$$|\nabla_t| = \sqrt{(d_x^t)^2 + (d_y^t)^2 + (d_z^t)^2}.$$

Gradiiento apskaičiavimui yra daug skirtingų metodų. Siekiant optimizuoti skaičiavimo greitį šešiakampėms gardelėms kai kurie metodai panaudoja linijinę kombinaciją tarp išvestinių. Tokia kombinacija tinkama, tačiau norint gauti kuo tikslesnę informaciją pageidautina, kad visos išvestinės turėtų indėlį gradiento skaičiavime. 5-as paveikslas vaizduoja normalizuotą gradientą, pažymėtą $\langle \nabla_t \rangle \in [0; 1]$, kuris yra atvaizduojamas ant audinio ir kuris paaiškina kaip naviko pokyčiai yra užfiksuojami.

6-as paveikslas vaizduoja naviko pokyčio atskyrimą į naviko/stromos ir naviko/fono pokyčių poras. Išskiriant SZ zoną tikrai naviko ploto pokyčiai, atsiradę dėl stromos kaimynų yra naudojami, atmetant pokyčius atsiradusius dėl fono. Taigi pokyčiai naviko plote $|\nabla_t|$ yra suskirstyti į naviko ir galimų gardelės kaimynų poras: naviko/stromos dalį ir naviko/fono dalį.

Tai buvo atlikta naviko išvestinėms priskyrus svorius su santykiniais pokyčiais į strumą ir foną: d_x^t priskirtas santykinų s ir b pokyčių svoris.

$${}_s d_x^t = d_x^t \frac{|d_x^s|}{\sum_{i \neq t} |d_x^i|} = d_x^t \frac{|d_x^s|}{|d_x^s| + |d_x^b|} \quad \text{ir} \quad {}_b d_x^t = d_x^t \frac{|d_x^b|}{\sum_{i \neq t} |d_x^i|} = d_x^t \frac{|d_x^b|}{|d_x^s| + |d_x^b|}$$

Tai motyvuojama tuo kad, jei kažkuriame šešiakampyje fono ploto kiekis labai mažai kinta, bet koks naviko ploto pokytis gali būti interpretuojamas kaip pokytis „sukeltas“ dėl stromos ploto pokyčių ir atvirkščiai. Pažymėtina, kad ${}_s d_x^t + {}_b d_x^t = d_x^t$, o tai užtikrina, kad jokia informacija nebus pridėta ar prarasta – ji tik atskirta. Atskyrimo svoriai yra panašūs išilgai y ir z, todėl bendras pokytis $|\nabla_t|$ gali būti atskirtas s ir b:

$$|\nabla_t| = |\nabla_t^s + \nabla_t^b|$$

Naviko pokyčių atskirtis į naviko/stromos ir naviko/fono pokyčius pavaizduotas 6-ame

paveiksle naudojant $|\nabla_t^s| = \sqrt{({}_s d_x^t)^2 + ({}_s d_y^t)^2 + ({}_s d_z^t)^2}$ ir

$|\nabla_t^b| = \sqrt{({}_b d_x^t)^2 + ({}_b d_y^t)^2 + ({}_b d_z^t)^2}$ su atitinkamai šviesesniais ir tamsesniais pilkos spalvos atspalviais.

7-as paveikslas vaizduoja gardelės tinklėlį ir visus jo elementus perklasifikuotus taip kad priklausytų arba audinio klasei arba NK, sudarant ribą tarp dominančių regiono klasių. Paveiksle parodyti stromos šešiakampiai yra žali, naviko – raudoni, fono – mėlynos spalvos ir NK, atskiriantis naviką ir strumą – geltoni. Gardelės elementų klasifikavimas gali būti atliekamas naudojant jau esamus klasifikavimo/klasterizavimo mašininio mokymosi metodus tik keliems regionams, todėl yra pageidautina rankiniu būdu nustatyti klasterizavimo slenkstines vertes. Siekiant nuosekliai sugrupuoti šešiakampius elementus į naviko, stromos, fono, NK ir naviko/fono sąsajas, normalizuotas gradientas, kuris žymimas $\langle \nabla_v \rangle \in [0; 1]$, yra naudojamas kaip tikimybė šešiakampiui priklausyti NK. Taigi gardelės elementai yra skirstomi į šiuos veiksmus:

1. Staigūs naviko ploto frakcijos pokyčiai nustatomi patikrinant ar $\langle \nabla_t \rangle > 0.5$.

- a. Visiems šešiakampiams, kuriems galioja ši sąlyga, $\langle \nabla_t^a \rangle$ ir $\langle \nabla_t^b \rangle$ maksimumas nulemia kam, atitinkamai NK ar naviko/fono sąveikos zonai, jie priklausys.
2. Gardelės elementai, kurie neturi staigių pokyčių, aprašytų 1a žingsnyje, yra suskirstomi į regiono audinių klases, kuriame navikas, stroma arba fonas yra sugrupuojami pagal didžiausius t , s ir b santykinius plotus, nes viso audinio santykinio ploto suma yra lygi 1 kiekviename gardelės elemente:
- $$t + s + b = 1, \text{ where } t, s \text{ and } b \in [0; 1].$$
3. Galiausiai, invaziniai audinių regionai yra identifikuojami šešiakampiuose, 2-ame etape klasifikuotuose kaip navikas ar stroma ir turinčiuose beveik vienodą naviko ir stromos santykinį plotą. Pavyzdžiui, naviko ir stromos šešiakampiai (pagal 2 etapą), kurių $|t - s| < 0.25$ yra laikomi, turintys panašų naviko ir stromos kiekį ir yra priskiriami prie invazyvaus NK ploto.

Pavyzdys yra skirtas pademonstruoti pritaikytą metodą vėžio naviko-stromos sąveikos zonos nustatymui. Bendrai, bet kurį pageidaujamą slenkstį galima panaudoti gradiento normai apskaičiuoti bet kuriai audinių klasei norint nustatyti ar gardelės elementai yra ant konkrečios klasės krašto. Priklausomai nuo biologinių procesų ir tikslo, galima pasirinkti išsaugoti atskirų audinio klasių kraštus arba papildomai atskirti kraštą, į atitinkamą įtaką turinčias klases sugretinus kaimyninių audinių klases. Be to, papildomų invazinių sričių pridėjimas yra neprivalomas, kaip ir pasirinktų kriterijų prioritetai, skirti įtraukti gardelės elementus į centrinį kraštą (navikinio audinio kraštas).

8-ame paveiksle vaizduojamas NK, pažymėtas geltona spalva, ir apskaičiuotas pasinaudojus paprasta šešiakampių atstumų transformacija, kai kiekvieno šešiakampio trumpiausias atstumas iki NK yra apskaičiuotas. Paveiksle vaizduojamas atstumas šešiakampėse gardelėse panaudojus atsitiktinį šešiakampio pilkos spalvos intensyvumą kiekvienai atstumo vertei. Galima rinktis iš kelių atstumo matavimų, pvz. Euklidinio, kuris, kaip pavyzdys, naudojant šešiakampius elementus ir skaičiuojant atstumą gardelėje buvo pakankamas.

9 paveiksle parodyta pilna sąveikos zona su centriniu NK (pažymėta geltona spalva) ir gretimos naviko ir stromos pusės (pažymėta atitinkamai geltona ir žalia spalvomis). Siekiant nustatyti SZ naviko ir stromos pusės, bet kuriam šešiakampiui h priskirti rangai, kurie buvo paskaičiuoti pasinaudojus atstumų skaičiavimais iliustruotais 8 paveiksle.

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

NK rangas yra lygus 0, naviko pusėje rangas yra teigiamas atstumas nuo NK, o stromos pusėje – neigiamas atstumas nuo NK. Likusios audinių klasės (fonas ir navikas/fonas) yra neįtraukiamos į tolimesnes analizes. Dabar SZ, susidedantį iš NK ir greta esančio naviko ir stromos audinio, gali būti apibrėžtas skirtingiems pločio pasirinkimams. Čia SZw reiškia SZ, sudaryta iš rango intervalo $\left[-\left\lfloor \frac{w}{2} \right\rfloor; \left\lfloor \frac{w}{2} \right\rfloor\right]$, kur $\lfloor \cdot \rfloor$ yra apvalinamas iki artimiausio sveikojo skaičiaus, esančio arčiausiai 0. Panašiai pagal rangus galima nustatyti skirtingus centrinio NK pločius: TE = TE1 (susidedantis iš r_0) ir TE3 (priklausančiam intervalui $[-1; 1]$ ir panašiai, o tai gali būti svarbu skirtingiems taikymams ir vėžio tipams. Jei nenurodyta kitaip, TE nurodo TE1.

10-as paveikslas vaizduoja, kaip galima apskaičiuoti informaciją apie ląstelių tankį SZ viduje ir išorėje, transformuojant/apibendrinant kiekvieno šešiakampio rangų duomenų vertes į rango kiekybinę įvertį. Tokie kiekybiniai įverčiai sudaro bendrą sąsajos profilį, kuris atskleidžia, kaip ląstelių tankiai (ar kitos savybės) gali skirtis SZ viduje ir už jos ribų. 10 paveikslas vaizduoja CD8+ tankio stačiakampes diagramas, apskaičiuotas tiek KN, tiek SŽN grupėms, o 11 paveikslas vaizduoja NK ir CD8 + tankio profilius kiekvienam atvejui atskirai.

Sąveikos zonų profiliai išreiškia kryptinės dispersijos (gradiento) savybes nuo stromos į naviką. Keli ląstelių tankio dispersijos rodikliai buvo patikrinti SZ ir už jos ribų, siekiant nustatyti statistinę galią prognozuojant bendrą išgyvenimą. Nustatyti du stipriausi ląstelių tankio rodikliai:

Masės centras (MC):

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

kur r_i indeksuoja visus SZ rangus, pvz. SZ9 – $r_i \in [-4; 4]$, bei $q(r_i)$, žyminti rango įverčio pasirinkimą, pvz. CD8+ ląstelių tankio vidurkį. MC apskaičiuoja koordinatę ant horizontalios ašies, pagal kurią būtų palaikomas profilis, išsilaikantis tobulame horizontaliame balanse. Ir atvirkščiai, tai gali būti suprantama kaip matavimo priemonė, leidžianti pamatuoti į kurią pusę linksta biožymuo (ar turi teigiamą gradientą).

Imunonuokrytis (IN):

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

Šis rodiklis rodo staigius ląstelių tankio pokyčius arčiausiai NK ir yra apskaičiuotas kaip rangų santykis tarp -1 ir 1. Kadangi šis staigus tankio nuokrytis dažnai buvo stebimas tiriant CD8+ ląsteles, rodiklis buvo pavadintas Imunonuokrytis. Priklausomai nuo konkrečių biologinių procesų, kuriuos atspindi specifinis biožymuo, šis indikatorius gali atspindėti ir kitų audinių atitinkamus staigius pokyčius visoje SZ (pvz., angiogenezės, fibrozės, proliferacijos).

11-as paveikslas iliustruoja CD8 ląstelių tankio profilius kiekvienam atvejui atskirai KN ir SŽN pacientų kohortose. MC ir IN rodikliai pasitvirtino kaip labai geri indikatoriai, kadangi jie geba užfiksuoti CD8 tankio profilių savybes/skirtumus atskiruose naviko atvejuose. Kituose navikuose kiti rodikliai gali būti optimalūs.

12-as paveikslas vaizduoja KN ir SŽN pacientų kohortų faktorinės analizės rezultatus. Ne tik MC ir IN rodikliai yra įtraukti, bet ir, siekiant dar labiau padidinti metodo statistinę galią, SZ profilio rodikliai gali būti sujungti pasinaudojus duomenų kintamųjų aprašomosios statistikos pasiskirstymus SZ gardelės elementuose. Iš paveikslo matyti, kad imunogradientinių rodiklių rinkinys atsižvelgiant į faktorinę analizę gali būti suskirstytas į du ortogoniškai nepriklausomus veiksnys. Konkrečiai, tiek KN, tiek ir SŽN kohortose, faktorius 1 gali būti vertinamas kaip „CD8 tankio lygis“, o 2 faktorius - „CD8 gradientas į naviką“.

13-as paveikslas parodo, kaip individualūs atvejai po faktorinės analizės procedūros gali būti suskirstyti pagal jų individualias MC ir/arba IN rodiklių reikšmes, naudojant juos kaip pirminius kintamuosius ir/arba su jais susijusių faktorių reikšmių įverčius, gautus iš faktorinės analizės. Paveikslai (g, h) iliustruoja ypač gerą atskyrimą naudojant susumuotą faktoriaus vertę, apskaičiuotą kaip „CD8 tankio“ ir „CD8 gradiento“ faktorių sumą abiejose pacientų kohortose.

Visų pirma, anksčiau nežinomas nuo laiko priklausomas poveikis buvo aptiktas KN pacientų prognoziniam pasiskirstyme (12 paveikslas (g)): nors daugiau nei 92% pacientų abiejose grupėse buvo gyvi po 5 metų nuo atliktos operacijos; tačiau bendro išgyvenimo kreivės pacientams, turintiems aukštą ir mažą suminę SZ CD8+ atsako faktoriaus reikšmę, smarkiai išsiskyrė nuo šio taško iki pat pabaigos su 87% ir 55% bendro išgyvenimo tikimybe po 10 metų. Tarp kitko, šis nuo laiko priklausomas veiksnys pasireiškė tik gradientinio tipo indikatoriams (paveikslas 12 (c, e, g)), bet ne CD8+ ląstelių vidutinio tankio pasiskirstyme

naviko pusės SZ (paveikslas 12 (a)). Šis atradimas akcentuoja imunogradientinių rodiklių galią, gauta iš chirurgiškai pašalintų žmonių, kurie buvo nudažyti IHC metodu naudojant antikūnus prieš citotoksines T ląsteles (CD8), prognozuoti ilgalaikę pacientų, turinčių šią gana gerai valdomą ligą, prognozę. Be to, tai reiškia, kad priešnavikinės imuninio atsako savybės, kurios potencialiai lemia ilgalaikę ligos rezultatą, yra koduojamos NMA ir kurios gali būti užfiksuotos imunogradientiniu tyrimu. Biologinis šio reiškinio interpretavimas veda link hipotezės, kad individualios imuninio atsako savybės įsitvirtina jau ankstyvosiose KN stadijose ir yra labai svarbios norint pasiekti pilną pasveikimą, nepaliekant potencialių naviko ląstelių ir naudojant standartines terapijas.

Šiame tyrime metodas buvo patvirtintas savo prognozinė verte dviejose nepriklausomose pacientų grupėse, turinčiose palyginamą atliktį ir panašius rezultatus. Tas pats metodas gali būti taikomas prognozuojant kitus tyrimo rodiklius, tokius kaip išgyvenimą be ligos, gydymo rezultatus tiek su klinikiniais, tiek ir su eksperimentiniais nustatymais. Ne navikinėje patologijoje, pavyzdys galėtų būti hepatito uždegiminių sąsajų profiliai, kurie gali būti siejami su biocheminėmis ligos aktyvumo savybėmis ar kitais tyrimo rezultatais.

Literatūra

1. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
2. Wong, K.M., T.J. Hudson, and J.D. McPherson, *Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2011. **12**: p. 407-30.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Whiteside, T.L., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5904-12.
5. Taube, J.M., et al., *Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics*. Mod Pathol, 2018. **31**(2): p. 214-234.
6. Parra, E.R., A. Francisco-Cruz, and 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**(2).
7. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
8. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
9. Hussain, S.P., et al., *Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3333-7.
10. Chraa, D., et al., *T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes*. J Leukoc Biol, 2019. **105**(2): p. 243-255.
11. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-8.
12. Galon, J., et al., *Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 205.
13. Galon, J., et al., *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours*. J Pathol, 2014. **232**(2): p. 199-209.
14. Jang, N., et al., *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**(4): p. 937-946.
15. Denkert, C., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy*. Lancet Oncol, 2018. **19**(1): p. 40-50.
16. van Dijk, N., et al., *The Cancer Immunogram as a Framework for Personalized Immunotherapy in Urothelial Cancer*. Eur Urol, 2019. **75**(3): p. 435-444.
17. Karasaki, T., et al., *An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(5): p. 791-803.

18. Blank, C.U., et al., *CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram"*. Science, 2016. **352**(6286): p. 658-60.
19. Hendry, S., et al., *Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research*. Adv Anat Pathol, 2017. **24**(5): p. 235-251.
20. Hendry, S., et al., *Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors*. Adv Anat Pathol, 2017. **24**(6): p. 311-335.
21. Jass, J.R., et al., *The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases*. Histopathology, 1986. **10**(5): p. 437-59.
22. Jass, J.R., S.B. Love, and J.M. Northover, *A new prognostic classification of rectal cancer*. Lancet, 1987. **1**(8545): p. 1303-6.
23. Mlecnik, B., et al., *The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis*. Sci Transl Med, 2016. **8**(327): p. 327ra26.
24. Harder, N., et al., *Tissue Phenomics for prognostic biomarker discovery in low- and intermediate-risk prostate cancer*. Scientific Reports, 2018. **8**.
25. Schwen, L.O., et al., *Data-Driven Discovery of Immune Contexture Biomarkers*. Frontiers in Oncology, 2018. **8**.

Išradimo apibrėžtis

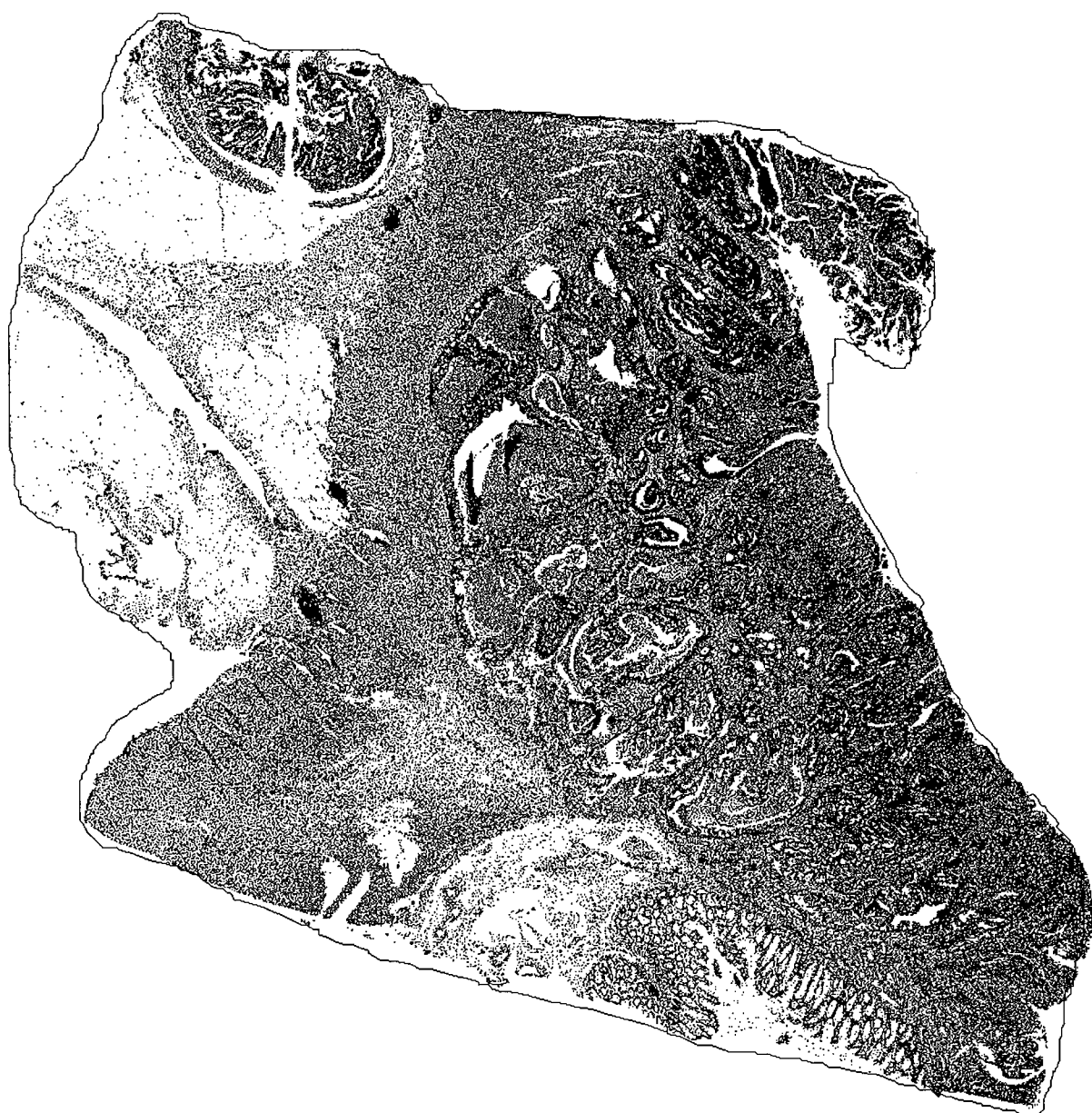
1. Automatizuotas būdas, skirtas ląstelių tankiui ir biožymenų raiškai nustatyti naviko/šeimininko sąveikos zonoje, charakterizuojamas tuo, kad jis apima šiuos žingsnius:

- a) gardelės elementais pagrįstą skaitmeninės vaizdo analizės duomenų apdorojimą, gautą iš vieno ar daugiau audinio pjūvių mikroskopinių vaizdų, nudažytų antikūnų savitu prisijungimu prie antigenų (žymenų), kuriuos sintetina imuninės ląstelės ir kitos ląstelės,
- b) naviko krašto nustatymą, sujungiant audinio turinio ir kaimynystės požymius, susijusius su imties vaizdų analizės duomenimis, siekiant atskirti naviko kraštą nepriklausomai nuo naviko augimo pobūdžio,
- c) gardelės elementais padengtų audinio pjūvių erdvinį rangavimą pagal audinio turinį ir atstumą iki mėginio naviko krašto,
- d) kintamo pločio sąveikos zonos išskyrimą,
- e) ląstelių tankio ir biožymenų raiškos profilių ir jų dispersijų kiekybinį nustatymą sąveikos zonoje, siekiant sukurti gradiento tipo rodiklius, tokius kaip masės centras,
- f) pasirinktinai, kiekybinių ir gradiento rodiklių apjungimą, siekiant gauti papildomos informatyvios vertės konkrečioms analizės užduotims atlikti.

2. Būdas pagal 1 punktą, skirtas vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo prognozei.

3. Būdas pagal 2 punktą, kur vėžys yra parinktas iš storosios žarnos vėžio, krūties vėžio, plaučių vėžio, inkstų vėžio arba melanomos.

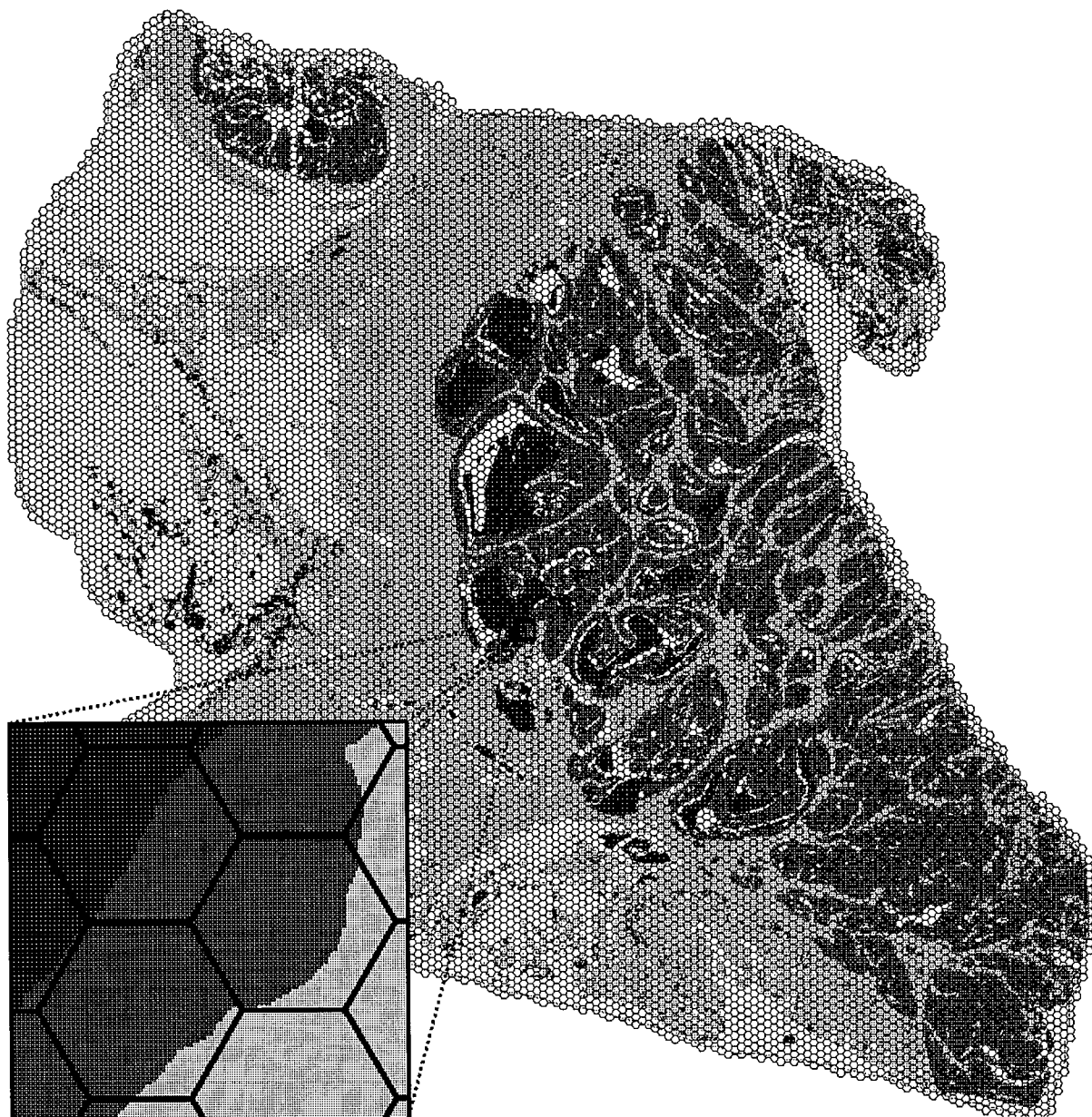
4. Būdas pagal bet kurį iš 1 - 3 punktų skirtas terapijos rezultatų prognozei.



1 pav.



2 pav.



3 pav.



4 pav.



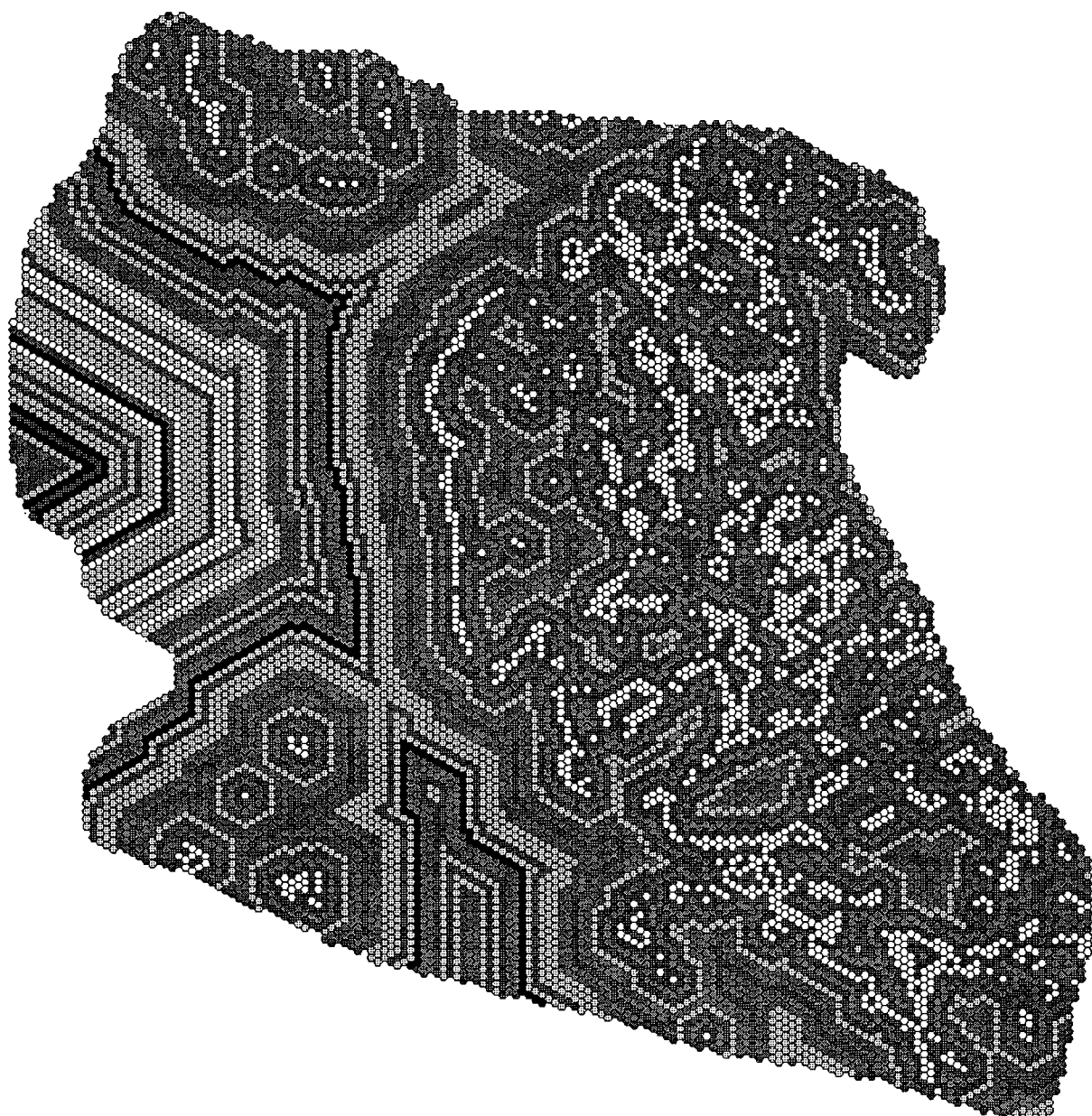
5 pav.



6 pav.



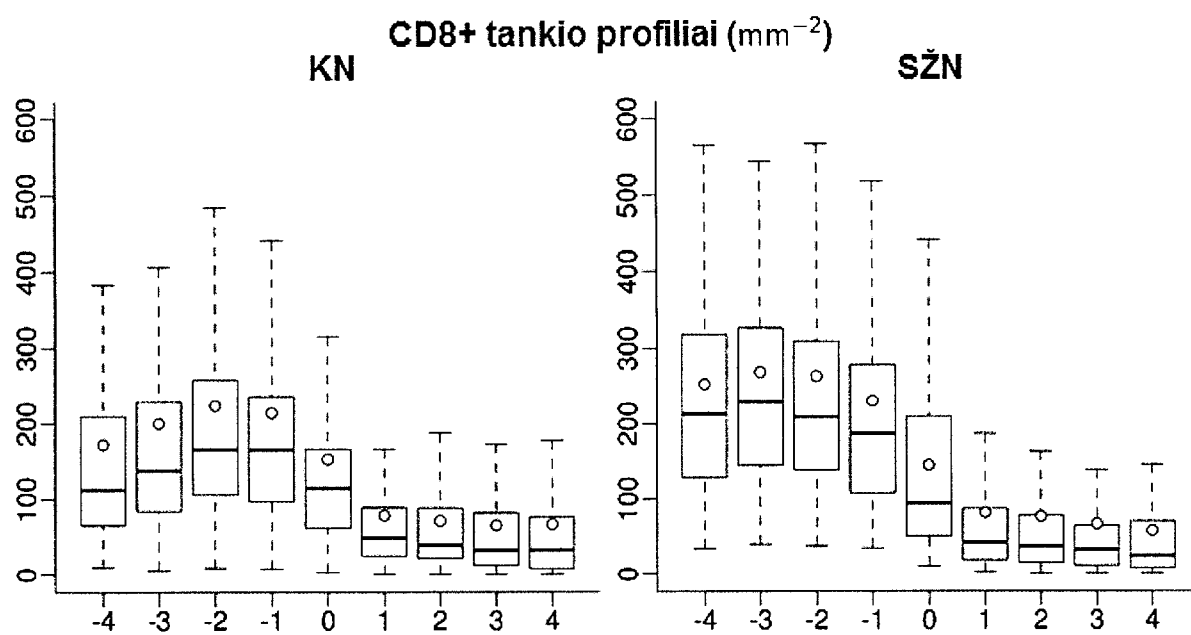
7 pav.



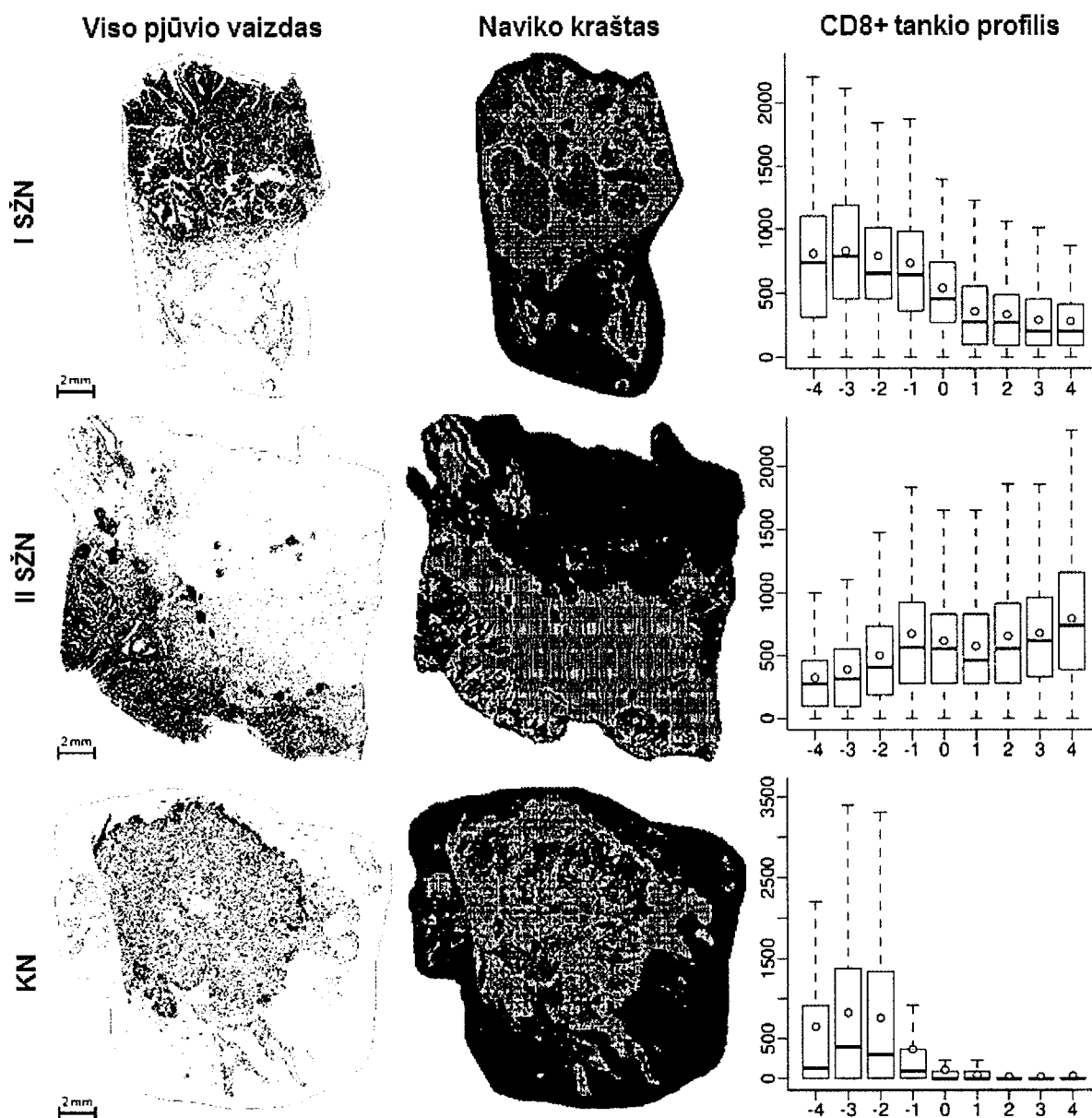
8 pav.



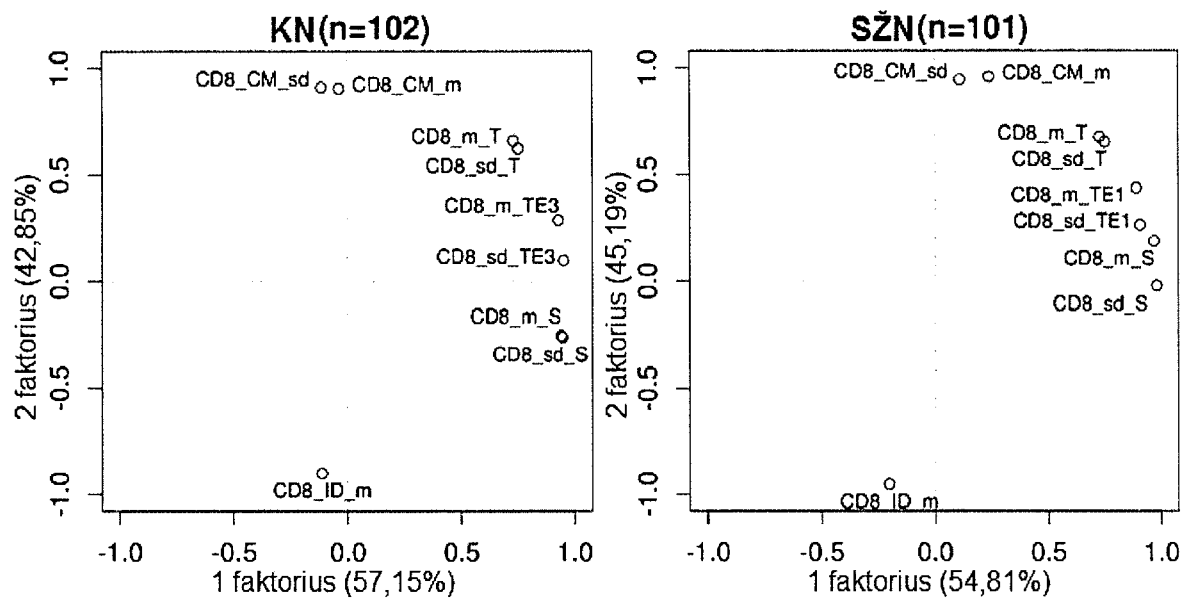
9 pav.



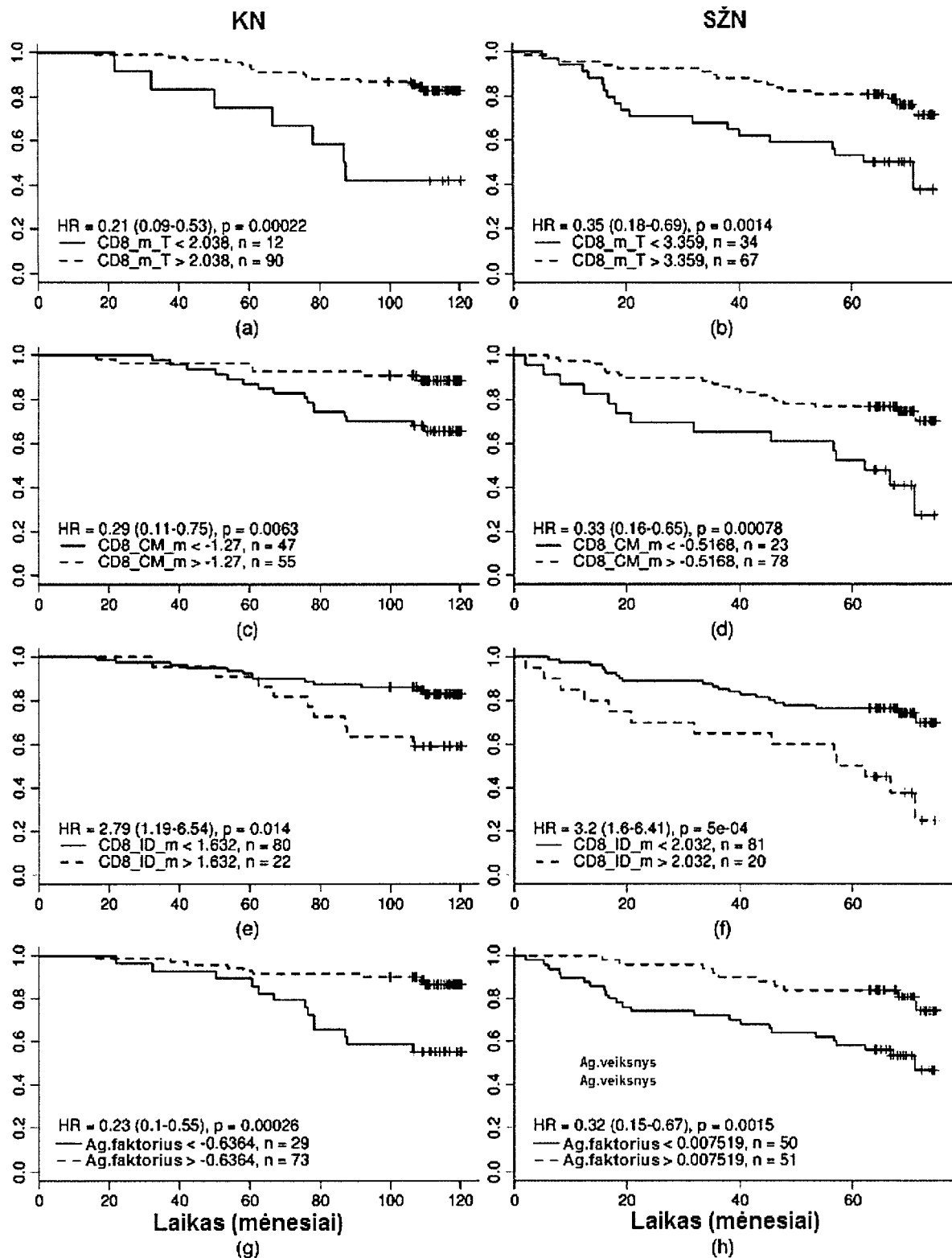
10 pav.



11 pav.



12 pav.



13 pav.