

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.378>

<https://orcid.org/0000-0002-8356-1473>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Karolina Žilionytė

Chemoimunoterapijos efektyvumo
vertinimas pelių navikų modeliuose,
pasižyminčiuose skirtingu antigeno
apdorojimo ir pateikimo mechanizmo
funkcionalumu

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija N 010

VILNIUS, 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universitete ir Nacionaliniame vėžio institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba, ES struktūrinis fondas, Nacionalinio vėžio instituto Mokslo fondas.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Vita Pašukonienė (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biologija - N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004);

Nariai:

dr. Rėda Matuzevičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina - M 001).

dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija - N 010);

prof. dr. Viktor Umansky (Heidelbergo universitetas, Vokietija, gamtos mokslai, biologija - N 010).

prof. dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, gamtos mokslai, biochemija - N 004);

dr. Ilona Uzielienė (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija - N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. rugsėjo 27 d., Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre 11 valandą R – 401 auditorijoje ir/arba nuotoliniu būdu.

Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva

Tel. +37062513232, el. paštas karolina.zilionyte@nvi.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.378>

<https://orcid.org/0000-0002-8356-1473>

VILNIUS UNIVERSITY

Karolina Žilionytė

Evaluation of chemoimmunotherapy
efficacy in murine tumor models with
different antigen processing and
presentation mechanism functionality

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology N 010

VILNIUS, 2022

This dissertation was prepared between 2017 and 2021 at Vilnius University and National Cancer Institute.

The research was supported by Research Council of Lithuania, European Funds and Scientific Foundation of National Cancer Institute

Academic supervisor - Prof. Dr. Vita Pašukonienė (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biology - N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, Natural Sciences, Biochemistry - N 004);

Members:

Dr. Rėda Matuzevičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001);

Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology - N 010);

Prof. Dr. Viktor Umansky (Heidelberg University, Germany, Natural Sciences, Biology - N 010);

Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, Natural Sciences, Biochemistry - N 004);

Dr. Ilona Uzielienė (Center for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biology - N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11 h on 27th September 2022 in Room R-401 of Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania

Tel. +37062513232; e-mail: karolina.zilionyte@nvi.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	8
1. ĮVADAS	10
1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai.....	11
1.2 Darbo naujumas.....	12
1.3 Ginamieji teiginiai.....	12
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
2.1 Vėžys ir jam būdingos savybės	13
2.2 Priešnavikinis imuninis atsakas.....	14
2.2.1 Priešnavikinio imuninio atsako inicijavimas	15
2.2.2 Navikinių ląstelių atpažinimas ir sunaikinimas	17
2.2.3 Kitos priešnavikiniam imuniniam atsakui svarbios imuninės ląstelės.....	20
2.3 Navikiniai Ag, jų paruošimas ir pateikimas MHC-I keliu	22
2.3.1 Navikiniai Ag.....	22
2.3.2 Navikinių Ag paruošimas ir pateikimas MHC-I keliu	23
2.4 Naviko imunosupresiniai mechanizmai	24
2.4.1 Pokyčiai naviko Ag apdoravimo ir pateikimo mechanizme.....	25
2.4.2 Imunosupresinės ląstelės.....	26
2.4.3 Naviko supresoriniai faktoriai.....	27
2.5 Priešvėžinė imunoterapija	27
2.5.1 Dendritinių ląstelių vakcinos	28
2.5.2 Antikūnai, nukreipti prieš imuninės patikros tašką PD-1	30
2.6 Strategijos priešvėžinės imunoterapijos efektyvumui pagerinti.....	31
2.6.1 Predikciniai biožymenys.....	32
2.6.2 Chemoterapijos ir imunoterapijos derinimas	33
2.7 Navikų su sutrikusiu AAPM gydymas.....	39
2.8 Ikiklinikiniai tyrimai.....	40
2.8.1 Transplantuojami singeniniai pelių navikiniai modeliai.....	41
2.8.2 Pelių navikinės ląstelių linijos.....	42
3. TYRIMŲ METODIKA	43
3.1 Aparatūra ir priemonės.....	43
3.2 Medžiagos	44
3.3 Pelės.....	46
3.4 Ląstelių linijos ir jų kultivavimas.....	46
3.5 Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo įvertinimas.....	46
3.6 LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacijos <i>in vitro</i> vertinimas	47
3.7 LLC1 ir GL261 ląstelių lizatų paruošimas	47
3.8 Pelių dendritinių ląstelių vakcinų gamyba	47
3.9 Navikų sukėlimas ir jų augimo sekimas pelėse.....	48

3.10 Prieš LLC1 ląsteles nukreipto imuninio atsako skatinimas suleidžiant navikinius Ag	49
3.11 Pelių su LLC1 ar GL261 navikais jautrumo imunoterapijai vertinimas	50
3.12 LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumo ciklofosfamidui vertinimas <i>in vitro</i>	50
3.13 Ciklofosfamido poveikio LLC1 ir GL261 ląstelių imunogeniškumui vertinimas <i>in vitro</i>	51
3.14 Efektyvios ciklofosfamido dozės gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais parinkimas	51
3.15 Pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymo ciklofosfamidu efektyvumo vertinimas	51
3.16 Pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymo ciklofosfamido ir imunoterapijos deriniais vertinimas	52
3.17 Pelių navikinės medžiagos ir blužnių apdorojimas	52
3.18 Ląstelių paviršiaus žymenų vertinimas tėkmės citometru.....	53
3.19 Su imuniniu atsaku susijusių genų raiškos analizė RT-PCR metodu.....	54
3.20 Statistinė duomenų analizė	55
4. REZULTATAI.....	56
4.1 LLC1 ir GL261 ląstelių charakterizavimas	56
4.1.1 LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacija <i>in vitro</i>	56
4.1.2 AAPM funkcionalumas LLC1 ir GL261 ląstelėse.....	56
4.2 AAPM funkcionalumo įtaka priešnavikiniam imuniniam atsakui	58
4.2.1 Sąryšis tarp AAPM funkcionalumo navikinėse ląstelėse ir naviko imuninės mikroaplinkos pobūdžio	58
4.2.2 Imuninio atsako sukėlimas prieš LLC1 navikus, pasižyminčius nefunkcionaliu AAPM	62
4.3. AAPM funkcionalumo įtaka LLC1 ir GL261 navikų jautrumui DLV ir anti-PD-1	64
4.3.1 <i>Ex vivo</i> paruoštų pelių dendritinių ląstelių vakcinų kokybės vertinimas.....	64
4.3.2 Ryšys tarp AAPM funkcionalumo ir naviko atsako į dendritinių ląstelių vakciną ir anti-PD-1	66
4.4 Ciklofosfamido imunomoduliacinis poveikis LLC1 ir GL261 ląstelėms	69
4.4.1 LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumas ciklofosfamidui <i>in vitro</i>	70
4.4.2 Ciklofosfamido gebėjimas sukelti imunogeninę LLC1 ir GL261 ląstelių žūtį <i>in vitro</i>	70
4.4.3 Ciklofosfamido poveikis LLC1 ir GL261 ląstelių AAPM <i>in vitro</i>	71

4.4.4 Optimalios ciklofosfamido dozės gydant peles su LLC1 ar GL261 navikais paieška	74
4.4.5 Ciklofosfamido efektyvumas gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais	76
4.5 Ciklofosfamido ir imunoterapijos kombinacijų efektyvumas gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais.....	80
4.5.1 Ciklofosfamido ir imunoterapijos kombinacijų efektyvumas gydant peles su LLC1 navikais	80
4.5.2 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija efektyvumas gydant peles su GL261 navikais	85
4.5.2.1 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija poveikis lokaliai prieš GL261 navikus nukreiptam imuniniam atsakui	85
4.5.2.2 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija poveikis sisteminiam imuniniam atsakui.....	89
4.5.2.3 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija gebėjimas aktyvuoti imuninį atmintį prieš GL261 ląsteles	91
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	95
IŠVADOS	104
LITERATŪROS SĄRAŠAS	105
PRIEDAI.....	127
SANTRAUKA.....	131
SUMMARY	131
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	176
PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE	177
CURRICULUM VITAE.....	178
PADĖKA	180
UŽRAŠAMS.....	181

SANTRUMPOS

- AAPM – Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizmas
Ag – antigenas
Ak – antikūnas
CD – pelių grupė, gydyta ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų kombinacija
CP – pelių grupė, gydyta ciklofosfamido ir anti-PD-1 kombinacija
CDP – pelių grupė, gydyta ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų ir anti-PD-1 kombinacija
CY – ciklofosfamidas
CTLA-4 – su citotoksinais T limfocitais susijęs antigenas 4 (angl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4)
DAMP – su ląstelių pažaidomis susijusios molekulinės struktūros (angl. damage-associated molecular patterns)
DL – dendritinė ląstelė
DLV – dendritinių ląstelių vakcina
DT – dvigubėjimo laikas (angl. doubling time)
FBS – fetalinis veršelio serumas (angl. fetal bovine serum)
FDA – Maisto ir vaistų administracija (angl. Food and Drug Administration)
Gr1⁺ MKL – mieloidinės kilmės ląstelių grupė, apimanti MKSL, neutrofilus ir granulocitus
IC₅₀ – koncentracija, reikalinga sukelti 50 % ląstelių augimo slopinimą
ICI – imuninės patikros taškų slopikliai (angl. immune checkpoint inhibitors)
ILŽ – imunogeninė ląstelių žūtis
Kseno AEP – avies embriono plaučių audinio lizatas
Kseno ŽEN – žiurkės embriono nervinio audinio lizatas
MKSL – mieloidinės kilmės supresinės ląstelės (angl. myeloid-derived suppressor cells)
MoAk – monokloninis antikūnas
NK – natūralūs kileriai (angl. natural killer cell)
NO – azoto monoksidas (angl. nitric oxide)
NSCLC – nesmulkiąląstelinis plaučių vėžys (angl. non-small-cell lung carcinoma)
NVI – Nacionalinis vėžio institutas
PAMP – su patogenais susijusios molekulinės struktūros (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PD-1 – programuotos ląstelių žūties baltymas 1 (angl. programmed cell death protein 1)
PD-L1 – programuotos ląstelės žūties ligandas 1 (angl. programmed death-

ligand 1)

RT-PCR – tikro laiko polimerazinė grandininė reakcija

SN – standartinis nuokrypis

T_{CM} – centrinės atminties T limfocitai

T_{EM} – efektoriniai atminties T limfocitai

TGI – naviko slopinimo indeksas (angl. tumor growth inhibition rate)

Th – T pagalbiniai limfocitai (angl. T helper)

TIL – naviką infiltruojantys limfocitai (angl. tumor infiltrating lymphocytes)

TLR – Toll receptoriai (angl. Toll-like receptors)

TMB – naviko mutacinis dažnis (angl. tumor mutational burden)

Treg – reguliaciniai T limfocitai

VFI – vidutinis fluorescencijos intensyvumas (angl. mean fluorescence intensity)

1. ĮVADAS

Per pastarąjį dešimtmetį imuninę sistemą moduluojančių preparatų taikymas onkologinėmis ligomis sergantiems pacientams tapo vienu svarbiausiu priešvėžinio gydymo metodu, leidžiančiu daliai pacientų pasiekti ilgalaikę remisiją ir pailginti išgyvenimo trukmę [1]. Vis tik imunoterapijos efektyvumas yra ribotas, o teigiamas gydymo efektas yra pasiekiamas tik nedidelei daliai pacientų. Objektyvaus atsako dažnis gydant imuninės patikros taškų slopikliais (ICI, angl. immune checkpoint inhibitor), nukreiptais prieš PD-1/PD-L1 kelią, pasiekiamas iki 40% [2], o gydant dendritinių ląstelių vakcinomis (DLV) – iki 15% onkologinių pacientų [3]. Siekiant pagerinti imunoterapijos efektyvumą yra svarbu nustatyti galimus naviko atsparumo imunoterapijai mechanizmus, nustatyti predikcinius biožymenis gydymo individualizavimui bei ieškoti efektyvių kombinacinio gydymo strategijų [1].

Įvairios imunoterapijos, įskaitant ICI, T limfocitų terapiją ir DLV, pasižymi skirtingu veikimo mechanizmu, tačiau jas sieja tai, kad jų terapinis efektas priklauso nuo CD8 T limfocitų - pagrindinių ląstelių kovoje su vėžiu [4]. Tyrimai rodo, kad tiek naviką infiltruojančių limfocitų (TIL, angl. – tumor infiltrating lymphocytes) skaičius, tiek su T limfocitų atsaku susiję veiksniai, tokie kaip naviko mutacinis dažnis (TMB, angl. tumor mutational burden), neoantigenų skaičius, PD-L1 raiška navikinių ląstelių paviršiuje turi predikcinę vertę individualizuojant gydymą T limfocitų veikimu paremta imunoterapija [5]. Vis dėlto, sėkmingam klinikiniam šių predikcinių žymenų taikymui trukdo jų ribotumas, tad universalių žymenų ar jų derinių paieška išlieka aktuali iki šių dienų [6],[7].

CD8 T limfocitų galėjimas atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles didžiąja dalimi priklauso nuo naviko ląstelių gebos apdoroti antigenus (Ag) ir pateikti juos kartu su MHC-I molekule savo paviršiuje. Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizme (AAPM) dalyvauja įvairūs baltymai ir juos koduojančių genų raiškos pokyčiai gali turėti reikšmingos įtakos naviko Ag pateikimo imuninei sistemai efektyvumui bei priešnavikiniam imuniniam atsakui [8]. Tyrimai rodo, kad sumažėjusi pavienių AAPM koduojančių genų raiška gali lemti nefunkcionalų AAPM, taip pat žemą TIL kiekį, atsparumą gydymui ICI bei atskleidžia potencialią predikcinę šio mechanizmo vertę ICI taikymui [9],[10],[11]. Vis dėlto, vertinant pavienių AAPM genų raišką dažnai gaunami nevienareikšmiai rezultatai, besiskiriantys tarp vėžio lokalizacijų ir netgi tos pačios lokalizacijos ribose ir ne visada koreliuojantys su atsaku į gydymą. AAPM yra sudėtingas, apimantis daugybę skirtingų,

koordinuotai veikiančių baltymų ir tik kompleksinis AAPM genų rinkinio raiškos įvertinimas gali suteikti pakankamai informacijos apie AAPM funkcionalumą ir išlikti universaliu parametru nepaisant skirtumų tarp pacientų ar vėžio lokalizacijų.

Siekiant pacientus, kurių navikuose nustatyti AAPM sutrikimai, įjautrinti imunoterapijai, tampa svarbu aktyvuoti navikinių ląstelių AAPM. Tyrimai rodo, kad AAPM pokyčiai, susiję su reguliavimo mechanizmu, yra grįžtami ir gali būti moduluojami įvairiomis terapinėmis priemonėmis [12]. Pastebėta, kad AAPM navikinėse ląstelėse gali aktyvuoti IFN- γ [13], DNR metiltrasferazių [14] ir histonų deacetilazių [15] slopikliais bei įvairiais chemoterapiniais vaistais [16],[17],[18]. Chemoterapiniai vaistai ne tik geba aktyvuoti navikinių ląstelių AAPM, bet taip pat pašalina didžiąją dalį navikinių ląstelių, sukelia imunogeninę navikinių ląstelių žūtį, selektyviai šalina imunosupresines ląsteles ir tokiu būdu sukuria palankią aplinką imunoterapijos veikimui [19].

Ciklofosfamidą (CY) – tai chemoterapinis vaistas, pasižymintis įvairiomis imuninę sistemą moduluojančiomis savybėmis [17]. Vis dėlto, šiai dienai ciklofosfamido poveikis navikinių ląstelių AAPM lieka neištirtas. AAPM funkcionalumo navikinėse ląstelėse moduliavimas chemoterapinėmis priemonėmis įgalintų imunoterapijos aktyvuotų imuninių mechanizmų, nukreiptų prieš navikines ląsteles, veikimą ir leistų kurti efektyvias chemoimunoterapines gydymo strategijas.

1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai

Įvertinti Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizmo funkcionalumo navike ryšį su atsaku į imunoterapiją bei jos derinius su ciklofosfamidu pelių modelyje.

1. Įvertinti AAPM funkcionalumą LLC1 ir GL261 navikuose.
2. Ištirti AAPM funkcionalumo poveikį imuninio atsako prieš LLC1 ir GL261 navikus pobūdžiui.
3. Nustatyti AAPM funkcionalumo ryšį su LLC1 ir GL261 navikų jautrumu gydymui dendritinių ląstelių vakcinomis ir anti-PD-1.
4. Ištirti ciklofosfamido moduluojantį poveikį navikinių ląstelių AAPM ir imuniniam atsakui.
5. Įvertinti ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 kombinacijų efektyvumą gydant peles su navikais, pasižyminčiais skirtingu AAPM funkcionalumu.

1.2 Darbo naujumas

1. Išsamiai apibūdinti C57BL/6 pelių singeniniai navikiniai modeliai LLC1 ir GL261, atskleidžiant jų AAPM funkcionalumo skirtumus.
2. Atskleistas ryšys tarp AAPM funkcionalumo navike ir navikų jautrumo gydymui dendritinių ląstelių vakcinomis.
3. Sudarytas genų rinkinys, kurio raiška prognozuoja navikų jautrumą gydymui dendritinių ląstelių vakcinomis bei anti-PD-1.
4. Pademonstruotas ciklofosfamido gebėjimas aktyvuoti navikinių ląstelių AAPM.
5. Atskleistas ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų ir anti-PD-1 sinergistinis efektas gydant peles su navikais, pasižyminčiais AAPM funkcionalumo sutrikimais.

1.3 Ginamieji teiginiai

1. LLC1 ir GL261 navikams būdingi AAPM funkcionalumo skirtumai.
2. AAPM funkcionalumo sutrikimai lemia neefektyvų naviko Ag pateikimą ir imuninės sistemos negebėjimą atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles.
3. AAPM funkcionalumas yra susijęs su naviko atsaku į gydymą imunoterapija.
4. Ciklofosfamidas aktyvuoja AAPM navikinėse ląstelėse bei lemia didesniu citotoksiškumu ir aktyvacinėmis savybėmis pasižyminčių T limfocitų susidarymą.
5. Chemoterapijos ir imunoterapijos kombinacijos užtikrina efektyvaus priešnavikinio imuninio atsako ir ilgalaikės imuninės atminties formavimąsi.

2.2 Priešnavikinis imuninis atsakas

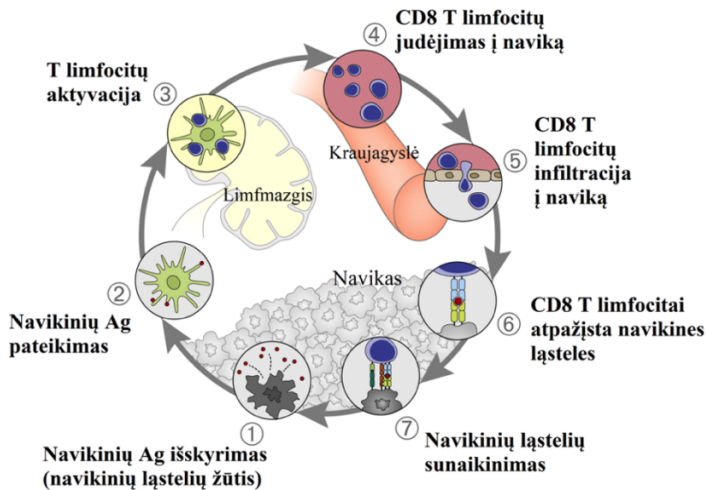
Imuninė sistema – tai sudėtinga, daugiakomponentė sistema, apimanti įvairias imunines ląsteles, organus, audinius bei molekules, kurios funkcionuodamos kartu užtikrina organizmo apsaugą nuo įvairių patogenų ir savų pakitusių ląstelių. Imuninė sistema yra ypatinga tuo, kad ji geba atskirti savus ir svetimus Ag [22]. Ag - tai svetima medžiaga, sukelianti organizmo imuninę reakciją [23]. Prieš savus Ag veikia imuninės tolerancijos mechanizmai, todėl normaliomis sąlygomis imuninė sistema į sveikas organizmo ląsteles nereaguoja ir tokiu būdu organizmas yra apsaugomas nuo nepageidaujamų autoimuninių reakcijų. Sveikai ląstelei piktybėjant ir joje kaupiantis mutacijoms, ląstelėje kinta baltymų profilis – joje prasideda imunei sistemai lig šiol nematytų baltymų raiška, kuri išprovokuoja imuninės sistemos atsaką, lemiantį pakitusių ląstelių sunaikinimą [22].

Nors ilgą laiką vėžys buvo traktuojamas kaip genetinė liga, vis dėlto, kelių pastarųjų dešimtmečių tyrimai keičia požiūrį į vėžį ir atskleidžia imuninės sistemos svarbą vėžio vystymosi procese. Kovai su navikinėmis ląstelėmis yra aktyvuojamas sudėtingas imuninis mechanizmas, apimantis įvairias imuninės sistemos ląsteles ir imuninius komponentus. Pagal gynybos mechanizmus ir kilmę, imuninę sistemą bendrai galima suskirstyti į įgimtą-Ag nespecifinį ir įgytą-Ag specifinį imunitetus. Tiek įgimtas, tiek įgytas imunitetai yra svarbūs kovoje su navikinėmis ląstelėmis ir darnus šių imunitetų veikimas užtikrina efektyvų navikinių ląstelių atpažinimą ir sunaikinimą [22].

Kad navikinės ląstelės būtų efektyviai naikinamos, yra būtina tam tikra imuninių procesų seka, bendrai įvardijama vėžio-imuniteto ciklu (2 pav.). Šis ciklas susideda iš 7 žingsnių, kuriuos pagal juose dalyvaujančias imunines ląsteles ir jų atliekamas funkcijas bendrąja prasme galima suskirstyti į II etapus:

- I etapas – priešnavikinio imuninio atsako inicijavimas. Šiame etape svarbiausią vaidmenį vaidina Ag pateikiančios ląstelės - dendritinės ląstelės, kurios fagocituoja žuvusias navikines ląsteles bei jų liekanas, keliauja į limfmazgius, kur pateikia navikinius Ag T limfocitams, juos aktyvuoja ir nukreipia reaguoti prieš specifinius navikinius Ag.
- II etapas – navikinių ląstelių atpažinimas ir sunaikinimas. Čia pagrindinis vaidmuo atitenka prieš navikinius Ag aktyvuotiems T limfocitams. Aktyvuoti T limfocitai palieka limfmazgius ir keliauja ieškoti navikinių ląstelių, prieš kurių Ag yra nukreiptos.

Radę tokias navikines ląsteles, T limfocitai išskiria citotoksines molekules, nulemiančias navikinių ląstelių žūtį.



2 pav. Vėžio-imuniteto ciklas. Pagal [24].

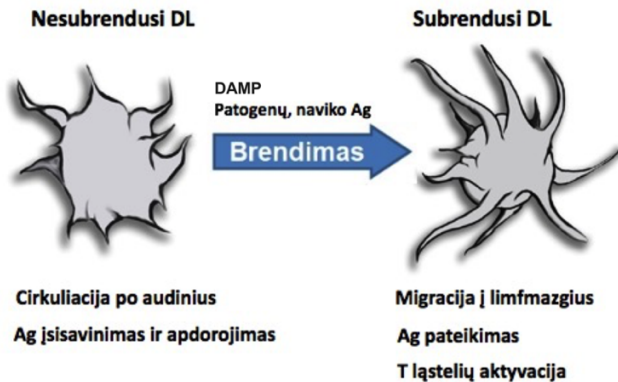
Jei nėra sutrikdomas pašalinių faktorių, šis vėžio-imuniteto ciklas yra kartojamas tol, kol pašalinamos visos navikinės ląstelės. Vis dėlto, naviko indukuoti imuninių atsaką slopinantys mechanizmai gali paveikti kiekvieną iš šių etapų ir turėti neigiamos įtakos priešnavikinio imuninio atsako efektyvumui [24].

2.2.1 Priešnavikinio imuninio atsako inicijavimas

Dendritinės ląstelės

Priešnavikinio imuninio atsako formavimasis prasideda tuomet, kai dėl maisto medžiagų stygiaus, imuninės sistemos veiklos ar gydymo sukeltos navikinių ląstelių žūtis į naviko mikroaplinką išsiskiria navikiniai Ag bei pažeistų ląstelių struktūros (DAMP, angl. damage-associated molecular patterns), į kurias reaguoja dendritinės ląstelės. Dendritinės ląstelės (DL) – pagrindinės profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės, inicijuojančios specifinį T limfocitų imuninį atsaką. DL formuojasi iš kaulų čiulpų ląstelių ir nesubrendusiame (neaktyviame) būvyje cirkuliuoja po organizmą, ieškodamos pavojaus signalų. Dėka paviršiuje esančių į Toll receptorių TLR (angl. Toll-like receptors) DL reaguoja į DAMP molekules, tokias kaip

HMGB1, ATP, DNR, RNR, HSP70 ir kt. [25]. Šie faktoriai į naviko mikroaplinką pritraukia nesubrendusias DL. Nesubrendusioms DL yra būdinga žema Ag pateikiančių molekulių MHC-II ir MHC-I, kostimuliacinių molekulių CD40, CD80, CD86 bei chemokinių receptoriaus CCR7 žymenų raiška ir aukštas fagocitinis aktyvumas (3 pav.).



3 pav. Nesubrendusių ir subrendusių dendritinių ląstelių savybių skirtumai. Pagal [26].

Atėjusios į pažaidos vietas DL endocitozės, fagocitozės bei pinocitozės būdu šalina mirštančias navikines ląsteles bei jų liekanas [27]. Naviko mikroaplinkoje esančios pavojaus molekulės ir navikiniai Ag sukelia DL brendimą-aktyvaciją. Brendimo metu vyksta morfologiniai, fenotipiniai ir funkciniai DL pokyčiai – ląstelių paviršiuje atsiranda citoplazminės išaugos, padidėja ir MHC-II, MHC-I, CD40, CD80, CD86 ir CCR7 raiška, sumažėja ląstelių fagocitinis aktyvumas, yra apdorojami ir paviršiuje pateikiami įsisavinti Ag. Dėka išaugusios CCR7 raiškos subrendusios DL toliau keliauja į limfmazgius, kuriuose pateikdamos navikinius Ag aktyvuoja naivuosius T limfocitus ir nukreipia juos specifinei kovai su navikinėmis ląstelėmis [28]. Sutiktus Ag DL gali apdoroti ir pateikti T limfocitams III būdais:

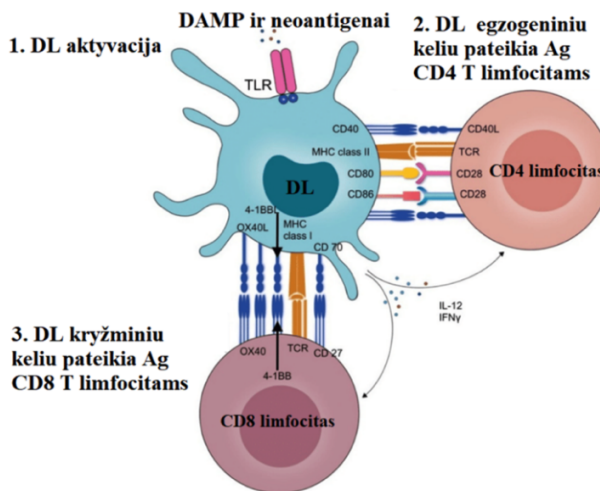
- I. Endogeniniu būdu – viduląsteliniai Ag apdorojami iki 8-9 aminorūgščių ilgio peptidų, sujungiami su MHC-I molekule ir iškeliami į DL paviršių, kur MHC I –Ag kompleksą atpažįsta ir aktyvuojasi CD8 T limfocitai;
- II. Egzogeniniu būdu – užląsteliniai Ag apdorojami iki 10-20 aminorūgščių ilgio peptidų, įkraunami į MHC-II molekulę, iškeliami į DL paviršių, kur MHC-II – Ag kompleksą atpažįsta

ir yra aktyvuojami CD4 T limfocitai;

III. Kryžminiu būdu – užląsteliniai Ag apdorojami iki peptidų, pakraunami ne į MHC-II, bet į MHC-I molekules ir MHC-I – Ag kompleksas iškeliamas į DL paviršių, kur yra atpažįstamas CD8 limfocitų.

Formuojantis priešnavikiniam imuniniam atsakui yra svarbūs egzogeninis ir kryžminis Ag pateikimo būdai. Aktyvuoti T limfocitus gali tik tinkamai subrendusios DL, kurios savyje turi visus T limfocitų aktyvacijai reikalingus signalus [27]. Kad DL galėtų aktyvuoti T limfocitus, reikalingi trys signalai (4 pav.):

- Ag pateikimas per MHC molekules;
- kostimuliacija per CD40, CD80 ir CD86 molekules;
- išskiriami IL-12 ir IFN- γ citokinai.



4 pav. CD4 ir CD8 T limfocitų aktyvacijai svarbūs dendritinių ląstelių suteikiami signalai. Pagal [29].

Tik gavę visus šiuos signalus T limfocitai aktyvuojasi ir gali atpažinti bei naikinti navikines ląsteles [30].

2.2.2 Navikinių ląstelių atpažinimas ir sunaikinimas

Šis etapas prasideda tuomet, kai DL aktyvuoti T limfocitai pradeda aktyviai proliferuoti ir dideli jų kiekiai palieka DL-T limfocitų sąveikos centrus – limfmazgius – bei pradeda cirkuliuoti organizme ieškodami navikinių ląstelių, pasižyminčių Ag, prieš kurį buvo aktyvuoti, raiška.

Bendrai T limfocitai yra skirstomi į CD8 ir CD4 T limfocitus, besiskiriančius atliekamomis funkcijomis bei poveikiu navikinėms ląstelėms [31].

CD8 T limfocitai

CD8 T limfocitai, dar kitaip vadinami citotoksiniais T limfocitais, yra pagrindinės priešnavikinio imuninio atsako efektorinės ląstelės. Padidėjęs CD8 T limfocitų kiekis naviko mikroaplinkoje dažnai yra siejamas su gera prognoze pacientams bei rodo priešnavikinio imuninio atsako vystymąsi [32],[33]. Šios ląstelės yra ypatingos tuo, kad geba specifiskai atpažinti navikines ląsteles pagal navikinius Ag jų paviršiuje ir pasižymi tiesioginiu citotoksinio poveikiu navikinėms ląstelėms. Atpažinę navikinę ląstelę, CD8 T limfocitai jos sunaikinimui gali pasitelkti įvairius būdus:

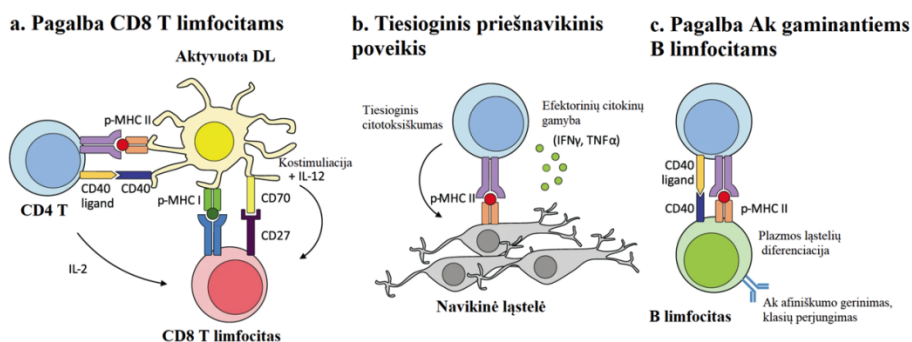
1. išskirdamos citokinus IFN- γ ir TNF- α , pasižyminčius priešnavikiniu poveikiu;
2. sekretuodamos perforinus ir granzimus [34] - perforinams navikinių ląstelių membranoje suformavus poras, pro jas į navikines ląsteles patenka granzimai, serino proteazės, skaidančios baltymus ir stabdančios baltymų gamybą, tokiu būdu sukeldamos ląstelės žūtį [35];
3. per Fas/FasL sąveiką – FasL, esantis aktyvuotų CD8 T limfocitų paviršiuje, jungiasi su navikinės ląstelės paviršiuje esančiu receptoriumi Fas, sukeldamas kaspazių nulemtą navikinių ląstelių apoptozę.

Po sąveikos su navikinėmis ląstelėmis, apie 95% CD8 T limfocitų žūsta juose aktyvavusis apoptozės mechanizmui. Likę CD8 T limfocitai virsta atminties ląstelėmis. Šios ląstelės užtikrina efektyvų ir greitą atsaką į atsinaujinusias navikines ląsteles [31]. Bendrai atminties CD8 T limfocitai pagal fenotipą ir savybes yra skirstomi į centrinės atminties CD8 T limfocitus (T_{CM}) ir efektorinius atminties CD8 T limfocitus (T_{EM}). Atskirų CD8 T limfocitų savybės kiek skiriasi – efektyvesni priešnavikiniame atsake yra T_{EM} limfocitai – jie žymiai greičiau reaguoja į pakartotinai sutiktus navikinius Ag, pasižymi didesniu citotoksiškumu, cirkuliuoja po organizmą ir gali reziduoti uždegiminėse vietose, tokiose kaip navikai [34].

CD4 T limfocitai

CD4 T limfocitai - pagalbiniai T limfocitai, kurių pagrindinė funkcija yra tiesioginis ir netiesioginis priešvėžinio imuniteto skatinimas, pasireiškiantis per kelis skirtingus mechanizmus (5 pav.) [36]:

- paviršinio CD40L raišką, kuris jungdamasis su CD40, esančiu DL paviršiuje, skatina IL-12 gamybą, kostimuliacinių molekulių raišką DL paviršiuje ir kryžminį Ag pateikimą CD8 T limfocitams [37]. Taip pat CD40L, jungdamasis su B limfocitų paviršiuje esančiu CD40, lemia B limfocitų diferenciaciją į plazmines ląsteles, gaminančias Ak, specifinius navikinius Ag;
- išskiriamą IL-2, kuris skatina CD8 T limfocitų proliferaciją ir citotoksines funkcijas;
- gaminamus citokinus IFN- γ bei TNF- α , pasižyminčius tiesioginiu citotoksiniu poveikiu navikinėms ląstelėms. Taip pat IFN- γ lemia efektyvesnę Ag apdorojimą DL ir Ag pateikimą CD8 T limfocitams.



5 pav. CD4 T limfocitų vaidmuo priešvėžiniame imunitete. Pagal [36].

CD4 T limfocitai - plastiškos ląstelės, kurios priklausomai nuo Ag, kuriuos joms pateikia DL, prigimties ir aplinkoje vyraujančių citokinių gali diferencijuotis į skirtingus subtipus – Th1, Th2, Th17 ir reguliacinis T limfocitai (Treg), dalyvaujančius skirtingo tipo imuniniame atsake [36]. Priešnavikinime imunitete svarbiausią vaidmenį atlieka Th1 limfocitai, kurių funkcijos pavaizduotos 4 paveiksle. Šios ląstelės skatina CD8 T limfocitų atsaką išskirdamos IL-2, sukeltantį jų proliferaciją. Taip pat CD4 Th1 limfocitai gali pasižymėti tiesioginiu citotoksiniu poveikiu navikinėms ląstelėms, pateikiančioms navikinius Ag kartu su MHC-II molekule bei dalyvauja B limfocitų afiniškumo gerinimo procese [38]. Kitų CD4 T limfocitų subtipų vaidmuo priešvėžiniame imuniniame atsake išlieka kontroversiškas.

Th2 limfocitai išskiria IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 ir dalyvauja imuniniame atsake prieš helmintus, bakterijas bei alergines

reakcijose [38]. Parodyta, kad šie citokinai lemia M2 tipo makrofagų poliarizaciją, skatina B limfocitų Ak gamybą, slopina T ląstelių citotoksines savybes ir tokiu būdu prisideda prie naviko progresavimo [22],[39].

Th17 limfocitai išskiria IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 ir yra svarbūs imuniniame atsake prieš bakterines, grybelines, virusines bei pirmuonių infekcijas. Šių ląstelių vaidmuo priešvėžiniame imuniniame atsake yra kontroversiškas – jos skatina CD8 T limfocitų bei NK ląstelių infiltraciją į navikus, aktyvuoja IL-12 gamybą DL ir makrofaguose, bet taip pat skatina Treg ląstelių infiltraciją bei M2 tipo makrofagų poliarizaciją [40].

2.2.3 Kitos priešnavikiniam imuniniam atsakui svarbios imuninės ląstelės

Formuojantis priešnavikiniam imuniniam atsakui yra svarbios ne tik DL bei T limfocitai, tačiau reikšmingas ir kitų imuninių ląstelių, tokių kaip makrofagų, B limfocitų, NK ląstelių bei mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių MKSL indėlis.

Makrofagai

Makrofagai – monocitinės kilmės ląstelės, pasižyminčios gebėjimu fagocituoti, pateikti navikinius Ag T limfocitams ir aktyvuoti priešvėžinį imuninį atsaką. TLR dėka makrofagai, kaip ir dendritinės ląstelės, jaučia aplinkoje esančias DAMP pavojaus molekules, pritraukiančias makrofagus į navikinių ląstelių žūties vietas. Atėję makrofagai fagocituoja žūstančias navikines ląsteles ar jų liekanas. Pavojaus molekulės bei navikiniai Ag sukelia makrofagų aktyvaciją. Apdorotus navikinius Ag makrofagai, kaip ir DL, per MHC-I ir MHC-II molekules pateikia CD8 ir CD4 T limfocitams. Vis dėlto, makrofagai neturi pakankamai kostimuliacinių signalų naiviųjų T limfocitų aktyvacijai ir gali tik pakartotinai stimuliuoti efektorinius ir atminties T limfocitus [41]. Makrofagai taip pat pasižymi Fc receptoriais, kurie jungiasi su Ak Fc sritimi ir dalyvauja Ak nulemtame citotoksiškume – fagocituoja Ak padengtas navikines ląsteles bei patogenus [42].

Makrofagai yra plastiškos ląstelės, kurių savybes nulemia aplinkoje vyraujantys faktoriai, lemiantys makrofagų poliarizaciją M1 ar M2 keliu. M1 tipo makrofagai dalyvauja priešnavikiniuose procesuose, o jų poliarizaciją paskatina aplinkoje esantys IFN- γ , TNF- α , LPS, GM-CSF. Aktyvuoti M1 tipo makrofagai lemia uždegiminės aplinkos formavimąsi išskirdami uždegimą skatinančius citokinus IL-6, IL-12, TNF- α ir tokiu būdu lemia efektyvesnę Ag apdorojimą ir pateikimą Ag pateikiančiose ląstelėse ir netiesiogiai skatina T limfocitų aktyvaciją ir proliferaciją. Taip pat M1 tipo

makrofaguose aktyvuojama iNOS, gaminančios azoto oksidą NO ir sukeliančios navikinių ląstelių žūtį, raiška.

Aplinkoje esantys IL-4, TGF- β , IL-10, PGE2 poliarizuoja makrofagus M2 tipo kryptimi. M2 tipo makrofagai pasižymi naviko vystymąsi skatinančiomis savybėmis - sekretuoja įvairius augimo faktorius (PDGF, HGF, bFGF) bei angiogenezę skatinančius faktorius (matrikso metaloproteazės, COX-2). M2 tipo makrofagams taip pat būdinga imuninę sistemą slopinančių citokinų IL-10 ir TGF- β sekrecija bei arginazės Arg1 raiška [43],[44]. Arg1 išsekvoja naviko mikroaplinkoje esantį L-argininą ir taip slopina T limfocitų proliferaciją ir kartu priešvėžinį imuninį atsaką [45].

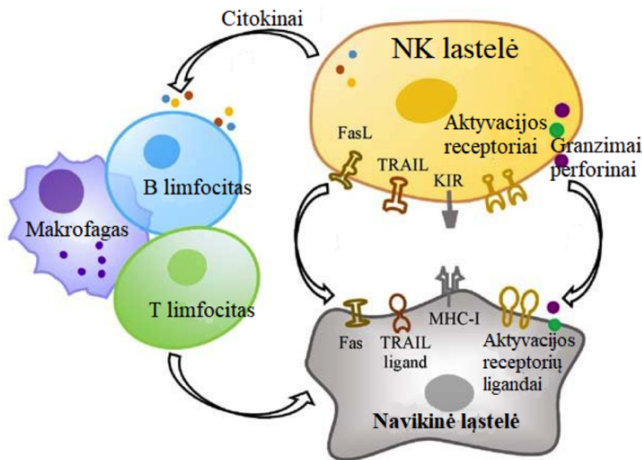
B limfocitai

B limfocitai taip pat yra Ag pateikiančios ląstelės. Kaip ir makrofagų atveju, dėl žemos kostimuliacinių molekulių raiškos, B limfocitai nesugeba aktyvuoti naiviųjų T limfocitų, bet gali reaktyvuoti Ag specifinius T limfocitus. B limfocitai specifinio receptoriaus BCR (angl. B cell receptor) dėka atpažįsta tirpius ir membraninius navikinius Ag. Pastarieji Ag sukelia B limfocitų aktyvaciją – B limfocitai apdoroja ir pateikia šiuos Ag kartu su MHC-II molekule CD4 T limfocitams. Susijungus B ir CD4 T limfocitams yra sukeliama B limfocitų proliferacija ir diferenciacija į plazmines ląsteles, gaminančias Ak. Šie Ak jungiasi prie navikinės ląstelės paviršiuje esančių Ag, prieš kuriuos buvo nukreipti. Prisijungusių Ak Fc sritys lemia NK ląstelių bei makrofagų nulemtą navikinių ląstelių sunaikinimą, dar kitaip vadinamą nuo antikūnų priklausomu ląstelių citotoksiškumu [46].

NK ląstelės

NK ląstelės yra įgimto imuniteto limfocitai. Šios ląstelės, kitaip nei T limfocitai, nepasižymi Ag specifinių receptorių raiška ir navikines ląsteles atpažįsta nespecifiniu būdu. NK ląstelių paviršiuje yra įvairių receptorių, aktyvuojančių ir slopinančių, kurių dėka jos jaučia pakitusią baltymų raišką navikinių ląstelių paviršiuje. Sveikos organizmo ląstelės pasižymi MHC-I molekulės raiška, kurios dėka pateikia savus Ag kitoms imuninėms ląstelėms, kad būtų atpažintos kaip savos ir sveikos organizmo ląstelės ir nebūtų sunaikintos. Vis dėlto, navikinių ląstelių paviršiuje MHC-I molekulės raiška dažnai yra sumažėjusi, siekiant išvengti imuninės sistemos atpažinimo ir sunaikinimo. NK ląstelių slopinantys receptoriai KIR yra jautrūs MHC-I molekulės raiškos pokyčiams ląstelių paviršiuje. Tačiau pilnai NK ląstelių aktyvacijai taip pat yra būtini signalai gaunami per aktyvuojančius

receptorius. Aktyvuojantis receptorius NKG2D reaguoja į MICA/MICB, ULBP1-6, kurių raiška navikinėse ląstelėse būna išaugusi, lyginant su sveikomis organizmo ląstelėmis. Kitas svarbus NK ląstelės aktyvuojantis receptorius yra CD16 (FcγR) – jis padeda NK ląstelėms pastebėti Ak padengtas navikines ląsteles bei skatina nuo Ak priklausomą citotoksiškumą [47]. Gavusi šiuos aktyvuojančius signalus NK ląstelė navikinę ląstelę sunaikina panašiai kaip ir T limfocitai (6 pav.). Tam ji pasitelkia kelis būdus – perforinus ir granzimus bei Fas/FasL ar TRAIL/TRAIL-R1/R2 sąveiką [48].



6 pav. Navikinių ląstelių sunaikinimas nuo NK ląstelių priklausomu būdu. Pagal [49].

2.3 Navikiniai Ag, jų paruošimas ir pateikimas MHC-I keliu

2.3.1 Navikiniai Ag

Beveik visos branduolį turinčios organizmo ląstelės savo paviršiuje per MHC-I molekulę pateikia sintetinamų baltymų peptidus. Šis procesas leidžia CD8 T limfocitams per T limfocitų receptoriaus ir MHC-I - peptido sąveiką patikrinti kiekvieną ląstelę ir pašalinti ląsteles, kuriose prasideda imuninei sistemai nematytų baltymų raiška. Prieš savus, nepakitusius ląstelės baltymus veikia imuninės tolerancijos mechanizmai, apsaugantys sveikas ląsteles nuo T limfocitų nulemtu sunaikinimo. Vykstant piktybinei transformacijai ir genetinėje medžiagoje kaupiantis atsitiktinėms

mutacijoms, ląstelėje kinta baltymų profilis ir prasideda naujų, ląstelei nebūdingų ir imuninei sistemai nepažįstamų baltymų raiška.

Naujai susidarę ląstelės baltymai yra vadinami neoantigenais. Jie dažniausiai vystosi iš ląstelės baltymų, įvykus mutacijoms juos koduojančiuose genuose, ir yra unikalūs navikui. Mutacinis dažnis tarp navikų varijuoja ir dažniausiai navikai turintys aukštą mutacinį dažnį pasižymi didesniu neoantigenų skaičiumi ir yra imunogeniškesni. Dėl savo svetimumo organizmui šie Ag yra imunogeniškiausiai navikiniai Ag.

Navikuose dėl įvykusių mutacijų gali keistis ir sveikų ląstelės baltymų raiškos profilis. Pakitusioje ląstelėje gali reaktyvuotis „nutildytų“ genų, randamų tik imunoprivilegiuotose organuose ar reikalingų vaisiaus ar embriono vystymosi metu, raiška. Tarp tokių baltymų yra vėžio/sėklidžių bei onkofetaliniai Ag, kurie taip pat yra svetimi imuninei sistemai ir iššaukia prieš navikines ląsteles nutaikytą imuninį atsaką.

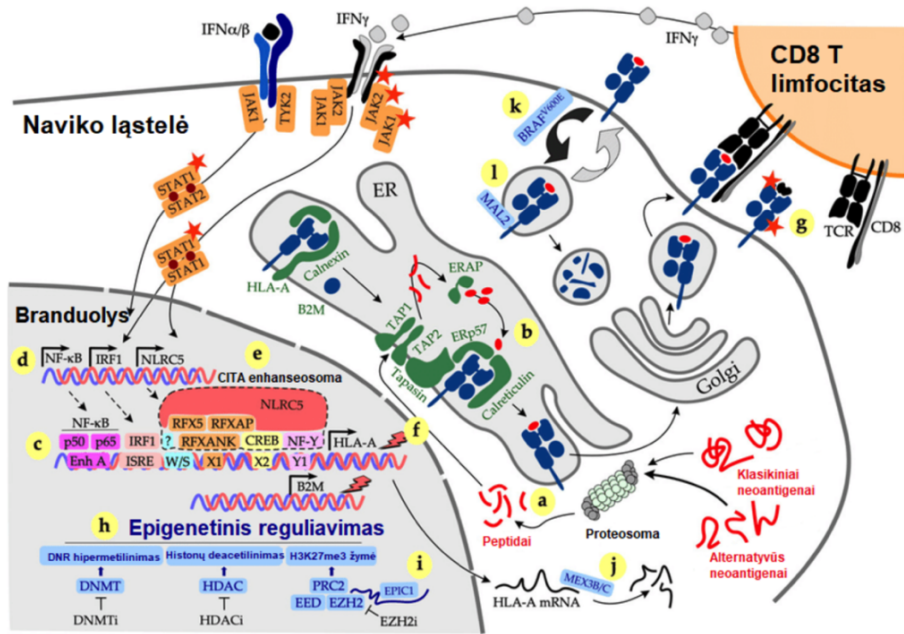
Navikinėje ląstelėje taip pat gali išaugti įprastų ląstelei baltymų sintezė, ir nors prieš tokius ląstelės baltymus veikia imuninės tolerancijos mechanizmai, neįprastai padidėjusi tokių baltymų raiška geba sukelti priešvėžinį imuninį atsaką [50],[51].

2.3.2 Navikinių Ag paruošimas ir pateikimas MHC-I keliu

Tam, kad imuninė sistema galėtų atpažinti navikines ląsteles ir jas sunaikinti yra būtina viena sąlyga – efektyvus navikinių Ag paruošimas ir jų pateikimas MHC-I keliu CD8 limfocitams. Naviko Ag pateikimas per MHC-I molekulę CD8 limfocitams vyksta sudėtingu, koordinuotu būdu, vadinamu Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizmu AAPM (7 pav.). Šiame mechanizme yra svarbūs 4 etapai – antigenų peptidų paruošimas, jų transportas ląstelės viduje, peptidų sujungimas su MHC-I molekule ir peptidų pateikimas ląstelės paviršiuje. Šiuose etapuose dalyvauja skirtingi ląstelės baltymai, kurių darnus veikimas užtikrina efektyvų Ag pateikimą navikinės ląstelės paviršiuje.

Visų pirma, baltymai ląstelėje yra skaidomi iki peptidų ubikvitino-proteosomos keliu. Proteosoma yra multimerinis baltymų kompleksas (PSMB8, PSMB9, PSMB10 ir kt.), randamas ląstelės citozolyje ir branduolyje. Gauti 2-25 aminorūgščių ilgio peptidai tuomet yra transportuojami iš citozolio į endoplazminį tinklą transportinių baltymų TAP1 bei TAP2 pagalba. Kad būtų tinkami sujungimui su MHC-I molekule, papildomai šie peptidai yra apdorojami aminopeptidazių ERAP1 ir ERAP2. Dalyvaujant endoplazminio tinklo šaperonams peptidai yra sujungiami su MHC-I molekule. Tuomet komplekso stabilumui prie jų yra prijungiamas

mikroglobulinas $\beta 2M$ ir MHC-I – peptido kompleksas yra perkeliamas į ląstelės paviršių, kur CD8 T limfocitai gali specifiskai atpažinti šį kompleksą ir sunaikinti navikinę ląstelę [8],[52].



7 pav. Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizmas navikinėje ląstelėje. Pagal [52].

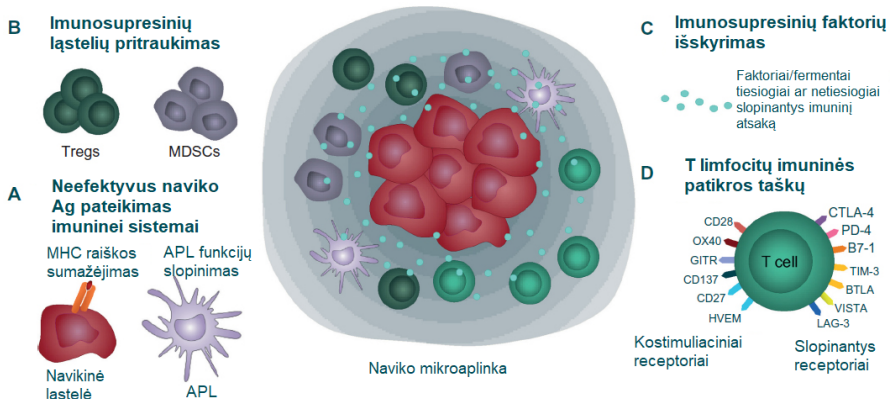
Daugumos AAPM komponentų, įskaitant MHC-I, $\beta 2M$, imunoproteosomų subvienetų, TAP, ERAP ir kt. genų raiška valdoma koordinuotai dėl jų promotoriuose esančių panašių kontrolės elementų [51]. Šių genų raiška yra indukuojama I tipo (IFN- α , IFN- β) ir II tipo (IFN- γ) interferonų, o šio kelio transkripcijos reguliaciją vykdo trys skirtingi elementai: branduolio faktorius kappa B NF- κ B, interferonų reguliuojamas faktorius IRF-1, NOD-like receptorius NLRCS. Įprastomis sąlygomis daugumos organizmo ląstelių paviršiuje MHC-I raiška nėra stipriai išreikšta, tačiau tiek paviršinės MHC-I, tiek MHC-I kelio komponentų raiška po poveikio interferonais reikšmingai padidėja [53].

2.4 Naviko imunospresiniai mechanizmai

Navikinės ląstelės siekdamos išvengti imuninės sistemos nulemtą sunaikinimo ir užsitikinti nekontroliuojamos proliferacijos galimybę, ilgainiui išvysto įvairius imuninių atsaką slopinančius mechanizmus. Kadangi

CD8 T limfocitai yra pagrindinės efektorinės ląstelės kovoje su vėžiu, dauguma imunosupresinių mechanizmų yra nutaikyti būtent į jas. Yra žinomi šie navikinių ląstelių išvystyti imunosupresiniai mechanizmai (8 pav.):

- gebėjimas slopinti Ag apdorojimo ir pateikimo per MHC-I molekulę mechanizmą;
- imuninių supresinių ląstelių vystymosi bei jų pritraukimo į naviką skatinimas;
- imunosupresiniu poveikiu pasižyminčių citokinų, fermentų bei kitų molekulių gamyba bei imuninę sistemą slopinančių baltymų raiška navikinių ląstelių paviršiuje [54].



8 pav. Naviko imunosupresiniai mechanizmai, leidžiantys išvengti imuninės sistemos kontrolės. Pagal [54].

2.4.1 Pokyčiai naviko Ag apdorojimo ir pateikimo mechanizme

Navikinėse ląstelėse AAPM gali būti slopinamas įvairiais būdais:

- dėl įvykusių mutacijų gali sumažėti arba būti prarandama vieno ar kelių AAPM dalyvaujančių baltymų raiška;
- dėl įvykusių mutacijų gali sumažėti transkripcijos faktorių, reguliuojančių AAPM, raiška. Taip pat jų raiška gali būti nuslopinama epigenetiškai;
- AAPM dalyvaujančių baltymų raiška gali būti nutildoma mikroRNR pagalba.

Visi šie būdai lemia pakitusį AAPM navikinėse ląstelėse. Tyrimai rodo, kad net ir vieno iš AAPM dalyvaujančių baltymų raiškos pokyčiai gali nulemti neefektyvų Ag pateikimą MHC-I keliu CD8 limfocitams ir pastarųjų negebėjimą atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles [9],[53],[55]. Visgi dažniausiai pokyčiai, susiję su AAPM reguliavimu yra grįžtami ir gali būti

paskatinami įvairiomis terapinėmis priemonėmis. Tačiau įvykę AAPM genetiniai pokyčiai yra negrįžtami ir tokių navikų gydymas tampa apsunkintas [12].

2.4.2 Imunosupresinės ląstelės

Navikinės ląstelės T limfocitų atsaką gali slopinti per imunosupresines ląsteles - mieloidinės kilmės supresorines ląsteles (MKSL) ir Treg - skatindamos šių ląstelių vystymąsi ir pritraukdamos jas į savo mikroaplinką.

Reguliaciniai T limfocitai

Treg limfocitai tiesiogiai slopina kitų T limfocitų funkcijas ir proliferaciją išskirdami imunosupresinius faktorius - IL-10 [56], TGF- β [57], IL-35 [58], PGE-2 [59]. Taip pat CD8 T limfocitų funkcijas jie gali nuslopinti ir netiesiogiai – jų išskiriami faktoriai slopina kostimuliacinių molekulių CD80 ir CD86 raišką dendritinių ląstelių paviršiuje ir tokiu būdu nulemia prastesnę naiviųjų CD8 T limfocitų aktyvaciją [60]. Normaliomis sąlygomis tai užtikrina imuninę toleranciją saviems Ag bei padeda suvaldyti atsaką į patogenus, tačiau esant vėžio patologijai yra nuslopinamas besiformuojantis priešvėžinis imuninis atsakas [38].

Mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės

MKSL – heterogeninė pirmtakinių ir santykinai nesubrendusių mieloidinių imuninių ląstelių grupė, pasižyminti imuninę sistemą slopinančiomis savybėmis [61]. Fiziologinį mieloidinių pirmtakų vystymąsi į DL, makrofagus ar granulocitus sutrikdo naviko ar jo stromos ląstelių išskiriami faktoriai, tokie kaip PGE-2, IL-6, GM-CSF, M-CSF, CSF, VEGF bei imuninės sistemos faktoriai TNF- α , IL-1 β [62]. Įprastinėmis sąlygomis MKSL yra atsakingos už imuninių reakcijų kontrolę, siekiant išvengti sveikų ląstelių naikinimo. Vis tik MKSL mechanizmai veikia nespecifiškai ir taip pat slopina priešnavikines imunines reakcijas bei skatina naviko progresavimą. MKSL T limfocitų funkcijų slopinimui pasitelkia įvairius faktorius - ARG1, TGF β , IL-10, COX2, IDO, NO ir reaktyvias deguonies formas [63].

2.4.3 Naviko supresoriniai faktoriai

Navikinės ląstelės taip pat gali išskirti imunosupresinius faktorius, kurie gali tiesiogiai ir netiesiogiai slopinti T limfocitų priešvėžinį imuninį atsaką. Navikinės ląstelės gali išskirti imunosupresinius citokinus TGF β , IL-10, slopinančius NK ląstelių ir T limfocitų funkcijas, turinčius neigiamos įtakos DL kostimuliacinių molekulių raiškai ir gebėjimui pateikti navikinius Ag T limfocitams [64]. Navikinės ląstelės taip pat gali išskirti VEGF, pasižymintį angiogenezę skatinančiomis savybėmis, taip pat į naviko mikroaplinką pritraukiančiomis Treg limfocitus bei slopinančiomis DL diferenciaciją ir subrendimą [64],[65]. Navikinių ląstelių paviršiuje stebima padidėjusi imuninės sistemos patikros taško PD-L1 raiška. PD-L1 jungdamasis su PD-1, esančiu aktyvuotų T limfocitų paviršiuje, nuslopina T limfocitų funkcijas ir leidžia navikinei ląstelei išvengti imuninės sistemos nulemtą sunaikinimą [64],[66].

2.5 Priešvėžinė imunoterapija

Navikinėms ląstelėms išvysčius imunosupresinius mechanizmus ir sugebėjus išvengti imuninės sistemos nulemtą sunaikinimą, paciento organizme pradeda formuotis kliniškai išreikštas navikas. Tokių pacientų gydymui standartiškai pasitelkiami tradiciniai vėžio gydymo būdai: chirurginis pašalinimas, chemoterapija ir spindulinis gydymas. Pastarąjį dešimtmetį klinikoje įsitvirtina inovatyvūs vėžio gydymo būdai, tokie kaip taikinių terapija ar priešvėžinė imunoterapija. Dėl navikų heterogeniškumo onkologinių pacientų gydymui dažniausiai skiriami kelių gydymo būdų deriniai, veikiantys skirtinguose kovos su vėžiu lygmenyse [67],[68].

Priešvėžinė imunoterapija – vėžio gydymo būdai, kuriais siekiama atstatyti prarastą paciento imuninės sistemos galimybę kontroliuoti navikų vystymąsi [69]. Gydymas priešvėžine imunoterapija pademonstavo įspūdingus klinikinius rezultatus – leido pasiekti ilgalaikę ligos remisiją ir reikšmingai pagerino onkologinių pacientų išgyvenamumą [1]. Priešvėžinės imunoterapijos indėlis gydant onkologinius pacientus buvo itin svarbus ir 2013 metais „Science“ žurnalas priešvėžinę imunoterapiją paskelbė metų proveržiu, sukėlusiu revoliuciją vėžio pacientų gydyme [70]. Priešvėžinė imunoterapija apima įvairias gydymo strategijas, kurios gali būti skirstomos pagal specifiškumą naviko Ag:

- naviko Ag specifinė imunoterapija – šių priešvėžinės imunoterapijos gydymo būdų veikimo principas yra pagrįstas Ag specifiniu imuninių mechanizmų aktyvinimu ir specifinio

priešvėžinio imuninio atsako skatinimu. Tarp tokių priešvėžinės imunoterapijos būdų yra dendritinių ląstelių vakcinos, onkolitiniai virusai, CAR-T ląstelių terapija, monokloniniai Ak.

- naviko Ag nespecifinė imunoterapija – šie priešvėžinės imunoterapijos gydymo būdai aktyvina imuninę sistemą nuo Ag nepriklausomu būdu ir sukelia bendrą imuninės sistemos aktyvaciją. Tokiu būdu veikia imuninės patikros taškus blokuojantys Ak bei citokinų terapija [71].

Priešvėžinės imunoterapijos gydymo būdus taip pat galima išskirstyti ir pagal priešvėžinio imuninio atsako aktyvavimo principą:

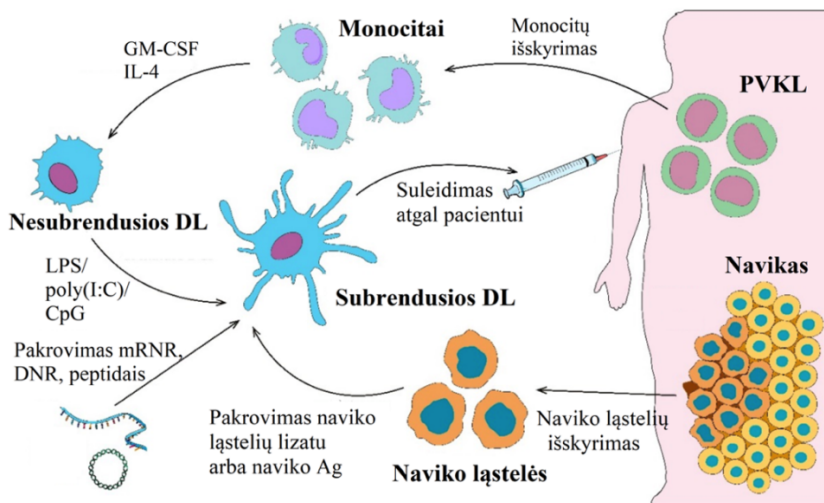
- aktyvi priešvėžinė imunoterapija – pasižymi netiesioginiu poveikiu navikinėms ląstelėms. Jos veikimo principas yra paremtas imuninės sistemos ląstelių aktyvinimu ir jų nukreipimu kovoti su navikinėmis ląstelėmis. Tokiu veikimo principu pasižymi dendritinių ląstelių vakcinos, navikinių peptidų/baltymų vakcinos, imuninę sistemą stimuliuojantys citokinai IL-2, IFN- α , TNF- α , GM-CSF bei imunomoduliuojantys antikūnai anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1 [72].
- pasyvi priešvėžinė imunoterapija – pasižymi tiesioginiu poveikiu navikinėms ląstelėms. Čia naudojamos prieš naviką aktyvuotos ląstelės bei specifinės molekulės, kurios specifiskai susijungusios su navikinėmis ląstelėmis sukelia jų žūtį. Tokiu būdu veikia prieš naviko baltymus nutaikyti antikūnai (anti-CD20), T ląstelių terapija (CAR-T ląstelės, TIL terapija), NK ląstelių terapija, onkolitiniai virusai (Oncorine®) [72],[73].

2.5.1 Dendritinių ląstelių vakcinos

Dendritinių ląstelių vakcinos (DLV) – tai aktyvi, Ag specifinė priešvėžinė imunoterapija, skatinanti T limfocitus sunaikinti naviką nuo Ag priklausomu būdu [74]. DL yra pagrindinės ląstelės, pateikiančios naviko Ag naiviesiems T limfocitams ir formuojančios specifinį priešvėžinį imuninį atsaką. Vis dėlto, naviko imunosupresiniai faktoriai - IDO, Arg1, IL-10, TGF- β , PGE2, VEGF - gali paveikti DL diferenciaciją, brendimą ir funkcijas, lemti tolerogeninių DL bei Treg limfocitų vystymąsi [75]. Šios priežastys lemia sutrikusį DL naviko Ag įsisavinimą ir pateikimą T limfocitams bei užkerta kelią efektyvaus priešvėžinio imuninio atsako vystymuisi. Net ir nesant aplinkoje DL funkcijas slopinančių faktorių,

fiziologiškai žemas DL skaičius paciento periferiniame kraujyje ir audiniuose gali trikdyti efektyvų priešvėžinio imuninio atsako formavimąsi [76].

Tokiu atveju pacientui gali pagelbėti autologinės DLV, kurios yra paruošiamos *ex vivo* būdu ir suleidžiamos atgal pacientui. *Ex vivo* DLV gaminamos iš paciento kraujo vienbranduolių ląstelių, kurios veikiant citokiniais GM-CSF ir IL-4, diferencijuoja į nesubrendusias DL (9 pav.) [77].



9 pav. *Ex vivo* dendritinių ląstelių vakcinos gamybos principas. Pagal [78].

Tam, kad DL galėtų pateikti navikinius Ag ir aktyvuoti T limfocitų atsaką yra svarbu nesubrendusias DL pakrauti navikiniais Ag. Navikinių Ag šaltiniai gali būti įvairūs - DL gali būti pakraunamos konkrečiais navikiniais Ag arba navikinių ląstelių baltymų lizatu, gaunamu iš paciento autologinio naviko arba iš alogeninių navikinių ląstelių linijų [75],[79]. Taip pat norint pagerinti gebėjimą indukuoti T limfocitų priešvėžinį imuninį atsaką, papildomai DL gali būti stimuliuojamos TLR ligandais – poli(I:C), lipopolisacharidais LPS, CpG ir kt. [80]. Paruoštos DLV yra suleidžiamos atgal į paciento organizmą – dažniausiai į paodį, bet taip pat gali būti leidžiamos į venas, limfą ar limfmazgius [81]. *Ex vivo* paruoštos ir pacientui suleistos DL keliauja į paciento limfinius mazgus, kuriuose pateikia navikinius Ag naiviesiems T limfocitams ir juos aktyvuoja. Aktyvuoti T limfocitai migruoja iš limfmazgių į navikus ir inicijuoja specifinę priešvėžinę imuninę ataką [82].

Gydymas DLV susideda iš kelių dozių, derinant DLV su kitais vėžio gydymo būdais [77],[83]. Gydymo DLV saugumas buvo parodytas

įvairiuose klinikiniuose I ir II fazės tyrimuose su pacientais, sergančiais kasos lataų adenokarcinoma [84], kepenų karcinoma [85], nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu [86], melanoma [87], prostatos vėžiu [88], neuroblastoma, sarkoma [89], ne Hodžkino limfoma [90] ir kitomis vėžio lokalizacijomis.

Tyrimai atskleidžia, kad DLV sugeba sukelti stiprų naviko Ag specifinį imuninį T limfocitų atsaką [91] ir užtikrinti ilgalaikės imuninės atminties prieš navikinius Ag susidarymą, lemiantį atsinaujinusių navikinių ląstelių sunaikinimą [92]. Nors surinkti duomenys rodo, kad gydymas DLV yra gerai pacientų toleruojamas ir saugus, teigiamas atsakas į gydymą yra pasiekiamas mažiau nei 15 % pacientų [3].

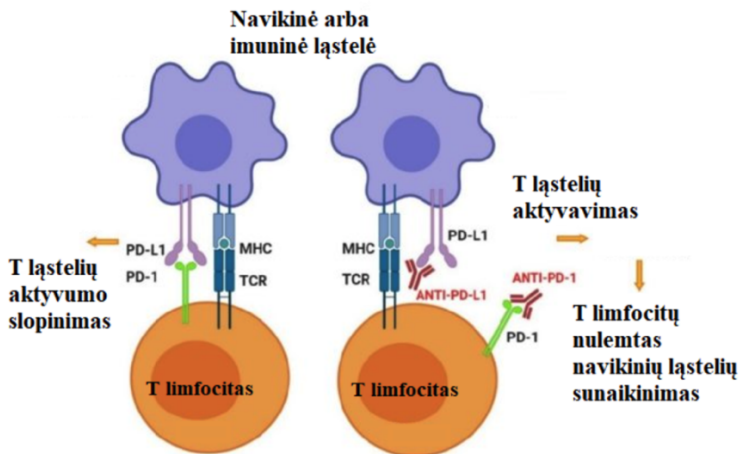
2.5.2 Antikūnai, nukreipti prieš imuninės patikros tašką PD-1

Imuninės patikros taškų slopikliai – aktyvios, naviko Ag nespecifinės imunoterapijos rūšis. Šie slopikliai yra antikūnai, specifiški imuninės patikros taškams, tokiems kaip PD-1, PD-L1 ir CTLA-4. Imuninės patikros taškai reguliuoja imuninį atsaką, palaikydami imuninę homeostazę ir užkirsdami kelią autoimuninėms reakcijoms. Yra žinoma apie 20 skirtingų imuninės patikros taškų ir jie gali pasižymėti tiek imuninį atsaką aktyvinančiu (ICOS, 4-1BB, CD40, GITR ir kt.), tiek imuninį atsaką slopinančiu (PD-1/PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ir kt.) poveikiu. Šie patikros taškai dalyvauja imuninės tolerancijos prieš savas ląsteles užtikrinime bei reguliuoja besivystančio imuninio atsako tipą, mastą ir trukmę. Įprastomis aplinkybėmis imuninės kontrolės taškai leidžia imuninei sistemai reaguoti į infekciją ir pakitusias ląsteles, kartu apsaugant sveikus audinius nuo nepageidaujamo imuninio atsako. Visgi navikinėse ląstelėse kai kurių imuninės patikros taškų, tokių kaip PD-L1, raiška gali nuslopinti prieš naviką nutaikytą imuninę ataką [93].

PD-L1 (angl. programmed cell death protein ligand 1) yra imuninės patikros taško PD-1 ligandas, randamas beveik ant visų organizmo ląstelių. PD-L1 jungiasi su PD-1 molekule, esančia T limfocitų paviršiuje, ir leidžia sveikoms organizmo ląstelėms apsisaugoti nuo autoimuninio sunaikinimo [94]. Navikinių ląstelių paviršiuje dažnai nustatoma išaugusi PD-L1 raiška, įgalinanti dar labiau išreikštas T limfocitų imuninį atsaką slopinančias savybes. PD-L1 ir PD-1 susijungimas lemia T limfocitų citotoksinių savybių slopinimą ir apoptozę [95].

Siekiant suvaldyti šį procesą buvo sukurti antikūnai, nukreipti prieš PD-1 (anti-PD-1) ar jo ligandą PD-L1 (anti-PD-L1), kurie susijungdami su šiomis molekulėmis, sutrikdo PD-1/PD-L1 sąveiką ir įgalina aktyvuotus T

limfocitus sunaikinti navikines ląstelės (10 pav.) [95]. Šis gydymo būdas pademonstravo įspūdingus klinikinius rezultatus – buvo reikšmingai pagerintas bendras pacientų išgyvenamumas, išgyvenamumas be ligos progresavimo bei pasiektas ligos stabilizavimas [96],[97]. Imuninės patikros taškų slopinimo antikūnais atradimas buvo toks svarbus onkologinių pacientų gydymui, kad 2018 metais už jų sukūrimą James Allison ir Tasuku Honjo buvo apdovanoti Nobelio premija medicinos srityje [98]. Antikūnais prieš PD-1/PD-L1 kelią Maisto ir vaistų administracijos (FDA, angl. Food and Drug Administration) buvo patvirtinti dvidešimt vienos lokalizacijos vėžiui gydyti, tarp jų - melanomai, smulkialąsteliniam ir nesmulkialąsteliniam plaučių vėžiui, galvos ir kaklo plokščialąstelinei karcinomai, Hodžkino limfomai, šlapimo pūslės, skrandžio, kiaušidžių, inkstų, kepenų, kolorektaliniai ir kitiems navikams gydyti [99]. Pacientų atsako į gydymą PD-L1/PD-1 kelio slopikliais dažnis svyruoja nuo 10–30 % kepenų, šlapimo pūslės ir inkstų vėžiu sergančiuose pacientuose, iki 40–50 % melanoma ir nesmulkialąstelinio plaučių vėžiu sergančiuose pacientuose ir net 65–75 % pacientuose, sergančiuose Hodžkino limfoma [100].



10 pav. PD-1/PDL-1 imuninės patikros taškų slopintojų anti-PD-1 ir anti-PD-L1 veikimo mechanizmas. Pagal [101].

2.6 Strategijos priešvėžinės imunoterapijos efektyvumui pagerinti

Klinikiniai gydymo imunoterapija rezultatai atskleidžia, kad pacientų atsakas į imunoterapiją yra nevienalytis ir dažnu atveju žemas [19]. Atlikti tyrimai rodo, kad rezistentiškumo imunoterapijai mechanizmai gali būti siejami su pačių navikinių ląstelių išvystytais imunosupresiniais

mechanizmais bei išoriniais imunosupresiniais mechanizmais, kurie buvo plačiau apžvelgti 2.4 skyriuje. Rezistentiškumo imunoterapijai mechanizmai apima žemą mutacijų dažnį, imunogeniškų navikinių Ag nebuvimą, pokyčius AAPM dalyvaujančių baltymų genetinėje medžiagoje, išaugusią PD-L1 raišką navikinių ląstelių paviršiuje, naviko mikroaplinkoje esančių imunosupresinių ląstelių (MKSL, Treg, M2 makrofagai) bei žemą TIL skaičių [102]. Norint pagerinti gydymo imunoterapija efektyvumą reikia geriau suprasti atsparumo imunoterapijai mechanizmus, ieškoti predikcinių žymenų pacientų gydymo imunoterapija individualizavimui bei naujų, efektyvių kombinacinių vėžio gydymo strategijų [19].

2.6.1 Predikciniai biožymenys

Atsparumo imunoterapijai mechanizmai dažnu atveju tampa ir biožymenimis atsako į imunoterapiją prognozavimui. Terminas “biožymuo“ apima bet kokią medžiagą, struktūrą ar procesą, kurį galima išmatuoti organizme ar jo šalutiniuose produktuose ir kuris gali paveikti arba numatyti ligos eigą [103]. Individualizuoto gydymo poreikis kyla iš naviko heterogeniškumo bei nevienalyčio pacientų atsako į gydymą. Individualizuotas gydymas – tai efektyviausios pacientui gydymo strategijos parinkimas pagal individualius paciento naviko genetinius ar imuninius parametrus [104]. Tyrimai atskleidžia, kad TIL skaičius, naviko mutacijų dažnis, neoantigenų skaičius, PD-L1 raiška gali pasitarnauti kaip predikciniai biožymenys prognozuojant atsaką į įvairias priešvėžines imunoterapijas [5].

Vienas pagrindinių biožymenų prognozuojant atsaką į gydymą PD-1/PD-L1 kelio slopikliais yra PD-L1 raiška navikinių ląstelių paviršiuje. Visgi atlikti tyrimai rodo, kad vien PD-L1 raiška nėra pakankamai informatyvus žymuo anti-PD-1/anti-PD-L1 taikymui [97] ir net 11-20% pacientų, kurių navikuose PD-L1 raiška nėra stipriai išreikšta, gydymas anti-PD-1/anti-PD-L1 gali turėti reikšmingą klinikinį poveikį [105]. Pastebėta, kad naviko mutacinis dažnis taip pat koreliuoja su pacientų atsaku į gydymą anti-PD-1/anti-PD-L1 melanoma [106], smulkialąstelinio ir nesulkialąstelinio plaučių [107],[108] bei šlapimo pūslės [109] vėžiu sergančiuose pacientuose. Vis dėlto, navikų mutacinio dažnio kaip biožymens universalumas yra kontroversiškas, ir klinikiniai tyrimai su pacientais, sergančiais inkstų [110] žmogaus papilomos viruso sukeltais galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių navikais [111] ar atsinaujinusia melanoma [112], koreliacijos tarp naviko mutacinio dažnio ir atsako į gydymą imuninės patikros taškų slopikliais neatskleidžia [113]. TIL kaip predikcinio žymens vertė anti-PD-L1/anti-PD-1 taikymui taip pat išlieka kontroversiška. Nors

tyrimai atskleidė TIL predikcinę vertę anti-PD-1 taikymui melanoma ir nesmulkiaūsteliniu vėziu sergančių pacientų gydymui [114], tačiau kito tyrimo metu melanoma, inkstų, kolorektaliniu, nesmulkiaūstelinių plaučių vėziu ar galvos ir kaklo navikais sergančiuose pacientuose koreliacija tarp atsako į gydymą anti-PD-L1 ir naviką infiltravusių limfocitų nebuvo stebima. Atlikus išsamesnį tyrimą paaiškėjo, kad pacientų jautrumas gydymui anti-PD-L1 buvo susijęs ne su TIL kiekiu, bet su T limfocitų aktyvumu [115].

Patvirtintų predikcinių žymenų DLV taikymui klinikoje šiai dienai nėra ir vyksta intensyvi tokių žymenų paieška. Kaip potencialus žymuo atsako į DLV gydymo prognozei galėtų būti naviko mutacinis dažnis, lemiantis didesnę neoantigenų skaičių ir galimai efektyvesnę DLV aktyvumą. DLV pakrautos neoantigenais ir suleistos atgal pacientui galėtų iššaukti stiprų, prieš naviką nukreiptą T limfocitų atsaką. Vis dėlto, šiai dienai naviko mutacinio dažnio predikcinė vertė DLV taikymui lieka neištirta [116]. Tiriant glioblastoma sergančius pacientus buvo įvertinta TIL predikcinė vertė DLV taikymui – pacientai, kuriems buvo nustatytas aukštas TIL kiekis, po gydymo DLV išgyveno ilgiau nei pacientai su žemu TIL kiekiu. Vis dėlto, buvo pastebėta, kad kai kurie pacientai, pasižymintys žemu priešoperaciniu TIL kiekiu, taip pat buvo jautrūs DLV ir gydymas DLV pagerino šių pacientų išgyvenamumą [117].

Taigi šių biožymenų sėkmingam klinikiniam pritaikymui trukdo ribotumas ir universalių žymenų ar jų derinio paieška išlieka aktuali iki šių dienų [5],[7]. Nustatius biožymenis galėtume parinkti pacientus, kuriems gydymas imunoterapija būtų efektyvus.

2.6.2 Chemoterapijos ir imunoterapijos derinimas

Kitas būdas imunoterapijos efektyvumui pagerinti yra taikant su kitais vėžio gydymo būdais [19]. Pacientų gydymas pavieni imunoterapija nėra pakankamai efektyvus - imunoterapija nėra pajėgi pašalinti didelio skaičiaus navikinių ląstelių, todėl norint pasiekti geriausią klinikinį gydymo efektą, imunoterapija yra derinama su kitais vėžio gydymo būdais – chirurginiu pašalinimu, chemoterapija bei spinduliniu gydymu [118].

2021 metų duomenimis FDA buvo patvirtinusi 27 imunoterapijų derinių onkologinių pacientų gydymui – iš kurių 14 yra imunoterapijos deriniai su chemoterapija. Šiuo metu vyksta daugybė klinikinių tyrimų, kurių siekis yra rasti efektyviausias imunoterapijos ir kitų gydymų kombinacijas [19]. Kaip rodo atlikti tyrimai, daugiausiai potencialo turi imunoterapijos derinimas su chemoterapiniais vaistais.

2.6.2.1 Chemoterapija

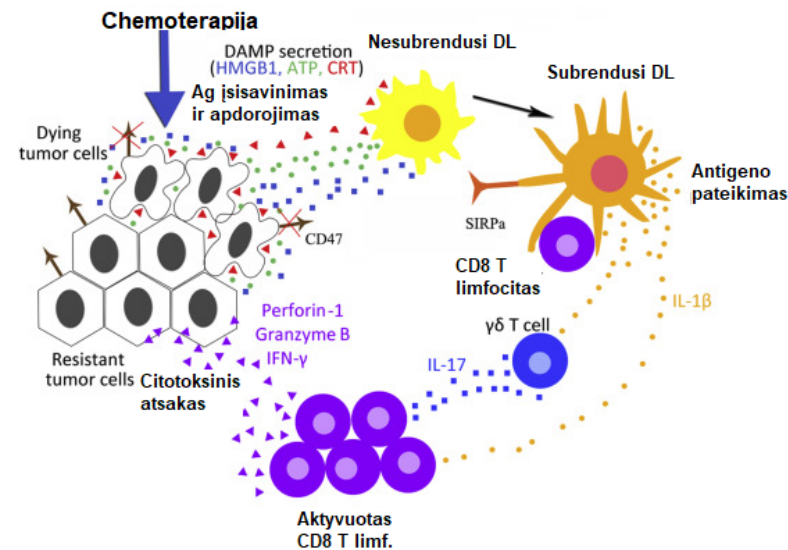
Chemoterapija – tai onkologinių pacientų gydymo būdas cheminiais junginiais, naikinančiais greitai besidalijančias ląsteles, tarp jų ir navikines ląsteles. Chemoterapiniai vaistai dažniausiai sukelia navikinių ląstelių apoptozę interkaluodami į ląstelės DNR ar slopindami jų dalijimąsi [119]. Yra daugybė chemoterapinių vaistų, kurie pagal veikimo mechanizmą gali būti skirstomi į antimetabolitus, alkilinančius agentus, antibiotikus ir alkaloidus [120]. Dauguma chemoterapinių vaistų buvo pritaikyti onkologinių pacientų gydymui dėl tiesioginio citotoksinio poveikio navikinėms ląstelėms, o šių vaistų poveikis imuninei sistemai nebuvo plačiai tyrinėjamas. Vis dėlto, pastarųjų dešimtmečių moksliniai ir klinikiniai tyrimai atskleidė, kad kai kurių chemoterapinių vaistų gydomasis poveikis pasireiškia per imunostimuliacinius mechanizmus [121]. Pastebėta, kad chemoterapiniai vaistai padeda suvaldyti imunosupresinius mechanizmus naviko mikroaplinkoje [19],[122,123], geba indukuoti navikinių ląstelių imunogeninę žūtį [124],[125] ir gali pagerinti navikinių ląstelių imunogenines savybes [126],[127].

2.6.2.2 Chemoterapijos ir imunoterapijos sinergistinis gydymo efektas

Dėl heterogeninės prigimties navikų gydymas kelia iššūkių ir norint pasiekti reikšmingą klinikinį efektą dažniausiai nepakanka taikyti vieno tipo terapijos. Pavyzdžiui, taikant monogydymą chemoterapiniais vaistais gali būti pašalinama didžioji dalis navikinių ląstelių, tačiau atsparios gydymui ląstelės nėra pašalinamos ir ilgainiui navikas gali atsinaujinti [128]. Imunoterapija nėra pajėgi pašalinti didžiulius kiekius navikinių ląstelių ir imunoterapijos efektas taip pat gali būti nuslopintas naviko išvystytų imunosupresinių mechanizmų [129]. Tuo tarpu chemoterapija geba sumažinti naviko masę, moduluoti imuninius mechanizmus naviko mikroaplinkoje ir moduluoti pačių navikinių ląstelių imunogenines savybes, tokiu būdu sukuriant palankią aplinką imunoterapijai veikti.

Kai kurie chemoterapiniai vaistai geba sukelti imunogeninę navikinių ląstelių žūtį (ILŽ). ILŽ yra ląstelių mirties tipas, kurios metu yra aktyvuojama ir į ląstelių naikinimą pajungiama imuninė sistema. Imunogeninės žūties metu ląstelių paviršiuje prasideda netipinių baltymų raiška ir į aplinką išsiskiria įvairios pavojaus molekulės DAMP (11 pav.). ILŽ charakterizuojama pagal baltymo kalretikulino translokaciją iš endoplazminio tinklo ant navikinių ląstelių paviršiaus, taip pat pagal ATP ir HMGB1 išsiskyrimą iš mirstančių navikinių ląstelių. Kalretikulino, ATP bei

HMGB1 lokalizacijos ląstelėje pokyčiai sukelia imuninės sistemos reakciją. Reaguodamos į pavojaus molekules ir navikus pradeda plūsti nesubrendusios DL. Pastarosios, patekusios į aplinką, pilną navikinių Ag bei pavojaus signalų, aktyvuojasi, subręsta ir numigravusios į limfmazgius aktyvina naivuosius T limfocitus. Aktyvuoti T limfocitai grįžta į naviką ir sunaikina navikines ląsteles, kurioms pavyko išvengti chemoterapinio poveikio [130]. Imunoterapijos aktyvuotus T limfocitus infiltruoti į naviko mikroaplinką taip pat paskatina ILŽ metu gaminamas chemokinas CXCL10 [19]. Gebėjimu sukelti navikinių ląstelių ILŽ pasižymi ciklofosfamidai, doksorubicinas, bleomicinas, oksaliplatina, 5-fluoruracilas, gemcitabinas, mitoksantronas, bortezomibas [131].



11 pav. Chemoterapijos indukuota imunogeninė navikinių ląstelių žūtis. Pagal [131].

Pastebėta, kad chemoterapija gali nuslopinti naviko imunosupresinius mechanizmus. Visų pirma, navikinės ląstelės yra pagrindinis imunosupresinių faktorių šaltinis. Chemocitotoksinis navikų pašalinimas lemia mažesnę navikinių ląstelių kiekį bei atitinkamai mažesnę imunosupresinių faktorių gamybą [19]. Taip pat pastebėta, kad kai kurios imunosupresinės ląstelės pasižymi didesniu jautrumu chemoterapiniams vaistams nei kitos imuninės ląstelės. Tad veikiant tam tikrais chemoterapiniais vaistais galima selektyviai pašalinti imunosupresines ląsteles, tokias kaip MKSL ir Treg. Parodyta, kad gemcitabinas, 5-fluorouracilas, paklitakstelis, doksorubicinas ir ciklofosfamidai geba

pašalinti MKSL iš blužnies, kraujo ir naviko masės tiek žmonėse, tiek pelėse [19],[132]. Tyrimai rodo, kad Treg ląstelės pasižymi selektyviu jautrumu tokiems chemoterapiniams agentams kaip ciklofosfamidai bei paklitakselis. Pastarųjų chemoterapinių vaistų poveikis buvo pastebėtas tiek onkologiniuose pacientuose, tiek pelių modeliuose, kur po poveikio vaistu Treg ląstelių skaičius sumažėjo kraujyje, blužnyje bei naviko masėje [133],[134],[135]. Chemoterapiniai vaistai, tokie kaip doksorubicinas ir ciklofosfamidai, imunomoduliuodami imunosupresinę naviko mikroaplinką gali paskatinti makrofagų poliarizaciją M1 kryptimi [136]. Kai kurie chemoterapiniai agentai, slopindami sisteminius ir lokalius imunosupresinius mechanizmus, sukuria palankią aplinką imunoterapijos aktyvuotam priešnavikiniam imuniniam atsakui veikti.

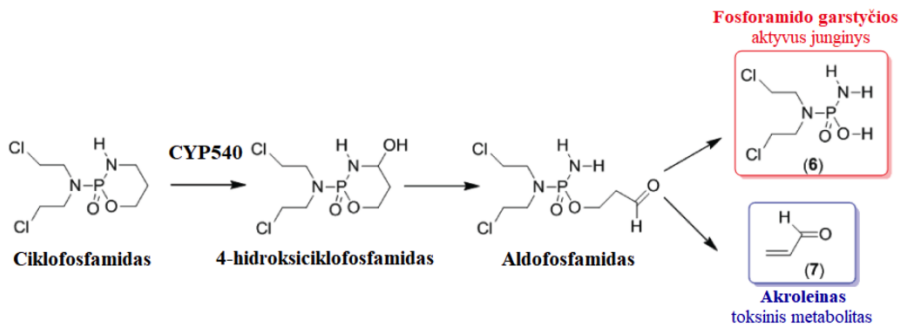
Derinant gydymą chemoterapija bei imunoterapija gali būti pasiekiamas sinergistinis šių terapijų efektas. Chemoterapija gali padėti įveikti imunosupresinius navikinių ląstelių barjerus, kurių imunoterapija nėra pajėgi įveikti. Tokiu būdu yra sukuriama palanki aplinka imunoterapijos aktyvuotam imuniniam atsakui veikti. Pastebėta, kad skirtingi chemoterapiniai vaistai pasižymi skirtingomis imunomoduliacinėmis savybėmis, todėl tinkamų chemoterapijos ir imunoterapijos derinių parinkimas tampa itin aktualus. Šiuo metu vyksta intensyvūs moksliniai ir klinikiniai tyrimai siekiant surasti optimalias chemoterapijos ir imunoterapijos strategijas onkologinių pacientų gydymui [137].

2.6.2.3 Ciklofosfamidai

Ciklofosfamidai (CY) yra neaktyvios formos provaistas, kuris suleistas į organizmą kepenų citochromų CYP450 pagalba yra skeliamas į aktyvią vaisto formą fosforamido garstyčias bei akroleiną (12 pav). Fosforamido garstyčios pasižymi DNR alkilinančiomis savybėmis ir lemia alkilo grupės prijungimą prie guanino bazės, tokiu būdu užkirsdomas kelias DNR grandinių atsiskyrimui, stabdydamos DNR replikaciją bei slopindamos ląstelių dalijimąsi [138].

Ciklofosfamidai yra vienas plačiausiai ir dažniausiai naudojamų chemoterapinių vaistų. Jis yra patvirtintas įvairių hematologinių ir solidinių navikų gydymui – lėtinei ir ūmiai limfogeninei leukemijai, Hodžkino ir ne Hodžkino limfomai, osteosarkomai, plazmocitomai, krūties, smulkialąsteliniam plaučių, kiaušidžių bei kitų lokalizacijų vėžiui gydyti [138]. Ciklofosfamidai pasižymi plačiu imunomoduliaciniu poveikiu – sukelia imunogeninę navikinių ląstelių žūtį, geba selektyviai pašalinti imunosupresines ląsteles, lemia I tipo IFN gamybą. Ciklofosfamidai

neišvengiamai paveikia ir sveikas organizmo ląsteles, tarp jų ir imuninės sistemos ląsteles. Įdomu tai, kad po gydymo CY atsikuriančios imuninės ląstelės dažnai pasižymi pranašesnėmis savybėmis – atsinaujinę B limfocitai pasižymėjo išaugusia navikai specifinių Ak gamyba, DL buvo būdinga gausi IL-12 sekrecija ir gebėjimas CD4 pagalbinių T limfocitų atsaką poliarizuoti Th1 ir Th17 kryptimi [140]. Taip pat pastebėtas išaugęs chemokino CXCL10 kiekis pacientų kraujo serume po gydymo CY [141]. CXCL10 kartu su CXCL9 ir CXCL11 koordinuoja kitų imuninių ląstelių, CD8 T limfocitų, NK ląstelių bei makrofagų diferenciaciją, aktyvaciją ir migraciją į navikus [142].



12 pav. Ciklofosfamido aktyvacijos mechanizmas. Adaptuota iš [139].

Vis dėlto, atlikti ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimai atskleidžia, kad CY imunomoduliacinis ir terapinis poveikis yra nulemtas CY dozės dydžio bei gydymo schemas. Gydymo sukeltas imuninis atsakas gali būti neoptimalus, kuomet gydymas skiriamas per tankiai, pavyzdžiui, kasdien taikant gydymą mažomis vaistų dozėmis (metronominė chemoterapija), arba tarpai tarp dozių yra dideli, pavyzdžiui, gydant maksimalia toleruojama chemoterapijos doze (klinikoje įprastas chemoterapinių vaistų dozavimas). Atlikti ikiklinikiniai tyrimai atskleidė, kad taikant metronominę CY gydymo schemą - 20–25 mg/kg kas 1-3 dienas - yra sumažinamas Treg ląstelių kiekis navike ir tokiu būdu pagerinamos efektorinės T ląstelių funkcijos. Tačiau gydant šia schema CY nesukelia efektyvaus priešvėžinio imuninio atsako ir yra sunaikinama maža dalis navikinių ląstelių. Gydymas maksimalia toleruojama CY doze – 150-170 mg/kg kas 2-3 dienas iš eilės kas 21 dieną - nors ir sunaikina didžiąją dalį navikinių ląstelių, tačiau kartu pasižymi dideliu toksiškumu sveikoms organizmo ląstelėms bei sukelia mielosupresiją ir efektyvaus priešnavikinio imuninio atsako nesivystymą. Tyrimai rodo, kad efektyvų priešnavikinį imuninį atsaką galima pasiekti skiriant vidutinio stiprumo protarpinį gydymą CY - 90-140 mg/kg kas 6 dienas. Tokia CY

gydymo schema duoda maksimalų gydymo efektą – pašalinama didžioji dalis navikinių ląstelių, tausojamos imuninės sistemos ląstelės bei aktyvuojamas priešvėžinis imuninis atsakas [143].

2.6.2.4 Ciklofosfamido ir imunoterapijos derinių efektyvumo vertinimas ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose

Sinergistinis CY ir DLV ar anti-PD-1 terapijų poveikis buvo atskleistas įvairuose ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose. Šie tyrimai rodo, kad ciklofosfamido ir įvairių imunoterapijų kombinacijomis gali būti sukiamas navikui specifinis priešvėžinis imuninis atsakas, pagerinamas pacientų išgyvenamumas bei pasiekiamas ligos stabilizavimas [144], [145], [146].

Pavyzdžiui, pelėse su MC38 storosios žarnos navikais gydymas CY ir DLV lėmė reikšmingą naviko vystymosi slopinimą bei CD4 ir CD8 T limfocitų atsako aktyvaciją [147]. Taip pat CY ir DLV kombinacija efektyviai prislopino B16 melanomos ir CT26 storosios žarnos navikų vystymąsi ir reikšmingai pagerino pelių išgyvenimą, lyginant su DLV grupe. CY ir DLV kombinacija gydytų pelių blužnies T limfocitai buvo labiau aktyvuoti ir išskyrė daugiau IFN- γ nei DLV grupėje [148]. Kito tyrimo metu gydant peles su indukuotais TC-1 plaučių navikais CY ir anti-PD-1 kombinacija sukėlė naviko Ag specifinį imuninį atsaką bei pagerino pelių išgyvenimą [149].

Šiuo metu klinikinių tyrimų duomenų bazėje yra aktyvūs per 185 ciklofosfamido bei imunoterapijos kombinacijų efektyvumo gydant onkologinius pacientus tyrimų [150]. Atlikti klinikiniai ciklofosfamido derinių su imunoterapija tyrimai atskleidžia potencialų šių terapijų sinergistinį efektą gydant onkologinius pacientus. Pavyzdžiui, gydymas ciklofosfamidu, COX-2 slopintuju celecoksibu, IL-2 bei DLV lėmė Ag specifinio priešvėžinio imuninio atsako formavimąsi 60% melanoma sergančių pacientų. Gydant šių vaistų kombinacija bendras pacientų išgyvenamumas buvo pagerintas 6 mėnesiais lyginant su pacientais, gydytais DLV ir IL-2 monoterapijomis [144]. Taip pat gydant glioblastoma ar nesmulkią ląstelių plaučių vėžiu (NSCLC, angl. non-small cell lung carcinoma) sergančius pacientus DLV, CY, poli(I:C), imikvimodu bei anti-PD-1 buvo pagerinamas pacientų išgyvenamumas. Lyginant su pacientais, gydytais standartiniu gydymo būdu – operaciniu, spinduliniu, taikiniu ir chemoterapiniu gydymu, glioblastoma sergančių pacientų išgyvenamumas buvo pagerintas nuo 11 iki 19 mėn., o NSCLC sergančiuose pacientuose nuo 7 iki 17 mėn. [151].

Atsakas į gydymą anti-PD-1, GM-CSF, ciklofosfamido bei spindulinio gydymo kombinacija pacientuose, sergančiuose galvos ir kaklo navikais, išsiskyrė. Vienam pacientui buvo pastebėtas dalinis atsakas į gydymą, 5 iš 13 pacientų buvo pasiektas ligos stabilizavimas, o 7 pacientams liga progresavo nepaisant gydymo. Vis dėlto, lyginant šio kombinacinio gydymo rezultatus su gydymu pavieniu anti-PD-1, sinergistinis terapijų efektas nebuvo pastebėtas [152]. Kito tyrimu metu pacientus, sergančius pažengusia sarkoma ar virškinamojo trakto stromos navikais, gydant CY ir anti-PD-1 kombinacija, klinikinis efektas buvo pasiektas tik 3 iš 50 pacientų [153]. Šie tyrimai atskleidžia, kad pacientų atsakas į gydymą CY ir imunoterapijos kombinacijomis yra nevienalytis ir reikia ieškoti predikcinių žymenų gydymo individualizavimui, taip pat kurti efektyvesnes kombinacines vėžio gydymo strategijas.

2.7 Navikų su sutrikusiu AAPM gydymas

Didelės įtakos atsakui į gydymą imunoterapija ar jos kombinacijomis su kitais gydymo būdais gali turėti defektai navikinių ląstelių AAPM. Esant AAPM sutrikimams, navikinės ląstelės savo paviršiuje nesugeba pateikti Ag ir nebegali būti atpažintos ir sunaikintos CD8 T limfocitų, todėl gydymas imunoterapija tokiems navikams gali tapti neveiksmingas. Tam, kad imunoterapija būtų efektyvi, gydant pacientus, kurių navikuose nustatyti AAPM pokyčiai, visų pirma, reikia pagerinti tokių navikų imunogenines savybes aktyvuojant jų AAPM [52].

AAPM yra valdomas ir aktyvuojamas I ir II tipo interferonų pagalba. Tad vienas iš būdų pagerinti navikinių ląstelių AAPM funkcionalumą yra panaudojus gydymą interferonais. Klinikiniai tyrimai rodo, kad pacientams, kurių navikuose buvo nustatyta žema MHC-I raiška ir žema CD8 T limfocitų infiltracija, kartu su standartiniu gydymu paskyrus gydymą IFN- γ gali būti padidinta MHC-I raiška navikinių ląstelių paviršiuje, tokiu būdu pagerinant CD8 T limfocitų infiltraciją į navikus bei atsaką į gydymą anti-PD-1 [13]. Tačiau viena didžiausių kliūčių IFN pritaikymui klinikoje yra dozės dydį ribojantis šalutinis poveikis [154].

Kadangi MHC-I raiška ir AAPM susijusių genų raiška gali būti slopinama epigenetiniu būdu hipermetilinant DNR, siekiant pagerinti AAPM aktyvumą, gali būti pasitelkiami DNR metiltransferazių slopikliai. Buvo parodyta, kad DNR metiltransferazių slopikliai, tokie kaip guadecitabinas, 5-azacitidinas ir decitabinas padidino MHC-I raišką krūties vėžio, melanomos ir neuroblastomos ląstelių linijose [155]. Taip pat gydymas guadecitabinu

gebėjo padidinti MHC-I raišką pelių krūties vėžio gyvūnų modelyje ir tokiu būdu pagerino prieš navikus nukreiptą T limfocitų atsaką [156].

Kitas epigenetinis AAPM reguliavimo būdas yra paremtas histonų deacetilinimu. Histonų deacetilinimo įtaka sumažėjusiai MHC-I ir pagrindinių AAPM komponentų raiškai buvo pastebėta gliomos navikų modeliuose [157] bei gimdos kaklelio vėžiu [158] ir melanoma [159] sergančiuose pacientuose. Histonų deacetilazių slopikliai, iš kurių keli jau yra patvirtinti FDA (romidepsinas, vorinostatas ir panobinostatas), geba padidinti MHC-I ir AAPM komponentų raišką tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sąlygomis [160].

Taip pat yra atskleistas dalies chemoterapinių vaistų aktyvuojantis poveikis navikinių ląstelių AAPM. Tokiomis savybėmis pasižymėjo paklitakselis [16], doksorubicinas [16], gemcitabinas [161], docetakselis [18], 5-fluorouracilas [162], topotekanas [163], irinotekanas [164]. Šie vaistai sugebėjo reikšmingai padidinti paviršinės MHC-I molekulės raišką bei atskirų AAPM koduojančių genų raišką navikinėse ląstelėse. Pokyčiai buvo stebimi tiek žmogaus navikinių ląstelių linijose *in vitro*, tiek pelių *in vivo* navikų modeliuose. Atlikus išsamesnius tyrimus, paaiškėjo, kad chemoterapiniams vaistams sukėlus stresą navikinėse ląstelėse, jose prasidėjo I tipo interferonų gamyba ir lėmusi AAPM aktyvaciją [163]. Šis chemoterapijos poveikis lemia efektyvesnę Ag apdorojimą ir pateikimą per MHC-I molekulę navikinių ląstelių paviršiuje ir įgalina imunoterapijos aktyvuotus T limfocitus atpažinti navikines ląsteles ir jas sunaikinti. Visgi ciklofosfamido poveikis navikinių ląstelių AAPM nėra ištyrinėtas.

2.8 Iki klinikiniai tyrimai

Moksliniai onkologiniai tyrimai yra svarbi, aktyvi ir nuolat kintanti sritis. Vien tik 2022 metais oficialioje klinikinių tyrimų duomenų bazėje buvo aktyvūs apytikriai 30 000 klinikinių onkologinių tyrimų [165]. Klinikiniai tyrimai žmonėse yra apriboti dėl etinių ir praktinių priežasčių, ir dėlto, yra neatsiejami nuo ikiklinikinių tyrimų gyvūnų modeliuose. Iki klinikiniai tyrimai tampa labai svarbiu etapu, jungiančiu *in vitro* tyrimus bei klinikinius vaistų tyrimus žmonėse [166],[167]. Tiek FDA, tiek daugumos šalių vaistų kontrolės tarnybos reikalauja naujų vaistų ar jų kombinacijų detalaus įvertinimo ikiklinikiniuose modeliuose prieš pradėdant klinikinius tyrimus su žmonėmis. Atliekant ikiklinikinius vaistų vertinimus didelis dėmesys yra skiriamas vaisto efektyvumui, toksiškumui ir farmakokinetikai [167].

Dėl anatomicinio, fiziologinio ir genetinio panašumo į žmones, graužikai yra tinkami biomedicininiais ir ikiklinikiniams tyrimams [168]. Tyrimai su šiais gyvūnais mokslininkams padėjo geriau suprasti vėžio atsiradimo, vystymosi, patofiziologinius procesus ir palengvino naujų gydymo strategijų paiešką [169]. Ikiklinikiniuose tyrimuose svarbiausias vaidmuo atitenka laboratorinėms pelėms. Tai yra patogus modelis dėl mažo dydžio, nebrangaus ir nesudėtingo laikymo, vislumo, trumpo nėštumo bei galimybės atspindėti žmogaus ligas [168],[170]. Ikiklinikiniams onkologiniams tyrimams gali būti naudojami įvairūs pelių navikiniai modeliai – transplantuojami, kancerogenų indukuojami, genetiškai pakeistų pelių modeliai bei žmogaus navikų ksenograftų modeliai [171].

2.8.1 Transplantuojami singeniniai pelių navikiniai modeliai

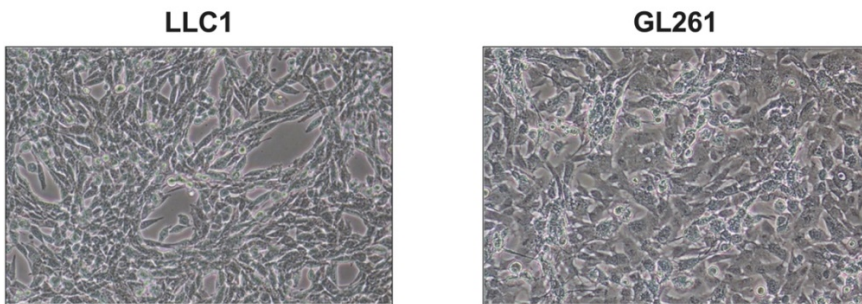
Šie modeliai gaunami įskiepijant jau išvestas pelių navikinių ląstelių linijas į imunologiškai suderinamų linijinių pelių, tokių kaip C57BL/6 ar BALB/c, organizmus [172]. Linijinės pelės – tai genetiškai tapačių pelių populiacija, gaunama mažiausiai 20 kartų nuosekliai kryžminant brolius-seseris [173]. Dažniausiai tokie navikai yra sukeliama po oda, kadangi tokiu būdu yra tiksliausia ir patogiausia sekti naviko dydį ir atsaką į gydymą. Taip pat gali būti sukeliama ortotopiškai – suleidžiant navikines ląsteles į organą, iš kurio jos yra išvestos – tokiu būdu sudarant naviko vystymuisi įprastą aplinką [174],[171].

Įskiepijami navikų modeliai yra patogūs eksperimentams dėl nedidelės eksperimento kainos, paprastumo ir sinchroniško navikų augimo. Tačiau tokiems navikiniams modeliams būdingas žemas heterogeniškumas bei prarandamas kancerogenezės procesas, vykstantis įprastomis sąlygomis [171]. Vis dėlto, onkologiniuose tyrimuose tai yra dažniausiai naudojami pelių modeliai. 2016 metais 506 iš 618 (82%) išleistų publikacijų onkologijos srityje pasitelkė transplantuojamus pelių navikinius modelius [166]. Nepaisant trūkumų, transplantuojamų navikų pelių modelių panaudojimas leido atlikti tris onkoimunologijos srityje ypatingai svarbius tyrimus – buvo identifikuoti imuninės patikros taškai, kurių pagrindu sukurta imuninės patikros taškus blokuojančių antikūnų terapija. Taip pat buvo pastebėta, kad kai kurie chemoterapiniai vaistai pasižymi gebėjimu sukelti imunogeninę navikinių ląstelių žūtį. Galiausiai buvo parodyta, kad derinant imunogeninę ląstelių žūtį sukeliančius chemoterapinius vaistus su imuninės sistemos patikros taškus blokuojančiais antikūnais, gali būti pasiekiamas sinergistinis terapinis efektas [171].

2.8.2 Pelių navikinės ląstelių linijos

Pelių navikinės ląstelių linijos yra komerciškai prieinamas produktas, išvestas iš linijinių pelių spontaniškas ar indukuotų navikų. Yra išvesta daugybė skirtingų navikinių ląstelių linijų, besiskiriančių savo kilme, imunogenišku, metastazavimo galimybe ir kitomis savybėmis. Tyrimai taip pat atskleidžia, kad pelių navikiniai modeliai pasižymi unikaliu imuniniu profiliu, galinčiu turėti įtakos atsakui į gydymą [175],[176].

Šiame darbe tyrimai buvo atliekami su C57BL/6 pelėms singeninėmis navikinėmis ląstelių linijomis – LLC1 ir GL261 (13 pav.). LLC1 – Lewis plaučių karcinomos ląstelių linija, išvesta iš spontaniškai išsivysčiusio naviko C57BL/6 pelių plaučiuose. Tai labai agresyvi ląstelių linija, pasižyminti greita proliferacija ir metastazavimu į kitus audinius [177]. GL261 – gliomos ląstelių linija, gauta iš C57BL/6 pelės gliomos naviko, išsivysčiusio paveikus 3-metilcholantrenu. GL261 navikai pelėse auga invazyviai, tačiau metastazavimu nepasižymi [178]. Iš literatūros yra žinoma, kad LLC1 ląstelės yra neimunogeniškos, jų paviršiuje MHC-I raiška yra išreikšta silpnai [176], o GL261 ląstelės pasižymi MHC-I raiška [178][179]. Vis dėlto, detalus AAPM vertinimas šiose navikinėse ląstelėse nėra atliktas.



13 pav. LLC1 ir GL261 ląstelių morfologija (200x didinimas, sudaryta autorės).

Plačiau ištyrinėjus AAPM funkcionalumo savybes LLC1 ir GL261 navikinėse ląstelėse, atsivertų galimybė įvertinti AAPM svarbą priešnavikiniam imuniniam atsakui bei atsakui į imunoterapinį gydymą DLV ir anti-PD-1. Taip pat tai įgalintų įvertinti chemoterapinio vaisto ciklofosfamido poveikį AAPM navikinėse ląstelėse bei ieškoti efektyviausių ciklofosfamido, DLV ir anti-PD-1 gydymo strategijų navikams, su skirtingo funkcionalumo AAPM, gydyti.

3. TYRIMŲ METODIKA

3.1 Aparatūra ir priemonės

Aparatūra

1 lentelė. Darbe naudoti prietaisai.

II saugumo klasės laminarinio oro srauto spinta	<i>Labguard NU-440, Nuairė</i>
Tėkmės citometras	<i>BD LSR II, Becton Dickinson</i>
Termostatas	<i>Model200, Memmert</i>
CO ₂ inkubatorius	<i>Autoflow NU-5510, Nuairė</i>
Inversinis mikroskopas	<i>Biolam P-1, Lomo</i>
Šviesinis mikroskopas	<i>Axiostar plus, Zeiss</i>
Nanospektrofotometras	<i>NanoDrop 2000</i>
Purtyklė	<i>Vortex V-1plus, bioSan</i>
Šaldoma centrifuga	<i>Rotixa 50 RS, Hettich</i>
Šaldoma centrifuga	<i>ALC PK 120R, Jouan</i>
Termocikleris	<i>SensoQuest</i>
Termocikleris	<i>Azure Cielo 3, Azure Biosystems</i>
Mikroplokštelių skaitytuvas	<i>Biotek ELx800</i>
Pelių anestezijos aparatas	<i>Harvard Apparatus</i>

Programinė įranga

Tėkmės citometro duomenų rinkimui skirta programa FACS Diva (*BD Biosciences*), tėkmės citometro duomenų analizei skirta programa FlowJo (*Tree Star*), statistinės analizės programa Microsoft Excel 2021 ir GraphPad Prism 9, RT-PCR duomenų analizei skirta Azure Cielo Manager (*Azure Biosystems*).

3.2 Medžiagos

2 lentelė. Darbe naudotos medžiagos.

Pelių granuliocitų, makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius GM-CSF	<i>Miltenyi Biotec</i>
<i>Escherichia coli</i> O127:B serotipo lipopolisacharidas LPS	<i>Sigma Aldrich</i>
Krioprotektorius dimetilsulfoksidas DMSO	<i>Roth</i>
IV tipo kolagenazė	<i>Gibco</i>
DNAzė I	<i>Worthington</i>
4-hidroksiperoksiciklofosfamidą	<i>Cayman Chemical</i>
Ciklofosfamido monohidratas	<i>Sigma Aldrich</i>
anti-PD-1 (RMP1-14)	<i>BioXcell</i>
Kopijinės DNR sintezės rinkinys Maxima	<i>Thermo Fisher</i>
RT-PCR rinkinys Maxima	<i>Thermo Fisher</i>
Trizolis	<i>Thermo Fisher</i>
Mitybinė terpė DMEM	<i>Gibco</i>
Mitybinė terpė RPMI	<i>Gibco</i>
Antibiotikų mišinys (streptomocinas, penicilinas)	<i>Gibco</i>
Fetalinis veršelio serumas (FBS, angl. fetal bovine serum)	<i>Gibco</i>
PBS-EDTA tirpalas	<i>Lonza</i>
Rinkinys ląstelių gyvybingumui vertinti CCK-8	<i>Dojindo</i>
Izofluranas	<i>Vetpharma</i>

Antikūnai

Paviršinių žymenų raiškos analizei tėkmės citometru buvo pasitelkti monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš tam tikras pelių paviršiaus molekules ir konjuguoti su atitinkama fluorescencine žyme (3 lentelė). Kiekvienam eksperimentui buvo atliekamas antikūnų titravimas ir parinkti optimalūs Ak kiekiai.

3 lentelė. Darbe naudoti su fluorescencine žyme žymėti monokloniniai antikūnai

Antikūnas (klonas)	Fluorescencinė žymė	Gamintojas
anti-CD16/CD32 (93)	nekonjuguotas	<i>BD Biosciences</i>
anti-CD11c (N418)	PE	<i>Miltenyi Biotec</i>
anti-CD86 (GL1)	FITC	<i>BD Biosciences</i>
anti-MHC II (M5/114)	PerCP-Cy5.5	<i>BD Biosciences</i>
anti-CD40 (3/23)	PE-Cy7	<i>Biolegend</i>
anti-MHC I (34-1-2S)	PerCP-eFluor710	<i>Thermo Fisher</i>
anti-CD274 (MIH5)	PE	<i>BD Biosciences</i>
anti-CD44 (IM7))	PE	<i>Miltenyi Biotec</i>
anti-CD45 (30-F11)	Pacific Blue	<i>eBioscience</i>
anti-CD3 (17A2)	APC-Cy7	<i>eBioscience</i>
anti-NK1.1 (PK136)	PE	<i>eBioscience</i>
anti-B220 (RA3-6B2)	FITC	<i>eBioscience</i>
anti-CD19 (eBio1D3)	APC	<i>eBioscience</i>
anti-CD8α (53-6.7)	PerCP-Cys 5.5	<i>BD Bioscience</i>
anti-CD4 (GK1.5)	FITS	<i>eBioscience</i>
anti-CD62L (MEL-14)	APC	<i>eBioscience</i>
anti-CD11b (M1/70)	APC	<i>eBioscience</i>
anti-F4/80 (BM8)	PerCP-Cy5-5	<i>eBioscience</i>
anti-CD206 (MR6F3)	PE	<i>eBioscience</i>
anti-Ly6C-Ly6G (RB6-8C5)	FITC	<i>eBioscience</i>
anti-CD11c (N418)	APC	<i>eBioscience</i>
anti-CD3 (145-2C11)	APC	<i>BD Biosciences</i>
anti-CD8 (53-6.7)	PE	<i>BD Biosciences</i>
anti-Calreticulin (1G6A7)	Alexa-Fluor647	<i>Novusbio</i>
anti-MHC I (AF6-88.5.5.3)	eFluor450	<i>Invitrogen</i>

3.3 Pelės

Šiame tyrime buvo naudojamos 8–12 savaičių amžiaus C57BL/6 linijos pelės. Pelės buvo veisiamos, laikomos ir visos procedūros su jomis atliekamos Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro vivariume (Vilnius, Lietuva). Visos procedūros su gyvūnais buvo atliekamos remiantis Europos parlamento ir tarybos direktyva 2010/63/ES 2010 m. rugsėjo 22 d. dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. Visas procedūras, kurios buvo vykdomos su gyvomis pelėmis, atliko Nacionalinio vėžio instituto NVI Imunologijos laboratorijos darbuotojai, turintys šiam darbui tinkamą kvalifikaciją. Tyrimui vykdyti buvo gautas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymus su laboratoriniais gyvūnais (Priedas B, Priedas C). Pelės buvo auginamos suteikiant *ad libitum* prieigą prie subalansuoto pelių pašaro ir vandens.

3.4 Ląstelių linijos ir jų kultivavimas

Kaip eksperimentiniai modeliai buvo naudojamos dvi C57BL/6 singeninės navikinės ląstelių linijos – Lewis plaučių karcinoma LLC1 ir glioma GL261. Šias ląstelių linijas NVI Imunologijos laboratorijai padovanojo UAB “Froceth” (Vilnius, Lietuva).

Ląstelės buvo kultivuojamos vienkartinuose flakonuose, mitybinėje DMEM terpėje, papildytoje 10% FBS ir 1% PS. Procedūros su ląstelėmis buvo atliekamos laminarinio oro srauto bokse, palaikant sterilias sąlygas ir naudojant sterilius reagentus bei priemones. Ląstelės buvo auginamos CO₂ inkubatoriuje, palaikant +37°C bei 5% CO₂. Esant poreikiui, buvo pakeičiama ląstelių kultivavimo terpė arba ląstelės buvo persėjamos.

Ląstelės buvo šaldomos 10 mln/ml tankiu specialioje šaldymo terpėje, sudarytoje iš 90% FBS ir 10% DMSO. Kriomėgintuvėliai su ląstelėmis buvo patalpinami į termoizoliacinę dėžutę, pripildytą izopropanoliu, ir laikomi –80°C 24 val. Vėliau mėgintuvėliai buvo perkelti į laikymo dėžutes ir iki mėnesio buvo laikomi –80°C temperatūroje, ilgesniam saugojimui perkelti į –150°C šaldiklį. Atšildymui mėgintuvėliai buvo patalpinami +37 °C vandens vonelėje, šaldymo terpė pašalinama centrifuguojant ir ląstelės naudojamos pagal poreikį.

3.5 Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo įvertinimas

Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo nustatymui buvo naudojama Goriajevo kamera. Tam tikslui ląstelių suspensija buvo sumaišoma su 0,4%

tripano mėliu santykiu 1:1. Tuomet 10 μ l suspensijos buvo užlašinama ant Gorijajevo kameros, dengiama stikleliu bei ląstelės vertinamos šviesiniu mikroskopu per 400x padidinimą. Mirusios ląstelės nuo gyvų ląstelių buvo atskiriamos pagal nusidažymą mėlyna spalva. Ląstelių skaičius nustatomas pagal formulę (1), o gyvybingumas apskaičiuojamas vertinant gyvų ląstelių procentinę dalį. Ląstelių skaičiaus nustatymo formulė:

$$Ląstelių\ skaičius = vidutinis\ ląstelių\ skaičius\ kameros\ kvadrato \times 0,625 \times 10^5 \times ląstelių\ suspensijos\ tūris \quad (1)$$

3.6 LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacijos *in vitro* vertinimas

Norint įvertinti LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacijos greitį *in vitro* į 12 šulinėlių plokšteles buvo užsėta po 10 000 LLC1 ląstelių arba po 25 000 GL261 ląstelių. Ląstelės buvo auginamos DMEM mitybinėje terpėje, o po 48, 72 ir 96 val. buvo vertinamas ląstelių skaičius ir gyvybingumas (pagal 3.5 skyrelyje aprašytą metodiką). Taip pat buvo paskaičiuojamas ląstelių dvigubėjimo laikas pagal formulę (2):

$$Ląstelių\ dvigubėjimo\ laikas = kultivavimo\ trukmė \times \ln(2)/\ln(galutinė\ ląstelių\ koncentracija/pradinė\ ląstelių\ koncentracija) \quad (2)$$

3.7 LLC1 ir GL261 ląstelių lizatų paruošimas

Dendritinių ląstelių brandinimo etape naudojamų GL261 ir LLC1 ląstelių lizatų gamybai buvo priauginta po 30 mln. ląstelių. Praskiedus ląsteles 1 mL PBS tirpalu ir perkėlus į kriomėgintuvėlius, buvo pradedamas ląstelių lizavimo procesas šildymo/šaldymo būdu. Kriomėgintuvėliai pakaitomis buvo patalpinami į diuaro indą su skystu azotu (-196°C), vėliau perkeliant į $+37^{\circ}\text{C}$ vandens vonelę. Šis šildymo/šaldymo ciklas kartotas 6 kartus. Gauti ląstelių lizatai centrifuguoti 4000 g 10 min., supernatantai surinkti ir filtruoti per 0,2 μ m filtrą. Įvertinus baltymų kiekį lizatuose NanoDrop 2000 spektrofotometru, paruošti lizatai buvo užšaldyti -80°C . Paruoštas LLC1 ląstelių lizatas taip pat buvo naudotas kaip teigiama kontrolė pelių atsako į ksenogeninę imunoterapiją vertinimui.

3.8 Pelių dendritinių ląstelių vakcinų gamyba

Pelių dendritinės ląstelės buvo ruošiamos remiantis Lutz et. al protokolu [180]. Tam tikslui pelė buvo numarinama atliekant cervikalinę kaklo slankstelių dislokaciją. Buvo pašalinami pelės užpakalinių galūnių kaulai, apvalomi nuo pašalinių audinių ir 3 min. patalpinami į 70% etanolio

tirpalą. Tuomet kaulai praplaunami PBS tirpalu, abu kaulų galai nukerpami žirklutėmis ir kaulų turinys išplaunamas. Ląstelių suspensija buvo filtruota per 70 µm filtrą ir įvertintas išskirtų ląstelių kiekis ir gyvybingumas (pagal 3.5 skyrelyje aprašytą metodiką).

Po 3 mln. išskirtų ląstelių buvo patalpintos į neaktyvuoto paviršiaus Petri lėkštelės, papildytas 10 ml mitybinės RPMI terpės su 10% FBS, 1% antibiotikų. Lėkštelės taip pat buvo papildytos 20 ng/ml pelių GM-CSF, kaulų čiulpų diferenciacijai į DL. 3 ir 6 dieną lėkštelės buvo papildytos 10 mL šviežios mitybinės terpės RPMI. Viso eksperimento metu lėkštelėse buvo palaikoma 20 ng/ml pelių GM-CSF koncentracija.

Kad būtų funkcionalios ir tinkamos gydymui, nesubrendusios DL turi būti subrandintos pateikiant joms navikinius Ag kartu su tinkamais adjuvantais. 7 kultivavimo dieną pelių buvo atliekamas DL brandinimas kultivuojant jas 24 val. aktyvuoto paviršiaus lėkštelėse, papildytose RPMI terpe, 20 ng/mL GM-CSF, 15 µg/mL paruošto LLC1 ar GL261 ląstelių lizato bei 1 µg/mL *Escherichia coli* lipopolisacharido (LPS). Prieš ir po brandinimo etapo pagal 3.5 skyrelyje aprašytą protokolą buvo vertinamas paruoštų DL skaičius ir gyvybingumas bei fenotipas pagal CD11c, MHC-II, CD80, CD86, CD40 žymenų raišką ląstelių paviršiuje (pagal 3.18 skyrelyje aprašytą metodiką). Paruoštos DL buvo užšaldytos ir laikomos tolimesniems eksperimentams -150°C.

3.9 Navikų sukėlimas ir jų augimo sekimas pelėse

Navikai buvo sukeliama po oda kairėje šlaunies pusėje suleidžiant 4×10^5 LLC1 ląstelių arba 3×10^6 GL261 ląstelių 100 µl fiziologinio tirpalo. Norint tiksliai suleisti naviką ir sukelti mažesnę stresą pelėms, joms buvo atliekama inhaliacinė anestezija izofluranu. Kuomet navikai tapo apčiuopiami, pradėtas jų matavimas slankmačio pagalba. Pelių navikai buvo matuojami kas 2–3 dienas, pelėms atliekant anesteziją izofluranu. Buvo matuojamas naviko ilgis ir plotis, o naviko dydis buvo apskaičiuojamas pagal formulę (3):

$$\text{naviko dydis} = \frac{\text{ilgis} \times \text{plotis}^2}{2} \quad (3)$$

Kai navikai pasiekė reikiamą dydį, priklausomai nuo eksperimento, pelės buvo numarintos atliekant cervikalinę kaklo slankstelių dislokaciją ir buvo surenkami pelių mėginiai. Taip pat pelės buvo paaukojamos navikams pasiekus 2-2,5 cm³ dydį.

Terapijos sukeliamas naviko augimo slopinimo indeksas (TGI, angl. tumor growth inhibition) buvo vertinamas pagal formulę (4).

$$TGI = \frac{(1 - \frac{Vt1}{Vt0}) / (\frac{Ct0}{Ct1})}{(1 - \frac{Ct0}{Ct1})} \times 100\% \quad (4)$$

V- gydomoji grupė, C – kontrolinė grupė; 0 – naviko dydis gydymo pradžioje, 1 – naviko dydis duotuoju momentu.

3.10 Prieš LLC1 ląsteles nukreipto imuninio atsako skatinimas suleidžiant navikinius Ag

Pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 navikai kairėje galinėje pėdutėje leidžiant 3×10^5 LLC1 ląstelių/30 μ l PBS. 14 dieną, kai navikai tapo vizualiai matomi ir apčiuopiami, pelėms buvo skiriama anestezija 100 mg/kg ketamino ir 10 mg/kg ksilazino ir navikas buvo chirurgiškai pašalinamas kartu su kaire pėdute. Po operacijos žaizda buvo dezinfekuota, pelytės laikomos po kaitrine lempa 5 min. po prabudimo. Kelias dienas pelytės buvo intensyviai stebimos dėl infekcijos ir galimų pooperacinių komplikacijų.

Prėjus 3 dienoms po naviko pašalinimo pelytės išskirstomos į grupes ir pradedamas vakcinavimas (4 lentelė). Pelėms buvo leidžiamas pasiruoštas autologinis LLC1 lizatas ar ksenogeniniai žiurkės embriono nervinio audinio (Kseno ŽEN) bei avies embriono plaučių audinio lizatai (Kseno AEP). Kseno ŽEN vakcina buvo paruošta projektų bendraautorių iš R.E. Kavetskio eksperimentinės patologijos, onkologijos ir radiobiologijos instituto (Kyjivas, Ukraina), o Kseno AEP - Emanuelio Kanto Universiteto, Klinikinės imunologijos instituto (Karaliaučius, Kaliningradas).

Atsakas į gydymą buvo vertinamas pagal bendrą pelių išgyvenamumą. Taip pat siekiant įvertinti lizatų sukeltą imuninį atsaką, po gydymo bei eksperimento pabaigoje buvo iš šlaunies venos buvo surenkami kraujo mėginiai. Surinktuose kraujo mėginiuose tėkmės citometru vertintas CD8 T limfocitų procentas nuo visų kraujo ląstelių.

4 lentelė. Vakcinų, naudotų sukelti imuninį atsaką prieš LLC1 navikus, dozės.

Grupė	Vakcina	Dozė
Kontrolė	PBS	100 μ l
LLC1 lizatas	Paruoštas LLC1 lizatas	150 μ g/100 μ l PBS
Kseno ŽEN	Žiurkės embriono nervinio audinio lizatas su adjuvantu B. subtilis B-7025	300 μ g/100 μ l PBS

Kseno AEP	Avies embriono plaučių audinio lizatas su adjuvantu polyX (6 µg/per pelę)	1-0,4 mg AEP/100 µl PBS s.c. 2-0,6 mg AEP/100 µl PBS s.c. 3-1,2 mg AEP/100 µl PBS i.p.
-----------	---	--

3.11 Pelių su LLC1 ar GL261 navikais jautrumo imunoterapijai vertinimas

Pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 arba GL261 navikai, sekamas jų dydis ir jiems pasiekus 50-100 mm³ dydį, pelės buvo paskirstytos į 3 grupes:

- K – kontrolinės pelės, kurioms netaikomas gydymas;
- DLV – pelės, kurioms taikomas gydymas DLV;
- Anti-PD-1 – pelės, kurioms taikomas gydymas anti-PD-1.

Pelių gydymas susidėjo:

- DLV grupėje – iš 3 dozių × 1 mln DLV/100 µl PBS, skiriamų kas 4 dienas, leidžiant po oda, dešinėje pusėje, šalia sritinio limfmazgio;
- Anti-PD-1 grupėje – iš 3 dozių x 200 µg/100 µl PBS, skiriamų kas 4 dienas, leidžiant intraperitoniškai.

Atsakas į gydymą imunoterapija buvo vertinamas pagal imunoterapijos sukeltą naviko augimo slopinimo efektą bei imunoterapijos sukeltus pokyčius naviko imuninio infiltrato ląstelinėje sudėtyje (leukocitai, CD4 T, CD8 T, B limfocitai, NK ląstelės, DL, M1 ir M2 makrofagai, Gr1⁺ mieloidinės kilmės ląstelės (Gr1⁺ MKL)) (pagal 3.18 skyrelį aprašytą metodiką) bei su imunine sistema susijusių genų raiškoje (pagal 3.19 skyrelį aprašytą metodiką). Tam tikslui savaitė po užbaigto gydymo buvo surenkami pelių navikiniai mėginiai.

3.12 LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumo ciklofosfamidui vertinimas *in vitro*

Po 2×10³ LLC1 ir 3×10³ GL261 ląstelių buvo išsėta į 96 šulinėlių plokštes ir auginama mitybinėje DMEM terpėje 24 val. Po 24 val. auginimo, terpė buvo pašalinta ir pakeista nauja terpe su 0,1; 0,39; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml CY. Po 24 ir 48 val. ląstelės buvo inkubuotos su CCK-8 tirpalu remiantis gamintojo pateiktu protokolu. Iš sugerties rezultatų buvo įvertintas ląstelių gyvybingumas ir paskaičiuota CY koncentracija reikalinga 50% prislopinti LLC1 ir GL261 ląstelių proliferaciją (IC₅₀).

3.13 Ciklofosfamido poveikio LLC1 ir GL261 ląstelių imunogeniškumui vertinimas *in vitro*

24 val. 7×10^4 LLC1 ir 1×10^5 GL261 ląstelių buvo auginamos 24 šulinėlių plokštelese DMEM terpėje. Po to terpė buvo pašalinta ir pakeista nauja terpe, papildyta 1,3 ir 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY. Po 4 val. terpė su CY buvo nuimta ir ląstelės užpiltos šviežia mitybine terpe. Praėjus 24 ir 48 val. po poveikio CY, LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje tėkmės citometrijos metodu buvo vertinama kalretikulino, susijusio su imunogenine ląstelių žūtimi, bei MHC-I raiška (pagal 3.18 skyrelyje aprašytą metodiką). Taip pat praėjus 48 val. po poveikio CY, LLC1 ir GL261 ląstelės buvo patalpintos Trizol tirpale ir užšaldytos -80°C temperatūroje su tikslu įvertinti AAPM dalyvaujančių genų raiškos pokyčius.

3.14 Efektyvios ciklofosfamido dozės gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais parinkimas

Atliekant eksperimentus su chemoterapiniais vaistais yra svarbus optimalios vaisto dozės parinkimas. Prieš pradėdant CY tyrimus *in vivo*, buvo atlikta efektyvios CY dozės paieška pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymui. Kuomet navikai pasiekė $\sim 50\text{-}100 \text{ mm}^3$ dydį, buvo pradėtas pelių gydymas. Remiantis literatūra, pelių su LLC1 navikais gydymui buvo vertinamos 90; 140; 180 mg/kg CY dozės. Pelių su GL261 navikais gydymui buvo vertinamos 45; 90 mg/kg CY dozės. Gydymas CY susidėjo iš 3 dozių, skiriamų kas 6 dienas [181], vaistą leidžiant intraperitoniskai. Optimali vaisto dozė pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymui buvo parenkama pagal naviko augimo slopinimą efektą bei imuninio infiltrato navikuose pokyčius. Tam tikslui savaitė po užbaigto gydymo buvo surenkami pelių navikiniai mėginiai.

3.15 Pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymo ciklofosfamidu efektyvumo vertinimas

Parinkus optimalią dozę, buvo pradėtas pelių su LLC1 ar GL261 navikais gydymas CY. Tam tikslui pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 arba GL261 navikai ir gydymas buvo pradėtas navikams pasiekus apytiksliai $50\text{-}100 \text{ mm}^3$ dydį.

- LLC1 navikų gydymui buvo parinkta 140 mg/kg CY dozė;
- GL261 navikų gydymui buvo parinkta 90 mg/kg CY dozė.

Pelių gydymas susidėjo iš 3 CY dozių, skiriamų kas 6 dienas. CY efektyvumas buvo vertintas pagal gebėjimą slopinti naviko vystymąsi, taip pat pagal sukeltus pokyčius naviko imuninio infiltrato ląstelinėje sudėtyje (leukocitai, CD4, CD8, B limfocitai, NK ląstelės, dendritinės ląstelės, M1 ir M2 makrofagai, Gr1⁺ MKL, pagal 3.18 skyrelyje aprašytą metodiką) bei su imunine sistema susijusių genų (susijusių su imuninio atsako aktyvacija ir slopinimu) bei genų, koduojančių MHC-I molekulę, raiškoje (pagal 3.19 skyrelyje aprašytą metodiką). Tam tikslui savaitė po užbaigto gydymo buvo surenkami pelių navikiniai mėginiai.

3.16 Pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymo ciklofosfamido ir imunoterapijos deriniais vertinimas

Navikams pasiekus 50-100 mm³ dydį, pelės buvo išskirstytos į grupes:

- K – kontrolines pelės, kurioms netaikomas gydymas;
- CY – pelės, kurioms taikomas gydymas CY;
- CD – pelės, kurioms taikomas gydymas CY ir DLV;
- CP – pelės, kurioms taikomas gydymas CY ir anti-PD-1;
- CDP – pelės, kurioms taikomas gydymas CY, DLV ir anti-PD-1

Gydymo efektyvumas buvo vertinamas pagal gebėjimą slopinti naviko vystymąsi, pagal sukeltus pokyčius naviko imuninio infiltrato ląstelinėje sudėtyje (leukocitai, CD4, CD8, B limfocitai, NK ląstelės, dendritinės ląstelės, M1 ir M2 makrofagai, Gr1⁺ MKL, pagal 3.18 skyrelyje aprašytą metodiką) bei su imunine sistema susijusių genų raiškoje (pagal 3.19 skyrelyje aprašytą metodiką). Taip pat buvo vertinamas gydymo aktyvuotas sisteminis imuninis atsakas. Tam tikslui savaitė po užbaigto gydymo buvo surenkami pelių navikiniai ir blužnies mėginiai.

GL261 navikų atveju, norint įvertinti, ar taikytas gydymas aktyvavo imuninės atminties mechanizmus, daliai pelyčių 68 eksperimento dieną buvo pakartotinai sukeltas navikas dešinėje pusėje, kitoje pusėje nei buvo sukeltas pirminis navikas.

3.17 Pelių navikinės medžiagos ir blužnių apdorojimas

LLC1 ir GL261 naviko mikroaplinkos charakterizavimui navikai buvo renkami pasiekus 200-300 mm³ dydį. Taip pat navikai buvo surenkami praėjus savaitei po užbaigto gydymo. Tam tikslui pelytės buvo numarinamos atliekant cervikalinę kaklo slankstelių dislokaciją. Tuomet navikai buvo išimami iš pelyčių ir pasmulkinami į gabalėlius. Dalis navikų fragmentų buvo patalpinti į Trizol tirpalą ir staigiai užšaldyti skystame azote.

Kita dalis fragmentų buvo toliau dezagreguojama IV tipo kolagenazės (100 U/mL) ir DNAzės I (40 U/mL) tirpale, +37°C temperatūroje apie 20 min. Ląstelių suspensija buvo filtruojama pro 70 µm filtrą ir centrifuguojama 300 g 5 min. Tuomet navikinės ląstelės buvo užšaldomos specialioje šaldymui skirtoje terpėje ir laikomos –150°C temperatūroje tolimesniems tyrimams.

Savaitė po užbaigto gydymo buvo surenkamos pelių blužnys. Blužnys buvo perkošiamas per 70 µm filtrą ir atliekama raudonųjų kraujo kūnelių lizė. Raudonieji kraujo kūneliai lizuoti ant ląstelių užpilant 900 µl distiliuoto H₂O ir purtant purtyklėje 7 sek. Reakcija buvo stabdoma užpilant 100 µl 10x PBS tirpalo. Ląsteles praplovus PBS tirpalu, dalis jų buvo sumaišyta su Trizol tirpalu ir staigiai užšaldyta skystame azote. Kita dalis ląstelių buvo sumaišyta su šaldymo terpe ir laikyta –150°C temperatūroje tolimesniems tyrimams.

3.18 Ląstelių paviršiaus žymenų vertinimas tėkmės citometru

1,5x10⁵ ląstelių per mėgintuvėlį buvo inkubuojamos su atitinkamais monokloniniais Ak (MoAk) ar jų kombinacijomis. MoAk optimalūs kiekiai ląstelių žymėjimui buvo nustatyti prieš eksperimentą. Vienas mėgintuvėlis su ląstelėmis nebuvo žymimas MoAk ir paliekamas kontrolei. Šiame darbe paviršiaus žymenų raiška buvo tiriama keliuose skirtinguose eksperimentuose:

- GL261 ir LLC1 ląstelių imunogeniškumo tyrime – buvo vertinama paviršinių MHC-I ir PD-L1 molekulių raiška;
- Autologinio/ksenogeninio lizatų eksperimento metu surinktuose kraujo mėginiuose buvo vertinamas CD8 limfocitų populiacijos dydis – CD3+CD8+
- Paruoštų pelių DLV kokybės tyrime - nesubrendusių bei GL261 ir LLC1 lizatais subrandintų DL paviršiuje buvo matuojama CD11c, CD86, MHC-II, CD80, CD40 molekulių raiška;
- LLC1 ir GL261 navikų imuninės aplinkos charakterizavime ir gydymo CY, DLV, anti-PD-1 bei jų derinių sukeltamų naviko imuninės mikroaplinkos pokyčių tyrime buvo vertinamos šios populiacijos:
 - NK ląstelės – CD45+CD3-NK1.1+
 - B limfocitai – CD45+CD3-NK1.1-CD19+B220+
 - CD4 T limfocitai – CD45+CD3+CD4+
 - CD8 T limfocitai – CD45+CD3+CD8+

- CD4 T_{EM} limfocitai - CD45+CD3+CD4+CD44+CD62L-
- CD8 T_{EM} limfocitai - CD45+CD3+CD8+CD44+CD62L-
- M1 makrofagai – CD45+CD11b+F480+CD206-
- M2 makrofagai – CD45+CD11b+F480+CD206+
- Dendritinės ląstelės - CD45+CD11b+F480-CD11c+
- Gr1⁺ MKL - CD45+CD11b+F480-CD11c-Gr1+

Prieš žymėjimą ląstelės buvo inkubuojamos su Fc receptorių blokuojančiais anti-CD16/CD32, tokiu būdu sumažinant nespecifinį MoAk jungimąsi.

- Gydomo CY, DLV, anti-PD-1 bei jų derinių sukeltamų sisteminio imuninio atsako pelių blužnyse vertinime:
 - NK ląstelės – CD3-NK1.1+
 - B limfocitai – CD3-NK1.1-CD19+B220+
 - CD4 T limfocitai – CD3+CD4+
 - CD8 T limfocitai – CD3+CD8+
 - CD4 T_{EM} limfocitai – CD3+CD4+CD44+CD62L-
 - CD8 T_{EM} limfocitai – CD3+CD8+CD44+CD62L-
 - M1 makrofagai – CD11b+F480+CD206-
 - M2 makrofagai – CD11b+F480+CD206+
 - Dendritinės ląstelės – CD11b+F480-CD11c+
 - Gr1⁺ MKL – CD11b+F480-CD11c-Gr1+

Prieš žymėjimą ląstelės buvo inkubuojamos su Fc receptorių blokuojančiais anti-CD16/CD32, tokiu būdu sumažinant nespecifinį MoAk jungimąsi.

- CY įtakos LLC1 ir GL261 ląstelių imunogeninėms savybėms tyrime – po poveikio CY ląstelių paviršiuje vertinta MHC-I ir kalretikulino raiška.

Ląstelių inkubacija su MoAk buvo vykdyta kambario temperatūroje, tamsoje, 25 min. Vėliau ląstelės buvo nuplaunamos PBS tirpalu nuo neprikibusių MoAk, surenkamos su tėkmės citometru ir duomenys analizuojami FlowJo ir FACSDiva programomis. Priklausomai nuo eksperimento per mėgintuvėlį buvo surenkama 2×10^4 - 5×10^4 ląstelių. Žymint ląsteles su MoAk, kurių fluorochromų spektrai persikloja, buvo atlikta kompensacija.

3.19 Su imuniniu atsaku susijusių genų raiškos analizė RT-PCR metodu

Visuminė iRNR iš LLC1 ir GL261 navikų bei blužnių mėginių buvo išskirta Trizol reagentu, pagal gamintojo protokolą. Išskirtos iRNR kiekis ir kokybė įvertinti NanoDrop 2000c spektrofotometru. Išskirta iRNR buvo

atvirkščiai transkribuota į kopijinę DNR naudojant „Maxima First Strand“ kDNR sintezės rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. PGR pradmenys paimti iš „PrimerBank“ duomenų bazės (pga.mgh.harvard.edu/ primerbank) (1 priedas). RT-PCR reakcija buvo pradama nuo polimerazės aktyvavimo 5 min. 95°C, po kurio sekė 40 ciklų, susidedančių iš denatūracijos 10 s 95°C bei pradmenų jungimo/grandinės ilginimo 30 s 60 °C. *Gapdh* buvo naudojamas kaip referentinis genas. RT-PCR atlikta Azure Cielo 3 termocikleriu, naudojant „Maxima SYBR Green qPCR Master Mix“ rinkinį. Gautų duomenų analizė atlikta naudojant Azure Cielo Manager programinę įrangą. Norint įvertinti genų raiškos pokyčius buvo naudojamas $\Delta\Delta C_T$ metodas.

3.20 Statistinė duomenų analizė

Tyrimų metu gauti rezultatai buvo statistiškai išanalizuoti ir pavaizduoti GraphPad Prism 9 programa. Duomenų normalinis ir lognormalinis pasiskirstymas įvertintas Shapiro-Wilk testu. Statistinio reikšmingumo tarp duomenų su normaliuoju pasiskirstymu įvertinimui buvo naudotas dvipusis neporinis Sjudento t-testas. Kitu atveju buvo atliekamas Mann-Whitney U testas. Esant daugiau nei dviems lyginamosioms grupėms statistinis reikšmingumas tarp šių grupių duomenų buvo įvertintas I tipo ANOVA su daugybinio palyginimo Tukey's korekcija.

Pelių navikų augimo kreivių statistinis palyginimas buvo atliekamas internetiniu įrankiu TumGrowth [182]. Naviko augimo longitudinalė analizė buvo atliekama naudojant mišraus poveikio modeliavimą ir II tipo ANOVA.

Pelių išgyvenimo tikimybės vertinimui buvo atliekama Kaplan-Meier išgyvenimo analizė. Gauti pelių išgyvenimo duomenys buvo palyginti Log-rank testu.

Charakterizuojant LLC1 ir GL261 ląstelių imuninį genų raiškos profilį, buvo naudojamas ΔC_T metodas ir duomenys buvo z-transformuoti (kai z reikšmė > 0 - reikšmė aukštesnė nei vidutinė, kai $z < 0$ – reikšmė žemesnė už vidutinę). Genų raiškos analizei p-vertės buvo pataisytos naudojant Benjamini, Krieger ir Yekutieli FDR (klaidingo atradimo rodiklio) metodą, kai $FDR (Q) = 1\%$.

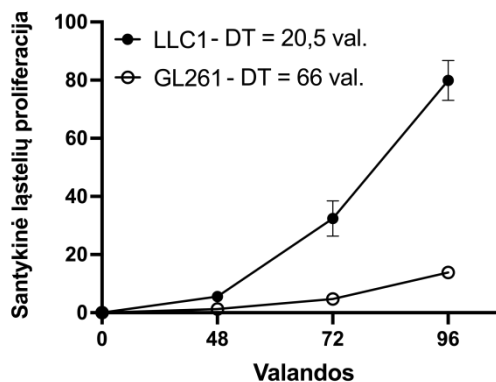
Duomenų vidurkiai buvo skaičiuojami iš bent 3 pakartojimų ir yra išreiškiami kaip vidurkis \pm SN. $P < 0,05$ vertė buvo laikoma statistiškai reikšminga. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip ***** 0,000001 $< p < 0,00001$, ****-0,00001 $< p < 0,0001$, ***-0,0001 $< p < 0,001$, ** -0,001 $< p < 0,01$, *-0,01 $< p < 0,05$.

4.REZULTATAI

4.1 LLC1 ir GL261 ląstelių charakterizavimas

4.1.1 LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacija *in vitro*

LLC1 ir GL261 navikų charakterizavimas buvo pradėtas nuo šių ląstelių linijų proliferacinio potencialo vertinimo. 14 paveiksle pavaizduoti santykiniai ląstelių proliferacijos duomenys, gauti padalinus galutinį ir pradinį ląstelių skaičius. Taip pat pagal formulę (2) buvo apskaičiuotas tirtų ląstelių dvigubėjimo laikas. LLC1 ląstelių dvigubėjimo laikas siekė 20,5 val., o GL261 ląstelių – 66 val. Atsižvelgiant į gautus rezultatus ir norint suvienodinti eksperimentų sąlygas, tolimesniuose eksperimentuose buvo išlaikomas proporcingas LLC1 ir GL261 ląstelių skaičiaus skirtumas.



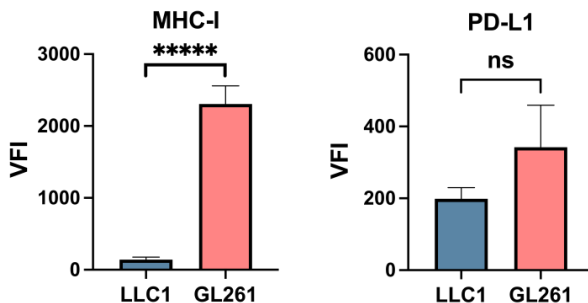
14 pav. Santykinė LLC1 ir GL261 ląstelių proliferacija. Duomenys pateikiami kaip vidurkis±SN, n=4. DT – dvigubėjimo laikas.

4.1.2 AAPM funkcionalumas LLC1 ir GL261 ląstelėse

AAPM analizė LLC1 ir GL261 ląstelėse buvo pradėta vertinant MHC-I raišką šių ląstelių paviršiuje. LLC1 ląstelių paviršiuje buvo nustatyta reikšmingai žemesnė MHC-I raiška, jos vidutinis fluorescencijos intensyvumas (VFI, angl. mean fluorescence intensity) siekė 140 ± 37 , lyginant su GL261 ląstelėmis, kurių VFI buvo 2307 ± 251 ($p=0,000001$) (15 pav.). Žema MHC-I raiška yra pradinis veiksnys, rodantis, kad naviko ląstelės gali turėti sutrikusį AAPM, ribojantį jų gebėjimą pateikti naviko Ag imuninei sistemai bei tokiu būdu leidžiantį apsaugoti nuo imuninės sistemos atpažinimo ir sunaikimo.

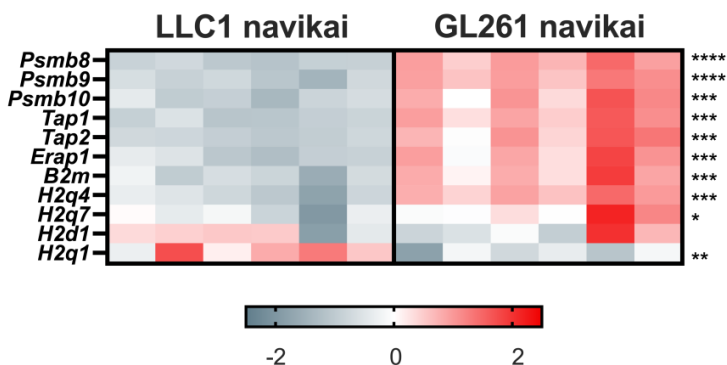
Kadangi tolimesnių tyrimų metu bus vertinamas LLC1 ir GL261 navikų jautrumas anti-PD-1 gydymui *in vivo*, LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje taip pat buvo matuojama PD-1 ligando PD-L1 raiška. PD-L1 buvo labiau išreikšta GL261 ląstelių paviršiuje, kur VFI siekė 342 ± 116 , nei LLC1

ląstelėse, kur VFI buvo 199 ± 31 ($p=0,08$) (15 pav.). Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad tiek LLC1, tiek GL261 ląstelėse paviršiaus PD-L1 raiška yra išreikšta, todėl abu navikai gali potencialiai reaguoti į gydymą anti-PD-1, kuris bus taikomas vėliau.



15 pav. MHC-I ir PD-L1 baltymų raiškos LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje analizė tėkmės citometru. MHC-I ir PD-L1 raiškos VFI duomenys pateikiami kaip duomenų vidurkis \pm SN, $n=4$. VFI – vidutinis fluorescencijos intensyvumas. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *****, $0,000001 < p < 0,00001$

LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje nustatyti MHC-I raiškos skirtumai paskatino plačiau patyrinėti šių ląstelių AAPM transkripciniame lygmenyje. Dėl šios priežasties pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 ($n=6$) arba GL261 ($n=6$) navikai, kuriems pasiekus $\sim 200-300 \text{ mm}^3$ dydį, jie buvo surenkami ir juose buvo tiriama genų, susijusių su AAPM raiška (16 pav.).



16 pav. Su AAPM susijusių genų raiškos profilio analizė RT-PCR metodu LLC1 ir GL261 navikuose. Analizei buvo surinkta po 6 $200-300 \text{ mm}^3$ dydžio LLC1 ir GL261 navikus. Kiekvieno geno vertės buvo paverstos z-balu. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *****, $0,00001 < p < 0,00001$, *** $0,0001 < p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

LLC1 ir GL261 navikuose buvo vertinama AAPM faktorius koduojančių *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1* bei *B2m* raiška. Taip pat buvo vertinama genų, koduojančių pačią MHC-I – *H2q4*, *H2q7*, *H2q1*, *H2d1* – raiška (16 pav.). Lyginant su GL261 navikais, LLC1 navikuose buvo pastebėta reikšmingai žemesnė *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1* ir *B2m* raiška, rodanti, kad LLC1 ląstelėse AAPM yra sutrikęs. AAPM nefunkcionalumas LLC1 ląstelėse gali būti susijęs tiek su pavieniu baltymų nefunkcionalumu, tiek su žema jų raiška.

H2q4, *H2q7*, *H2q1*, *H2d1* raiška LLC1 ir GL261 navikuose svyravo: *H2q7*, *H2q4* raiška buvo reikšmingai didesnė GL261 navikuose, LLC1 navikuose buvo labiau išreikšta *H2q1* raiška, o reikšmingų *H2d1* raiškos skirtumų tarp LLC1 ir GL261 navikų nebuvo pastebėta. Tokia MHC-I koduojančių genų raiškos svyravimų tarp LLC1 ir GL261 navikų priežastimi gali būti MHC-I molekulės aukštas polimorfizmas ir potransliacinės modifikacijos [183]. Tai gerokai apsunkina MHC-I koduojančių genų raiškos vertinimą, todėl *H2q4*, *H2q7*, *H2q1*, *H2d1* raiška nebuvo įtraukta į tolimesnį atsako į imunoterapiją vertinimą.

Gauti rezultatai atskleidžia AAPM molekulinis skirtumus LLC1 ir GL261 ląstelėse. Nors šie navikiniai modeliai yra dažnai naudojami onkogenezės ir vėžio gydymo strategijų efektyvumo tyrimuose bei yra gana nemažai duomenų apie jų savybes, vis tik AAPM detalus įvertinimas šiuose navikiniuose modeliuose, mūsų žiniomis, atliktas pirmą kartą. Žema paviršinės MHC-I molekulės bei AAPM koduojančių genų *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* raiška rodo sutrikusį AAPM LLC1 ląstelėse. O GL261 ląstelėse nustatyta aukšta paviršinės MHC-I molekulės ir AAPM koduojančių genų *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* raiška atspindi funkcionalų AAPM.

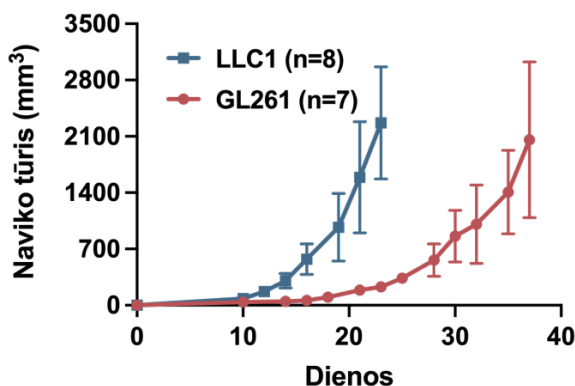
4.2 AAPM funkcionalumo įtaka priešnavikiniam imuniniam atsakui

4.2.1 Sąryšis tarp AAPM funkcionalumo navikinėse ląstelėse ir naviko imuninės mikroaplinkos pobūdžio

Norint iširti, ar LLC1 ir GL261 navikinėse ląstelėse nustatyti AAPM funkcionalumo skirtumai turi įtakos imuninio atsako prieš šias ląsteles formavimuisi, pelėms buvo sukelti poodiniai navikai. Navikams pasiekus 200-300 mm³ dydį, po 6 navikus iš kiekvienos grupės buvo surenkama imuninio atsako vertinimui. Surinktuose navikiniuose mėginiuose buvo analizuojama imuninių ląstelių infiltracija bei su imunine sistema

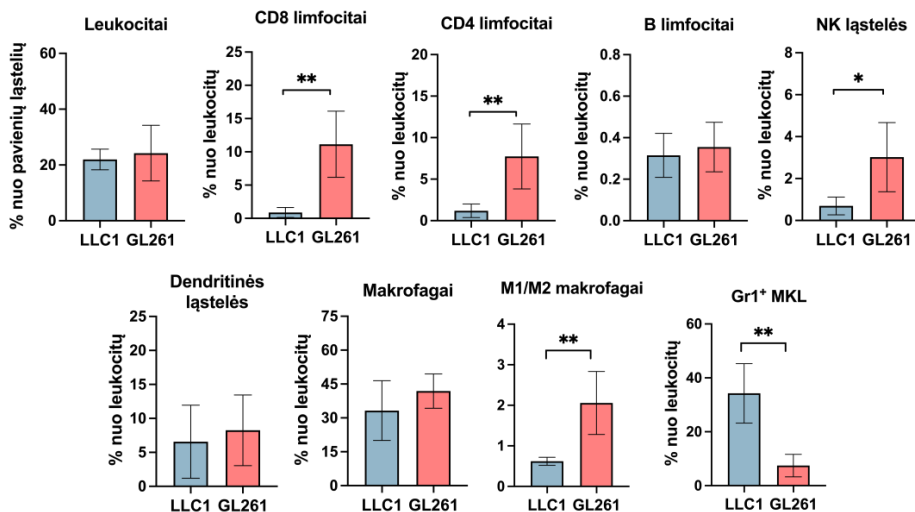
susijusių faktorių raiška.

Visų pirma, buvo stebimas skirtingas navikų vystymosi greitis – GL261 navikai vystėsi reikšmingai lėčiau nei LLC1 navikai ($p < 0,0001$) (17 pav.). Nors bendra leukocitų procentinė dalis šiuose navikuose buvo panaši ($22 \pm 3,7\%$ ir $24,2 \pm 9,9\%$, $p > 0,05$), atlikus imuninio infiltrato sudėties analizę buvo pastebėti skirtumai (18 pav.). GL261 navikai buvo žymiai gausiau infiltruoti CD8 T limfocitais ir NK ląstelėmis, lyginant su LLC1 navikais ($p = 0,003$; $p = 0,01$). Nepaisant to, kad CD8 T limfocitų ir NK ląstelių navikinių ląstelių atpažinimo mechanizmai yra skirtingi, šios imuninės ląstelės pasižymi tiesioginiu citotoksišku poveikiu pakitusioms ląstelėms ir yra vieni pagrindinių priešnavikinio imuniteto komponentų.



17 pav. LLC1 ir GL261 navikų augimo kreivės. Naviko dydis buvo matuojamas slankmačiu kas 2-3 dienas. Rezultatai vaizduojami kaip vidurkis \pm SN.

Lyginant su LLC1 navikais, GL261 navikuose taip pat buvo nustatyta reikšmingai didesnė su CD8 T limfocitų ir NK ląstelių citotoksiškumu susijusių genų, tokių kaip *Gzma* ($p = 0,01$), *Gzmb* ($p = 0,002$) ir *Ifng* ($p = 0,0008$) raiška, patvirtinanti citotoksinių imuninių reakcijų vystymąsi (19 pav.). LLC1 navikuose nustatytas žemas CD8 T limfocitų ir NK ląstelių procentas ir mažesnė su citotoksiškumu susijusių genų *Gzma*, *Gzmb* ir *Ifng* raiška byloja, kad citotoksiniai mechanizmai šiuose navikuose nebuvo vyraujantys. Nors NK ląstelės taip pat gali atpažinti ir nužudyti navikines ląsteles, kurių paviršiaus MHC-I raiška sumažėjusi, menka jų infiltracija į LLC1 navikus leido manyti, kad NK ląstelės neprisideda prie LLC1 navikinių ląstelių naikinimo.



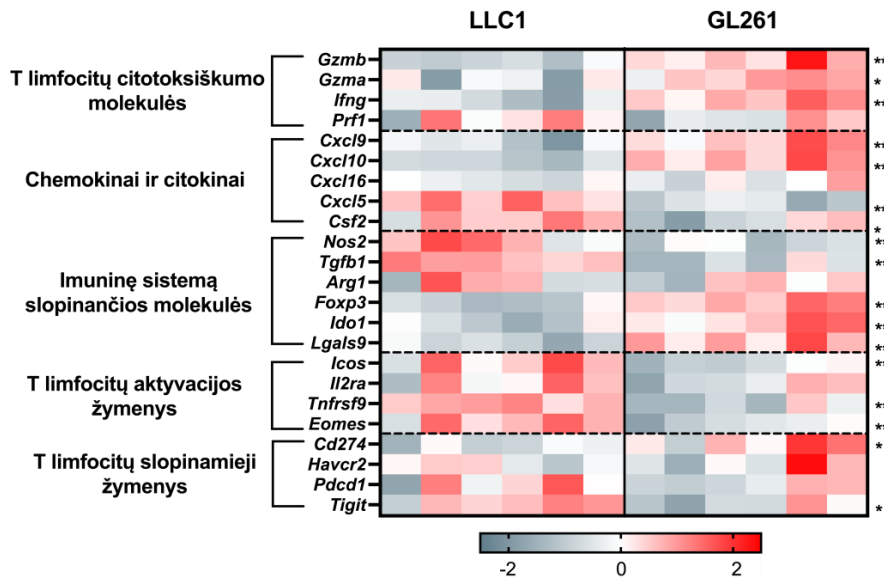
18 pav. Imuninio infiltrato dydžio ir ląstelių sudėties LLC1 ir GL261 navikuose analizė tėkmės citometru. Analizei buvo surinkta po 6 200-300 mm³ dydžio LLC1 ir GL261 navikus. Gr1⁺ MKL – Gr1⁺ mieloidinės kilmės ląstelės. M1/M2 makrofagų grafike pavaizduotas M1 ir M2 makrofagų procento navike santykis. Rezultatai rodomi kaip vidurkis±SN, LLC1 n=3-4, GL261 n=4-5. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti grafikuose, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Kadangi DL yra pagrindinės navikinius antigenus T limfocitams pateikiančios ir specifinį priešvėžinį imuninį atsaką inicijuojančios ląstelės, jų infiltracijos į navikus sutrikimai taip pat gali lemti T limfocitų atsako nesiformavimą navikuose. Vis dėlto, LLC1 ir GL261 navikuose buvo nustatytas panašus procentas infiltravusių DL ($p > 0,05$), kas rodo, kad DL infiltracija į LLC1 navikus nėra pažeista ir gali būti sukeliama specifinis navikui T limfocitų imuninis atsakas. Tai dar labiau patvirtina T limfocitų aktyvacijos žymenų *Icos* ir *Tnfrsf9* raiška, kuri buvo didesnė LLC1 navikuose, lyginant su GL261 (20 pav.). Šie rezultatai rodo, kad DL aktyvino T limfocitus prieš LLC1 ląsteles, tačiau aktyvinti T limfocitai galimai negebėjo atpažinti taikininių ląstelių, prieš kurias yra nukreipti, dėl jose sutrikusio AAPM.

LLC1 ir GL261 navikuose taip pat buvo nustatyti reikšmingi chemokinių *Cxcl9* ir *Cxcl10* genų raiškos skirtumai. Šie chemokinais yra atsakingi už T limfocitų, NK ląstelių ir makrofagų pritraukimą į naviko masę. Didesnė *Cxcl9* ir *Cxcl10* raiška iš dalies paaiškina, kodėl GL261 navikai yra gausiau infiltruoti T limfocitais ir NK ląstelėmis. Negana to, šių chemokinių raiška yra reguliuojama IFN γ [142], kurio raiška taip pat buvo

reikšmingai didesnė GL261 navikuose.

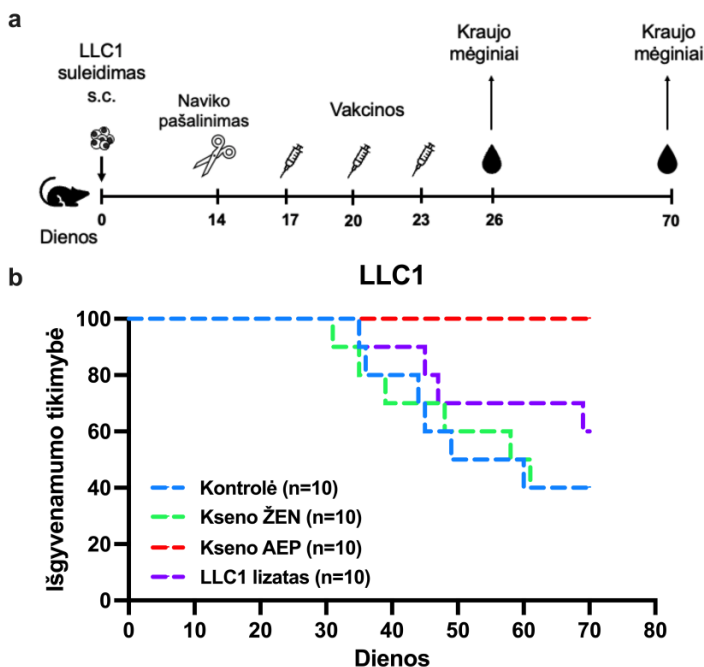
LLC1 ir GL261 navikuose taip pat dominavo skirtingi imunitetą slopinantys mechanizmai. Lyginant su LLC1 navikais, CD4 T limfocitų infiltracija buvo didesnė GL261 navikuose, o tolesnė *FoxP3* ir *Ido1* genų raiškos analizė leidžia dalį tų limfocitų identifikuoti kaip Treg limfocitus. Taip pat LLC1 ir GL261 navikuose vyravo skirtingų potipių makrofagai, kurių vystymąsi galimai nulėmė skirtingi naviko mikroaplinkoje esantys veiksniai. GL261 navikuose dominavo M1 makrofagai, susiję su priešnavikiniu imuniniu atsaku, o LLC1 navikuose dominavo naviko progresavimą skatinantys M2 makrofagai [4]. LLC1 navikuose buvo pastebimas reikšmingai didesnis Gr1⁺ MKL ląstelių, apimančių MKSL, neutrofilus bei kitus granulocitus, kurių pritraukimą į naviko masę ir tolimesnį gausėjimą galėjo nulemti aukštesnė *Csf2* ir *Cxcl5* raiška LLC1 navikuose. Juose taip pat buvo stipriau išreikšta *Nos2* ir *Tgfb1* raiška, susijusi su mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių nulemtu imuninio atsako slopinimu [184].



19 pav. Su imuniniu atsaku susijusių genų raiškos analizė LLC1 ir GL261 navikuose RT-PCR metodu. Analizei buvo surinkta po 6 200-300 mm³ dydžio LLC1 ir GL261 navikus. Kiekvieno geno vertės buvo paverstos z-balu. Reikšmingi genų raiškos skirtumai pavaizduoti grafikuose, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

4.2.2 Imuninio atsako sukėlimas prieš LLC1 navikus, pasižyminčius nefunkcionaliu AAPM

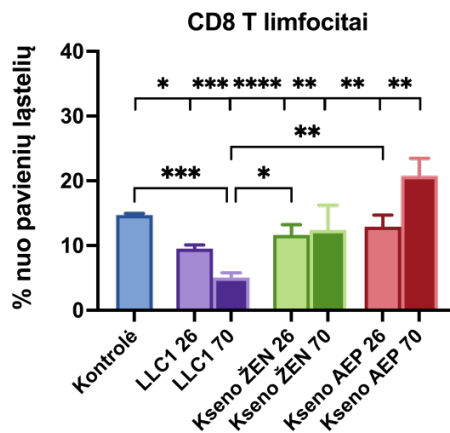
Norint įvertinti, ar įmanoma terapinėmis priemonėmis paskatinti imuninio atsako prieš LLC1 navikus formavimąsi, pelėms buvo sukeliamas poodinis LLC1 navikas, kuris buvo pašalintas ir skiriamos 3 autologinės ir ksenogeninės kilmės lizatų dozės. Eksperimento schema yra pavaizduota 20 a paveiksle. Šių lizatų vakcinomis buvo siekiama sukelti DL aktyvaciją bei prieš LLC1 ląsteles nukreiptą T limfocitų imuninį atsaką, užtikrinantį likutinių LLC1 ląstelių pašalinimą ir užkertantį kelią metastazių formavimuisi. Kaip teigiama atsako kontrolė buvo pasirinkti ksenogeniniai lizatai, pagaminti iš embrioninių audinių – kseno ŽEN ir kseno AEP. Šie lizatai savyje turi įvairių onkofetalinių bei vėžio-sėklidžių Ag, kurių raiška dažnai vyksta ir navikinėse ląstelėse. Taip pat dėl ksenogeninės kilmės prieš šiuos Ag neturėtų formuotis imuninės tolerancijos mechanizmai [50],[185],[186].



20 pav. Pelių išgyvenamumas po vakcinavimo autologiniu LLC1 lizatu bei ksenogeniniais avies embriono plaučių (AEP) bei žiurkės embriono nervinio audinių lizatais. a – eksperimento atlikimo schema. b – pelių išgyvenimo kreivės. Kseno ŽEN – žiurkės embriono nervinio audinio lizatas, Kseno AEP – avies embriono plaučių audinio lizatas.

Autologinio ir ksenogeninių lizatų gebėjimas išsaukti prieš LLC1 ląsteles nukreiptą imuninį atsaką buvo vertinamas pagal bendrą pelių išgyvenimą ir CD8 T limfocitų pokyčius pelių kraujyje po gydymo ir eksperimento pabaigoje. Eksperimento pabaigoje kontrolinių pelių išgyvenamumas siekė 40% (20 pav. b). Teigiamo poveikio pelių išgyvenimui neturėjo vakcinacija kseno ŽEN lizatu - pelių išgyvenamumas šioje grupė, kaip ir kontrolėje, siekė 40% ($p>0,05$). Vakcinacija LLC1 lizatu pelių išgyvenimą pagerino nežymiai – iki 60% ($p>0,05$). Vienintelis kseno AEP lizatas užtikrino 100% pelių išgyvenimą (lyginant su K, $p=0,004$; lyginant su LLC1; su kseno ŽEN, $p=0,004$).

Norint įvertinti, ar lizatai gebėjo indukuoti prieš LLC1 ląsteles nukreiptą imuninį atsaką pelių kraujo mėginiuose, paimtuose 26 eksperimento dieną (3 dienos po vakcinavimo pabaigos) ir 70 eksperimento dieną (eksperimento pabaigoje), buvo vertinama CD8 T limfocitų procentinė dalis nuo visų kraujo ląstelių (21 pav.).



21 pav. CD8 T limfocitų kiekio pelių kraujyje po vakcinacijos autologiniais ir ksenogeniniais lizatais vertinimas tėkmės citometru. Kraujas tyrimams buvo imtas 26 ir 70 eksperimento dieną. Grafikuose skirtingi kraujo ėminiai atitinkamai pažymėti – grupe ir ėmimo diena (26 ir 70). Rezultatai rodomi kaip vidurkis \pm SN, $n=3$. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti grafikuose, **** $0,00001<p<0,0001$, *** $0,0001<p<0,001$, ** $0,001<p<0,01$, * $0,01<p<0,05$.

Vienintelėje grupėje, kuriai buvo skiriamas kseno AEP lizatas, lėmęs reikšmingai išaugusį pelių išgyvenimą, lyginant su kontrolinėmis pelėmis buvo stebimas reikšmingai išaugęs CD8 limfocitų skaičius eksperimento pabaigoje.

Gauti rezultatai parodė, kad sutrikęs AAPM navikinėse ląstelėse lemia

imuninės sistemos negebėjimą atpažinti ir sunaikinti tokių navikinių ląstelių. LLC1 navikuose, su nefunkcionaliu AAPM, nebuvo stebimos su CD8 T limfocitais ir NK ląstelėmis susijusios citotoksinės imuninės reakcijos. Priešingai, GL261 navikuose, pasižyminčiuose aktyviu AAPM, buvo nustatytas citotoksinių imuninio atsako formavimasis. Vis dėlto, kaip rodo tyrimo su autologiniu ir ksenogeniniais lizatais rezultatai, imuninis atsakas prieš LLC1 ląsteles gali būti paskatinamas išoriškai, tik tam reikia ieškoti efektyvių gydymo strategijų.

4.3. AAPM funkcionalumo įtaka LLC1 ir GL261 navikų jautrumui DLV ir anti-PD-1

4.3.1 *Ex vivo* paruoštų pelių dendritinių ląstelių vakcinų kokybės vertinimas

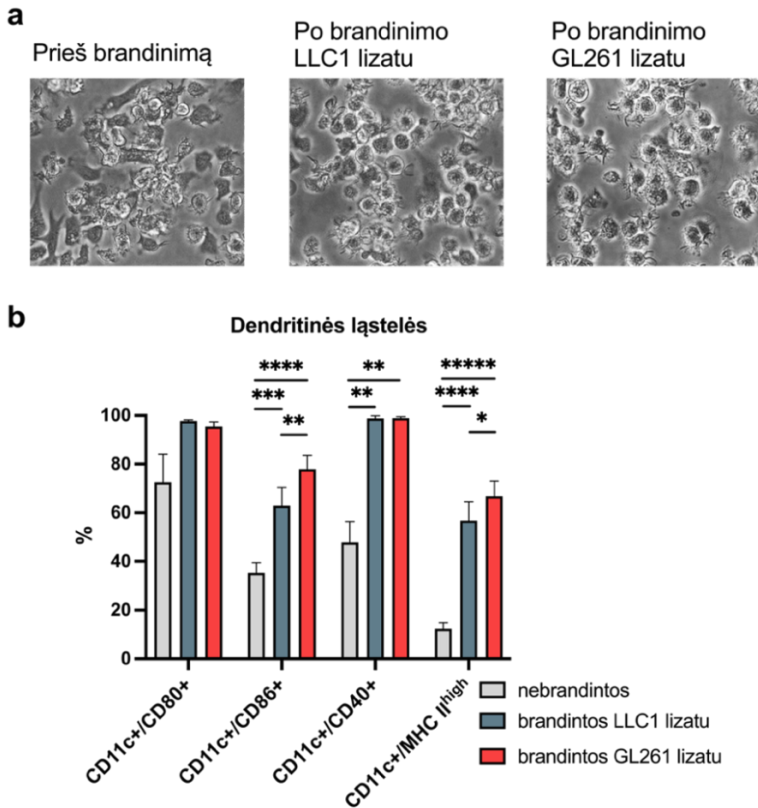
Charakterizavus LLC1 ir GL261 navikus pagal AAPM funkcionalumą ir besiformuojančią imuninę mikroaplinką, toliau buvo siekiama įvertinti LLC1 ir GL261 navikų atsaką į gydymą priešvėžine imunoterapija – paruoštomis DLV bei PD-1 patikros tašką blokuojančiu antikūnu anti-PD-1. Paruoštos DLV buvo įvertintos morfologiškai ir fenotipiškai tiek po diferenciacijos etapo (nesubrendusios DL), tiek po brandinimo etapo (subrendusios DL), siekiant patvirtinti jų subrendimą ir tinkamumą pelių gydymui.

DL brandinimas su LLC1 arba GL261 lizatu sukėlė akimi pastebimus morfologinius ląstelių pokyčius – ląstelių paviršiuje atsirado citoplazminės išaugos, būdingos subrendusioms DL ir leidžiančios padidinti ląstelės paviršiaus plotą bei tokiu būdu pagerinti Ag pateikimą T limfocitams (22 pav. a). Įvykusį DL subrendimą taip pat patvirtina išaugęs populiacijų dydis paruoštos DL (22 pav. b):

- CD11c+/CD80+ (nesubrendusios DL su DL+LLC1 $p > 0,05$; su DL+GL261 $p > 0,05$);
- CD11c+/CD86+ (nesubrendusios DL su DL+LLC1 $p = 0,0005$; su DL+GL261 $p = 0,00003$);
- CD11c+/CD40+ (nesubrendusios DL su DL+ LLC1 $p = 0,009$; su DL+GL261 $p = 0,009$);
- CD11c+/MHC-II^{high} (nesubrendusios DL su DL+LLC1 $p = 0,00006$; su DL+GL261 $p = 0,000004$).

Taip pat gauti rezultatai išryškino skirtingą LLC1 ir GL261 lizatų gebėjimą sukelti DL brandimą. DL, brandintose GL261 lizatu, buvo nustatyta reikšmingai didesnė CD11c+/CD86+ ir CD11c+/MHC-II^{high} ląstelių populiacijų dalis nei DL, brandintose LLC1 lizatu ($p = 0,008$; $p = 0,05$). Kaip

rodo atlikti tyrimai, skirtingas navikinių ląstelių gebėjimas sukelti DL brendimą gali būti susijęs su jų gaminamais imunosupresiniais faktoriais, tokiais kaip VEGF, TGFB1, IL-10, GM-CSF, IL-6 [187]. Nepaisant to, kad DL, brandintos LLC1 ir GL261 lizatais, pasižymėjo šiek tiek skirtinga DL charakteringų žymenų raiška, visgi paruoštos DL, atitinka subrendusių DL charakteristikas ir turėtų sukelti priešnavikinį imuninį atsaką suleistos atgal pelėms.

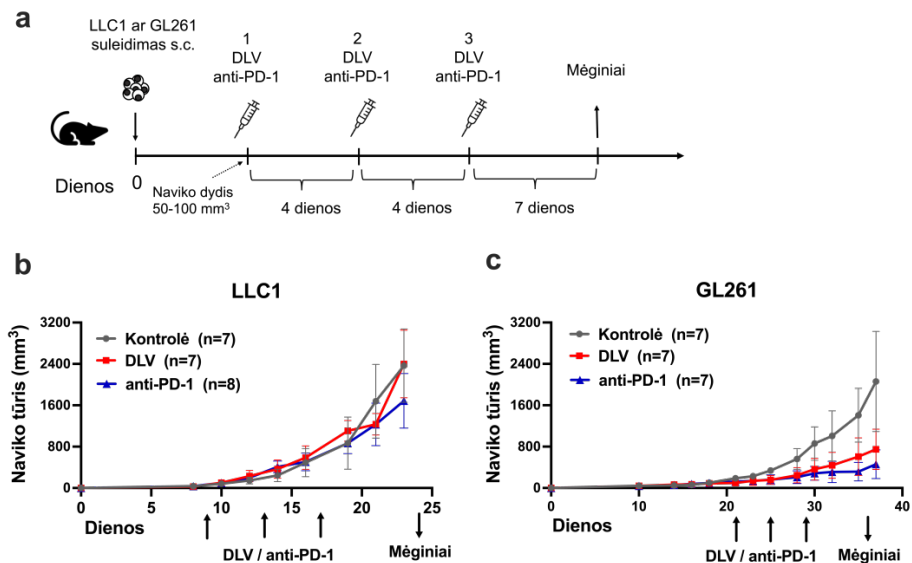


22 pav. Pagamintų pelių DL kokybės įvertinimas prieš ir po 24 val. brandinimo su LLC1 arba GL261 lizatais ir LPS. a - DL morfologija padidinus 400x. b - DL fenotipo vertinimas tėkmės citometru. DL fenotipas buvo įvertintas pagal CD11c raišką kartu su CD80/CD86/CD40/MHC-II. DL – dendritinė ląstelė, LPS – lipopolisacharidas. Rezultatai rodomi kaip vidurkis±SN, n=4. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip ***** 0,000001<p<0,00001, **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p≤0,05.

4.3.2 Ryšys tarp AAPM funkcionalumo ir naviko atsako į dendritinių ląstelių vakciną ir anti-PD-1

Siekiant įvertinti, ar AAPM funkcionalumo skirtumai, nustatyti LLC1 ir GL261 navikuose lemia jų atsaką į gydymą DLV ir anti-PD-1, pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 arba GL261 navikai ir pelės buvo gydomos pagal 23 a paveiksle pateiktą schemą. Atsakas į DLV arba anti-PD-1 buvo vertinamas pagal naviko vystymosi greitį, imuninių ląstelių infiltrato navike dydį ir sudėtį bei pagal imuninius parametrus, vyraujančius naviko mikroaplinkoje.

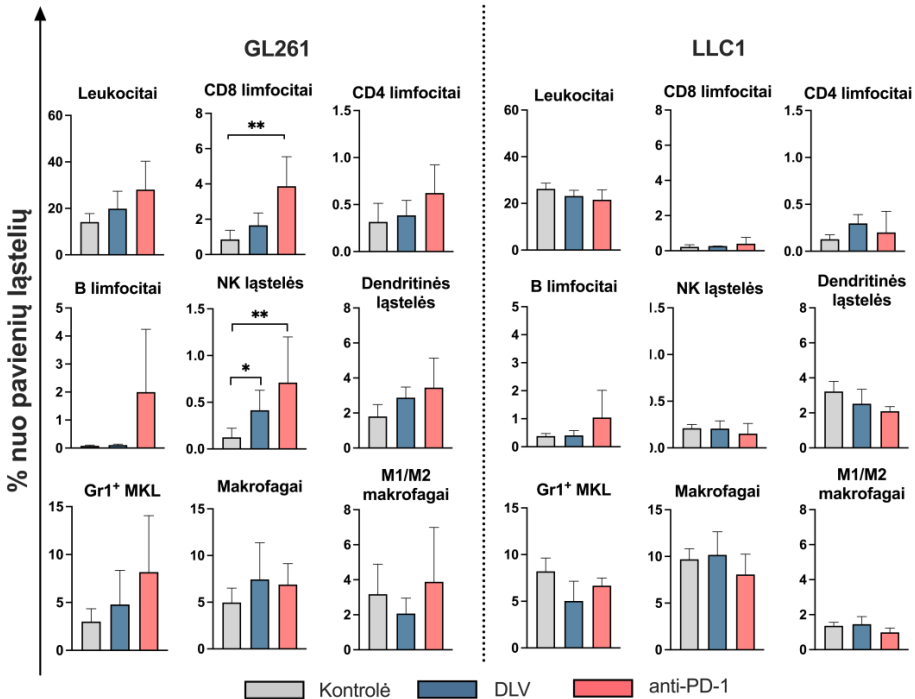
LLC1 naviko atveju DLV ar anti-PD-1 neturėjo jokio slopinančio poveikio naviko augimui – pelių, gydytų imunoterapija, navikai vystėsi panašiu tempu kaip ir negydytų pelių (23 pav., b). Anaipol tiek DLV, tiek anti-PD-1 reikšmingai prislopino GL261 navikų augimą. Gydant DLV GL261 navikų TGI siekė 55%, o gydanti anti-PD-1 TGI buvo 71%.



23 pav. LLC1 ir GL261 navikų atsakas į gydymą DLV ir anti-PD-1. a - Pelių skiepijimo ir mėginių ėmimo schema. b - LLC1 ir GL261 navikų augimo kreivės. Naviko dydis buvo matuojamas kas 2-3 dienas slankmačiu. Rezultatai rodomi kaip duomenų vidurkis \pm SN.

Kadangi imunoterapija nepasižymi tiesioginiu poveikiu navikinėms ląstelėms, kaip, pavyzdžiui, chemoterapija ar spindulinis gydymas, jos poveikis navikams atsiskleidžia per imuninius mechanizmus. Praėjus savaitei

po užbaigto gydymo, surinktuose navikiniuose mėginiuose buvo vertinamas terapijos nulemtas imuninis atsakas. Po gydymo GL261 navikuose buvo stebima padidėjusi CD45+ leukocitų infiltracija, tačiau LLC1 navikuose teigiamo imunoterapijos poveikio leukocitų skaičiui nebuvo pastebėta. Gydymas imunoterapija GL261 navikuose taip pat padidino NK ląstelių (kontrolė su DLV $p=0.01$, kontrolė su anti-PD-1 $p=0.004$) ir CD8 T limfocitų kiekį, ypač pelių, gydytų anti-PD-1, grupėje (kontrolė su anti-PD-1 $p=0,001$) (24 pav.).

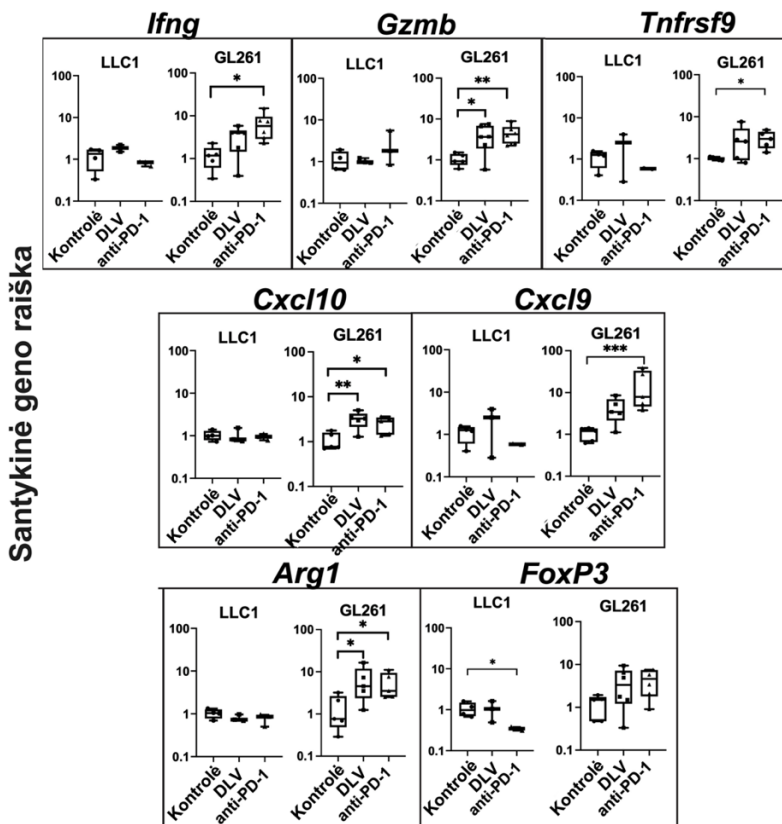


24 pav. Imuninių ląstelių infiltracijos LLC1 ir GL261 navikuose po gydymo DLV ir anti-PD-1 analizė tėkmės citometru. Naviko mėginiai buvo paimti praėjus 7 dienoms po gydymo pabaigos. Pilka spalva vaizduoja kontrolines peles, melsva – peles, gydytas DLV, rausva – peles, gydytas anti-PD-1. M1/M2 makrofagų grafike pavaizduotas M1 ir M2 makrofagų procento navike santykis. Rezultatai rodomi kaip duomenų vidurkis±SN, LLC1 n=3-4, GL261 n=4-5. Reikšmingi imuninių ląstelių skirtumai surinktuose LLC1 ir GL261 naviko mėginiuose pavaizduoti kaip ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

Imunoterapijos nulemta prieš GL261 ląsteles nutaikyto imuninio atsako aktyvumą dar labiau patvirtina po gydymo išaugusi su

citotoksiškumu susijusių genų *Ifnɡ* (kontrolė su anti-PD-1 $p=0,01$) ir *Gzmb* (kontrolė su DLV $p=0,04$; su anti-PD-1 $p=0,01$) ir T limfocitų aktyvacijos žymens *Tnfrsf9* (4-1BB) raiška (kontrolė su anti-PD-1 $p=0,04$).

GL261 navikuose po taikyto gydymo taip pat buvo stebima padidėjusi chemokinių *Cxcl9* (kontrolė su anti-PD-1 $p=0,0009$) ir *Cxcl10* (kontrolė su DLV $p=0,008$, kontrolė su anti-PD-1 $p=0,03$), glaudžiai susijusių su T limfocitų infiltracija į navikus, raiška (25 pav.) Gydymas imunoterapija neturėjo reikšmingo poveikio NK ląstelių ar CD8 limfocitų infiltracijai ar *Ifnɡ*, *Gzmb*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Tnfrsf9* genų raiškai LLC1 navikuose, kas paaiškina DLV ir anti-PD-1 teigiamo efekto LLC1 navikams trūkumą.



25 pav. Su priešvėžiniu imuniniu atsaku siejamų genų raiškos analizė LLC1 ir GL261 navikuose RT-PCR metodu. Rezultatai rodomi kaip duomenų vidurkis \pm SN, LLC1 $n=3-4$, GL261 $n=4-5$. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *** $0,0001 < p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

Po taikyto gydymo LLC1 ir GL261 navikuose taip pat buvo

vertinami imunosupresiniai mechanizmai. LLC1 navikuose nebuvo pastebėta jokių imunosupresinių mechanizmų aktyvavimo požymių – Gr1⁺ MKL ir M2 makrofagų skaičius bei *Arg1* raiška išliko nepakitusi. Anaiptol, kaip rodo sumažėjusi *Foxp3* raiška LLC1 navikuose (kontrolė su anti-PD-1 p=0,04), gydymas anti-PD-1 galimai pasižymėjo Treg limfocitų slopinančiu poveikiu. Nors po gydymo GL261 navikuose nebuvo stebimas reikšmingas Gr1⁺ MKL ar M2 makrofagų skaičiaus pokytis, su šiomis ląstelėmis siejamo imunosupresinio faktoriaus *Arg1* raiška reikšmingai išaugo (kontrolė su DLV p=0,04, su anti-PD-1 p=0,04), galimai kaip naviko atsakas į gydymo sukeltą priešvėžinę imuninę ataką.

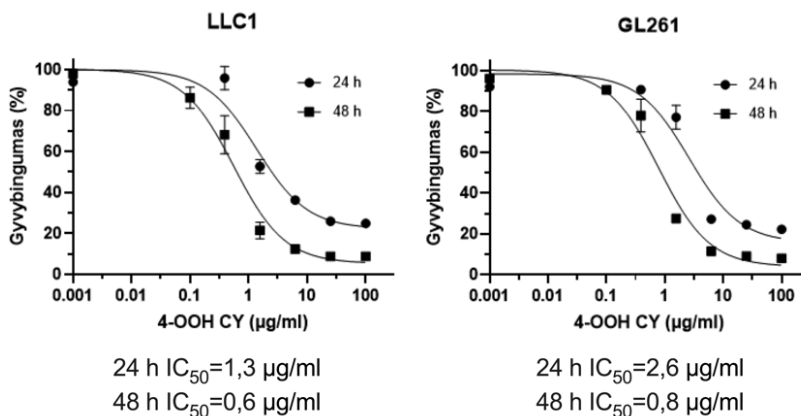
Gauti rezultatai rodo, kad AAPM funkcionalumas navikinėse ląstelėse yra susijęs su jų jautrumu gydymui imunoterapija – dendritinių ląstelių vakcinomis ir anti-PD-1. LLC1 navikai, kuriuose AAPM buvo nefunkcionalus, nebuvo jautrūs gydymui DLV ir anti-PD-1 – gydymas nepaskatino priešvėžinio imuninio atsako formavimosi. Nors GL261 navikuose AAPM buvo funkcionalus, prieš tokius navikus formavosi imuninis atsakas, imunoterapija efektyviai prislopino navikų vystymąsi bei sukėlė priešvėžinį imuninį atsaką, tačiau nesugebėjo užtikrinti pilno naviko sunaikinimo. Tai rodo, kad nepaisant navikų jautrumo imunoterapijai, yra reikalingos kombininės gydymo strategijos, pralaužiančios naviko imunosupresinius barjerus ir padedančios dar labiau atsiskleisti imunoterapijos teigiamam efektui. Tam tikslui dėl plataus imunostimuliacinio spektro buvo nuspręsta iširti chemoterapinio vaisto ciklofosfamido poveikį LLC1 ir GL261 ląstelėms bei iširti jo derinių su DLV ir anti-PD-1 efektyvumą gydant peles su skirtingo AAPM funkcionalumo navikais.

4.4 Ciklofosfamido imunomoduliacinis poveikis LLC1 ir GL261 ląstelėms

Prieš pradėdant platesnius tyrimus, pirmiausia buvo siekiama įvertinti chemoterapinio vaisto ciklofosfamido poveikį LLC1 ir GL261 ląstelių gyvybingumui, gebėjimui indukuoti šių ląstelių imunogeninę žūtį bei aktyvuoti AAPM *in vitro*. Kadangi ciklofosfamidas yra neaktyvi vaisto forma, kurią *in vivo* aktyvia paverčia kepenų fermentai, šio eksperimento metu buvo naudojama aktyvi ciklofosfamido forma 4-hidroksiperoksiciklofosfamidas, toliau tekste žymima CY.

4.4.1 LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumas ciklofosfamidui *in vitro*

CY imunomoduliuojančio poveikio LLC1 ir GL261 ląstelėms tyrimai buvo pradėti nuo jų jautrumo šiam vaistui vertinimo. 26 paveiksle parodyta LLC1 ir GL261 ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo CY koncentracijos ir poveikio vaistu trukmės. Gauti rezultatai rodo LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumą chemoterapinio vaisto CY poveikiui *in vitro*. CY koncentracija, reikalinga sukelti pusės LLC1 ląstelių žūtį (IC_{50}) po 24 val. poveikio buvo 1,3 $\mu\text{g/ml}$, o po 48 val. - 0,6 $\mu\text{g/ml}$, GL261 atveju atitinkamai siekė 2,6 $\mu\text{g/ml}$ ir 0,8 $\mu\text{g/ml}$.



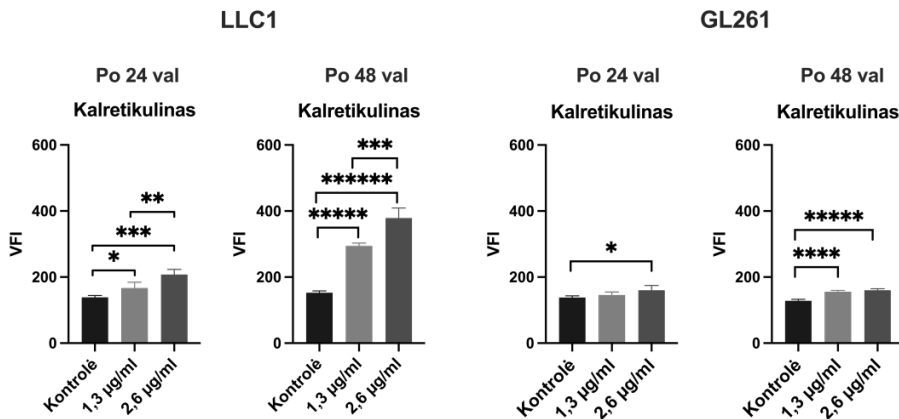
26 pav. LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumo CY poveikiui *in vitro* vertinimas kolorimetrine CCK8 analize. Ląstelių gyvybingumas matuotas praėjus 24 ir 48 val. po poveikio didėjančia CY koncentracija. Duomenys grafike pateikiami kaip duomenų vidurkis \pm SN, n=5.

4.4.2 Ciklofosfamido gebėjimas sukelti imunogeninę LLC1 ir GL261 ląstelių žūtį *in vitro*

Toliau buvo vertinamas CY gebėjimas sukelti LLC1 ir GL261 ląstelių imunogeninę žūtį (27 pav.). Kadangi CY iš pelių organizmo yra pašalinamas per 4 val., siekiant tiksliai atkartoti tikrąsias sąlygas ir įvertinti CY imunomoduliacinį poveikį LLC1 ir GL261 ląstelėms, jos buvo veikiamos CY 4 val. *in vitro*, po to vaistas buvo pašalintas ir pakeistas šviežia mitybine terpe.

CY gebėjimas indukuoti imunogeninę ląstelių žūtį buvo vertinamas pagal endoplazminio tinklo baltymo kalretikulino raišką LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje praėjus 24 ir 48 val. po poveikio nustatytomis IC_{50} CY koncentracijomis 1,3 ir 2,6 $\mu\text{g/ml}$. Reikšmingi kalretikulino raiškos

skirtumai LLC1 ląstelėse buvo stebimi praėjus 24 val. po poveikio 1,3 µg/ml arba 2,6 µg/ml CY koncentracija (kontrolė su 1,3 µg/ml p=0,045; kontrolė su 2,6 µg/ml p=0,0002; 1,3 µg/ml su 2,6 µg/ml p=0,007) ir GL261 ląstelėse po poveikio 2,6 µg/ml CY koncentracija (kontrolė prieš 2,6 µg/ml p=0,04). Kalretikulino raiška LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje po poveikio CY toliau didėjo (LLC1 – kontrolė su 1,3 µg/ml p=0,000005; kontrolė su 2,6 µg/ml p=0,0000001; 1,3 su 2,6 µg/ml p=0,0003; GL261 - kontrolinė su 1,3 µg/ml p=0,00003; kontrolė su 2,6 µg/ml p=0,000008). Kaip rodo gauti rezultatai kalretikulino raiška ląstelių paviršiuje didėjo laike ir priklausė nuo CY koncentracijos.

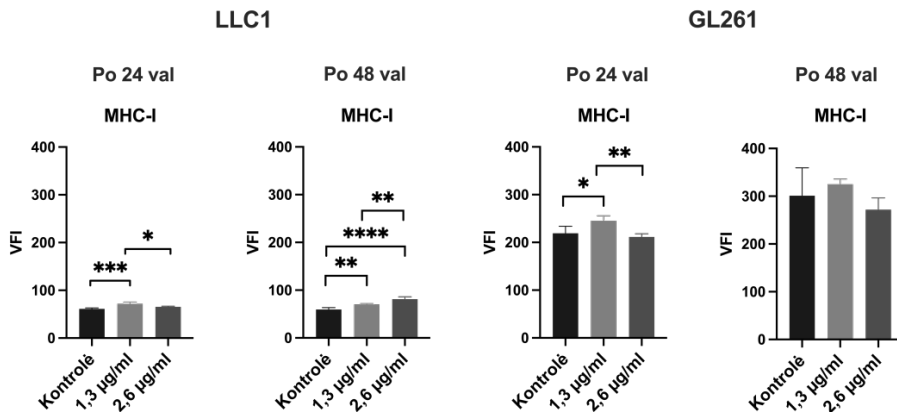


27 pav. CY poveikio kalretikulino raiškai LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje vertinimas tėkmės citometru. LLC1 ir GL261 ląstelės buvo veikiamos 1,3 arba 2,6 µg/ml CY 4 val., pakeičiant šviežia mitybine terpe. Kalretikulino raiška ląstelių paviršiuje vertinta praėjus 24 ir 48 val. po poveikio, žymint ląsteles anti-kalretikulino-AlexaFluor647 antikūnais. Kalretikulino vidutinio fluorescencijos intensyvumo (VFI) duomenys yra pateikiami kaip vidurkis±SN, n=4. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip ***** 0,0000001 <p<0,000001, ***** 0,000001<p<0,00001, **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

4.4.3 Ciklofosfamido poveikis LLC1 ir GL261 ląstelių AAPM *in vitro*

CY poveikio AAPM vertinimas buvo pradėtas nuo MHC-I raiškos LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje matavimo (28 pav.). Tam tikslui ląstelės buvo veikiamos 4 val. CY, vėliau vaistas buvo pašalintas ir ląstelės kultivuojamos 24 ir 48 val. mitybinėje terpėje.

Praėjus 24 val. po poveikio 1,3 µg/ml CY buvo stebima reikšmingai išaugusi MHC-I raiška LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje (LLC1 – kontrolė su 1,3 µg/ml $p=0,0006$; GL261 - kontrolė su 1,3 µg/ml $p=0,005$), kuri buvo ryškesnė lyginant su didesne vaisto doze veiktomis ląstelėmis, neturėjusios reikšmingos įtakos MHC-I raiškai (LLC1 - 2,6 µg/ml su 1,3 µg/ml $p=0,02$; GL261 - 2,6 µg/ml su 1,3 µg/ml $p=0,005$). Taip pat CY sukėlė reikšmingą MHC-I raiškos aktyvaciją LLC1 ląstelių paviršiuje, kuri išliko reikšmingai padidėjusi praėjus 48 val. po poveikio ir priklausė nuo CY dozės dydžio. Visgi praėjus 48 val. po poveikio CY GL261 ląstelėse MHC-I raiškos skirtumų nebuvo stebima ir raiška grįžo į kontrolinių ląstelių lygį.

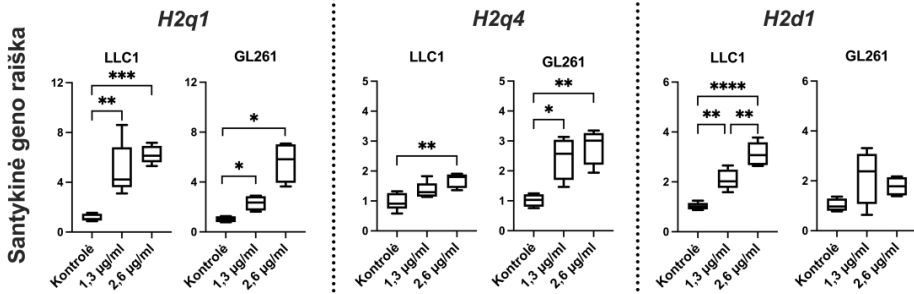


28 pav. CY poveikio MHC-I molekulės raiškai LLC1 ir GL261 ląstelių paviršiuje vertinimas tėkmės citometru. LLC1 ir GL261 ląstelių kultūros buvo veikiamos 1,3 arba 2,6 µg/ml CY 4 val., pakeičiant šviežia mitybine terpe. MHC-I raiška ląstelių paviršiuje vertinta praėjus 24 ir 48 val. po poveikio, žymint ląsteles anti-MHC-I-PerCP-eFluor710. MHC-I raiškos VFI duomenys pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=4. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Pastebėjus CY aktyvuojantį poveikį MHC-I raiškai navikinių ląstelių paviršiuje, toliau buvo siekiama iširti CY poveikį šių ląstelių AAPM. Tam tikslui LLC1 ir GL261 ląstelės buvo veikiamos CY 4 val. *in vitro*, po to vaistas buvo pašalintas ir pakeistas šviežia mitybine terpe (29 pav.). Praėjus 48 val. po poveikio LLC1 ir GL261 ląstelėse buvo vertinama CY įtaka AAPM koduojančių genų raiškos lygiui. Padidėjusi paviršiaus MHC-I raiška LLC1 ląstelėse, veiktose CY, taip pat buvo patvirtinta ir ją koduojančių genų raiškos rezultatais. Po poveikio CY *H2q1*, *H2q4*, *H2d1* raiška LLC1

ląstelėse reikšmingai išaugo ir didėjo proporcingai CY koncentracijai (29 pav.).

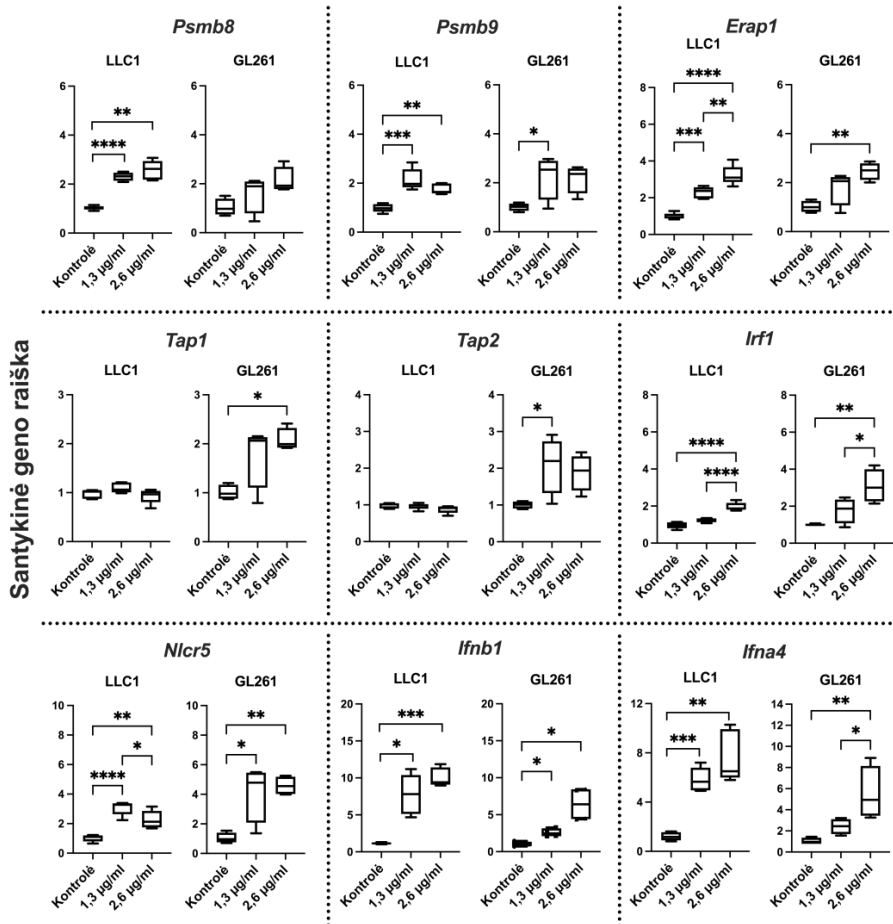
Analogiška situacija buvo stebima GL261 ląstelėse, kur po poveikio CY reikšmingai padidėjo *H2q1* ir *H2q4* raiška, nors paviršiaus MHC-I raiškos skirtumų GL261 ląstelėse praėjus 48 val. po poveikio CY nebuvo stebėta.



29 pav. Santykinė MHC-I molekulę koduojančių genų raiškos analizė RT-PCR metodu LLC1 ir GL261 ląstelėse po poveikio CY *in vitro*. Ląstelės buvo veiktos 4 val. kultūroje su 1,3 arba 2,6 µg/ml CY, vėliau vaistas pakeistas šviežia terpe, o genų raiška ląstelėse buvo matuota praėjus 48 val. po poveikio CY. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=5. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Taip pat CY pasižymėjo aktyvuojančiu poveikiu ir pačiame AAPM koduojančių genų, tokių kaip *Psm8*, *Psm9*, *Erap1*, *Tap1* ir *Tap2* raiškai (30 pav.). Po poveikio CY šių genų raiškos profilis tarp LLC1 ir GL261 navikų išsiskyrė. Reikšmingai išaugusi *Psm8*, *Psm9*, *Erap1* raiška buvo stebima LLC1 ląstelėse, veiktose 1,3 µg/ml arba 2,6 µg/ml CY. Taip pat *Tap2*, *Psm9* buvo reikšmingai išaugusi GL261 ląstelėse, veiktose 1,3 µg/ml CY, ir *Tap1*, *Erap1* GL261 ląstelėse, veiktose 2,6 µg/ml CY.

MHC-I ir AAPM koduojančių genų raiška yra valdoma transkripcijos faktorių *Irf1* bei *Nlcr5*. Šie transkripcijos faktoriai priklauso interferonais valdomų transkripcijos faktorių grupei. Po poveikio CY LLC1 ir GL261 ląstelėse buvo stebima reikšmingai išaugusi transkripcijos faktorių *Irf1*, *Nlcr5* bei *Ifnb1*, *Ifna4* genų raiška, proporcinga CY koncentracijai. Gauti rezultatai rodo, kad AAPM pokyčiai LLC1 ląstelėse yra grįžtami ir gali būti moduluojami terapinėmis priemonėmis.

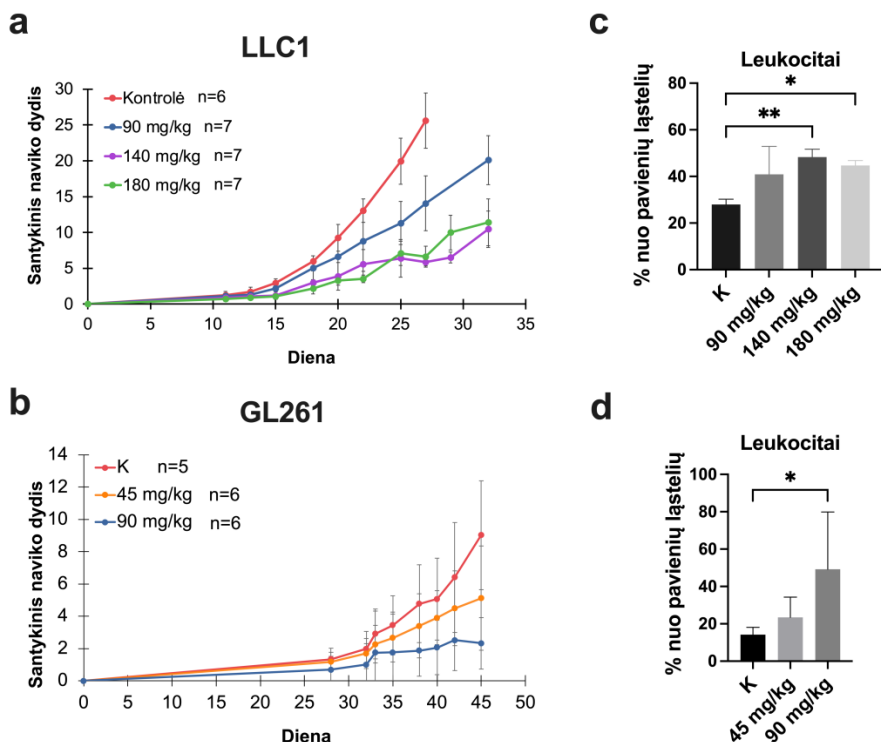


30 pav. AAPM ir jo transkripcijos faktorius koduojančių genų raiškos analizė RT-PCR metodu LLC1 ir GL261 ląstelėse po poveikio CY *in vitro*. Ląstelės buvo veiktos 4 val. kultūroje su 1,3 arba 2,6 µg/ml CY, vėliau vaistas pakeistas šviežia terpe. Genų raiška ląstelėse matuota praėjus 48 val. po poveikio CY. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=5. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

4.4.4 Optimalios ciklofosfamido dozės gydant peles su LLC1 ar GL261 navikais paieška

Patvirtinus LLC1 ir GL261 ląstelių jautrumą CY poveikiui bei CY gebėjimą sukelti imunogeninę šių ląstelių žūtį bei aktyvuojantį poveikį AAPM, toliau buvo siekiama įvertinti CY poveikį LLC1 ir GL261 navikams

in vivo. Visų pirma, buvo atlikti optimalios CY dozės pelių su LLC1 ir GL261 navikais gydymui tyrimai. Tam tikslui pelėms buvo sukelti poodiniai navikai, kuriems pasiekus apytiksliai 100 mm³ dydį, buvo pradėtas gydymas CY, susidedantis iš 3 dozių, skiriamų kas 6 dienas. Optimali dozė buvo parenkama pagal gebėjimą slopinti naviko vystymąsi bei pagal leukocitų skaičių navikuose, atspindintį gydymo nulemtą bendrą imuninės sistemos aktyvaciją (31 pav.).



31 pav. Optimalios CY dozės pelių su LLC1 ar GL261 navikais gydymui paieška. a, c – LLC1 ir GL261 navikų vystymosi gydant skirtingomis CY koncentracijomis grafikai. Navikų dydžiai buvo matuojami kas 2-3 dienas slankmačiu. b, d – leukocitų procento LLC1 ir GL261 navikuose pokyčių po gydymo CY analizė tėkmės citometru. K – žymimos kontrolinės pelės. Duomenys atvaizduojami kaip duomenų vidurkis±SN. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

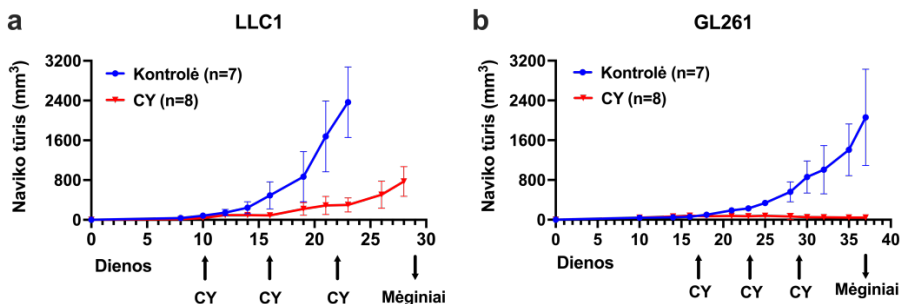
LLC1 navikų atveju geriausiu terapiniu efektu pasižymėjo 140 mg/kg ir 180 mg/kg CY dozės – jos reikšmingai prislopino navikų vystymąsi ir sukėlė reikšmingą imuninės sistemos aktyvumą, kaip rodo navikuose išaugęs leukocitų skaičius. Gydant 140 mg/kg ir 180 mg/kg CY dozėmis

buvo gauti panašūs rezultatai, tarp kurių reikšmingų skirtumų nebuvo stebėta. Tad tolimesniems *in vivo* eksperimentams su LLC1 navikais buvo pasirinkta 140 mg/kg CY dozė, kaip galimai mažiau kenksminga kitoms sveikoms organizmo, tarp jų ir imuninėms, ląstelėms.

GL261 navikų atveju geresniu terapiniu efektu, lyginant su 45 mg/kg, pasižymėjo 90 mg/kg CY dozė – ji efektyviai prislopino GL261 navikų vystymąsi bei lėmė reikšmingai išaugusią leukocitų infiltraciją į navikus. Gydant 45 mg/kg CY dozė, reikšmingo imuninės sistemos aktyvavimo nebuvo stebėta. Remiantis gautais rezultatais, tolimesniems *in vivo* tyrimams buvo pasirinkta 90 mg/kg CY dozė.

4.4.5 Ciklofosfamido efektyvumas gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais

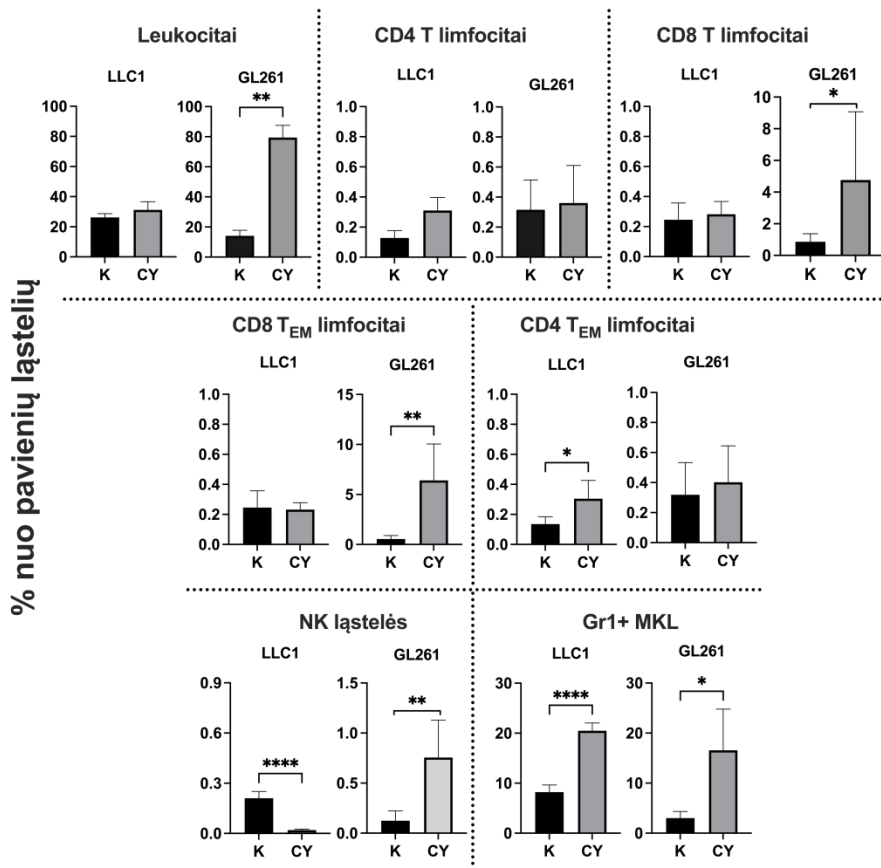
Nustačius optimalias CY dozes, toliau buvo siekiama giliau panagrinėti, CY imunomoduliacinį poveikį priešvėžinio imuninio atsako formavimuisi bei imunogeninėms LLC1 ir GL261 ląstelių savybėms *in vivo* (32 pav.). Atsakas į gydymą CY buvo vertinamas pagal naviko vystymąsi, imuninių ląstelių infiltrato dydį, sudėtį ir genų, susijusių su imuniniu atsaku, raišką. Gydymas CY reikšmingai prislopino LLC1 navikų vystymąsi (kontrolė su CY $p < 0.0001$). 23 eksperimento dieną gydymo CY LLC1 navikų TGI siekė 74%.



32 pav. LLC1 ir GL261 navikų augimo kreivės, gydant CY. Navikų dydis buvo matuojamas kas 2-3 dienas slankmačiu. Navikams pasiekus 50-100 mm³ tūrį buvo pradedamas gydymas CY. Grafikuose strėlytės žymi CY suleidimo dienas. Pelėms su LLC1 navikais buvo skiriama 140 mg/kg, o pelėms su GL261 navikais – 90 mg/kg CY dozė. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN.

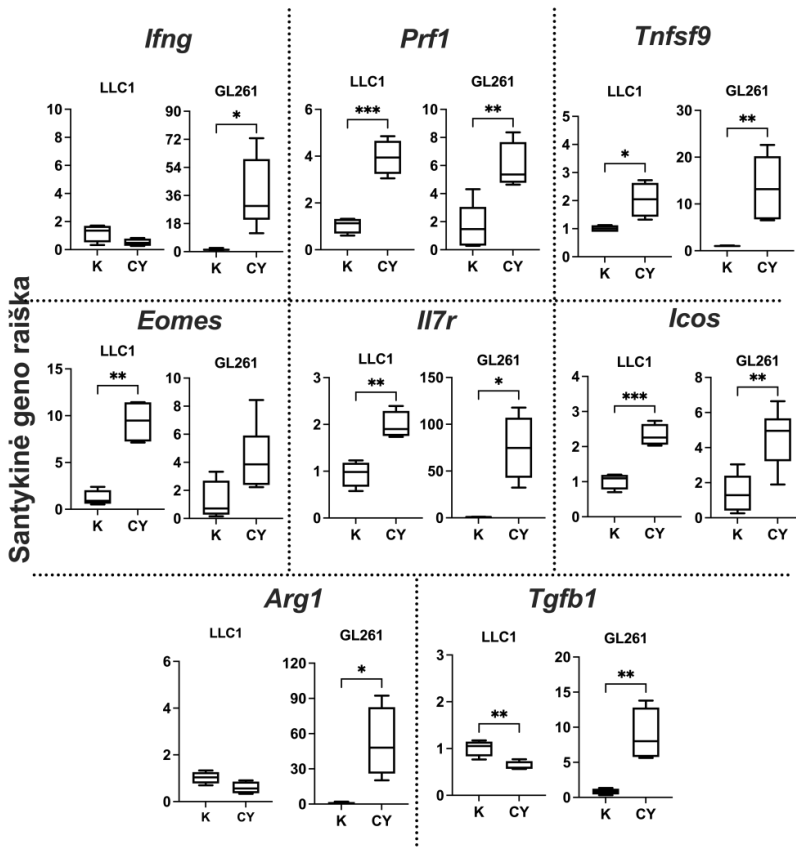
Nors praėjus savaitei po užbaigto gydymo, 29 eksperimento diena, priešingai nei optimalios dozės parinkimo eksperimentuose, nebuvo stebima

leukocitų ar CD4, CD8 T limfocitų skaičiaus reikšmingų skirtumų LLC1 navikuose, tačiau navikuose buvo reikšmingai išaugęs CD4 efektorinių atminties T limfocitų skaičius (33 pav.). Taip pat po gydymo LLC1 navikuose reikšmingai išaugo T limfocitų aktyvacijos žymenų *Tnfrsf9*, *Icos* bei imuninės atminties faktorių *Eomes*, *Il7r* raiška, rodanti CY sukeltą T limfocitų aktyvaciją bei atminties T limfocitų formavimąsi (34 pav.).



33 pav. Imuninių ląstelių sudėties pokyčių po gydymo CY LLC1 ir GL261 navikuose analizė tėkmės citometru. Pelėms su LLC1 navikais buvo skiriama 140 mg/kg, o pelėms su GL261 navikais – 90 mg/kg CY dozė. Pelių navikai buvo surinkti praėjus 7 dienoms po užbaigto gydymo. K - kontrolinė pelių grupė. Gr1⁺ MKL – Gr1⁺ mieloidinės kilmės ląstelės, CD4 T_{EM} limfocitai – CD4 efektoriniai atminties limfocitai, CD8 T_{EM} limfocitai – CD8 efektoriniai atminties limfocitai. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip **** 0,0001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Teigiamas CY efektas buvo dar ryškesnis gydant peles su GL261 navikais. Gydymas CY reikšmingai slopino GL261 navikų vystymąsi (kontrolė su CY $p < 0.0001$), o 7 eksperimento dieną CY sukeltas naviko slopinimas siekė 99,9% (32 pav.). Po gydymo CY buvo stebima reikšmingai padidėjusi leukocitų infiltracija į navikus, kuri sudarė apie 80% naviko ląstelių (33 pav.).



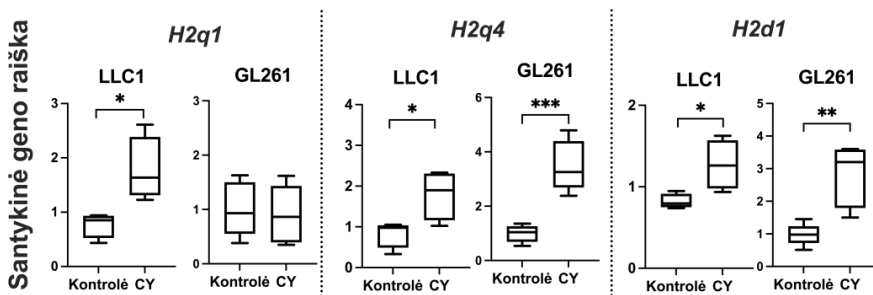
34 pav. Su imuniniu atsaku susijusių genų raiškos analizė RT-PCR metodu LLC1 ir GL261 navikuose gydymo CY. Pelėms su LLC1 navikais buvo skiriama 140 mg/kg, o pelėms su GL261 navikais – 90 mg/kg CY dozė. Pelių navikai buvo surinkti praėjus 7 dienoms po užbaigto gydymo. K - kontrolinė pelių grupė. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis \pm SN, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Gydymas CY taip pat lėmė reikšmingai didesnę CD8 T limfocitų infiltraciją į navikus ir jų aktyvaciją (*Tnfrsf9*, *Icos* raiška) ir citotoksiškumą (*Ifng*, *Prf1* raiška) (34 pav.). Po gydymo CY GL261 navikuose buvo nustatytas

reikšmingai padidėjęs CD8 T_{EM} limfocitų skaičius bei su jais susijusio imuninės atminties faktorių koduojančio geno *Il7r* raiška.

Gydymas CY taip pat sukėlė reikšmingai išaugusią Gr1⁺ MKL populiacijos LLC1 ir GL261 navikuose dydį. Su supresorinėmis ląstelėmis siejamų faktorių *Arg1* ir *Tgfb1* genų raiška po gydymo CY, lyginant su kontrole, GL261 navikuose buvo reikšmingai didesnė. Gauti rezultatai rodo, kad Gr1⁺ MKL populiacijos padidėjimas GL261 navikuose gali būti susijęs su supresorinių imuninių ląstelių skaičiaus navike išaugimu. LLC1 navikuose *Arg1* raiška po gydymo CY išliko nepakitusi, o *Tgfb1* reikšmingai sumažėjo. GL261 navikų atveju gydymas CY sukėlė stiprų imuninį atsaką, kurio suvaldymui galėjo būti aktyvuotos ir supresorinės imuninės ląstelės. Taip pat tikėtina, kad gydymą išgyvenusios navikinės ląstelės bandė išvystyti imunosupresinius mechanizmus, kuriais galėtų apsiginti nuo imuninės sistemos poveikio.

Norint įvertinti, ar CY pasižymi navikinių ląstelių imunogeniškumą gerinančiomis ir jų AAPM aktyvuojančiomis savybėmis, praėjus savaitei po gydymo CY LLC1 ir GL261 navikuose buvo ištirta MHC-I molekulę koduojančių genų - *H2q1*, *H2q4*, *H2d1*, raiška (35 pav.). Visų šių genų raiška po gydymo CY LLC1 navikuose reikšmingai padidėjo. Taip pat reikšmingai išaugusi *H2q4* ir *H2d1* raiška buvo stebima ir GL261 navikuose. Gauti rezultatai rodo, kad CY poveikis AAPM mechanizmui pasireiškė ne tik *in vitro*, bet ir *in vivo* sąlygomis.



35 pav. MHC-I molekulę koduojančių genų raiškos analizė RT-PCR metodu LLC1 ir GL261 navikuose po gydymo CY. Pelėms su LLC1 navikais buvo skiriama 140 mg/kg, o pelėms su GL261 navikais – 90 mg/kg CY dozė. Pelių navikai buvo surinkti praėjus 7 dienoms po užbaigto gydymo. Rezultatai grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

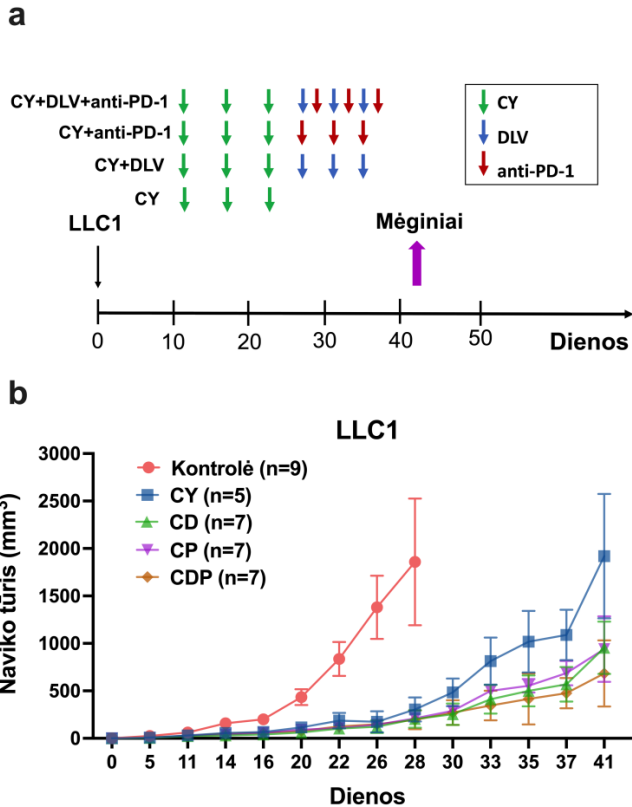
Šios studijos metu buvo stebimas imunomoduliacinis CY poveikis LLC1 ir GL261 ląstelėms, pasireiškęs gebėjimu sukelti imunogeninę šių ląstelių žūtį bei aktyvuojančiu poveikiu šių ląstelių AAPM. Šis CY poveikis navikinėms ląstelėms pasireiškė tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sąlygomis. Taip pat buvo stebimas CY moduliacinis poveikis LLC1 ir GL261 navikuose besiformuojančiam imuniniam atsakui. Visų pirma buvo stebima bendra leukocitų aktyvacija, pasireiškianti reikšmingai išaugusiu leukocitų skaičiumi navike. CY taip pat pasižymėjo T limfocitų savybes moduluojančiomis savybėmis – po gydymo LLC1 ir GL261 navikus infiltravę T limfocitai išsiskyrė didesne aktyvacija, citotoksiškumu bei imuninės atminties savybėmis. Tokie limfocitai turėtų efektyviau atpažinti ir naikinti navikines ląsteles bei užtikrinti imuninę apsaugą navikinėms ląstelėms atsinaujinus. Šios savybės daro CY patraukliu chemoterapiniu vaistu derinimui su imunoterapinėmis priemonėmis, ypačiai T limfocitų veikimu paremtomis imunoterapijomis.

4.5 Ciklofosfamido ir imunoterapijos kombinacijų efektyvumas gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais

4.5.1 Ciklofosfamido ir imunoterapijos kombinacijų efektyvumas gydant peles su LLC1 navikais

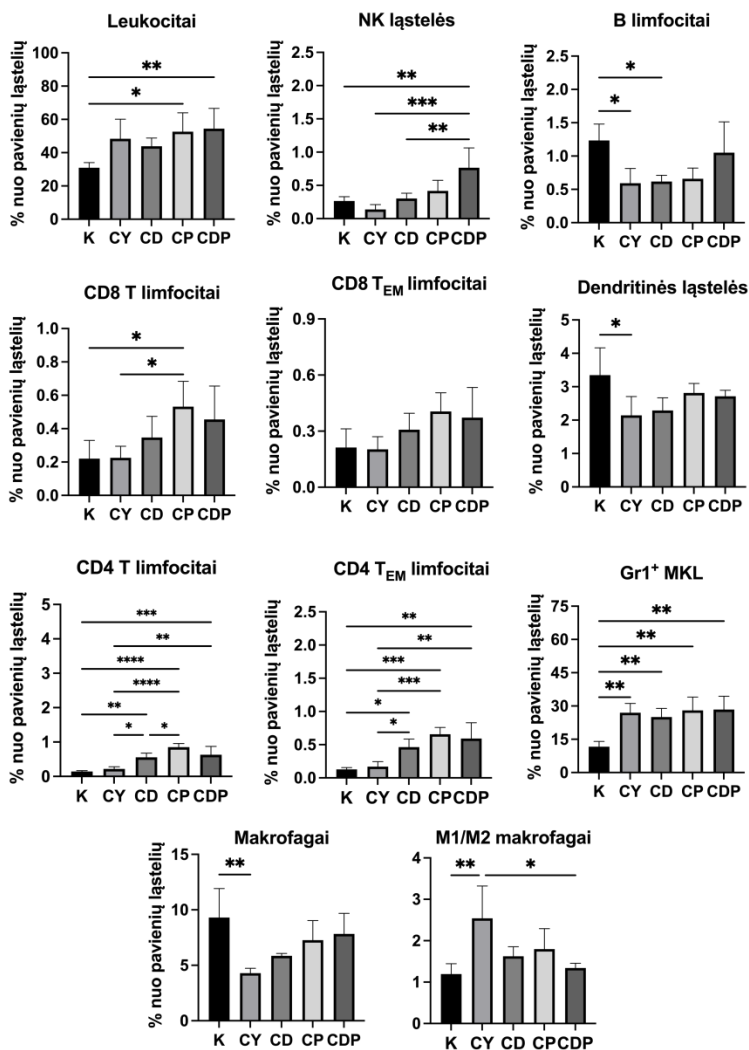
Pastebėjus CY imunomoduliacinį poveikį navikinėms bei imuninėms ląstelėms buvo siekiama iširti, ar gydymas CY geba sukurti palankią naviko aplinką imunoterapijos veikimui ir ar CY ir imunoterapija kombinacija gali pasižymėti sinergistiniu poveikiu indukuojant ir moduluojant priešvėžinį imuninį atsaką. Tam tikslui pelėms buvo sukelti poodiniai LLC1 navikai, kuriems pasiekus 50-100 mm³ dydį, pradėtas gydymas CY kursu, po kurio sekė imunoterapija (36 pav., a).

Viso eksperimento metu buvo stebimos 5 pelių grupės – kontrolė, kurioms gydymas netaikomas; CY – pelės, gydomos CY; CD - pelės, gydomos CY ir DLV; CP – pelės, gydomos CY ir anti-PD-1; bei CDP – pelės, gydomos CY, DLV ir anti-PD-1. Pelių grupė, gydoma pavieniu CY, šio eksperimento ribose įtraukta kaip atspirties taškas sinergistinio CY ir imunoterapijos veikimo vertinimui. Gydymo efektyvumas buvo vertinamas pagal LLC1 naviko vystymąsi, imuninių ląstelių infiltrato dydį ir sudėtį, imuninių genų raišką LLC1 navikuose (lokalus priešnavikinis imuninis atsakas) ir imuninių ląstelių pokyčius pelių blužnyje (sisteminis imuninis atsakas).



36 pav. LLC1 navikų atsakas į gydymą CY bei CY kombinacijomis su imunoterapija. a – eksperimento schema. b - LLC1 naviko augimo kreivės taikant CY ir CY derinius su imunoterapija. CY – ciklofosfamidą, DLV – dendritinių ląstelių vakcina, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Pelėms buvo skiriama 140 mg/kg CY dozė. Rezultatai rodomi kaip vidurkis±SN.

Nors gydymas pavieniu CY reikšmingai prislopino LLC1 navikų vystymąsi, efektyvesnis navikų slopinimas buvo stebėtas pelėse, papildomai gydytose DLV, anti-PD-1 ar jų kombinacija ($p < 0.001$). Reikšmingų naviko slopinimo skirtumų tarp pelių grupių, gydytų CY ir imunoterapijos kombinacijomis nebuvo stebėta (36 pav., b) ($p > 0.05$). 28 eksperimento dieną gydymo nulemtas TGI CY+anti-PD-1 (CP) grupėje siekė 78%, CY+DLV+anti-PD-1 (CDP) grupėje – 77%, CY+DLV (CD) grupėje – 73%, o CY grupėje – 70%. Po gydymo CY ar CY ir imunoterapijos deriniais LLC1 navikuose buvo stebimi imuninių ląstelių pokyčiai, bylojantys apie gydymo sukeltą imuninį atsaką (37 pav.).



37 pav. Imuninių ląstelių infiltracijos LLC1 navikuose po gydymo CY bei jo kombinacijų su imunoterapija analizė tėkmės citometru. Naviko mėginiai buvo paimti praėjus 7 dienoms po gydymo pabaigos. K – kontrolė, CY – ciklofosfamidas, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Gr1⁺ MKL – Gr1⁺ mieloidinės kilmės ląstelės, CD4 T_{EM} limfocitai – CD4 efektoriniai atminties limfocitai, CD8 T_{EM} limfocitai – CD8 efektoriniai atminties limfocitai. Pelėms buvo skiriama 140 mg/kg CY dozė. M1/M2 makrofagų grafike pavaizduotas M1 ir M2 makrofagų procento navike santykis. Duomenys grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=4. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

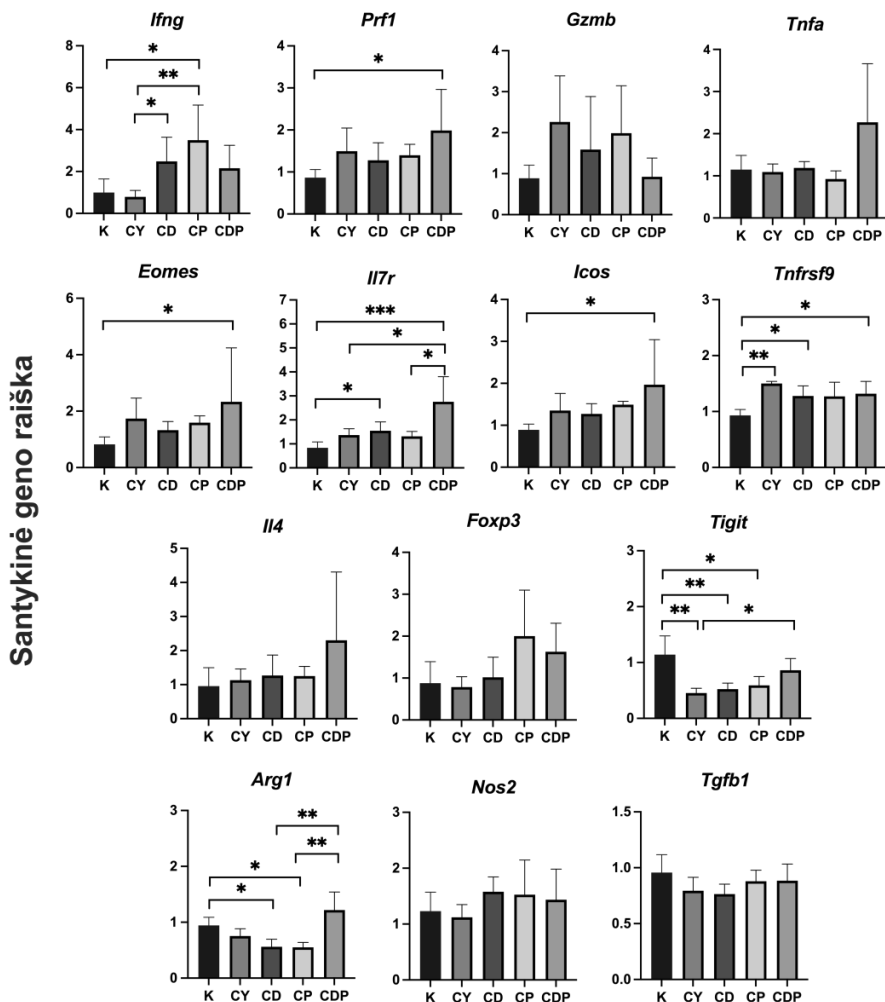
Visų pirma, po gydymo CY ir jo deriniais su imunoterapija navikuose buvo nustatytas didesnis leukocitų populiacijos dydis, kuris, lyginant su kontrole, reikšmingai kito pelių grupėse, gydytose CY+anti-PD-1 ir CY+DLV+anti-PD-1.

CY ir imunoterapijos kombinacijos pelėse aktyvavo T limfocitų atsaką - CD8 T limfocitų skaičiaus bei su jais siejamo *Ifng* raiškos pokyčiai (38 pav.) navikuose buvo CP grupėje ($p < 0.05$), bet taip pat buvo stebimi CD ir CDP grupėse. Su CD8 T limfocitų citotoksiškumu siejamo *Prfl* padidėjusi raiška buvo stebima CDP pelių grupėje. Po gydymo CDP grupėje reikšmingai išaugo NK ląstelių populiacijos dydis, taip pat sietinų su išaugusia *Prfl* raiška, bei pasižyminčių tiesioginiu priešnavikiniu poveikiu.

Lyginant su kontroline ar CY grupe, CY ir imunoterapijos kombinacijos lėmė reikšmingai išaugusią CD4 limfocitų infiltraciją į LLC1 navikus. Siekiant suprasti besivystančio CD4 T limfocitų atsako tipą, buvo įvertinta citokinų ir faktorių, sietinų išskirtinai su tam tikru tipu, tokių kaip *Ifng*, *Tnfa* (Th1 atsakas), *Il4* (Th2 atsakas) ir *Foxp3* (Treg atsakas) genų raiška (38 pav.). Po gydymo navikuose nebuvo pastebėta reikšmingų *Foxp3*, *Il4* ir *Tnfa* skirtumų. Reikšmingi *Ifng* raiškos skirtumai po gydymo CD bei CP grupėse rodo, kad gydymas galimai paskatina CD4 T limfocitų poliarizaciją Th1, susijusio su priešvėžiniu imuniniu atsaku, kryptimi, tačiau ne Th2 ar Treg kryptimi.

Taip pat gydymas CY ir imunoterapijos kombinacijomis lėmė atminties T ląstelių formavimąsi – CD4 T_{EM} limfocitų skaičiaus navike reikšmingas padidėjimas buvo stebimas CD, CP, CDP grupėse, lyginant su kontrole ar CY grupėmis. Įvertinus *Eomes* ir *Il7r*, siejamų su atminties T limfocitų atsaku, raišką, lyginant su kontrole, reikšmingi *Eomes* skirtumai buvo nustatyti CDP grupėje, o *Il7r* – CD ir CDP grupėse. Gydymas taip pat turėjo įtakos T limfocitų aktyvumui. Reikšmingai padidėjusi T limfocitų aktyvacijos žymens *Tnfrsf9* raiška buvo pastebėta CY, CD, CP ir CDP pelių grupėse, taip pat CDP grupėje buvo nustatyta padidėjusi *Icos* raiška. T limfocitų supresijos *Tigit* žymens raiška po gydymo CY, CD, CP, lyginant su kontrole, taip pat reikšmingai sumažėjo.

Po gydymo CY bei jo deriniais su imunoterapija, lyginant su kontrole, LLC1 navikuose buvo stebimas reikšmingai išaugęs Gr1⁺ MKL skaičius. Kadangi ši ląstelių grupė apima įvairias imunines ląsteles, pasižyminčias supresorinėmis ar neutraliomis savybėmis, papildomai buvo atlikta *Nos2*, *Tgfb1* ir *Arg1* raiškos analizė. Gauti rezultatai parodė, kad Gr1⁺ MKL skaičiaus padidėjimas navikuose po taikyto gydymo nėra susijęs su imunosupresinėmis savybėmis pasižyminčių ląstelių aktyvacija transkripciniame lygmenyje.



38 pav. Su imunine sistema susijusių genų raiškos analizė RT-PCR metodu LLC1 navikuose po gydymo CY bei jo kombinacijomis su imunoterapija. Navikų mėginiai buvo paimti praėjus 7 dienoms po gydymo pabaigos. K – kontrolė, CY – ciklofosfamidai, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Pelėms buvo skiriama 140 mg/kg CY dozė. Duomenys grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=4. Reikšmingi imuninių ląstelių skirtumai surinktuose mėginiuose pavaizduoti kaip *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

4.5.2 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija efektyvumas gydant peles su GL261 navikais

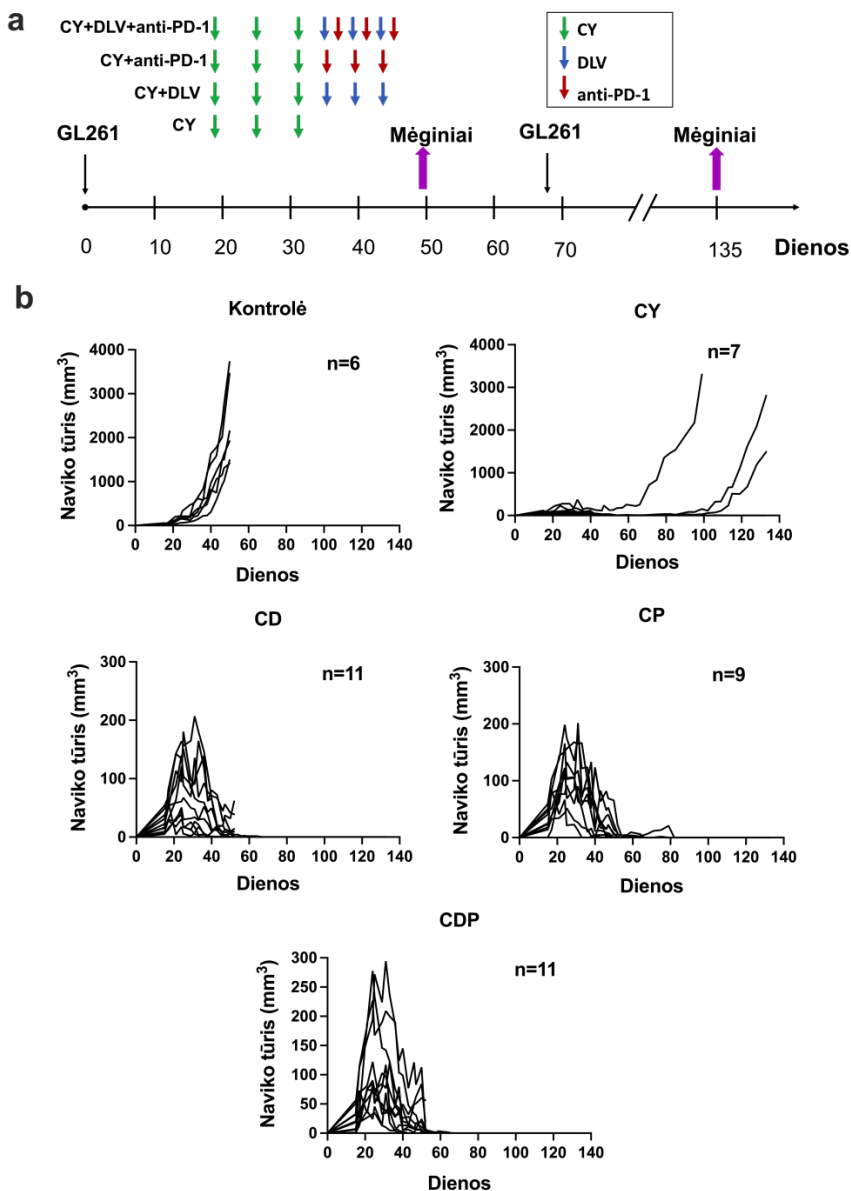
Analogiškas eksperimentas buvo atliktas ir su kitu navikiniu modeliu – GL261. Pelėms buvo sukelti poodiniai GL261 navikai ir taikytas gydymas CY ir jo deriniais su DLV bei anti-PD-1 (39 pav., a). Gydymo efektyvumas buvo vertinamas:

- pagal lokaliai sukeltą imuninį atsaką – buvo vertinamas GL261 navikų vystymasis gydymo fone ir užbaigus gydymą, taip pat su imuniniu atsaku susijusių genų raiška GL261 navikuose savaitė po taikyto gydymo;
- pagal sistemiškai sukeltą imuninį atsaką – vertinti imuninių ląstelių pokyčiai pelių blužnyse praėjus savaitei po užbaigto gydymo ir eksperimento pabaigoje (135 eksperimento dieną);
- pagal gebėjimą indukuoti imuninę atmintį – pelėms buvo pakartotinai sukelti GL261 navikai bei sekamas jų augimas bei sistemiškai vertinamas susidariusių T efektorinių atminties limfocitų skaičius bei su imunine atmintimi susijusių genų raiška.

4.5.2.1 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija poveikis lokaliai prieš GL261 navikus nukreiptam imuniniam atsakui

Pradinis gydymas CY visose gydymo grupėse sukėlė naviko augimo sulėtėjimą, perėjusį į palaipsnį naviko regresiją 33-36 eksperimento dieną (39 pav., b). 35 eksperimento dieną pagal numatytą gydymo planą buvo pradėtas gydymas imunoterapija. Imunoterapijos fone toliau buvo stebima GL261 navikų regresija, kol galiausiai apie 50 eksperimento dieną navikai išnyko pelių grupėse, kurioms buvo taikytas kombinuotas CY ir imunoterapijos gydymas. Pelės buvo papildomai stebimos dar 90 dienų, tačiau navikai šiose pelėse neregredavo. Vis dėlto, pavienio CY gydymo grupėje eksperimento eigoje buvo stebimas pirminio naviko atsinaujinimas - apie 50 eksperimento dieną vienoje pelėje, taip pat apie 90 eksperimento dieną dar dvejose pelėse.

Praėjus 7 dienoms po kombinuoto gydymo pabaigos ir navikams toliau regresuojant, dalis pelyčių buvo paaukota besivystančio lokalaus imuninio atsako analizei. Po gydymo su CD8 T limfocitų ir NK ląstelių citotoksiškumu siejamo *Ifn γ* raiška (40 pav.) reikšmingai padidėjo visose gydymo grupėse, o reikšmingas *Prf1* raiškos padidėjimas buvo stebimas CY, CP, CDP grupėse.



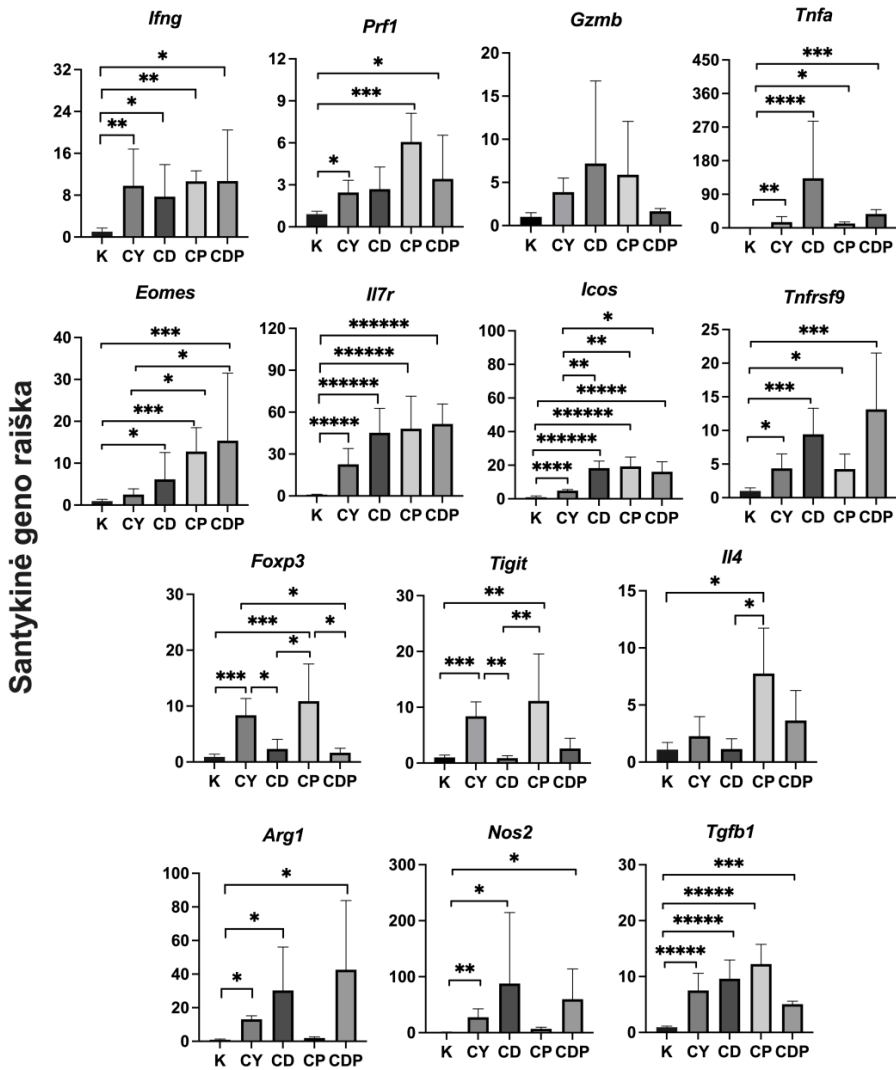
39 pav. GL261 navikų atsakas į gydymą CY bei jo kombinacijomis su imunoterapija. a - eksperimento schema.. Pelėms buvo taikomas gydymas 90 mg/kg CY doze, po kurio sekė gydymas imunoterapija. b - GL261 navikų augimo kreivės taikant gydymą CY ir CY deriniais su imunoterapija. K – kontrolė, CY – ciklofosfamidas, DLV – dendritinių ląstelių vakcina, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys.

CY ar jo kombinacijos su imunoterapija pasižymėjo panašiu Th1 poliarizuojančiu poveikiu – po gydymo, lyginant su kontrole, reikšmingi *Ifng* ir *Tnfa* skirtumai buvo gauti visose gydymo grupėse, tačiau tarp gydymo grupių reikšmingi skirtumai neišryškėjo. Gydymas CY arba jo kombinacijomis su imunoterapija GL261 navikuose pasižymėjo kiek skirtingu CD4 T limfocitus poliarizuojančiu poveikiu. Ryškiausias Th2 atsaką poliarizuojantis poveikis buvo stebimas CP grupėje – po gydymo *Il4* raiška reikšmingai padidėjo lyginant su kontroline ar CD grupėmis. CY ir CP grupėse išryškėjo Treg limfocitų vystymasis – po gydymo *Foxp3* raiška šiose grupėse buvo reikšmingai didesnė nei kontrolinėje, CDP ar CDP grupėse.

Taikytas gydymas pelėse paskatino ir imuninės atminties formavimąsi. Imuninės atminties aktyvavimo požymių – *Il7r* ir *Eomes* genų raiška buvo ryškiausia pelėse, gydytose CY ir imunoterapijos kombinacijomis nei kontrolinėje ar CY grupėse.

Po gydymo, lyginant su kontrole, taip pat buvo stebimas reikšmingas T limfocitų aktyvacijos žymenų *Tnfrsf9* ir *Icos* pokytis. Nors jis buvo stebimas ir po gydymo CY, gydymas CY ir imunoterapijos kombinacijomis dar labiau padidino T limfocitų aktyvaciją – *Icos* raiška kombinacinėse grupėse buvo reikšmingai didesnė nei CY grupėje. Nors reikšmingų skirtumų tarp gydymo grupių *Tnfrsf9* raiškoje nebuvo gauta, šio geno raiška CD ir CDP grupėse buvo apytikriai dukart didesnė nei CY ar CP grupėse. Taip pat CY ir CP grupėse *Tigit* raiška buvo reikšmingai išaugusi lyginant su kontrole, CD bei CDP grupėmis.

Su imunosupresija susijusių faktorių *Arg1*, *Nos2* raiška po gydymo reikšmingai padidėjo CY, CD ir CDP grupėse, o reikšmingas *Tgfb1* padidėjimas buvo stebimas visose gydymo grupėse. Šie genų raiškos pokyčiai rodo, kad gydymo fone buvo aktyvintas ir supresinis imuninis atsakas. Dažnu atveju jis turi neigiamos įtakos gydymo efektyvumui, nes gali slopinti gydymo efektą [188]. Vis dėlto, šiuo atveju reikia atsižvelgti į tai, kad taikytas gydymas sukėlė stiprų imuninį atsaką prieš navikines ląsteles, lėmusį GL261 navikų regresiją bei uždegiminės aplinkos susidarymą. Uždegiminėje aplinkoje yra daugybė faktorių, tokių kaip IL-1, IL-6, TNF- α , PGE-2, GM-CSF, TGF- β ir kt., kurios skatina MKSL ląstelių pritraukimą bei jų dalijimąsi [188,189]. Stipriai uždegiminei aplinkai suvaldyti gali būti įjungiami imunosupresiniai mechanizmai, tokie kaip MKSL, kontroliuojantys imuninio atsako stiprumą ir užtikrinantys, kad aktyvus imuninis atsakas nepridarytų žalos sveikoms organizmo ląstelėms [63].



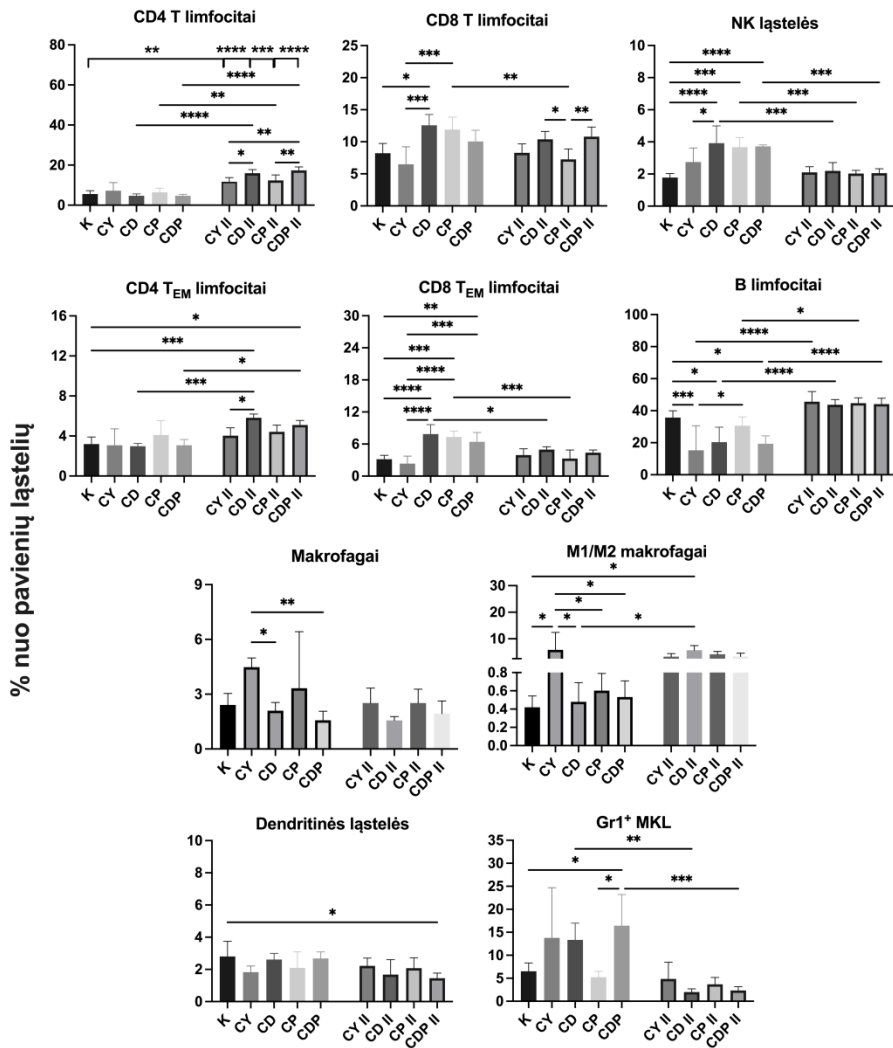
40 pav. Su imunine sistema susijusių genų raiška GL261 navikuose po gydymo CY bei jo kombinacijomis su imunoterapija. Navikų mėginiai buvo paimti praėjus 7 dienoms po gydymo pabaigos. K – kontrolė, CY – ciklofosfamidas, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Pelėms buvo skiriama 90 mg/kg CY dozė. Duomenys grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=4-5. Reikšmingi imuninių ląstelių skirtumai surinktuose mėginiuose pavaizduoti kaip *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

4.5.2.2 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija poveikis sisteminiam imuniniam atsakui

Praėjus savaitei po užbaigto gydymo buvo surinkti pelių blužnių mėginiai gydymo sukeltam sisteminiam imuniniam atsakui įvertinti. Atlikus analizę, CD8 T limfocitų reikšmingi skirtumai, lyginant su kontrole, buvo pastebėti tik CD grupėje (41 pav.).

Nepaisant to, gydymas CY ir imunoterapijos deriniais lėmė reikšmingai išaugusį CD8 T_{EM} limfocitų skaičių, lyginant su kontroline ar CY grupėmis. Nei gydymas pavieniu CY, nei deriniuose su imunoterapija neturėjo poveikio CD4 limfocitų ar CD4 T_{EM} limfocitų skaičiui pelių blužnyse. Taip pat buvo stebimas teigiamas CY ir imunoterapijos derinių efektas NK ląstelėms – jų skaičius po gydymo reikšmingai padidėjo, lyginant su kontrolinėmis pelėmis. Dažniausiai, NK ląstelių aktyvacija siejama kartu su besivystančiu Th1 atsaku, kurio metu gaminamas IL-2, reikalingas NK ląstelių ekspansijai [190].

Taip pat lyginant su kontrole po gydymo CY, CD ir CDP grupėse buvo stebimas išaugęs Gr1⁺ MKL skaičius. Gr1⁺ MKL ląstelių pokyčiai blužnyje sutampa su navike nustatytą ir su šiomis ląstelėmis sietinų genų *Arg1*, *Nos2* ir *Tgfb1* raiška ir rodo, kad gydymo fone imunosupresiniai mechanizmai galimai buvo paskatinti ir sistemiškai.

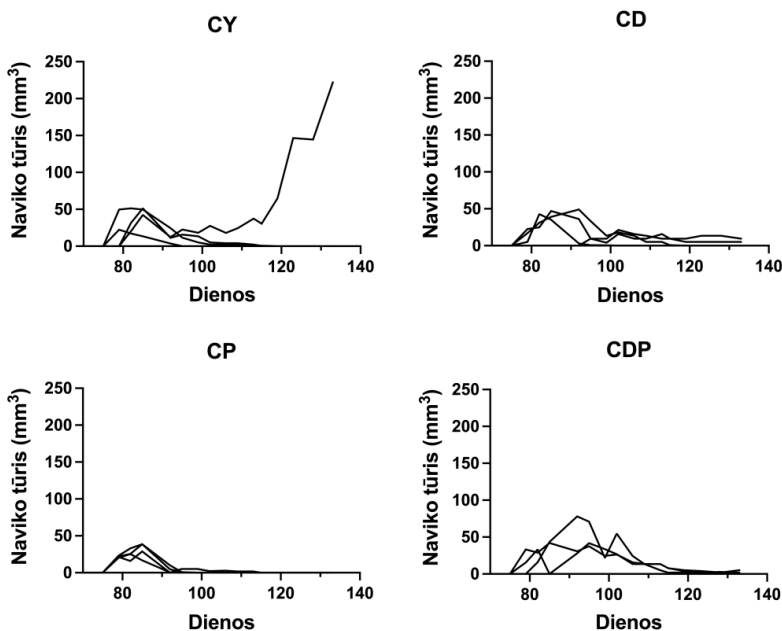


41 pav. Pelių su GL261 navikais blužnies imuninių ląstelių sudėtis po gydymo CY bei CY kombinacijomis su DLV ir anti-PD-1. Blužnies mėginiai buvo paimti praėjus 7 dienoms po gydymo ir eksperimento pabaigoje. CY – ciklofosfamidas, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Grupių trumpiniai be II žymėjimo atitinka mėginius, imtus 7 dienas po gydymo Atitinkamai gydymo grupės su II žymėjimu atspindi mėginius, imtus eksperimento pabaigoje. CD4 T_{EM} limfocitai – CD4 efektoriniai atminties T limfocitai, CD8 T_{EM} limfocitai – CD8 T efektoriniai atminties limfocitai. M1/M2 makrofagų grafike pavaizduotas M1 ir M2 makrofagų procento navike santykis. Pelėms buvo skiriama 90 mg/kg CY dozė. Duomenys

grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis \pm SN, n=4-5. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip **** $0,00001 < p < 0,0001$, *** $0,0001 < p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

4.5.2.3 Ciklofosfamido ir jo kombinacijų su imunoterapija gebėjimas aktyvuoti imuninį atmintį prieš GL261 ląsteles

Norint įvertinti, ar taikytas gydymas, kaip rodo gauti CD8 T_{EM} limfocitų bei su jais susijusių faktorių raiškos rezultatai, išties aktyvavo imuninės atminties prieš GL261 ląsteles susidarymą, daliai pelyčių 68 eksperimento dieną buvo pakartotinai sukeltas navikas dešinėje nugaros pusėje, kitoje pusėje nei buvo sukeltas pirminis navikas (42 pav.). Pelėms papildomai joks gydymas nebuvo taikomas.



42 pav. Pakartotinai sukeltų GL261 navikų vystymasis. Navikai pelėms buvo pakartotinai suleisti 68 eksperimento dieną. Navikai pelėms buvo sukelti dešinėje nugaros pusėje, kitoje pusėje nei buvo sukeltas pirminis navikas, grupėje n=4. CY – ciklofosfamidas, DLV – dendritinių ląstelių vakcina, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys.

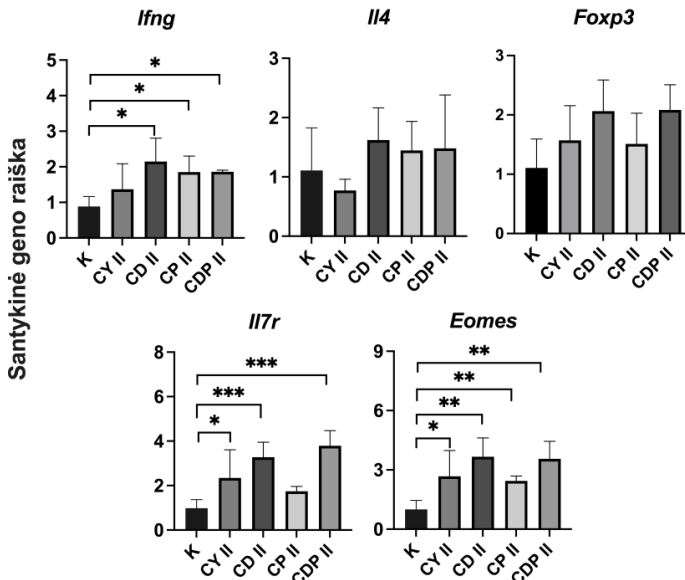
Naujai sukeltų navikų vystymasis buvo stebimas 4/4 pelių CD grupėje ir 4/4 pelių CP grupėje. Šiose grupėse 83-85 eksperimento dieną navikams pasiekus iki 50 mm³ dydį buvo stebima jų regresija. CDP grupėje navikai išsivystė 3/4 pelių, pasiekė 50-80 mm³ dydį ir išliko dinaminėje pusiausvyroje iki 100-105 eksperimento dienos, vėliau buvo stebima šių navikų regresija. Pavienio CY grupėje antriniai navikai išsivystė 4/4 pelių, apie 85 dieną pasiekė 50 mm³ dydį ir pradėjo regresuoti. Visgi vienoje pelytėje, gydytoje CY, navikas išsprūdo iš imuninės sistemos priežiūros ir pradėjo sparčiai didėti. Tai rodo, kad gydymas CY ir imunoterapijos kombinacijomis užtikrino efektyvesnės imuninės atminties susiformavimą, lyginant su gydymu CY.

Eksperimento pabaigoje (135 dieną) buvo surenkami pelių blužnių mėginiai ir vertinama, koks imuninis atsakas vyravo ir kaip jis keitėsi nuo užbaigto gydymo (41 pav.). Lyginant su pradiniais kontrolinių pelių duomenimis ilgalaikėje perspektyvoje gydymas CY ar CY ir imunoterapijos kombinacijomis CD8 T limfocitų ar CD8 T_{EM} limfocitų skaičiui įtakos neturėjo. Vis tik lyginant grupės ribose, ryškiausias CD8 T limfocitų skaičiaus sumažėjimas buvo stebimas CP grupėje, o CD8 T_{EM} limfocitų skaičius labiausiai krito CD ir CP grupėse.

Eksperimento pabaigoje, lyginant su pradiniais kontrolinių pelių duomenimis, buvo stebimas reikšmingas CD4 T limfocitų skaičiaus padidėjimas visose gydymo grupėse. Šis pokytis buvo akivaizdus ir gydymo grupių ribose, kur lyginant su pradiniais gydytų pelių duomenimis, eksperimento pabaigoje buvo stebimas išaugęs CD4 T limfocitų skaičius, o reikšmingai didžiausi CD4 T limfocitų skaičiai buvo nustatyti CD bei CDP grupėse. Eksperimento pabaigoje CD ir CDP grupėse taip pat buvo stebimas reikšmingai padidėjęs CD4 T_{EM} limfocitų skaičius lyginant tiek su pradiniais kontrolės, tiek su pradiniais grupių duomenimis. Šie rezultatai rodo, kad skiriant gydymą CY kombinacija su kombinacija su DLV (CY+DLV ar CY+DLV+anti-PD-1) – buvo užtikrinamas ilgą laiką trunkantis CD4 T limfocitų atsakas bei imuninės atminties susiformavimas.

Remiantis šiais rezultatais buvo atlikta T limfocitų imuninės atminties genų (*Il7r*, *Eomes*) bei su CD4 T limfocitų subtipais susijusių citokinų bei faktorių (*Ifng*, *Il4*, *Foxp3*) raiškos analizė (43 pav.). Lyginant su pradiniais kontrolės duomenimis, *Eomes* ir *Il7r* genų raiška reikšmingai padidėjo visose gydymo grupėse ir byloja apie taikyto gydymo paskatintą ilgalaikės imuninės atminties susidarymą. Reikšmingai išaugusi *Ifng* raiška rodo, kad gydymas CY ir imunoterapijos kombinacijomis lėmė CD4 T limfocitų atsako poliarizaciją Th1, pasižyminčių priešnavikiniu poveikiu, kryptimi. Reikšmingų *Il4* ir *Foxp3* genų raiškos pokyčių nebuvimas rodo,

kad taikytas gydymas nelėmė CD4 T limfocitų atsako poliarizacijos Th2 ar Treg kryptimi.



43 pav. Imuninių genų raiškos analizė RT-PCR metodu pelių, gydytų CY ar CY kombinacijomis su imunoterapija, blužnyse eksperimento pabaigoje (135 eksperimento dieną). K- kontrolė, CY – ciklofosfamidą, CD – ciklofosfamido ir dendritinių ląstelių vakcinų derinys, CP – ciklofosfamido ir anti-PD-1 derinys, CDP – ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 derinys. Pelėms buvo skiriama 90 mg/kg CY dozė. Duomenys grafikuose pateikiami kaip duomenų vidurkis±SN, n=4-5. Reikšmingi skirtumai pavaizduoti kaip *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Nors eksperimento pabaigoje buvo stebimas vis dar aktyvus T limfocitų atsakas, galintis aktyvuoti NK ląsteles, CD, CP ir CDP grupių pelių blužnyse buvo nustatytas sumažėjęs NK ląstelių skaičius lyginant su NK ląstelių skaičiumi praėjus savaitei po užbaigto gydymo. Kaip rodo tyrimai, NK ląstelės yra jautrios senėjimo procesui – jų skaičius blužnyje pelėms senstant reikšmingai mažėja [191]. Tarp I ir II pelių mėginių ėmimo yra apytiksliai 3 mėn. trukmės tarpas, kuris galėjo turėti įtakos NK ląstelių skaičiui pelių blužnyse ir net esant aktyviam T ląstelių atsakui, tai nebūtinai atsispindi NK ląstelių skaičiuje.

Eksperimento pabaigoje (135 dieną) buvo stebimas Gr1⁺ MKL ląstelių kiekio sumažėjimas – lyginant su pradiniais duomenimis,

reikšmingai šių ląstelių skaičius nukrito CD ir CDP grupėse. Yra žinoma, kad GL261 navikinės ląstelės išskiria G-CSF, granulocitų kolonijas stimuliuojantį faktorių, skatinantį mieloidinių ląstelių, tarp jų ir MKSL vystymąsi. GL261 navikams vystantis proporcingai stebimas ir MKSL bei DL skaičiaus didėjimas pelių blužnyse [192]. Tyrimai rodo, kad chirurgiškai pašalinus 4T1 pelių krūties naviko ląsteles, kurios taip pat geba išskirti G-CSF ir lemia mieloidinių ląstelių vystymąsi, buvo stebimas ir MKSL ląstelių skaičiaus sumažėjimas pelių blužnyse [193]. Taigi Gr1⁺ MKL skaičiaus pokyčiai pelių blužnyse galimai yra susiję su žemu navikinių ląstelių skaičiumi ar jų nebuvimu ir galimai žema G-CSF sekrecija.

Gauti rezultatai atskleidė sinergistinį CY, DLV ir anti-PD-1 poveikį gydant peles su LLC1 ir GL261 navikais. CY aktyvavo LLC1 navikuose AAPM ir įjautrino šiuos navikus DLV ir anti-PD-1 gydymui. Gydant peles su LLC1 navikais, chemoimunoterapijos deriniai pasižymėjo geresniu navikus slopinančiu efektu. LLC1 ir GL261 navikų atveju, lyginant su CY, gydymas chemoimunoterapiniais deriniais lėmė efektyvesnę T limfocitų atsaką – po taikyto gydymo T limfocitai pasižymėjo geresnėmis aktyvacinėmis, citotoksinėmis ir imuninėmis atminties savybėmis. Gydymas chemoimunoterapijos deriniais taip pat užtikrino efektyvią GL261 navikų regresiją bei ilgalaikę šių navikų kontrolę.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Pastarąjį dešimtmetį priešvėžinės imunoterapijos svarba gydant onkologinius pacientus vis didėja. Atsiradę nauji imunoterapiniai metodai skinasi kelią į kliniką. Nors gydymas imunoterapija leidžia pasiekti įspūdingus gydymo rezultatus, tačiau žemas pacientų atsakas į imunoterapiją skatina geriau suprasti atsparumo imunoterapijai priežastis ir ieškoti būdų, kaip pagerinti gydymo efektyvumą ir pasiekti aukštesnį terapinį efektą didesnei daliai pacientų. Šioje studijoje, pasitelkiant pelių navikinius modelius, yra atskleidžiama nefunkcionalaus Ag apdoravimo ir pateikimo mechanizmo navikinėse ląstelėse įtaka imuninio atsako prieš navikus nesivystymui bei atsparumui gydymui imunoterapiniais preparatais – dendritinių ląstelių vakcinomis ir anti-PD-1.

Navikinių Ag pateikimas kartu su MHC-I molekule ląstelių paviršiuje yra kritinis veiksnys, leidžiantis CD8 T limfocitams atskirti pakitusias ląsteles nuo sveikų organizmo ląstelių ir jas sunaikinti. Tam, kad naviko Ag būtų efektyviai pateikiami su MHC-I molekule navikinių ląstelių paviršiuje yra būtinas darnus AAPM koduojančių baltymų, tokių PSMB8, PSMB9, PSMB10, TAP1, TAP2, CNX, TAPBP, CALR, ERAP1, ERAP2, B2M ir kt. veikimas, užtikrinantis Ag apdorojimą iki peptidų, sujungimą su MHC-I molekule ir MHC I-Ag iškėlimą į navikinės ląstelės paviršių [8]. Lyginant C57BL/6 pelių singeninius Lewis plaučių karcinomos LLC1 ir gliomos GL261 modelius buvo nustatyta reikšmingai mažesnė *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* genų raiška ir žema paviršinės MHC-I molekulės raiška LLC1 ląstelėse – signalizuojanti apie sutrikusią AAPM veiklą ir neefektyvų naviko Ag pateikimą CD8 T limfocitams.

Žema CD8 T limfocitų infiltracija bei žema su jų atsaku siejamų genų *Ifng*, *Gzmb*, *Prfl* raiška atskleidžia AAPM nefunkcionalumo LLC1 ląstelėse įtaką specifinio prieš LLC1 ląsteles nukreipto imuninio atsako sutrikimui. Nors CD8 T limfocitų atsako stoka gali būti siejama ir su sutrikusia DL veikla, kaip rodo DL infiltracijos į navikus ir T limfocitų aktyvacijos žymenų duomenys – DL aktyvuoti T limfocitai dėl sutrikusio AAPM negebėjo atpažinti ir sunaikinti LLC1 ląstelių. Dėl šios priežasties vėžio-imuniteto ciklas buvo sutrikdytas, imuniniai veiksniai *Ifng*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, reikalingi tolesnei CD8 T limfocitų aktyvacijai bei infiltracijai nebuvo gaminami ir priešnavikinis imuninis atsakas buvo stabdomas.

Sutrikusio AAPM koreliacija su CD8 T limfocitų atsako nesivystymu prieš navikines ląsteles buvo pastebėta ir kitų mokslinių tyrimų metu. Neefektyvus T limfocitų atsakas buvo susietas su HLA-I (MHC-I

atitinkamo žmogėse) raiškos praradimu NSCLC sergančių pacientų navikuose [10], sumažėjusia tapasino raiška ir naviko progresavimu kolorektaliniu vėžiu sergančių pacientų navikuose [9] bei sutrikusia B2M raiška melanoma sergančių pacientų navikuose [194]. AAPM elementai veikia koordinuotai, o tyrimai rodo, kad netekus ar pasikeitus bent vieno iš koduojančių genų raiškai, Ag pateikimas ir apdorojimas gali vykti neefektyviai ir lemti CD8 T limfocitų atsako nebuvimą [8].

Vienas svarbiausių šio tyrimo rezultatų yra pastebėtas ryšys tarp AAPM funkcionalumo LLC1 ir GL261 navikuose ir jų atsako į gydymą DLV ir anti-PD-1. Atliktuose pelių tyrimuose terapinis DLV ir anti-PD-1 efektas nebuvo pasiekiamas esant navikuose AAPM funkciniais sutrikimams. Klinikinėje praktikoje DLV, pakrautos navikiniais Ag, tik daliai pacientų sukelia specifinį CD8 limfocitų atsaką ir reikšmingai pagerina pacientų išgyvenamumą [195]. Pelėse su LLC1 navikais nefunkcionalus AAPM tampa kliūtimi DLV aktyvuotiems T limfocitams atpažinti ir nužudyti LLC1 ląsteles, todėl terapinis efektas nėra pasiekiamas. Gydymas anti-PD-1 yra grindžiamas T limfocitų citotoksiniu poveikiu išlaisvinimu, slopinant PD-1/PD-L1 sąsą [196]. Dėl išreikštos PD-L1 raiškos LLC1 ląstelių paviršiuje bei didelės MKSL, taip pat pasižymintios PD-L1 raiška [197], infiltracijos navikuose, teoriškai anti-PD-1 galėtų būti efektyvus gydant peles su LLC1 navikais. Tačiau dėl nefunkcionalaus AAPM LLC1 navikuose nesivystant T limfocitų atsakui, gydymas anti-PD-1 tampa neveiksmingas.

Šie rezultatai rodo, kad AAPM funkcionalumas naviko ląstelėse yra esminis veiksnys, lemiantis T limfocitais pagrįstos imunoterapijos efektyvumą, ir atskleidžia predikcinę AAPM genų raiškos vertę individualizuojant gydymą DLV ir anti-PD-1. Kiti tyrėjai taip pat parodė AAPM genų raiškos predikcinę vertę imunoterapijos taikymui. Buvo parodyta, kad *Psm8* ir *Psm9* raiškos įvertis gali padėti sėkmingai stratifikuoti melanomos pacientus anti-CTLA-4 arba anti-PD-1 terapijai [11]. Taip pat buvo atskleista HLA I raiškos predikcinė vertė anti-PD-1/anti-PD-L1 terapijos individualizavimui pacientams, sergantiems NSCLC [10]. Kitos studijos metu *B2m* geno raiškos netekimas buvo susietas su NSCLC pacientų atsparumu ICI gydymui [198], tačiau nebuvo susijęs su atsaku į anti-PD-L1 tiesiosios žarnos vėžio pacientuose [199].

Priklausomai nuo geno ir naviko lokalizacijos, AAPM sutrikimai aptinkami iki 85% onkologinių pacientų ir yra būdingi tiek solidiniams, tiek hematologiniams piktybiniais navikams [200]. Gali pakisti tiek vieno, tiek kelių skirtingų su AAPM susijusių genų raiška, o šie pokyčiai tarp skirtingų navikų varijuoja [8]. Tai iš dalies paaiškina gaunamus prieštarigus pavienių

AAPM elementus koduojančių genų raiškos koreliacijos su atsaku į gydymą imunoterapija rezultatus ir rodo, kad platesnis AAPM koduojančių genų raiškos vertinimas, apimant AAPM koduojančių genų rinkinį, geriau atspindėtų AAPM funkcionalumą ir turėtų didesnę predikcinę galią individualizuojant imunoterapinį gydymą pacientams. 2020 metais atliktas tyrimas atskleidžia predikcinę AAPM genų rinkinio, susidedančio iš 8 skirtingų genų, raiškos vertę individualizuojant anti-PD-1 gydymą melanoma ir NSCLC sergantiems pacientams [201]. Taip pat 2019 metais 18 AAPM genų raiška kartu su TMB duomenimis buvo sėkmingai pritaikyta stratifikuojant pacientus ICI gydymui nepriklausomai nuo vėžio lokalizacijos [202]. Šios studijos metu gauti rezultatai ne tik patvirtina šiuos tyrimus, rodančius ryšį tarp AAPM genų rinkinio raiškos pokyčių ir jautrumo anti-PD-1, bet ir atskleidžia ryšį tarp AAPM genų raiškos ir jautrumo gydymui DLV. Iki šiol literatūroje mums nepavyko rasti jokių sąsajų tarp AAPM mechanizmo funkcionalumo navikinėse ląstelėse ir gydymo DLV efektyvumo.

Kitas svarbus veiksnys, lemiantis priešnavikinio imuninio atsako formavimąsi ir imunoterapijos veiksmingumą, yra naviko mutacinis dažnis TMB, koreliuojantis su neoantigenų kiekiu. Dėl somatinių mutacijų, vykstančių navikinių ląstelių genome, gali prasidėti naujų baltymų – neoantigenų raiška. Neoantigenai yra imuninei sistemai nepažįstami baltymai, kurie pasižymi aukštu imunogeniškumu laipsniu ir yra būdingi tik navikinėms ląstelėms [203]. Tiek navikinių Ag imunogeniškumas, tiek galimybė juos pateikti yra svarbūs faktoriai formuojantis priešnavikiniam imuniniam atsakui [202]. Nors šiai hipotezei įvertinti genomo sekoskaitos analizė nebuvo atlikta, kitų tyrėjų duomenimis GL261 ląstelių genomas pasižymėjo 4978 mutacijomis, kas atspindi ~ 1,8 mutacijos/Mb dažnį [204]. LLC1 ląstelėse mutacinis dažnis siekė 70 mutacijų/Mb [205]. Nors tai yra skirtingi tyrimai ir negalima tiesiogiai lyginti jų rezultatų, tačiau panašu, kad dėl apytiksliai 40 kartų didesnio mutacinio dažnio LLC1 ląstelėse, jos turėtų sukelti stipresnį priešnavikinį imuninį atsaką nei GL261 navikai. Vis dėlto, prieš LLC1 navikus nukreiptas imuninis atsakas nesivystė ir už tai gali būti atsakingas nefunkcionalus AAPM.

Skirtingą LLC1 ir GL261 navikų atsaką į gydymą imunoterapija galėjo nulemti ir skirtingi šiuose navikuose vyraujantys imunosupresiniai mechanizmai. GL261 navikuose dominavo *FoxP3*, *Ido1* raiška, susijusi su Treg ir tolerogeninių dendritinių ląstelių aktyvumu, o LLC1 navikuose buvo paplitusios MKSL ir M2 makrofagai ir su jais susijusių *Nos2* ir *Tgfb1* raiška. Tačiau nepaisant imunosupresinių mechanizmų GL261 navikuose buvo stebimas imuninio atsako aktyvavimas ir naviko vystymosi slopinimas, tad

tai verčia manyti, kad atsakas į gydymą galėjo būti stebimas ir LLC1 navikų atveju. Kadangi teigiamo terapinio poveikio LLC1 navikams nepastebėta, tikėtina, kad atsparumo DLV ir anti-PD-1 priežastis nėra susijusi su imunosupresinėmis ląstelėmis ar imunosupresiniais faktoriais. Taip pat pelių 6 skirtingų navikinių modelių atsako į kombinuotą chemoterapijos ir imunoterapijos gydymą tyrimas atskleidė, kad gydymui jautrūs navikai kaip tik pasižymėjo didesne imunosupresinių faktorių *Arg1*, *Nos2*, *Ido*, *Tgfb* ir *Illi0* raiška palyginti su gydymui atspariais navikais [176]. Šie rezultatai patvirtina, kad imunosupresinės molekulės navike nėra vienintelis faktorius, susijęs su atsparumu gydymui. Tad, mūsų nuomone, skirtingą LLC1 ir GL261 navikų atsaką į imunoterapiją didžiąja dalimi nulėmė AAPM funkcionalumo skirtumai, nustatyti šiose ląstelėse.

Šis tyrimas rodo, kad sumažėjusi genų, koduojančių AAPM, pvz., *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m*, raiška gali lemti atsparumą DLV arba anti-PD-1 pelių navikiniuose modeliuose ir gali turėti predikcinę reikšmę gydymo DLV ir anti-PD-1 individualizavimui. Antigenų apdoravimo ir pateikimo mechanizmas yra universalus visose ląstelėse, pasireiškia tuo pačiu būdu ir apima tuos pačius baltymus, tad tai atveria kelią plačiam šių genų rinkinio raiškos įvertimo klinikiniam pritaikymui individualizuojant gydymą DLV ir anti-PD-1. Pacientui individualių gydymo strategijų parinkimas ne tik leidžia pasiekti optimalų paciento atsaką į gydymą, išgyvenimo pagerinimą, tikslingiau išnaudoti gydymo kaštus, bet taip pat ir apsaugo pacientus, kurie potencialiai neturės naudos iš gydymo, nuo šalutinių, sveikatai grėsmę keliančių reakcijų, susijusių su taikomu gydymu. Kad T limfocitų veikimu paremta imunoterapija būtų veiksminga pacientams, kurių navikuose nustatyti AAPM sutrikimai, reikia ieškoti būdų, padėsiančių pagerinti AAPM funkcionalumą ir paverčiančių navikines ląsteles labiau matomomis imunoterapijos aktyvuotiems T limfocitams.

Šio tyrimo metu buvo atskleistas chemoterapinio vaisto ciklofosfamido aktyvuojantis poveikis AAPM pelių navikinėse ląstelėse *in vitro*. Šis poveikis LLC1 ir GL261 ląstelėse pasireiškė per CY indukuotą autokrinę I tipo interferonų IFN- α ir IFN- β gamybą. Šiuos interferonus navikinės ląstelės išskiria patiriamu streso metu ir jie pasižymi pleiotropiniu poveikiu [206]. Nors CY poveikis I tipo IFN gamybai navikinėse ląstelėse buvo parodytas ankstesniais tyrimais [207], tačiau CY poveikis navikinių ląstelių AAPM, mūsų žiniomis, dar nebuvo tirtas. LLC1 ir GL261 ląstelėse IFN aktyvavo AAPM kelio transkripcijos faktorių *Nlcr5* ir *Irf1* raišką ir tokiu būdu patį AAPM, kaip rodo išaugusi AAPM faktorių *Psm8*, *Psm9*, *Erap1*, *Tap1*, *Tap2* bei MHC-I koduojančių genų *H2d1*, *H2q1*, *H2q4* raiška.

AAPM LLC1 ir GL261 navikinėse ląstelėse buvo aktyvuotas tiek LLC1, tiek GL261 ląstelėse nepriklausomai nuo AAPM funkcionalumo. Tačiau CY sukelta AAPM aktyvacija atspindėjo tik LLC1 ląstelių paviršiuje, kur po poveikio buvo stebimas reikšmingas paviršinės MHC-I molekulės raiškos padidėjimas. Įdomu tai, kad paviršinės MHC-I raiškos pokyčiai GL261 paviršiuje nebuvo stebimi. Tai rodo, kad navikinėse ląstelėse esant funkcionaliam AAPM, CY sukelta AAPM genų raiškos aktyvacija gali būti kontroliuojama potransliacinėmis modifikacijomis, slopinančiomis MHC-I raišką ląstelių paviršiuje, kai ji yra pakankama [201].

Gydymas CY reikšmingai prislopino LLC1 ir GL261 navikų vystymąsi *in vivo*. Nors tai didžiąja dalimi gali būti susiję su tiesioginiu citotoksinu CY poveikiu navikinėms ląstelėms, su imunine sistema susijusių parametrų vertinimas LLC1 ir GL261 navikuose atskleidė, kad gydymas CY pagerino imunogenines navikinių ląstelių savybes bei aktyvavo imuninį atsaką, galėjusį papildomai įsitraukti į navikinių ląstelių naikinimą. Visų pirma, CY aktyvuojantis poveikis AAPM buvo patvirtintas ir *in vivo* – net ir praėjus savaitei po gydymo CY kursu LLC1 ir GL261 navikuose buvo stebima reikšmingai išaugusi MHC-I molekulę koduojančių genų *H2d1*, *H2q1*, *H2q4* raiška. Tai galimai lėmė pagerintą navikinių ląstelių gebėjimą pateikti naviko Ag imuninei sistemai ir iššaukti prieš save nukreiptą imuninį atsaką. Faktas, kad net praėjus savaitei po gydymo, buvo stebima išaugusi MHC-I koduojančių genų raiška, nors pats vaistas iš organizmo pasišalina per 4 val., rodo, kad buvo indukuotas imuninis atsakas, lėmęs tolimesnę IFN gamybą ir AAPM aktyvaciją. Taip pat gydymas CY galėjo paskatinti priešvėžinį imuninį atsaką ir sukeldamas LLC1 ir GL261 ląstelių imunogeninę žūtį, kaip rodo išaugusi kalretikulino raiška ląstelių paviršiuje po poveikio CY *in vitro* ir bendro leukocitų skaičiaus padidėjimas navikuose po gydymo CY.

CY gydymo sukeltas imuninis atsakas LLC1 ir GL261 navikuose, galimai dėl skirtingos šių navikų imuninės prigimties, išsiskyrė. GL261 navikuose, kuriuose AAPM yra funkcionalus ir buvo stebimas CD8 limfocitų atsakas, gydymas CY dar labiau jį sustiprino. LLC1 navikuose, kuriuose AAPM nėra tinkamai funkcionuojantis ir CD8 limfocitų atsakas nesivysto, gydymas CY nesukėlė reikšmingų T limfocitų skaičiaus skirtumų. Tai rodo, kad reikalingas papildomas gydymas, kuris paskatintų T limfocitų atsaką prieš LLC1 ląsteles. Vis tik buvo stebima bendra gydymo CY tendencija - LLC1 ir GL261 navikus infiltravusiems T limfocitams buvo būdingos labiau išreikštos citotoksinės ir aktyvacinės savybės, lemiančios jų efektyvesnę kovą prieš navikines ląsteles. Toks CY poveikis T limfocitams nėra plačiai ištirtas, tačiau buvo pastebėtas gydant pacientus su

metastazavusiu kolorektaliniu vėžiu. Po gydymo CY pacientų T limfocitai pasižymėjo išaugusia aktyvacijos žymenų ICOS, CD25 raiška bei citotoksiškumo faktorių granzimo B, perforino raiška [208]. Taip pat po gydymo CY pelių mastocitomos modelyje buvo stebėta išaugusi T limfocitų citotoksiškumo faktorių raiška, galimai lėmusi ir efektyvesnę T limfocitų gebėjimą naikinti taikines ląsteles [209].

Gydymas CY paskatino ir T imuninės atminties ląstelių formavimąsi – LLC1 navikuose reikšmingai išaugo CD4 T_{EM} atminties limfocitų kiekis, o GL261 navikuose – CD8 T_{EM} limfocitų kiekis. CY gebėjimas indukuoti T limfocitų imuninę atmintį buvo pastebėtas ir ankstesniuose tyrimuose, kurių metu parodyta, kad CY *in vivo* sukelia I tipo IFN gamybą, lemia CD4 ir CD8 efektorinių atminties ląstelių formavimąsi bei Th1 atsako poliarizaciją pelių modelyje [210]. NSCLC sergantiems pacientams taikant neoadjuvantinę chemoterapiją taip pat buvo stebimas išaugęs CD8 limfocitų bei navike reziduojančių CD8 ir CD4 atminties limfocitų skaičius, kuris buvo susietas su teigiamu terapiniu efektu [211]. Išaugęs navike reziduojančių CD8 atminties ląstelių skaičius NSCLC pacientuose buvo siejamas su geromis prognozėmis ir pagerėjusiu pacientų išgyvenamumu [212]. Vis dėlto, tikslus CY poveikio T atminties ląstelėms mechanizmas nėra aiškus [213]. Tikėtina, kad CY navikuose sukelia imunogenišką aplinką, kurioje esti įvairūs faktoriai, tokie kaip IL-2, I tipo IFN, IL7, aktyvuojantys priešvėžinį imuninį atsaką ir lemiantys imuninės atminties formavimąsi [214].

CY AAPM aktyvuojantis poveikis gali padaryti navikines ląsteles imunogeniškesnėmis ir labiau matomomis imuninei sistemai bei tokiu būdu atverti kelią T limfocitų veikimu paremtiems imunoterapiniams gydymams. Taip pat CY sukeltas imuninis atsakas gali būti papildomai moduluojamas imunoterapinėmis priemonėmis ir nukreipiamas priešvėžine linkme. CY ir dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 sinergistinis poveikis yra atskleidžiamas šios studijos metu. LLC1 atveju CY ir imunoterapijos kombinacijos pasižymėjo stipresniu naviko slopinimo efektu nei pavienis gydymas CY ar imunoterapija. Sinergistinis šių terapijų efektas gali būti grindžiamas pagerintu AAPM aktyvumu bei susidariusiu efektyvesniu T limfocitų atsaku prieš LLC1 ląsteles. Kombinacinis CY ir imunoterapijos gydymas, priešingai nei pavienis gydymas CY ar imunoterapija, sukėlė T limfocitų ir T efektorinių atminties ląstelių infiltraciją į LLC1 navikus, kuri buvo ryškesnė CD4 limfocitų populiacijoje. Ryškesnis CY ir DLV kombinacijos CD4 limfocitų atsaką stimuliuojantis efektas buvo stebimas ir gydant peles su indukuotais storosios žarnos MC38 navikais [215]. Taip pat CD4 limfocitų atsako svarbą atsake į gydymą CY ir anti-PD-1 patvirtina tyrimai su pelių plaučių TC-1 navikais, kur selektyviai pašalinus CD4

limfocitus terapinis gydymo efektas pelėse nebuvo pasiekiamas [216].

Nors ilgą laiką priešnavikiniame atsake CD4 T limfocitai buvo laikomi viso labo pagalbinėmis ląstelėmis, aktyvuojančiomis CD8 T limfocitus, daugėja tyrimų, atskleidžiančių CD4 limfocitų tiesioginį dalyvavimą šalinant navikines ląsteles [217–221]. CD4 T limfocitų priešnavikinis poveikis buvo pastebėtas tiriant 6 skirtingus pelių navikinius modelius MB49, WR21, TRAMP-C2, IP2-E4, 3B-11 ir 2F-2B. CD4 limfocitų gebėjimas šalinti navikines ląsteles buvo nepriklausomas nuo CD8 limfocitų ar MHC-II raiškos navikinių ląstelių paviršiuje. Visgi šio tyrimo metu buvo pastebėta, kad šalinant navikines ląsteles CD4 T limfocitų atsakui buvo reikalinga NK ląstelių pagalba [222]. CD4 limfocitų atsako svarba buvo pastebėta ir pelių su indukuotais kiaušidžių navikais atveju. Terapiniam atsakui į gydymą švitintomis bei doxorubicinu ir cisplatina veiktomis kiaušidžių vėžio ląstelėmis pasiekti buvo būtini CD4 T limfocitai ir NK ląstelės, bet ne CD8 T limfocitai [223]. CD4 limfocitų citotoksiškumas navikinėms ląstelėms gali pasireikšti keliais būdais - per Fas ir Trail kelius, indukuojančius navikinių ląstelių žūtį [224] bei taip pat per citotoksinius faktorius – perforinus ir granulizinus [225][226]. Visgi kuriais atvejais yra indukuojamas CD4 limfocitų priešnavikinis imuninis atsakas išlieka neaišku. Apie CY ir imunoterapijos kombinacijų indukuotą T limfocitų imuninį atsaką byloja citotoksiškumo *Prfl*, aktyvacijos *Tnfrsf9*, *Icos* bei imuninės atminties *Il7r*, *Eomes* parametrų raiška, kuri tendencingai reikšmingai labiausiai išaugo po gydymo CY+DLV+anti-PD-1 kombinacija. Įdomu tai, kad gydymas CY+DLV+anti-PD-1 kombinacija lėmė ir NK ląstelių atsako aktyvaciją. Tikėtina, kad CY+DLV+anti-PD-1 sukeltas terapinis efektas gydant peles su LLC1 navikais galimai yra susijęs su CD4 T limfocitų bei NK ląstelių atsaku.

GL261 navikų atveju gydymas CY lėmė naviko vystymosi slopinimą ir regresiją. Vis dėlto, pavienis CY neužtikrino pakankamai efektyvaus imuninio atsako prieš GL261 ląsteles susidarymo ir vykdant ilgalaikę stebėseną dalyje pelyčių buvo fiksuotas GL261 naviko atsikūrimas. Taikant kombinacinį gydymą CY+DLV, CY+anti-PD-1 bei CY+DLV+anti-PD-1 GL261 navikai 3 mėnesių bėgyje pelytėse nebeatsinaujino, o naujai sukelti GL261 navikai pelėse nesivystė. Po gydymo nustatytas sistemiškai išaugęs CD8 T limfocitų ir NK ląstelių kiekis bei navike išaugusi citotoksiškumo faktorių *Pfr1* ir *Ifng* raiška rodo gydymo nulemtų citotoksinių reakcijų aktyvaciją bei jų svarbą užtikrinant imuninę apsaugą prieš GL261 ląsteles. Kaip ir LLC1 naviko atveju, kombinacinis gydymas CY ir imunoterapija lėmė išaugusią T limfocitų aktyvaciją bei taikant kombinaciją su DLV buvo užkertamas kelias T limfocitų slopinančių molekulių raiškai. Tyrimai rodo,

kad gydant peles su indukuotais mezoteliomos navikais 5-FU, anti-CTLA-4 bei anti-PD-L1 kombinacinio gydymo terapinis efektas buvo pasiekiamas per CD8 T limfocitus ir buvo susijęs su geresniu pelių išgyvenamumu [227]. Taip pat taikant neoadjuvantinę chemoterapiją gemcitabinu su anti-PD-1 buvo aktyvintas NK ląstelių ir CD8 T limfocitų atsakas, susijęs su naviko augimo slopinimu ir geresniu pelių su kasos navikais išgyvenamumu [228].

Taip pat gydymas CY ir imunoterapijos kombinacijomis lėmė sisteminę bei navikui lokalių CD8 T limfocitų atminties susiformavimą, kaip rodo navike išaugusi *I17r* ir *Eomes* raiška ir sistemiškai padidėjęs CD8 T_{EM} limfocitų skaičius. Šie gydymo aktyvinti mechanizmai pelytėse, gydytose CY ir imunoterapijos kombinacijomis, užtikrino efektyvesnę GL261 navikų vystymosi ir atsinaujinimo kontrolę. Kaip rodo tyrimai, pavienis gydymas CY ar anti-PD-L1 negebėjo sukelti efektyvios T limfocitų atminties, kuri buvo aktyvuota tik taikant kombinacinį gydymą [229]. Įdomu tai, kad eksperimento eigoje visose gydymo grupėse CD8 T_{EM} limfocitų skaičius grįžo į normos ribas ir buvo stebimas CD4 ir CD4 T_{EM} limfocitų atsako įsivyravimas, kuris buvo ryškiausias CY+DLV bei CY+DLV+anti-PD-1 grupėse. Aktyvus periferinis Th1 tipo CD4 limfocitų atsako vystymasis buvo stebimas ir pelių spontaninio krūties vėžio modelyje, taikant gydymą anti-CD40, IFN- γ , anti-PD-1 ir anti-PD-L1 kombinacijomis. Šiame modelyje gydymo paskatinti Th1 CD4 T_{EM} limfocitai užtikrino ilgalaikę imuninę apsaugą ir užkirto kelią pakartotinai sukeltų navikų vystymuisi. Analogiški rezultatai buvo pastebėti ir gydant melanoma sergančius pacientus kombinuotu gydymu anti-CTLA-4 ir GM-CSF. Pacientų, kuriuose gydymas buvo susijęs su ligos stabilizavimu ir reikšmingai išaugusiu bendru išgyvenamumu, kraujyje, praėjus 3 ir 6 savaitėms po užbaigto gydymo buvo nustatytas reikšmingai išaugęs Th1 CD4 T_{EM} limfocitų skaičius nei lyginant su pacientais, kurių liga po taikyto gydymo progresavo [230][231]. Panaši situacija buvo stebima NSCLC atveju - išaugęs kraujo CD4CD62L^{low} limfocitų kiekis (CD4CD62L^{low} T limfocitai yra įvardijami kaip CD4 T_{EM} limfocitai [232,233], buvo susijęs su pacientų teigiamu atsaku į gydymą anti-PD-1, nulėmusį reikšmingai pagerintą pacientų išgyvenamumą be ligos progresavimo. Šiuose pacientuose net ir praėjus daugiau nei 500 dienų po gydymo buvo stebimas išaugęs kraujo CD4CD62L^{low} limfocitų kiekis, galimai užtikrinęs efektyvią ligos kontrolę. O pacientų, kurie atsakė į gydymą anti-PD-1, bet ilgainiui liga progresavo, kraujyje buvo stebimas CD4CD62L^{low} limfocitų kiekio sumažėjimas [234]. Kito tyrimo metu NSCLC pacientuose padidėjęs kraujo CD4 limfocitų ir NK ląstelių kiekis prieš gydymą anti-PD-1 buvo susietas su teigiamu atsaku į gydymą

imunoterapija bei geresniu išgyvenamumu be ligos progresavimo. Taip pat po gydymo imunoterapijai jautrių pacientų kraujyje buvo stebimas išaugęs CD4 limfocitų kiekis, rodantis, kad imunoterapijos teigiamas efektas yra susijęs su CD4 limfocitų atsako aktyvavimu pacientuose [235]. Tyrime gauti rezultatai atskleidžia CD4 limfocitų bei CD4 T_{EM} limfocitų atsako svarbą ilgalaikiam sėkmingam priešnavikiniam imuniniam atsakui ir efektyviam imunoterapiniam gydymui.

Šios studijos metu sinergistinis ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų bei anti-PD-1 efektas buvo stebimas gydant peles su skirtingo funkcionalumo AAPM navikais. Gydant peles su LLC1 navikais, pasižyminčiais nefunkcionaliu AAPM, CY ir imunoterapijos sinergistinis efektas atsiskleidžia per CY gebėjimą aktyvuoti AAPM ir padaryti navikines ląsteles matomomis imunoterapijos aktyvuotiems T limfocitams atpažinti ir sunaikinti. LLC1 navikai be sutrikusio AAPM taip pat pasižymi dideliu agresyvumu ir aukštu proliferaciniu potencialu, turinčiu reikšmingos neigiamos įtakos terapiniam efektui pasiekti. Tai yra dažnas modelis chemoterapiniams vaistams vertinti *in vivo* – šiame modelyje atskleidus chemoterapinio vaisto vinorelbino terapinį efektą, pastarasis buvo sėkmingai perkeltas į klinikinius tyrimus [236]. Taigi nors ir nebuvo pasiektas 100% gydymo nulemtas LLC1 navikų sunaikinimas, gautas reikšmingas terapinis efektas rodo didžiulį CY, DLV ir anti-PD-1 kombinacijos potencialą navikų su nefunkcionaliu AAPM gydyti. Gydant peles su GL261 navikais, pasižyminčiais funkcionaliu AAPM, sinergistinis CY ir imunoterapijos efektas, lėmęs GL261 navikų išnykimą ir užtikrinusį ilgalaikę apsaugą nuo naviko atsinaujinimo, galimai atsiskleidė per aktyvuotus T limfocitų imuninės atminties mechanizmus. Kaip rodo gauti rezultatai, CY pasižymi įvairiomis naviką ir imuninę sistemą moduluojančiomis savybėmis, įgalinančiomis jo platų pritaikymą kuriant naujas chemoimunoterapijos strategijas.

IŠVADOS

1. Paviršinės MHC-I molekulės ir AAPM elementus koduojančių genų *Psm8*, *Psm9*, *Psm10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* raiška navikuose atspindi AAPM funkcinį nepakankamumą. Aukšta šių faktorių raiška GL261 ląstelėse rodo aktyvų AAPM, o žema - atspindi nefunkcionalų AAPM LLC1 ląstelėse.
2. GL261 navikuose, kuriuose AAPM pilnavertis, yra stebimas imuninio atsako formavimasis. Nefunkcionalus AAPM gali būti terapinis taikyns indukuojant imuninį atsaką LLC1 navikuose.
3. Nefunkcionalus AAPM LLC1 navikuose lemia jų atsparumą gydymui dendritinių ląstelių vakcinoms ir anti-PD-1. AAPM faktorių raiška prognozuoja jautrumą gydymui dendritinių ląstelių vakcinomis ir anti-PD-1.
4. Ciklofosfamidą aktyvuoja AAPM ir tokiu būdu sustiprina naviko T limfocitų aktyvacines bei citotoksines savybes ir paskatina T limfocitų imuninės atminties susidarymą.
5. Ciklofosfamido, dendritinių ląstelių vakcinų ir anti-PD-1 kombinacijos pasižymi sinergistiniu poveikiu:
 - ciklofosfamidą aktyvuoja LLC1 navikų AAPM ir įjautrina navikus gydymui dendritinių ląstelių vakcinomis ir anti-PD-1.
 - chemoimunoterapija užtikrina ilgalaikę imunoterapijai jautrių GL261 navikų kontrolę.
 - chemoimunoterapija lėmė efektyvų navikų vystymosi slopinimą, T limfocitų atsako bei T limfocitų imuninės atminties formavimąsi. Geriausiu terapiniu efektu pasižymėjo ciklofosfamido+dendritinių ląstelių vakcinų+anti-PD-1 kombinacija.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Bai R, Chen N, Li L, Du N, Bai L, Lv Z, et al. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Frontiers in Oncology* 2020;10:1290. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01290>.
- [2] Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *New England Journal of Medicine* 2017;377:2500–1. <https://doi.org/10.1056/nejmc1713444>.
- [3] Calmeiro J, Carrascal MA, Tavares AR, Ferreira DA, Gomes C, Falcão A, et al. Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy: The Role of Human Conventional Type 1 Dendritic Cells. *Pharmaceutics* 2020;12(2):158. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020158>.
- [4] Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology* 2020;17:807–21. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>.
- [5] McKean WB, Moser JC, Rimm D, Hu-Lieskovan S. Biomarkers in Precision Cancer Immunotherapy: Promise and Challenges. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2020:e275–91. https://doi.org/10.1200/edbk_280571.
- [6] Smolle E, Leithner K, Olschewski H. Oncogene addiction and tumor mutational burden in non-small-cell lung cancer: Clinical significance and limitations. *Thoracic Cancer* 2020;11:205–15. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13246>.
- [7] Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nature Reviews Cancer* 2020;20:662–80. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0285-7>.
- [8] Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: Organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1172–87. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt184>.
- [9] Sokol L, Koelzer VH, Rau TT, Karamitopoulou E, Zlobec I, Lugli A. Loss of tapasin correlates with diminished CD8+ T-cell immunity and prognosis in colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* 2015;13. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0647-1>.
- [10] Perea F, Sánchez-Palencia A, Gómez-Morales M, Bernal M, Concha Á, Méndez García M, et al. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget* 2017;9(3):4120-4133. doi:10.18632/oncotarget.23469

- [11] Kalaora S, Lee JS, Barnea E, Levy R, Greenberg P, Alon M, et al. Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma. *Nature Communications* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14639-9>.
- [12] Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 2016;39:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.12.007>.
- [13] Zhang S, Kohli K, Graeme Black R, Yao L, Spadinger SM, He Q, et al. Systemic Interferon-g Increases MHC Class I Expression and T-cell Infiltration in Cold Tumors: Results of a phase 0 clinical trial. *Cancer Immunology Research* 2019;7:1237–43. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0940>.
- [14] Luo N, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Sanchez V, Opalenik SR, Li H, et al. DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC-I to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nature Communications* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02630-w>.
- [15] Sabbatino F, Liguori L, Polcaro G, Salvato I, Caramori G, Salzano FA, et al. Role of human leukocyte antigen system as a predictive biomarker for checkpoint-based immunotherapy in cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms21197295>.
- [16] Kaneno R, Shurin G v., Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cellular Oncology* 2011;34:97–106. <https://doi.org/10.1007/s13402-010-0005-5>.
- [17] Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *British Journal of Cancer* 2010;102:115–23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605465>.
- [18] Hodge JW, Garnett CT, Farsaci B, Palena C, Tsang KY, Ferrone S, et al. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *International Journal of Cancer* 2013;133:624–36. <https://doi.org/10.1002/ijc.28070>.
- [19] Zhu S, Zhang T, Zheng L, Liu H, Song W, Liu D, et al. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy. *Journal of Hematology and Oncology* 2021;14. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01164-5>.
- [20] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017;168:670–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.

- [21] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [22] Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: A double-edged sword in cancer. *Inflammation Research* 2013;62:823–34. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0645-9>.
- [23] National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms n.d. <https://www.cancer.gov/> (accessed June 2, 2022).
- [24] Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>.
- [25] El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019;43. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
- [26] Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in Immunology* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00082>.
- [27] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 2012;12:265–77. <https://doi.org/10.1038/nrc3258>.
- [28] Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Frontiers in immunology* 2013;4:438. doi:10.3389/fimmu.2013.00438
- [29] Jayant K, Habib N, Huang KW, Warwick J, Arasaradnam R. Recent advances: The imbalance of immune cells and cytokines in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(5):338. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050338>.
- [30] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263–6. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00455-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00455-x).
- [31] Obar JJ, Lefrançois L. Memory CD8+ T cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1183:251–66. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05126.x>.
- [32] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 2003;348(3):203-213. doi:10.1056/NEJMoa020177
- [33] Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1303-10.
- [34] Martin MD, Badovinac VP. Defining memory CD8 T cell. *Frontiers in Immunology* 2018;9:2692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>.

- [35] Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death and Differentiation* 2010;17:616–23. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.206>.
- [36] Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Therapy* 2021;28:5–17. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0183-x>.
- [37] Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews* 2009;229:152–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>.
- [38] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012;2012:925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
- [39] Protti MP, de Monte L. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. *OncoImmunology* 2012;1:89–91. <https://doi.org/10.4161/onci.1.1.17939>.
- [40] Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-shakib A, Jadidi-Niaragh F, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology* 2017;322:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.015>.
- [41] Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Communication and Signaling* 2019;17:147. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0471-y>.
- [42] Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 2015;7:303–10. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1011450>.
- [43] Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell International* 2021;21(1):389. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02089-2>.
- [44] Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology* 2015;6:263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>.
- [45] Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation* 2015;2015:816460. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>.
- [46] Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:15–27. <https://doi.org/10.1038/nri2454>.

- [47] Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2017;8:1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>.
- [48] Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology* 2019;105:1319–29. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>.
- [49] Fang F, Xiao W, Tian Z. Challenges of NK cell-based immunotherapy in the new era. *Frontiers of Medicine* 2018;12:440–50. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0653-9>.
- [50] Strioga MM, Darinskas A, Pasukoniene V, Mlynska A, Ostapenko V, Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: To use or not to use? *Vaccine* 2014;32:4015–24. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.006>.
- [51] Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology* 2021;12:636568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>.
- [52] Shklovskaya E, Rizos H. Mhc class i deficiency in solid tumors and therapeutic strategies to overcome it. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22136741>.
- [53] Taylor BC, Balko JM. Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response. *Frontiers in Immunology* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866>.
- [54] Davies M. New modalities of cancer treatment for NSCLC: Focus on immunotherapy. *Cancer Management and Research* 2014;6:63–75. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S57550>.
- [55] Lou Y, Vitalis TZ, Basha G, Cai B, Chen SS, Choi KB, et al. Restoration of the expression of transporters associated with antigen processing in lung carcinoma increases tumor-specific immune responses and survival. *Cancer Research* 2005;65:7926–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3977>.
- [56] Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *The Journal of experimental medicine* 1999;190(7):995-1004. doi:10.1084/jem.190.7.995
- [57] Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev.* 2007;220:199-213. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x
- [58] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566–9. <https://doi.org/10.1038/nature06306>.
- [59] Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang S-C, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, et al. Prostaglandin E2 Induces FOXP3 Gene Expression and T Regulatory

- Cell Function in Human CD4 + T Cells. *The Journal of Immunology* 2005;175:1483–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1483>.
- [60] Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006;118:240–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x>.
- [61] Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology* 2018;35:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.004>.
- [62] Poschke I, Kiessling R. On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clinical Immunology* 2012;144:250–68. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.06.003>.
- [63] Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research* 2017;5:3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.
- [64] Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* 2007;25:267–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>.
- [65] Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer* 2013;13:871–82. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>.
- [66] Zhang H, Dai Z, Wu W, Wang Z, Zhang N, Zhang L, et al. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2021;40. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01987-7>.
- [67] Siamof CM, Goel S, Cai W. Moving Beyond the Pillars of Cancer Treatment: Perspectives From Nanotechnology. *Frontiers in Chemistry* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.598100>.
- [68] Abbas Z, Rehman S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. *Neoplasm, InTech*; 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>.
- [69] Akkin S, Varan G, Bilensoy E. A review on cancer immunotherapy and applications of nanotechnology to chemoimmunotherapy of different cancers. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/molecules26113382>.
- [70] Couzin-Frankel Jennifer. Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy. Science* 2013;342:1432–3. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>.
- [71] Monjazebe AM, Hsiao HH, Sckisel GD, Murphy WJ. The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *J Immunotoxicol* 2012;248-58. doi: 10.3109/1547691X.2012.685527.
- [72] Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro J-MB-S, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer

- immunotherapies. *Oncotarget* 2014;5(24):12472-508. doi: 10.18632/oncotarget.2998.
- [73] Kwak JJ, Tirumani SH, van den Abbeele AD, Koo PJ, Jacene HA. Cancer immunotherapy: Imaging assessment of novel treatment response patterns and immune-related adverse events. *Radiographics* 2015;35:424–37. <https://doi.org/10.1148/rg.352140121>.
- [74] Xu Q, Liu G, Yuan X, Xu M, Wang H, Ji J, et al. Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens. *Stem Cells*. 2009;27:1734–40. <https://doi.org/10.1002/stem.102>.
- [75] Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaf LE. Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Frontiers in Immunology* 2019;10:766. 2019 Apr 11. doi:10.3389/fimmu.2019.00766
- [76] Alvarez-Dominguez C, Calderón-Gonzalez R, Terán-Navarro H, Salcines-Cuevas D, Garcia-Castaño A, Freire J, et al. Dendritic cell therapy in melanoma. *Annals of Translational Medicine* 2017;5:1–9. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.13>.
- [77] Gu, Yz., Zhao, X. & Song, Xr. Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2020;41:959–969. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0415-5>
- [78] Baldin AV, Savvateeva LV, Bazhin AV, Zamyatnin AA Jr. Dendritic Cells in Anticancer Vaccination: Rationale for Ex Vivo Loading or In Vivo Targeting. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):590. doi:10.3390/cancers12030590
- [79] Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG, Clark GJ. Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer. *Frontiers in Immunology* 2021;12:641307. doi:10.3389/fimmu.2021.641307
- [80] Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Frontiers in Immunology* 2018;9:2874. doi: 10.3389/fimmu.2018.02874.
- [81] Hoteit M, Oneissi Z, Reda R, Wakim F, Zaidan A, Farran M, Abi-Khalil E, El-Sibai M. Cancer immunotherapy: A comprehensive appraisal of its modes of application. *Oncology Letters* 2021;22(3):655. doi: 10.3892/ol.2021.12916.
- [82] Elster JD, Krishnadas DK, Lucas KG. Dendritic cell vaccines: A review of recent developments and their potential pediatric application. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2232-2239. doi:10.1080/21645515.2016.1179844
- [83] van Willigen WW, Bloemendal M, Gerritsen WR, Schreibelt G, de Vries IJM, Bol KF. Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time. *Frontiers in Immunology* 2018;9:2265. doi: 10.3389/fimmu.2018.02265.

- [84] Nagai K, Adachi T, Harada H, Eguchi S, Sugiyama H, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunotherapy pulsed with wilms tumor 1 peptide and mucin 1 as an adjuvant therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma after curative resection: A Phase I/IIa clinical trial. *Anticancer Research* 2020;40:5765–76. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14593>.
- [85] Matsui HM, Hazama S, Nakajima M, Xu M, Matsukuma S, Tokumitsu Y, et al. Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2021;70:945–57. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02737-y>.
- [86] Zhong R, Ling X, Cao S, Xu J, Zhang B, Zhang X, et al. Safety and efficacy of dendritic cell-based immunotherapy (DCVAC/LuCa) combined with carboplatin/pemetrexed for patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer without oncogenic drivers. *ESMO Open* 2022;7. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100334>.
- [87] Boudewijns S, Bloemendal M, de Haas N, Westdorp H, Bol KF, Schreibelt G, et al. Autologous monocyte-derived DC vaccination combined with cisplatin in stage III and IV melanoma patients: a prospective, randomized phase 2 trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2020;69:477–88. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02466-x>.
- [88] Westdorp H, Creemers JHA, van Oort IM, Schreibelt G, Gorris MAJ, Mehra N, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2019;7. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0787-6>.
- [89] Hlavackova E, Pilatova K, Cerna D, Selingerova I, Mudry P, Mazanek P, et al. Dendritic cell-based immunotherapy in advanced sarcoma and neuroblastoma pediatric patients: Anti-cancer treatment preceding monocyte harvest impairs the immunostimulatory and antigen-presenting behavior of dcs and manufacturing process outcome. *Frontiers in Oncology* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01034>.
- [90] Lin Y, Atwell T, Weisbrod A, Maas M, Armstrong A, Deeds M, et al. Dendritic cell vaccine treatment for indolent B cell non-hodgkin lymphoma: clinical trial in progress. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2014;2. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-s3-p76>.
- [91] Draube A, Klein-González N, Mattheus S, Brilliant C, Hellmich M, Engert A, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018801>.

- [92] Kalinski P, Muthuswamy R, Urban J. Dendritic cells in cancer immunotherapy: Vaccines and combination immunotherapies. *Expert Review of Vaccines* 2013;12:285–95. <https://doi.org/10.1586/erv.13.22>.
- [93] Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges. *Journal of Hematology and Oncology* 2018;11. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0582-8>.
- [94] Dong Y, Sun Q, Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(2):2171-2186. doi:10.18632/oncotarget.13895
- [95] Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 2019;15:1111–22. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>.
- [96] Wang X, Bao Z, Zhang X, et al. Effectiveness and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(35):59901-59914. doi:10.18632/oncotarget.18316
- [97] Sun L, Zhang L, Yu J, Zhang Y, Pang X, Ma C, et al. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58674-4>.
- [98] Smyth MJ, Teng MWL. 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. *Clinical and Translational Immunology* 2018;7. <https://doi.org/10.1002/cti2.1041>.
- [99] Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS Journal* 2021;23. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00574-0>.
- [100] Johnson DB, Nebhan CA, Moslehi JJ, Balko JM. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2022;19:254–67. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00600-w>.
- [101] Alard E, Butnariu AB, Grillo M, Kirkham C, Zinovkin DA, Newnham L, et al. Advances in anti-cancer immunotherapy: CAR-T cell, checkpoint inhibitors, dendritic cell vaccines, and oncolytic viruses, and emerging cellular and molecular targets. *Cancers (Basel)* 2020;12:1–38. <https://doi.org/10.3390/cancers12071826>.
- [102] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168:707–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>.
- [103] Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* 2010;5:463–6. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.

- [104] Hoeben A, Joosten EAJ, van den Beuken-Van Everdingen MHJ. Personalized medicine: Recent progress in cancer therapy. *Cancers (Basel)* 2021;13:1–3. <https://doi.org/10.3390/cancers13020242>.
- [105] Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology* 2016;17:e542–51. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30406-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30406-5).
- [106] Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Molecular Cancer Therapeutics* 2017;16:2598–608. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0386>.
- [107] Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierio PA, Atmaca A, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 2018;33:853-861.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.001>.
- [108] Singal G, Miller PG, Agarwala V, Li G, Kaushik G, Backenroth D, et al. Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database Supplemental content. *JAMA* 2019;321:1391–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3241>.
- [109] Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10031):1909-1920. doi:10.1016/S0140-6736(16)00561-4
- [110] Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science* 2018;359:801–6. <https://doi.org/10.1126/science.aan5951>.
- [111] Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, Kuo FC, Shivdasani P, Frieden A, et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight* 2018;3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98811>.
- [112] Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 2017;171:934-949.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.028>.
- [113] Bai R, Lv Z, Xu D, Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomarker Research* 2020;8. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00209-0>.
- [114] Uryvaev A, Passhak M, Hershkovits D, Sabo E, Bar-Sela G. The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD-1 therapy in patients with metastatic non-small

- cell lung cancer or metastatic melanoma. *Medical Oncology* 2018;35.
<https://doi.org/10.1007/s12032-018-1080-0>.
- [115] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563–7.
<https://doi.org/10.1038/nature14011>.
- [116] Cannon MJ, Block MS, Morehead LC, Knutson KL. The evolving clinical landscape for dendritic cell vaccines and cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2019;11:75–9.
<https://doi.org/10.2217/imt-2018-0129>.
- [117] Melody SH, Shaina S, Tina W, Joseph PA, Richard GE, Alexander MT, et al. TCR sequencing can identify and track glioma-infiltrating T cells after DC vaccination. *Cancer Immunology Research* 2016;4:412–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0240>.
- [118] Yu S, Wang Y, He P, Shao B, Liu F, Xiang Z, et al. Effective Combinations of Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment. *Frontiers in Oncology* 2022;12.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.809304>.
- [119] Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacology and Therapeutics* 2016;160:145–58.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.008>.
- [120] Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International Journal of Oncology* 2019;54:407–19.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>.
- [121] Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity* 2013;39:74–88.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.014>.
- [122] Welters MJ, van der Sluis TC, van Meir H, et al. Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses. *Sci Transl Med.* 2016;8(334):334ra52.
[doi:10.1126/scitranslmed.aad8307](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8307)
- [123] Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Research* 2010;70:3052–61.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-3690>.
- [124] Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Research* 2011;71:768–78.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2788>.

- [125] Minute L, Teijeira A, Sanchez-Paulete AR, et al Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8:e000325. doi: 10.1136/jitc-2019-000325
- [126] Gravett AM, Trautwein N, Stevanović S, Dalgleish AG, Copier J. Gemcitabine alters the proteasome composition and immunopeptidome of tumour cells. *OncoImmunology* 2018;7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1438107>.
- [127] Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, Liu LF. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS ONE* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032542>.
- [128] Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance* 2019;2:141–60. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>.
- [129] Kim SI, Cassella CR, Byrne KT. Tumor Burden and Immunotherapy: Impact on Immune Infiltration and Therapeutic Outcomes. *Frontiers in Immunology* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.629722>.
- [130] Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2019;23:4854–65. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14356>.
- [131] Wang YJ, Fletcher R, Yu J, Zhang L. Immunogenic effects of chemotherapy-induced tumor cell death. *Genes and Diseases* 2018;5:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.003>.
- [132] de Cicco P, Ercolano G, Ianaro A. The New Era of Cancer Immunotherapy: Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Overcome Immune Evasion. *Frontiers in Immunology* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01680>.
- [133] Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007;56:641–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8>.
- [134] Chen CA, Ho CM, Chang MC, Sun WZ, Chen YL, Chiang YC, et al. Metronomic chemotherapy enhances antitumor effects of cancer vaccine by depleting regulatory T lymphocytes and inhibiting tumor angiogenesis. *Molecular Therapy* 2010;18:1233–43. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.34>.
- [135] Zhong H, Lai Y, Zhang R, Daoud A, Feng Q, Zhou J, et al. Low dose cyclophosphamide modulates tumor microenvironment by TGF- β signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030957>.
- [136] Buhtoiarov IN, Sondel PM, Wigginton JM, Buhtoiarova TN, Yanke EM, Mahvi DA, et al. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through

- repolarization of tumour-associated macrophages. *Immunology* 2011;132:226–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03357.x>.
- [137] Wei Y, Du Q, Jiang X, Li L, Li T, Li M, et al. Efficacy and safety of combination immunotherapy for malignant solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2019;138:178–89. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.04.008>.
- [138] Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2016;78:661–71. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3152-1>.
- [139] Marcella Gabrielle Mendes M, Paulo Renato Y, Jean Leandro dos S, Chung Man C. Targeted Prodrug Design for the Treatment of Malignant Melanoma. *Journal of Dermatology Research and Therapy* 2016;2. <https://doi.org/10.23937/2469-5750/1510019>.
- [140] Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol* 2011;33:369–83. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0245-0>.
- [141] Moschella F, Torelli GF, Valentini M, Urbani F, Buccione C, Petrucci MT, et al. Cyclophosphamide induces a type I interferon-Associated sterile inflammatory response signature in cancer patients' blood cells: Implications for cancer chemoimmunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2013;19:4249–61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3666>.
- [142] Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews* 2018;63:40–7. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>.
- [143] Wu J, Waxman DJ. Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Letters* 2018;419:210–21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.050>.
- [144] Ellebaek E, Engell-Noerregaard L, Iversen TZ, Froesig TM, Munir S, Hadrup SR, et al. Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, Interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: Results from a phase II trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2012;61:1791–804. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1242-4>.
- [145] Laheru D, Lutz E, Burke J, Biedrzycki B, Solt S, Onners B, et al. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide for metastatic pancreatic cancer: A pilot study of safety, feasibility, and immune activation. *Clinical Cancer Research* 2008;14:1455–63. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0371>.
- [146] Scurr M, Pembroke T, Bloom A, Roberts D, Thomson A, Smart K, et al. Effect of Modified Vaccinia Ankara–5T4 and Low-Dose Cyclophosphamide on Antitumor Immunity in Metastatic Colorectal

- Cancer. National Health Service (NHS) Trust 2017;3.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2579>.
- [147] Wojas-Turek J, Szczygieł A, Kicielińska J, Rossowska J, Piasecki E, Pajtasz-Piasecka E. Treatment with cyclophosphamide supported by various dendritic cell-based vaccines induces diversification in CD4+ T cell response against MC38 colon carcinoma. *International Journal of Oncology* 2016;48:493–505. <https://doi.org/10.3892/ijco.2015.3278>.
- [148] Liu JY, Wu Y, Zhang XS, Yang JL, Li HL, Mao YQ, et al. Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007;56:1597–604. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0305-4>.
- [149] Mkrtichyan M, Najjar YG, Raulfs EC, Abdalla MY, Samara R, Rotem-Yehudar R, et al. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. *European Journal of Immunology* 2011;41:2977–86. <https://doi.org/10.1002/eji.201141639>.
- [150] US National Library of Medicine. *Clinical Trials* n.d. <https://clinicaltrials.gov> (accessed May 24, 2022).
- [151] Wang QT, Nie Y, Sun SN, Lin T, Han RJ, Jiang J, et al. Tumor-associated antigen-based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2020;69:1375–87. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02496-w>.
- [152] Babiker H, Brana I, Mahadevan D, Owonikoko T, Calvo E, Rischin D, et al. Phase I Trial of Cemiplimab, Radiotherapy, Cyclophosphamide, and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients with Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncologist* 2021;26:e1508–13. <https://doi.org/10.1002/onco.13810>.
- [153] Maud Toulmonde, Nicolas Penel, Julien Adam, Christine Chevreau, Jean-Yves Blay, Axel Le Cesne, et al. Combination of pembrolizumab and metronomic cyclophosphamide in patients with advanced sarcomas and GIST: A French Sarcoma Group phase II trial. *Journal of Clinical Oncology* 2017;35:11053–11053.
- [154] Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: Implications for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2016;16:131–44. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>.
- [155] Cornel AM, Mimpfen IL, Nierkens S. MHC class I downregulation in cancer: Underlying mechanisms and potential targets for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2020;12:1–33. <https://doi.org/10.3390/cancers12071760>.
- [156] Luo N, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Sanchez V, Opalenik SR, Li H, et al. DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC-I to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nature Communications* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02630-w>.

- [157] Yang W, Li Y, Gao R, Xiu Z, Sun T. MHC class I dysfunction of glioma stem cells escapes from CTL-mediated immune response via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncogene* 2020;39:1098–111. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1045-6>.
- [158] Mora-García M de L, Duenas-González A, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Santiago-Osorio E, Ortíz-Navarrete VF, et al. Up-regulation of HLA class I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *BMC Cancer* 2007;7. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-s1-a12>.
- [159] Khan ANH, Gregorie CJ, Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2008;57:647–54. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0402-4>.
- [160] Sznarkowska A, Mikac S, Pilch M. MHC class I regulation: The origin perspective. *Cancers (Basel)* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/cancers12051155>.
- [161] Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *British Journal of Cancer* 2010;102:115–23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605465>.
- [162] Khallouf H, Märten A, Serba S, et al. 5-Fluorouracil and interferon- α immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. *Journal of immunotherapy* 2012;35(3):245-253. doi:10.1097/CJI.0b013e31824b3a76
- [163] Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, Liu LF. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS ONE* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032542>.
- [164] Iwai T, Sugimoto M, Wakita D, Yorozu K, Kurasawa M, Yamamoto K. Topoisomerase I inhibitor, irinotecan, depletes regulatory T cells and up-regulates MHC class I and PD-L1 expression, resulting in a supra-additive antitumor effect when combined with anti-PD-L1 antibodies. *Oncotarget*. 2018;9(59):31411-31421. doi:10.18632/oncotarget.25830
- [165] National Library of Medicine (U.S.). n.d. clinicaltrials.gov (accessed April 19, 2022).
- [166] Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG. Preclinical mouse solid tumour models: Status quo, challenges and perspectives. *Nature Reviews Cancer* 2017;17:751–65. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.92>.
- [167] Mak IWY, Evaniew N, Ghert M. Lost in Translation: Animal Models and Clinical Trials in Cancer Treatment. *Am J Trans Res* 2014; 6(2):114–8. doi: 1943-8141/ajtr1312010

- [168] Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. Bryda E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine* 2013;110(3):207-211.
- [169] Ireson CR, Alavijeh MS, Palmer AM, Fowler ER, Jones HJ. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *British Journal of Cancer* 2019;121:101–8. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0495-5>.
- [170] Didžiapetrienė J, Uleckienė S. Eksperimentiniai onkologijos modeliai. Vilnius: 2008.
- [171] Zitvogel L, Pitt JM, Daillère R, Smyth MJ, Kroemer G. Mouse models in oncoimmunology. *Nature Reviews Cancer* 2016;16:759–73. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.91>.
- [172] Franklin MR, Platero S, Saini KS, Curigliano G, Anderson S. Immuno-oncology trends: Preclinical models, biomarkers, and clinical development. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;10. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003231>.
- [173] Kurosawa T. Inbred Animal Strains. eLS, Wiley; 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001442.pub2>.
- [174] Schmidt KM, Geissler EK, Lang SA. Subcutaneous Murine Xenograft Models: A Critical Tool for Studying Human Tumor Growth and Angiogenesis In Vivo. *Method Mol Biol* 2016;1464:129–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3999-2_12.
- [175] Yu JW, Bhattacharya S, Yanamandra N, Kilian D, Shi H, Yadavilli S, et al. Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments. *PLoS ONE* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206223>.
- [176] Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *Journal of Immunotherapy* 2013;36:477–89. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000436722.46675.4a>.
- [177] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Letters*. 1980;11(1):63-73. doi:10.1016/0304-3835(80)90130-5
- [178] Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, Trajcevski S, Hídvégi EJ, Hamada H, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science* 2006;97:546–53. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00208.x>.
- [179] Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12:107. doi:10.1186/1479-5876-12-107
- [180] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from

- mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 1999;223(1):77-92. doi:10.1016/s0022-1759(98)00204-x
- [181] Wu J, Jordan M, Waxman DJ. Metronomic cyclophosphamide activation of anti-tumor immunity: Tumor model, mouse host, and drug schedule dependence of gene responses and their upstream regulators. *BMC Cancer* 2016;16. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2597-2>.
- [182] Enot DP, Vacchelli E, Jacquelot N, Zitvogel L, Kroemer G. TumGrowth: An open-access web tool for the statistical analysis of tumor growth curves. *OncoImmunology* 2018;7:1–3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1462431>.
- [183] Dellgren C, Nehlin JO, Barington T. Cell surface expression level variation between two common human leukocyte antigen alleles, HLA-A2 and HLA-B8, is dependent on the structure of the C terminal part of the alpha 2 and the alpha 3 domains. *PLoS ONE* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135385>.
- [184] Tcyganov E, Mastio J, Chen E, Gabrilovich DI. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Current Opinion in Immunology* 2018;51:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.009>.
- [185] Symchych TV, Fedosova NI, Karaman OM, et al. The anticancer efficiency of the xenogeneic vaccine and the indication for its use. *Experimental oncology* 2014;36(2):79-84.
- [186] Voeykova IM, Fedosova NI, Karaman OM, et al. Use of xenogeneic vaccine modified with embryonal nervous tissue antigens in the treatment of B16-melanoma-bearing mice. *Experimental oncology* 2014;36(1):24-28.
- [187] Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Review* 2006;25(3):323-331. doi:10.1007/s10555-006-9002-6
- [188] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology* 2009;182:4499–506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>.
- [189] Haist M, Stege H, Grabbe S, Bros M. Review the functional crosstalk between myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells within the immunosuppressive tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2021;13:1–34. <https://doi.org/10.3390/cancers13020210>.
- [190] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2012;12:180–90. <https://doi.org/10.1038/nri3156>.
- [191] Menees KB, Earls RH, Chung J, Jernigan J, Filipov NM, Carpenter JM, et al. Sex- and age-dependent alterations of splenic immune cell profile and NK cell phenotypes and function in C57BL/6J mice. *Immunity and Ageing* 2021;18. <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00214-3>.

- [192] McKelvey KJ, Hudson AL, Kumar RP, Wilmott JS, Attrill GH, Long G v., et al. Temporal and spatial modulation of the tumor and systemic immune response in the murine GL261 glioma model. *PLoS ONE* 2020;15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226444>.
- [193] Bosiljcic M, Cederberg RA, Hamilton MJ, Lepard NE, Harbourne BT, Collier JL, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells in combination with primary mammary tumor resection reduces metastatic growth in the lungs. *Breast Cancer Research* 2019;21. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1189-x>.
- [194] Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane JP, et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nature Communications* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01062-w>.
- [195] Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology* 2014;15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70585-0).
- [196] Markowitz GJ, Havel LS, Crowley MJ, Ban Y, Lee SB, Thalappillil JS, et al. Immune reprogramming via PD-1 inhibition enhances early-stage lung cancer survival. *JCI Insight* 2018;3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96836>.
- [197] Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Frontiers in Immunology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01310>.
- [198] Gettinger S, Choi J, Hastings K, Truini A, Datar I, Sowell R, et al. Impaired HLA class I antigen processing and presentation as a mechanism of acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Discovery* 2017;7:1420–35. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0593>.
- [199] Middha S, Yaeger R, Shia J, et al. Majority of B2M-Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:PO.18.00321. doi:10.1200/PO.18.00321
- [200] Seliger B, Ferrone S. HLA Class I Antigen Processing Machinery Defects in Cancer Cells—Frequency, Functional Significance, and Clinical Relevance with Special Emphasis on Their Role in T Cell-Based Immunotherapy of Malignant Disease. *Methods in Molecular Biology*, vol. 2055, Humana Press Inc.; 2020, p. 325–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9773-2_15.
- [201] Thompson JC, Davis C, Deshpande C, Hwang WT, Jeffries S, Huang A, et al. Gene signature of antigen processing and presentation machinery predicts response to checkpoint blockade in non-small cell lung cancer (NSCLC) and melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000974>.

- [202] Wang S, He Z, Wang X, Li H, Liu XS. Antigen presentation and tumor immunogenicity in cancer immunotherapy response prediction. *Elife* 2019;8:e49020. <https://doi.org/10.7554/eLife.49020>
- [203] Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nature Reviews Cancer* 2017;17:209–22. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.154>.
- [204] Genoud V, Marinari E, Nikolaev SI, Castle JC, Bukur V, Dietrich PY, et al. Responsiveness to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immune checkpoint blockade in SB28 and GL261 mouse glioma models. *OncoImmunology* 2018;7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1501137>.
- [205] Zhong W, Myers JS, Wang F, Wang K, Lucas J, Rosfjord E, et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC Genomics* 2020;21. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6344-3>.
- [206] Lu C, Klement JD, Ibrahim ML, Xiao W, Redd PS, Nayak-Kapoor A, et al. Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2019;7. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0635-8>.
- [207] Du B, Waxman DJ. Medium dose intermittent cyclophosphamide induces immunogenic cell death and cancer cell autonomous type I interferon production in glioma models. *Cancer Letters* 2020;470:170–80. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.025>.
- [208] Scurr M, Pembroke T, Bloom A, Roberts D, Thomson A, Smart K, et al. Low-dose cyclophosphamide induces antitumor T-cell responses, which associate with survival in metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2017;23:6771–80. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0895>.
- [209] Hanoteau A, Henin C, Svec D, Bisilliat Donnet C, Denanglaire S, Colau D, et al. Cyclophosphamide treatment regulates the balance of functional/exhausted tumor-specific CD8+ T cells. *OncoImmunology* 2017;6. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1318234>.
- [210] Schiavoni G, Mattei F, Di Pucchio T, Santini SM, Bracci L, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood* 2000;15;95(6):2024-30.
- [211] Gaudreau PO, Negrao M v., Mitchell KG, Reuben A, Corsini EM, Li J, et al. Neoadjuvant Chemotherapy Increases Cytotoxic T Cell, Tissue Resident Memory T Cell, and B Cell Infiltration in Resectable NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* 2021;16:127–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.027>.
- [212] Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, et al. CD8+CD103+ Tumor–Infiltrating Lymphocytes

- Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients . *The Journal of Immunology* 2015;194:3475–86.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402711>.
- [213] Włodarczyk M, Ograczyk E, Kowalewicz-Kulbat M, Drusczyńska M, Rudnicka W, Fol M. Effect of Cyclophosphamide Treatment on Central and Effector Memory T Cells in Mice. *International Journal of Toxicology* 2018;37:373–82.
<https://doi.org/10.1177/1091581818780128>.
- [214] Ding ZC, Zhou G. Cytotoxic chemotherapy and CD4+ effector T cells: An emerging alliance for durable antitumor effects. *Clinical and Developmental Immunology* 2012;2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/890178>.
- [215] Wojas-Turek J, Szczygieł A, Kicielińska J, Rossowska J, Piasecki E, Pajtasz-Piasecka E. Treatment with cyclophosphamide supported by various dendritic cell-based vaccines induces diversification in CD4+ T cell response against MC38 colon carcinoma. *International Journal of Oncology* 2016;48:493–505. <https://doi.org/10.3892/ijco.2015.3278>.
- [216] Mkrtychyan M, Najjar YG, Raulfs EC, Abdalla MY, Samara R, Rotem-Yehudar R, et al. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. *European Journal of Immunology* 2011;41:2977–86. <https://doi.org/10.1002/eji.201141639>.
- [217] Fernandez-Cruz E, Woda BA, Feldman JD. Elimination of syngeneic sarcomas in rats by a subset of T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1980;152(4):823-841.
doi:10.1084/jem.152.4.823
- [218] Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 2005;22:371–83.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.003>.
- [219] Greenberg PD, Kern DE, Cheever MA. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *The Journal of experimental medicine* 1985;161(5):1122-1134.
doi:10.1084/jem.161.5.1122
- [220] Qin, Z, and T Blankenstein. “CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells.” *Immunity* 2000;12,6: 677-86. doi:10.1016/s1074-7613(00)80218-6
- [221] Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8633-8638. doi:10.1073/pnas.96.15.8633

- [222] Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007;109(12):5346-5354. doi:10.1182/blood-2006-10-051318
- [223] Kim JE, Jang MJ, Lee JI, et al. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4+ T cells in peritoneal space. *Journal of Immunotherapy* 2012;35(1):1-13. doi:10.1097/CJI.0b013e3182328569
- [224] Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *Journal of Immunology*. 1998;161(5):2195-2200.
- [225] Williams N S, Engelhard V H. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *Journal of Immunology* 1996;156:153–9.
- [226] Sun Q, Burton RL, Lucas KG. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* 2002;99(9):3302-3309. doi:10.1182/blood.v99.9.3302
- [227] Principe N, Aston WJ, Hope DE, Tilsed CM, Fisher SA, Boon L, et al. Comprehensive Testing of Chemotherapy and Immune Checkpoint Blockade in Preclinical Cancer Models Identifies Additive Combinations. *Frontiers in Immunology* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.872295>.
- [228] Brooks J, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Niemann J, Ribback S, Peters K, et al. Perioperative, spatiotemporally coordinated activation of T and NK cells prevents recurrence of pancreatic cancer. *Cancer Research* 2018;78:475–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2415>.
- [229] Rossi A, Lucarini V, Macchia I, Sestili P, Buccione C, Donati S, et al. Tumor-Intrinsic or Drug-Induced Immunogenicity Dictates the Therapeutic Success of the PD1/PDL1 Axis Blockade. *Cells* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/cells9040940>.
- [230] Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhiredy D, Martins MM, et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168:487-502.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.022>.
- [231] Kwek SS, Kahn J, Greaney SK, Lewis J, Cha E, Zhang L, et al. GM-CSF and ipilimumab therapy in metastatic melanoma: Clinical outcomes and immunologic responses. *OncImmunity* 2016;5. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1101204>.
- [232] Pakpour N, Zaph C, Scott P. The central memory CD4+ T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. *Journal of Immunology* 2008;180(12):8299-8305. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8299

- [233] Zaph C, Rook KA, Goldschmidt M, Mohrs M, Scott P, Artis D. Persistence and function of central and effector memory CD4⁺ T cells following infection with a gastrointestinal helminth. *Journal of Immunology* 2006;177(1):511-518. doi:10.4049/jimmunol.177.1.511
- [234] Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, Yoshimura K, Horimoto K, Kitazawa M, et al. CD4⁺ T-cell immunity in the peripheral blood correlates with response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunology Research* 2020;8:334–44. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0574>.
- [235] Yan Y, Wang X, Liu C, Jia J. Association of lymphocyte subsets with efficacy and prognosis of immune checkpoint inhibitor therapy in advanced non-small cell lung carcinoma: a retrospective study. *BMC Pulmonary Medicine* 2022;22:166. <https://doi.org/10.1186/s12890-022-01951-x>.
- [236] Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *BioMed Research International* 2015;2015:621324. doi:10.1155/2015/621324

PRIEDAI

Priedas 1. Tyrime naudoti PGR pradmenys.

Genas	Tiesioginis pradmuo (5'-3')	Atvirkštinis pradmuo (5'-3')
<i>Prf1</i>	CTGCCACTCGGTCAGAAATG	CGGAGGGTAGTCACATCCAT
<i>Gzmb</i>	TCTCGACCCTACATGGCCTTA	TCCTGTTCTTTGATGTTGTGGG
<i>Gzma</i>	GGGAGATCAACCTGTCTTCCA	GTCTTGAGTGAGGAACAACCG
<i>Cxcl10</i>	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	GGCTCGCAGGGATGATTCAA
<i>Arg1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
<i>Lgals9</i>	TTACTGGACCAATCCAAGGAGG	AGCTGTTCTGAAAGTTCACCAC
<i>Nos2</i>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
<i>Haver2</i>	TCAGGTCTTACCCTCAACTGTG	GGGCAGATAGGCATTTTACCA
<i>Tigit</i>	CCACAGCAGGCACGATAGATA	CATGCCACCCCAGGTCAAC
<i>CD8a</i>	CCGTTGACCCGCTTCTGT	TTCGGCGTCCATTTTCTTTGG
<i>H2k1</i>	CAGGTGGAGCCCAGTATTG	CGTACATCCGTTGGAACGTG
<i>H2q7</i>	GAGCAGGCTGGTATTGCAGAG	CACCATAAGACCTGGGGTGA
<i>B2m</i>	TTCTGGTGCTTGCTCACTGA	CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC
<i>Psmb8</i>	ATGGCGTTACTGGATCTGTGC	GCGGAGAAACTGTAGTGTCCC
<i>Psmb9</i>	GGGACAACCATCATGGCAGT	CAGCAGCGGAACCTGAGAG
<i>Psmb10</i>	GACAAAAGCTGCGAGAAGATCC	CGCGTAGTCATCTCAGTGTCC
<i>H2d1</i>	TCGGCTATGTGGACAACAAGG	GGCCATAGCTCCAAGGACAC
<i>Tap1</i>	GGACTTGCCTTGTTCGAGAG	GCTGCCACATAACTGATAGCGA
<i>Tap2</i>	GACATGGCTTTACTTGGGTTGC	GTGCCCTCTATCCAGAGTCC
<i>Erap1</i>	TAATGGAGACTCATTCCCTTGGGA	AAAGTCAGAGTGCTGAGGTTTG
<i>H2q1</i>	CACGCAGTTTGTGCGCTTC	CGTGTGTTCCGTTCCCAATAC
<i>H2q4</i>	ATGGCGTCAACAATGCTGC	GGGACACGGAGGTGTAGAA
<i>Il2ra</i>	CAAGAACGGCACCATCCTAAA	TCCTAAGCAACGCATATAGACCA
<i>Tnfrsf9</i>	CGTGCAGAACTCCTGTGATAAC	GTCCACCTATGCTGGAGAAGG
<i>Eomes</i>	GCGCATGTTTCTTTCTTGAG	GGTCGGCCAGAACCACTTC
<i>Cxcl9</i>	GGAGTTCGAGGAACCCTAGTG	GGGATTTGTAGTGGATCGTGC
<i>Cxcl16</i>	ATACCGCAGGGTACTTTGGAT	CTGCAACTGGAACCTGATAAAGA
<i>Csf2</i>	GGCCTTGGAAGCATGTAGAGG	GGAGAACTCGTTAGAGACGACTT
<i>Cxcl5</i>	TCCAGCTCGCCATTCATGC	TTGCGGCTATGACTGAGGAAG
<i>Cd274</i>	AGTATGGCAGCAACGTCACG	TCCTTTTCCAGTACACCACTA
<i>Tgfb1</i>	CCACCTGCAAGACCATCGAC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
<i>Icos</i>	ACGCCATTTCAACTTGAGTGG	TCCTGGGAGACTTGTAAGGCA
<i>Ido1</i>	TGGCGTATGTGTGGAACCG	CTCGCAGTAGGGAACAGCAA
<i>Ifng</i>	ACAGCAAGGCGAAAAAGGATG	TGGTGGACCACTCGGATGA
<i>Gapdh</i>	AGGTGGTGTGAACGGATTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<i>Il7r</i>	GCGGACGATCACTCCTTCTG	AGCCCCACATATTGAAATTCCA
<i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Il4</i>	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGT

<i>Nler5</i>	GCTGAGAGCATCCGACTGAAC	AGGTACATCAAGCTCGAAGCA
<i>Irf1</i>	ATGCCAATCACTCGAATGCG	TTGTATCGGCCTGTGTGAATG
<i>Ifna4</i>	TGATGAGCTACTACTGGTCAGC	GATCTCTTAGCACAAGGATGGC
<i>Ifnb1</i>	CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC	GGCAGTGTA ACTCTTCTGCAT

Priedas 2. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos išduotas leidimas atlikti bandymus su laboratoriniais gyvūnais.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS
ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2017-05-16 Nr. G2-66
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. *specialusis leidimas*, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2017-05-19 išvada Nr. 5 „Dėl leidimo atlikti bandymo su gyvūnais projektą“.

l e i d ž i a m a š i a m ū k i o s u b j e k t u i a t l i k t i b a n d y m o s u g y v ū n a i s p r o j e k t ā:

duomenys apie ūkio subjektą:

pavadinimas Valstybinio mokslinio tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras,

adresas Molėtų pl. 29, Vilnius,

kodas Juridinių asmenų registre 302877556;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Gydomųjų priešvėžinių vakcinų efektyvumo tyrimas eksperimentiniuose pelių modeliuose“,

vadovas Adas Darinskas,

naudojami gyvūnai 120 pelių;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Valstybinio mokslinio tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras,

adresas Molėtų pl. 29, Vilnius.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau–vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*: Nenaudojama.

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja iki 2018 m. gruodžio 31 d.

Direktorius



Darius Remeika

* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“

Priedas 3. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos išduotas leidimas atlikti bandymus su laboratoriniais gyvūnais.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS
ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2019-06 -11 Nr. G2-118
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2019-05-29 išvada Nr. 12 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,

leidžiama šiam ūkio subjektui atlikti bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras,
adresas Molėtų pl. 29, Vilnius,

kodas Juridinių asmenų registre 302877556;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Chemo-imunoterapijų derinių efektyvumo, gydant indukuotus pelių uždegiminio ir neuždegiminio tipo navikus vertinimas“,

vadovas Karolina Žilionytė,

naudojami gyvūnai 378 pelės;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras,

adresas Molėtų pl. 29, Vilnius.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*:

Eil. Nr.	Vaisto pavadinimas	Gamintojas	Vaistinė forma	Kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą
I.	ISOFLURANE 1000 mg/g	Piramal Healthcare	skystis	1000 ml

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą galioja iki 2022 m. rugsėjo 30 d.

Direktoriaus pavaduotojas

Vidmantas Paulauskas

* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“.

SANTRAUKA

SUMMARY

Evaluation of chemoimmunotherapy efficacy in murine tumor models with different antigen processing and presentation mechanism functionality

ABBREVIATIONS

Ag - antigen

Ab - antibody

APPM - Ag processing and presentation mechanism

CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines

CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1

CDP - a group of mice treated cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1

CY – cyclophosphamide

DC - dendritic cell

DCV- dendritic cell vaccine

FBS – fetal bovine serum

Gr1⁺ MDC - myeloid derived cells, including myeloid-derived suppressor cells, neutrophils and granulocytes

IC₅₀ - the concentration required to induce 50% inhibition of cell growth

ICD - immunogenic cell death

ICI - immune checkpoint inhibitors

IP - intraperitoneally

Xeno SEL - sheep embryo lung tissue lysate

Xeno REN - rat embryo nerve tissue lysate

MDSC - myeloid-derived suppressor cells

MFI - mean fluorescence intensity

NK - natural killer

PD-1 - programmed cell death protein 1

PD-L1 - programmed cell death-ligand 1

s.c. - subcutaneously

SD - standard deviation

T_{EM} - effector memory T lymphocytes

TGI - tumor growth inhibition

Th - T helper lymphocytes

TIL - tumor infiltrating lymphocytes
TMB - tumor mutational burden
Treg - regulatory T lymphocytes

INTRODUCTION

Over the past decade, immunotherapy has become one of the most important treatments for oncology patients, enabling to achieve long-term remission and prolong survival [1]. However, immunotherapy's effectiveness is limited and treatment's positive effect is achieved only in some patients. The objective response rate of immune checkpoint inhibitors (ICIs), targeting the PD-1/PD-L1 pathway, is achieved in up to 40% of oncology patients [2], whereas the objective response rate to dendritic cell vaccines (DCV) is only 15% [3]. To improve the efficacy of immunotherapy, it is important to identify possible mechanisms of tumor resistance, determine predictive biomarkers for treatment individualization, and search for effective combined treatment strategies [1].

Various immunotherapies, including ICI, T lymphocyte therapy, and DCV, have different mechanisms of action but they all rely on CD8 T lymphocytes, the main cells in the fight against cancer cells [4]. Studies show that both the number of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and factors associated with T lymphocyte response, such as tumor mutational burden (TMB), neoantigen count, PD-L1 expression, have a predictive value for the individualization of treatment with T lymphocyte-based immunotherapy [5]. However, the successful clinical use of these predictive markers is hampered by their limitations, and the search for universal markers or their combinations thereof remains relevant to this day [6], [7].

The ability of CD8 T lymphocytes to recognize and kill tumor cells depends largely on the potency of the tumor cells to process antigens (Ag) and present them via the MHC-I molecule on their surface. Various proteins are involved in the Ag processing and presentation mechanism (APPM) and changes in the expression of genes encoding them can have a significant impact on the efficiency of tumor Ag presentation to the immune system and the antitumor immune response [8]. Studies suggest that decreased expression of individual APPM-encoding genes may lead to dysfunctional APPM, low TIL levels, resistance to ICI treatment, and reveal a potential predictive value of APPM for ICI application [9], [10], [11]. However, assessing the expression of individual APPM genes often yields ambiguous results that differ between cancer localizations and even within the same

localization and do not always correlate with response to treatment. APPM is complex, involving many different, coordinated proteins, and only a complex evaluation of APPM gene set expression can provide sufficient information about APPM functionality and remain a universal parameter regardless of differences between patients or cancer localizations.

To sensitize patients whose tumors have APPM dysfunctionality to immunotherapy, it becomes important to activate APPM in tumor cells. Studies show that the changes associated with the regulatory mechanism of APPM are reversible and can be modulated by various therapeutic measures [12]. Treatment with IFN- γ [13], DNA methyltransferases [14] and histone deacetylases inhibitors [15], and various chemotherapeutic agents [16], [17], [18] has been shown to activate APPM in tumor cells. Chemotherapeutic drugs are not only able to activate tumor cell's APPM but are also able to eliminate most tumor cells, induce immunogenic death of tumor cells, selectively eliminate immunosuppressive cells, and thus create a favorable environment for the action of immunotherapy [19].

Cyclophosphamide (CY) is a chemotherapeutic drug with various immune system modulating properties [17]. However, the effect of cyclophosphamide on tumor cell APPM remains unknown. Modulation of APPM functionality in tumor cells by chemotherapeutic agents would enable the effects of immunotherapy-activated immune mechanisms directed against tumor cells and allow the development of effective chemoimmunotherapeutic treatment strategies.

Aim

To evaluate the association of AAPM functionality in tumors with response to immunotherapy and combination therapy with cyclophosphamide in a murine tumor model.

Objectives

1. To determine APPM functionality in LLC1 and GL261 tumors.
2. To evaluate the effect of APPM functionality on the immune response against LLC1 and GL261 tumors.
3. To assess the relationship between APPM functionality in LLC1 and GL261 tumors and their sensitivity to dendritic cell vaccines and anti-PD-1 treatment.
4. To study the modulating effect of cyclophosphamide on tumor cell APPM and immune response.

5. To evaluate the effectiveness of CY, DCV, and anti-PD-1 combinations in the treatment of mice with tumors of different APPM functionality.

Novelty

1. Murine tumor models LLC1 and GL261 have been described in detail, revealing differences in their APPM functionality.
2. Relationship between APPM functionality in tumors and their sensitivity to DCV treatment has been revealed.
3. Set of genes whose expression predicts tumor sensitivity to DCV and anti-PD-1 treatment has been identified.
4. The ability of cyclophosphamide to activate APPM in tumor cells has been demonstrated.
5. Synergistic effect of cyclophosphamide, DCV, and anti-PD-1 in the treatment of mice with APPM dysfunctional tumors has been revealed.

Hypotheses

1. LLC1 and GL261 tumors are characterized by differences in APPM functionality.
2. APPM dysfunctionality results in inefficient tumor Ag presentation and inability of the immune system to recognize and destroy tumor cells.
3. APPM functionality is related to tumor sensitivity to immunotherapy.
4. Cyclophosphamide activates APPM in tumor cells and results in the formation of T lymphocytes with increased cytotoxicity and activating properties.
5. Combinations of cyclophosphamide, DCV, and anti-PD-1 result in the formation of an effective antitumor immune response and long-term immune memory.

METHODS

Mice and cell lines

C57BL/6 mice, 8 to 12 weeks of age, were obtained from State Research Institute Centre for Innovative Medicine (Vilnius, Lithuania). The research was approved by the State Food and Veterinary Service (Priedas 2, Priedas 3). Procedures with animals were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Animals had *ad libitum* access to food and water. C57BL/6 syngeneic tumor cell lines Lewis lung

carcinoma LLC1 and glioma GL261 were used as experimental models. These cell lines were a kind gift from JSC Froceth (Vilnius, Lithuania).

Evaluation of LLC1 and GL261 cell proliferation *in vitro*

10,000 LLC1 cells or 25,000 GL261 cells were seeded in 12-well plates and cultured in DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. After 48, 72, and 96 h cell number and viability were assessed.

Preparation of LLC1 and GL261 cell lysates

LLC1 and GL261 lysates were prepared by repeated freeze/thaw cycle in liquid nitrogen and +37°C water bath, centrifuged (4000 g, 10 min), and filtered through a 0.2- μ m syringe filter. Lysate protein concentration was assessed with a spectrophotometer.

Production of murine dendritic cell vaccines

Mouse dendritic cells (DC) were prepared according to Lutz et al. al protocol [180]. Isolated bone marrow cells were cultivated at 3×10^6 per Petri dish in 10 ml RPMI medium containing 10% FBS, 1% antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin), 20 ng/ml recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF. On days 3 and 6, dishes were supplemented with fresh medium maintaining the same concentration of GM-CSF. On day 7, DC maturation was induced by incubating with 15 μ g/ml LLC1 or GL261 lysate and 1 μ g/ml LPS for 24 hours. The quality of prepared DCs was assessed by flow cytometer before and after maturation based on the expression of CD11c, MHC-II, CD80, CD86 and CD40 markers.

Induction of immune response against LLC1 cells by injection of tumor Ag

Mice were injected with 3×10^5 LLC1 cells s.c. in the left hind foot. On day 14, when the tumors became visually visible and palpable, mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine and tumors were surgically removed along with the left foot. After 3 days, mice were injected with prepared autologous LLC1 lysate (3x150 μ g/100 μ l PBS IP), xenogeneic rat embryonic nerve tissue lysate (xeno REN, 3x300 μ g/100 μ l

PBS IP) or sheep embryonic lung tissue lysate (xeno SEL, 0,4 mg s.c./0,6 mg s.c./1,2 mg/100 μ l PBS IP). Xeno REN was prepared by project co-authors from R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology (Ukraine), and Xeno SEL – from Emmanuel Kant University, Institute of Clinical Immunology (Kaliningrad, Russia). Response to treatment was assessed by overall mice survival and peripheral blood from the hip vein was collected for CD8 lymphocyte count evaluation with the flow cytometer.

Induction and monitoring of LLC1 and GL261 tumors growth in mice

Tumors were induced by subcutaneous (s.c.) injection of 4×10^5 LLC1 cells or 3×10^6 GL261 cells in the left flank of mice. For accurate tumor injection, mice were anesthetized by inhalation with isoflurane. When the tumors became palpable, their length and width were measured every 2-3 days and their volume was calculated according to the formula:

$$tumor\ volume = \frac{length \times width^2}{2}$$

When the tumors reached the appropriate size (depending on the experiment), mice were sacrificed by cervical dislocation and the tumor samples were collected. Mice were also sacrificed when tumors reached 2-2,5 cm^3 . Therapy-induced tumor growth inhibition index (TGI) was evaluated according to the formula:

$$TGI = \frac{(1 - \frac{V_{t1}}{V_{t0}}) / (\frac{C_{t0}}{C_{t1}})}{(1 - \frac{C_{t0}}{C_{t1}})} \times 100\%$$

V- treated group, C – control group; 0 – tumor volume at the start of the treatment, 1 – tumor volume at a given time.

Evaluation of sensitivity to immunotherapy in mice with LLC1 or GL261 tumors

Mice were induced with LLC1 or GL261 tumors s.c., their size was monitored, and when they reached a size of 50-100 mm^3 , the mice were divided into three groups: control (untreated), DCV (3 doses \times 1 million DCV/100 μ l of PBS every four days s.c.), anti-PD-1 (3 doses \times 200 μ g/100 μ l of PBS every four days IP). Response to immunotherapy was evaluated according to the tumor growth inhibition effect and induced changes in tumor immune infiltrate and immune-related gene expression.

Evaluation of LLC1 or GL261 cell's sensitivity to cyclophosphamide *in vitro*

2×10^3 LLC1 and 3×10^3 GL261 cells were seeded in 96-well plates. After 24 hours of cultivation the medium was removed and replaced with new medium supplemented with 0,1; 0,39; 1,56; 6,25; 25; 100 $\mu\text{g/ml}$ CY concentration. After 24 and 48 h of incubation, cell viability was assessed with CCK-8 and the concentration of CY required to inhibit the proliferation of LLC1 and GL261 cells by 50% (IC_{50}) was calculated.

Cyclophosphamide modulating effect on LLC1 and GL261 cells *in vitro*

7×10^4 LLC1 and 1×10^5 GL261 cells were seeded in 24-well plates. After 24 hours of cultivation the medium was removed and replaced with new medium supplemented with 1,3 or 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY. After 4 h, the medium with CY was removed and were replenished with fresh medium. 24 and 48 h after exposure surface expression of calreticulin and MHC-I on LLC1 and GL261 cells was assessed by flow cytometry. The APPM-related gene expression was evaluated as well.

Evaluation of the efficacy of cyclophosphamide treatment in mice with LLC1 and GL261 tumors

Prior to initiation of treatment, effective doses of CY for the treatment of tumor-bearing mice were determined *in vivo* - 140 mg/kg for LLC1 and 90 mg/kg for GL261. After selecting the optimal doses, LLC1 or GL261 tumors were induced in mice and treatment with optimal CY doses was initiated when the tumors reached 50-100 mm^3 . Treatment of mice consisted of 3 doses of CY administered every six days. The efficacy of CY treatment was assessed by tumor growth inhibition effect, induced changes in tumor immune infiltrate, as well as immune-related and APPM-related genes expression.

Evaluation of the efficacy of cyclophosphamide and immunotherapy combinations in mice with LLC1 and GL261 tumors

When LLC1 and GL261 tumors reached 50-100 mm^3 , mice were divided into groups and treatment was started:

1. C – control mice;
2. CY – mice treated with cyclophosphamide;

3. CD – mice treated with cyclophosphamide and DCV;
4. CP – mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1;
5. CDP – mice treated with cyclophosphamide, DCV, and anti-PD-1.

The effectiveness of the combination treatment was evaluated by the ability to suppress tumor growth, as well as by the induced systemic and tumor-specific immune response and the expression of immune-related genes.

In the case of GL261 tumors, to assess whether the treatment activated immune memory, on 68 experiment day mice were re-inoculated with GL261 cells on the right side, opposite to the primary tumor.

Preparation of mouse tumor and spleen samples

Tumors were divided into pieces – some of the tumor fragments were placed in Trizol and snap frozen in liquid nitrogen (for RT-PCR), another part were disaggregated with collagenase type IV (100 U/mL) and DNase I (40 U/mL) and frozen in a special medium (for flow cytometry). Spleens were filtered through a 70 µm filter, red blood cells were lysed, and cells were frozen in Trizol (for RT-PCR) or in a special medium (for flow cytometry). For analysis of samples by flow cytometry, samples were incubated with monoclonal Ab.

In the characterization of the immune environment of LLC1 and GL261 tumors and evaluation of the local and systemic immune response to CY, DCV, anti-PD-1, and their combinations, the following was evaluated (for systemic immune response analysis in spleen CD45 was not included):

- Population of NK cells - CD45+CD3-NK1.1+
- B lymphocyte population - CD45+CD3-NK1.1-CD19+B220+
- CD4 T lymphocyte population - CD45+CD3+CD4+
- CD8 T lymphocyte population - CD45+CD3+CD8+
- CD4 T_{EM} lymphocyte population-CD45+CD3+CD4+CD44+CD62L-
- CD8 T_{EM} lymphocyte population-CD45+CD3+CD8+CD44+CD62L-
- Population of M1 macrophages - CD45+CD11b+F480+CD206-
- Population of M2 macrophages - CD45+CD11b+F480+CD206+
- Dendritic cell population - CD45+CD11b+F480-CD11c+
- Gr1 + myeloid cell population - CD45+CD11b+F480-CD11c-Gr1+

Before labeling with antibodies, samples were incubated with Fc receptor-blocking MoAb, thereby reducing non-specific MoAb binding. Incubation of cells with MoAb was performed at room temperature in the dark for 25 min. Cells were subsequently washed with PBS solution from non-adherent MoAb and analyzed with BD LSR II flow cytometer.

Compensation was performed when labeling cells with MoAk with overlapping fluorochrome spectra.

Analysis of immune-related gene expression by RT-PCR

Total mRNA from LLC1 and GL261 tumor and spleen samples were extracted with Trizol. The quantity and quality of the isolated mRNA were evaluated with a NanoDrop 2000c spectrophotometer. mRNA was reverse transcribed into the cDNA using the Maxima First Strand cDNA synthesis kit. The PCR primers required for gene expression analysis were taken from the PrimerBank database (pga.mgh.harvard.edu/primerbank) (Priedas 1). The RT-PCR was started from polymerase activation for 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95° C and 30 s at 60°C. *Gapdh* was used as the reference gene. RT-PCR was performed using an Azure Cielo 3 thermocycler using a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix kit. The analysis of the obtained data was performed using Azure Cielo Manager software. The $\Delta\Delta CT$ method was used to assess changes in gene expression.

Statistical data analysis

The obtained results were statistically analyzed and displayed in graphs using GraphPad Prism 9. The normal and lognormal distribution of the data was assessed by the Shapiro-Wilk test. A two-tailed unpaired Student's t-test was used to assess statistical significance between data with normal distribution. Otherwise, the Mann-Whitney U test was performed. For more than two groups, statistical significance between the data was assessed by Type I ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons.

A statistical comparison of mouse tumor growth curves was performed using the online tool TumGrowth [182]. Longitudinal analysis of tumor growth was done using mixed-effect modeling and type II ANOVA.

Survival results were analyzed with a log-rank test and expressed as Kaplan–Meier survival curves.

To characterize the immune gene expression profile of LLC1 and GL261 cells, the ΔC_T method was used and the data were z-transformed (when z value > 0 – value is higher than mean, when z < 0 – value is lower than mean). For gene expression analysis, p-values were corrected using the FDR (False detection rate) method of Benjamini, Krieger, and Yekutieli when $FDR(Q) = 1\%$.

At least three replicates were performed, data are presented as mean \pm SD. Significant differences are shown as ***** $0,0000001 < p < 0,000001$, **** $0,000001 < p < 0,00001$, **** $0,00001 < p < 0,0001$, *** $0,0001 < p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

RESULTS

In vitro proliferation of LLC1 and GL261 cells

The proliferative potential of LLC1 and GL261 cells was assessed (Figure 1). The doubling time (DT) of LLC1 cells was found to be 20,5 h and of GL261 cells – 66 h. To make equal experimental conditions, the proportional number of LLC1 and GL261 cells was maintained in further experiments.

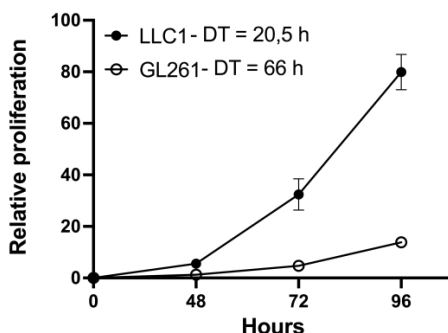


Figure 1. Relative proliferation of LLC1 and GL261 cells. Data are presented as mean \pm SD, n=4. DT – doubling time.

APPM functionality in LLC1 and GL261 cells

Analysis of APPM in LLC1 and GL261 cells was initiated by assessing surface MHC-I molecule expression (Figure 2, a). Significantly lower expression of MHC-I was found on the surface of LLC1 cells; its mean fluorescence intensity MFI was 140 ± 37 , compared to GL261 cells, whose MFI of MHC-I expression was 2307 ± 251 ($p=0,000001$). Since the LLC1 and GL261 tumor's sensitivity to anti-PD-1 treatment *in vivo* will be assessed later, PD-L1 expression on the surface of LLC1 and GL261 cells was also measured. Both LLC1 and GL261 cells showed surface PD-L1 expression (MFI 199 ± 31 and 342 ± 116 respectively, $p=0,08$), suggesting that both tumors may potentially respond to anti-PD-1 treatment (Figure 2).

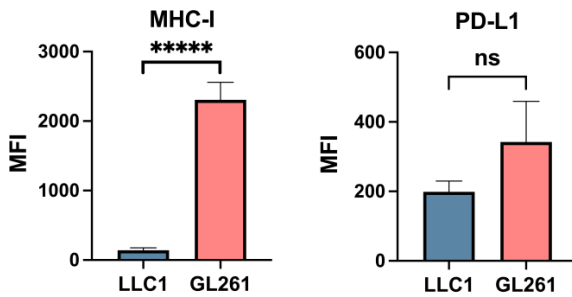


Figure 2. Flow cytometric analysis of MHC-I and PD-L1 protein expression on the surface of LLC1 and GL261 cells. MFI of MHC-I and PD-L1 expression are presented as the mean±SD, n=4. MFI - mean fluorescence intensity. Significant differences are represented as *****, 0,000001 p<0,00001.

The expression of genes involved in APPM - *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* - was also evaluated in LLC1 and GL261 tumors (n=6) (Figure 3). Compared with GL261 tumors, significantly lower expression of *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* genes was observed in LLC1 tumors, indicating that APPM is impaired at various levels in LLC1 cells.

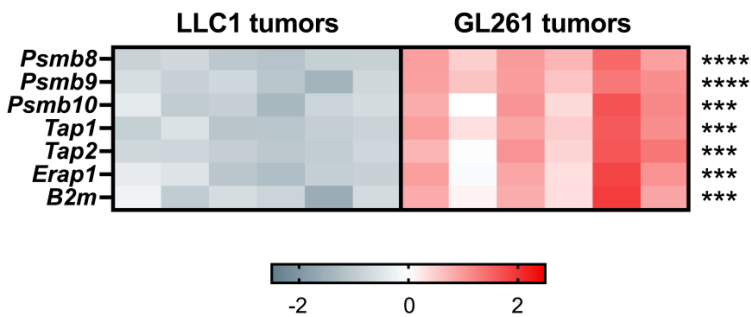


Figure 3. Expression analysis of APPM-related genes by RT-PCR in LLC1 and GL261 tumors. 6 LLC1 and GL261 tumors of 200-300 mm³ size were analyzed. Values for each gene were converted to a z-score. Significant differences are represented as *****, 0,00001 p<0,0001, *** 0,0001 p<0,001, ** 0,001 p<0,01, * 0,01 p<0,05.

These results reveal molecular APPM differences between LLC1 and GL261 cells. Low expression of the surface MHC-I and APPM-encoding genes *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* indicate impaired APPM in LLC1 cells. Meanwhile, in GL261 cells, the high expression of

surface MHC-I and APPM-encoding genes *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* reflect functional APPM.

The relationship between APPM functionality in tumor cells and the nature of the tumor immune microenvironment

To evaluate whether differences in APPM functionality affect the formation of immune response against LLC1 and GL261 cells, subcutaneous tumors were induced in mice and their growth was observed. (Figure 4, a).

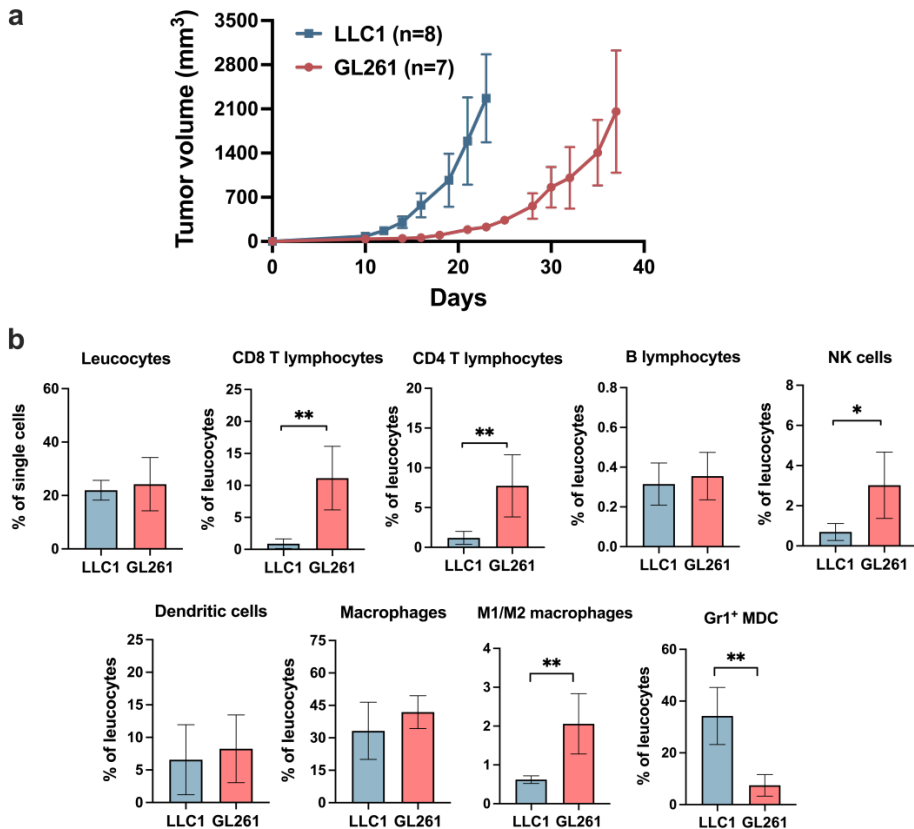


Figure 4. Characterization of growth and immune composition of LLC1 and GL261 tumors. a – Tumors growth curves. Tumor size was measured with a caliper every 2-3 days. Results are represented as mean±SD. b - Flow cytometric analysis of immune infiltrate composition in LLC1 and GL261 tumors. Six LLC1 and GL261 tumors of 200-300 mm³ size were collected for analysis. Gr1⁺ MDC – Gr1⁺ myeloid derived cells. M1/M2 macrophage graph shows the ratio of M1 to M2 macrophages percentage in the tumor. Results are shown as mean±SD, LLC1 n=3-4, GL261 n=4-5. Significant differences are shown in graphs as ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p≤0,05.

Firstly, different rates of tumor growth were observed - GL261 tumors developed significantly slower than LLC1 tumors ($p < 0,0001$). Although the overall percentage of leukocytes in these tumors was similar ($22 \pm 3,7\%$ and $24,2 \pm 9,9\%$, respectively, $p > 0,05$), differences in the immune infiltrate composition were observed (Figure 4, b). GL261 tumors were significantly more infiltrated by CD8 T lymphocytes and NK cells compared to LLC1 tumors ($p = 0,003$ and $p = 0,01$, respectively).

Compared with LLC1 tumors, GL261 tumors also showed significantly higher expression of genes associated with CD8 T lymphocytes and NK cells cytotoxicity, such as *Gzma* ($p = 0,01$), *Gzmb* ($p = 0,002$) and *Ifng* ($p = 0,0008$), confirming the development of cytotoxic immune response (Figure 5). Low percentage of CD8 T lymphocytes and NK cells and lower expression of cytotoxicity-related genes *Gzma*, *Gzmb*, and *Ifng* in LLC1 tumors suggest that cytotoxic mechanisms were not predominant.

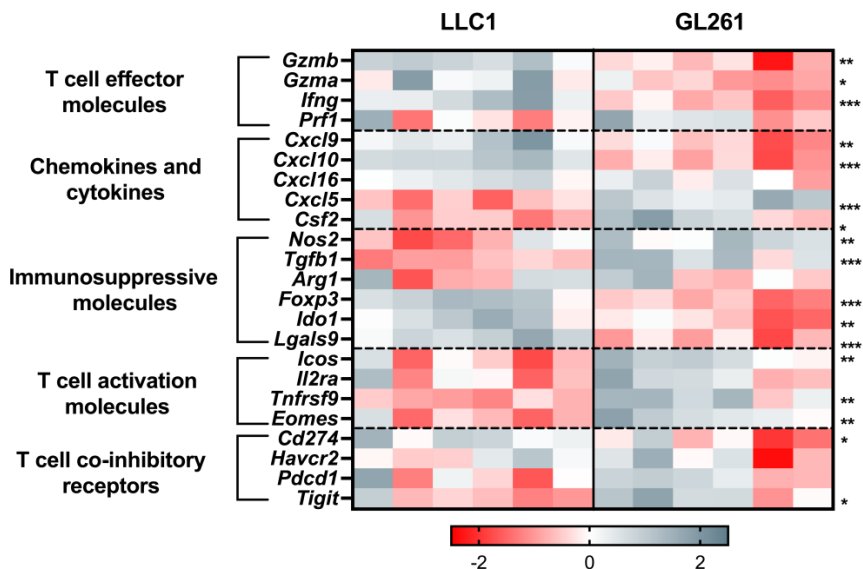


Figure 5. RT-PCR analysis of immune-related gene expression in LLC1 and GL261 tumors. Six LLC1 and GL261 tumors of 200-300 mm³ size were collected for analysis. Values for each gene were converted to a z-score. Significant differences in gene expression are shown in graphs, *** 0,0001 < p < 0,001, ** 0,001 < p < 0,01, * 0,01 < p < 0,05.

However, a similar percentage of LLC1 and GL261 tumors infiltrating DC ($p > 0,05$) was found, indicating that DC infiltration into LLC1 tumors is not impaired and may elicit a tumor-specific immune response. This is

further confirmed by the expression of T lymphocyte activation markers such as *Icos* and *Tnfrsf9*, which was higher in LLC1 tumors compared with GL261. These results indicate that DCs were able to activate T lymphocytes, but T lymphocytes were possibly unable to recognize LLC1 cells due to the impaired APPM.

LLC1 and GL261 tumors were also dominated by different immunosuppressive mechanisms. Compared with LLC1 tumors, CD4 T lymphocyte infiltration was higher in GL261 tumors, and further analysis of *FoxP3* and *Ido1* expression allowed some of those lymphocytes to be identified as Treg lymphocytes. Also, different subtypes of macrophages predominated in LLC1 and GL261 tumors - GL261 tumors were dominated by M1 macrophages, associated with the antitumor immune response, while LLC1 tumors were dominated by M2 macrophages, promoting tumor progression [4]. In LLC1 tumors, significantly higher levels of Gr1⁺ MDC, including MDSC, neutrophils and granulocytes, were observed. They also showed increased expression of *Nos2* and *Tgfb1*, which is associated with immune response suppression by MDSC [184].

Induction of an immune response against LLC1 tumors with non-functional APPM

To evaluate whether it is possible to stimulate an immune response against LLC1 tumors by therapeutic means, LLC1 tumors were induced, when removed and mice were given three doses of autologous and xenogeneic lysates (Figure 6, a). The purpose of these vaccines was to induce DC activation and T lymphocyte response against LLC1 cells, ensuring the removal of residual LLC1 cells and preventing the formation of metastases. Xenogeneic lysates were selected as positive controls - they contain oncofetal and cancer-testis antigens, which are often expressed in tumor cells [50],[185],[186].

At the end of the experiment, the survival of control mice was 40% (Figure 6, b). Vaccination with xeno REN lysate did not have a positive effect on the survival of mice, which was 40% ($p > 0,05$). Vaccination with LLC1 lysate slightly improved the survival of mice by up to 60% ($p > 0,05$). Only xeno SEL lysate ensured 100% survival of mice (vs. control, $p=0,004$; vs. LLC1 lysate and vs. SEL, $p=0,004$). Also at the end of the experiment in this group significant increase in CD8 T lymphocyte count was observed compared to control mice (Figure 6, c).

These results demonstrated that dysfunctional tumor APPM results in immune system disability in recognizing and destroying tumor cells.

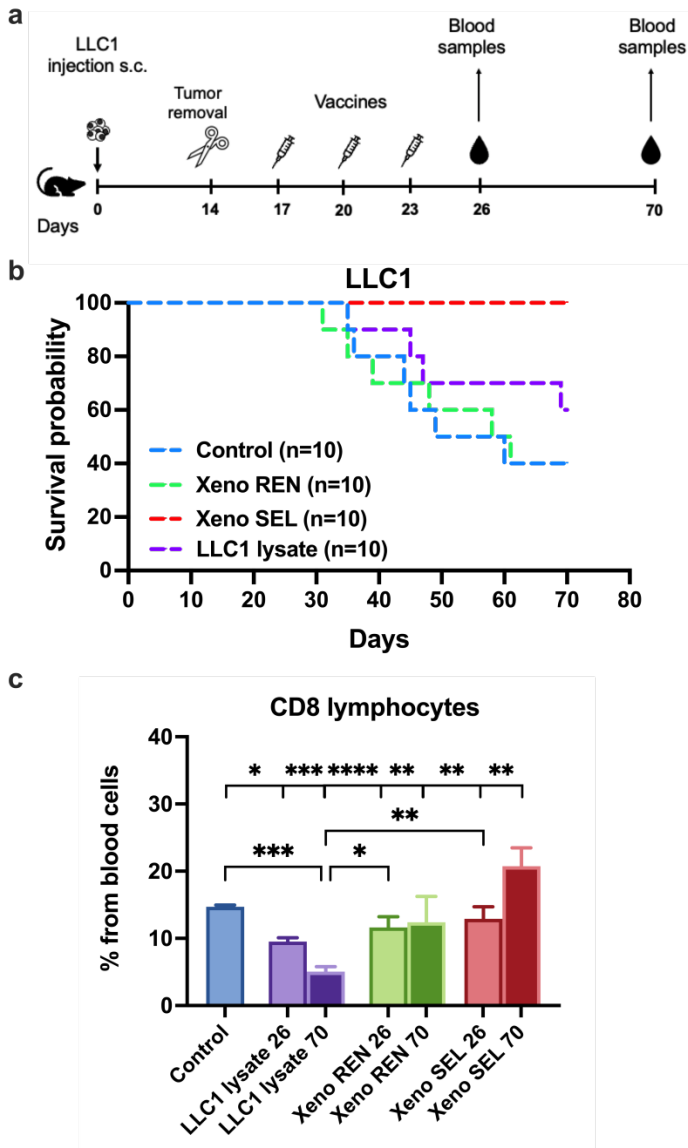


Figure 6. Survival of mice after vaccination with autologous LLC1 lysate or xenogeneic lysates. a - scheme of the experiment. b - mice survival curves. c - Flow cytometric evaluation of CD8 T lymphocytes in the blood of mice after vaccination with autologous and xenogeneic lysates. Blood was taken on the 26th and 70th day of the experiment and is marked as 26 and 70, respectively. Results are shown as mean±SD, n=3. Significant differences are shown in graphs, **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p≤0,05. Xeno REN – rat embryo nerve tissue lysate, xeno SEL – sheep embryo lung tissue lysate.

No cytotoxic immune responses associated with CD8 T lymphocytes and NK cells were observed in LLC1 tumors with dysfunctional APPM. However, the formation of cytotoxic immune response was observed in GL261 tumors with active APPM. This experiment shows that the immune response against LLC1 cells can be induced therapeutically, but effective treatment strategies are needed.

Evaluation of the quality of murine dendritic cells vaccines prepared *ex vivo*

Prepared DCV were evaluated morphologically and phenotypically after differentiation and maturation stages to confirm their suitability for treatment. Maturation with LLC1 or GL261 lysate induced morphological DC changes - cytoplasmic veils appeared on their surface (Figure 7, a).

DC maturation is further confirmed by the increased proportion of:

- CD11c⁺/CD80⁺ ($p > 0,05$ immature DC vs. DC+LLC1/+GL261);
- CD11c⁺/CD86⁺ ($p = 0,0005$ immature DC vs. DC+LLC1; $p = 0,00003$ vs. DC+GL261);
- CD11c⁺/CD40⁺ ($p = 0,009$ immature DC vs. DC+LLC1; $p = 0,009$ with DC+GL261);
- CD11c⁺/MHC II^{high} ($p = 0,00006$ immature DC vs. DC+LLC1; $p = 0,000004$ vs. DC+GL261) cell population size in prepared DCs (Figure 7, b).

DCs matured with LLC1 or GL261 lysates resembled properties of mature DCs and could induce an antitumor immune response when injected into mice.

Relationship between tumor APPM functionality and response to dendritic cell vaccine and anti-PD-1

LLC1 or GL261 tumors were induced s.c. and were treated according to the plan shown in Figure 8, a. Treatment with DCV or anti-PD-1 did not have any inhibitory effect on LLC1 tumor growth, which developed at a similar rate to untreated mice (Figure 8, b). In contrast, both DCV and anti-PD-1 treatment significantly inhibited GL261 tumor growth. The TGI of DCV reached 55% and 71% for anti-PD-1.

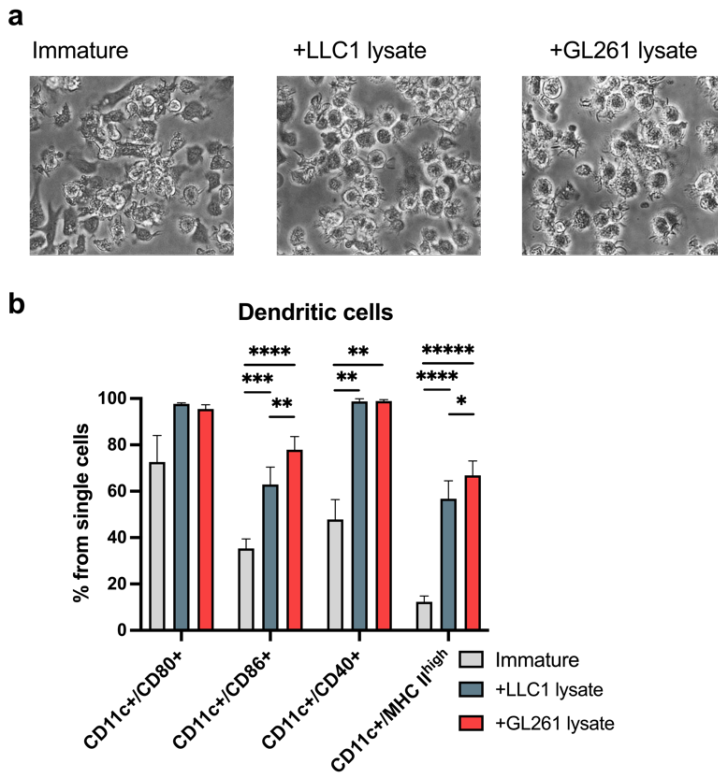


Figure 7. Evaluation of murine DC quality before and after 24 h maturation with LLC1 or GL261 lysates and LPS. a - DC morphology at 400x magnification. b - evaluation of DC phenotype by flow cytometry. DC phenotype was assessed by the expression of CD11c together with CD80/CD86/CD40/MHC-II. DC – dendritic cell, LPS – lipopolysaccharide. Results are shown as mean±SD, n=4. Significant differences are represented as *****, 0,000001<p<0,00001, **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p< 0,01, * 0,01<p≤0,05.

Increased leukocyte infiltration was observed in GL261 tumors, but no positive immunotherapy effect on leukocyte counts was seen in LLC1 tumors (Figure 9, a). In GL261 tumors immunotherapy also increased the number of NK cells (control vs. DCV p=0,01; vs anti-PD-1 p=0,004) and CD8 T lymphocytes, especially in the group of mice treated with anti-PD-1 (control vs. anti-PD-1 p=0,001).

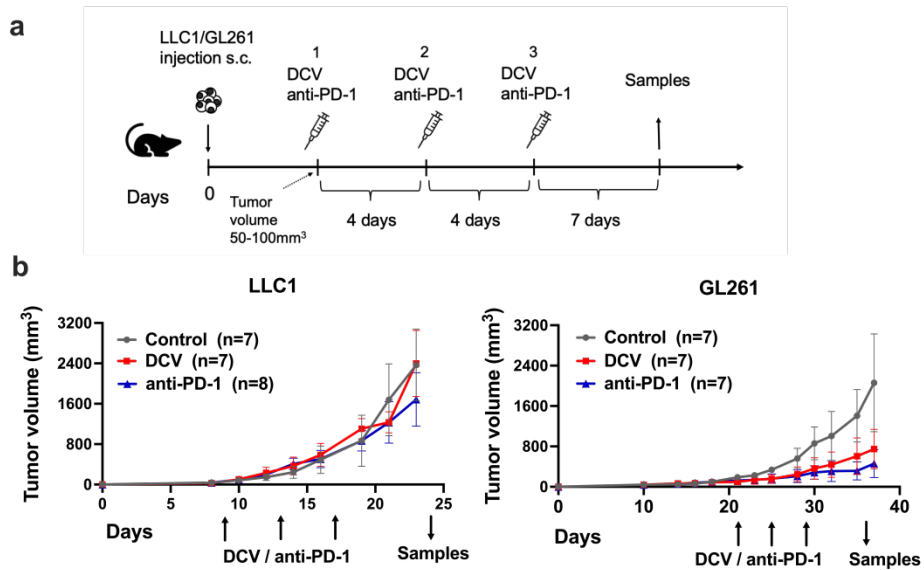


Figure 8. LLC1 and GL261 tumors response to DCV and anti-PD-1. a - vaccination and sampling plan. b - LLC1 and GL261 tumor growth curves. Tumor size was measured every 2-3 days with a caliper. Results are shown as mean±SD.

Immunotherapy-induced activation of the immune response against GL261 cells is further confirmed by an increase in cytotoxicity-related genes such as *Ifng* (control vs. anti-PD-1 $p=0,01$), *Gzmb* (control vs. DCV $p=0,04$; vs. anti-PD-1 $p=0,01$) and T lymphocyte activation marker *Tnfrsf9* (control vs. anti-PD-1 $p=0,04$) expression (Figure 9, b). Increased expression of chemokines *Cxcl9* (control vs. anti-PD-1 $p=0,0009$) and *Cxcl10* (control vs. DCV $p=0,008$, vs. anti-PD-1 $p=0,03$), closely related to T lymphocyte infiltration, were also observed in GL261 tumors. In LLC1 tumors immunotherapy had no significant effect on NK cell or CD8 T lymphocyte infiltration or the expression of *Ifng*, *Gzmb*, *Cxcl9*, *Cxcl10* and *Tnfrsf9*, which explains the lack of a positive treatment effect.

No change in the number of immunosuppressive cells was observed in LLC1 and GL261 tumors after treatment (data not shown). Nevertheless, the expression of *Arg1* significantly increased in GL261 tumors after treatment (control vs. DCV $p=0,04$, vs. anti-PD-1 $p=0,04$), possibly as a reaction to treatment-induced antitumor immune response.

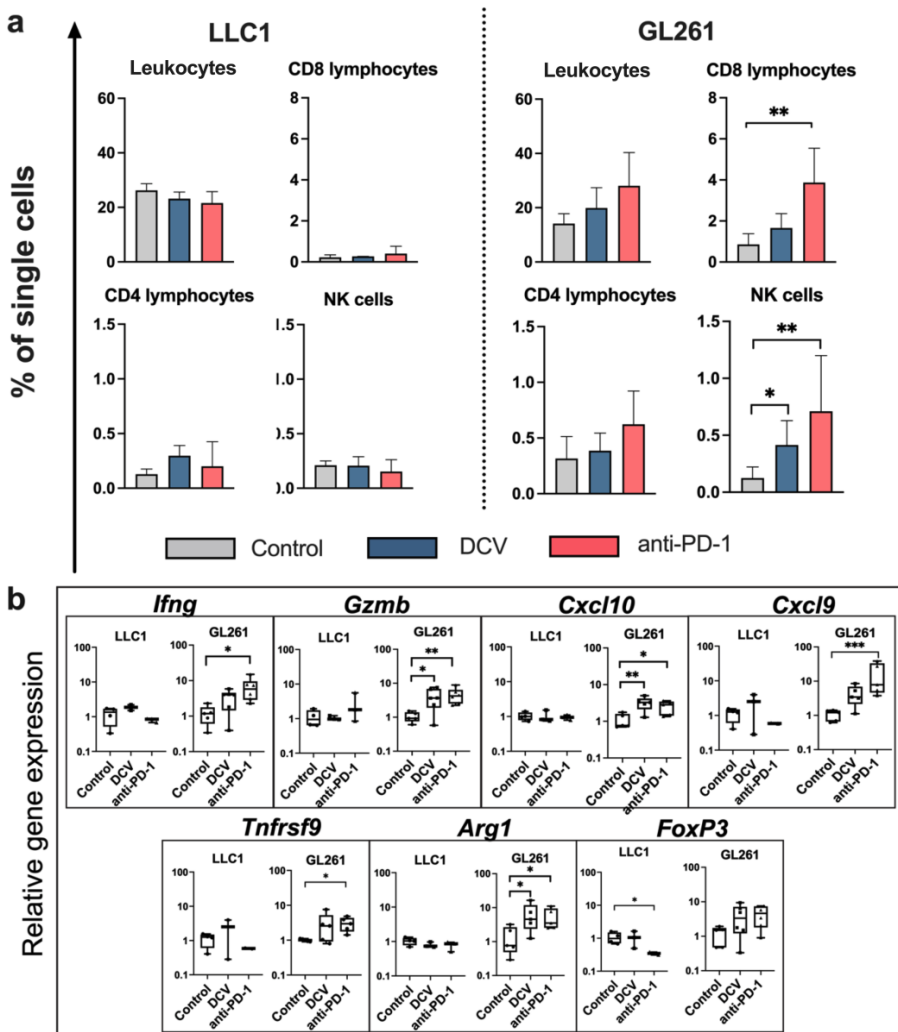


Figure 9. LLC1 and GL261 tumors response to DCV and anti-PD-1. a - flow cytometric analysis of immune cell infiltration in LLC1 and GL261 tumors after treatment with DCV or anti-PD-1. Tumor samples were collected seven days after the end of treatment. b – RT-PCR analysis of immune-related gene expression in collected LLC1 and GL261 tumors. Results are shown as mean \pm SD, LLC1 n=3-4, GL261 n=4-5. Significant differences are represented as *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p< 0,01, * 0,01<p \leq 0,05.

These results show that APPM functionality in tumor cells is related to their sensitivity to immunotherapy - DCV and anti-PD-1. LLC1 tumors in which APPM was dysfunctional were resistant to immunotherapy - treatment

did not induce an anti-tumor immune response. Although APPM was functional in GL261 tumors and immunotherapy effectively suppressed tumor growth and induced an antitumor immune response but failed to ensure complete tumor elimination. This shows that despite tumor's sensitivity to immunotherapy, combinatorial treatment strategies are needed to break the immunosuppressive barriers of the tumor and help to reveal the positive effect of immunotherapy. Due to the broad immunostimulatory properties, it was decided to study chemotherapeutic drug cyclophosphamide effect on LLC1 and GL261 cells and to evaluate the effectiveness of its combinations with DCV and anti-PD-1 in the treatment of mice with tumors of different APPM functionality.

Cyclophosphamide immunomodulatory effect on LLC1 and GL261 cells *in vitro*

The aim of this experiment was to evaluate LLC1 and GL261 cell's sensitivity to CY (Figure 10), CY ability to induce immunogenic cell death (Figure 11) and to activate APPM *in vitro* (Figures 12-15).

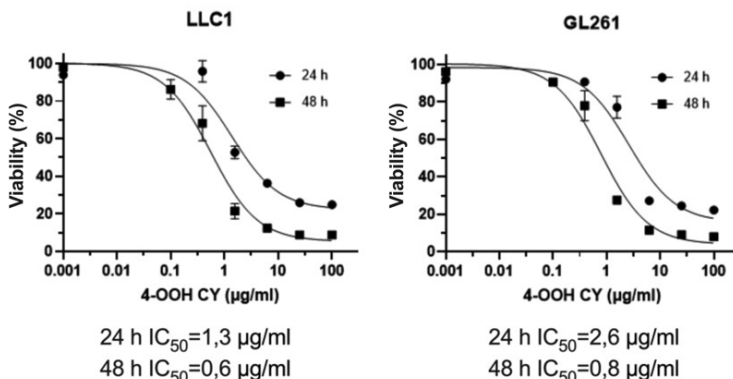


Figure 10. Evaluation of LLC1 and GL261 cell sensitivity to CY by colorimetric CCK8 assay *in vitro*. Cell viability was measured 24 and 48 h after exposure to CY. 4-OOH CY – cyclophosphamide. Data are presented in the graph as the mean±SD, n=5.

Because CY is an inactive form, its active form, 4-hydroxyperoxy cyclophosphamide, has been used in *in vitro* studies. Firstly, it was shown that LLC1 and GL261 cells were sensitive to CY. IC₅₀ CY concentration for LLC1 cells was 1,3 µg/ml after 24 hours and 0,6 µg/ml after 48 h, while for GL261 cells – 2,6 µg/ml and 0,8 µg/ml, respectively.

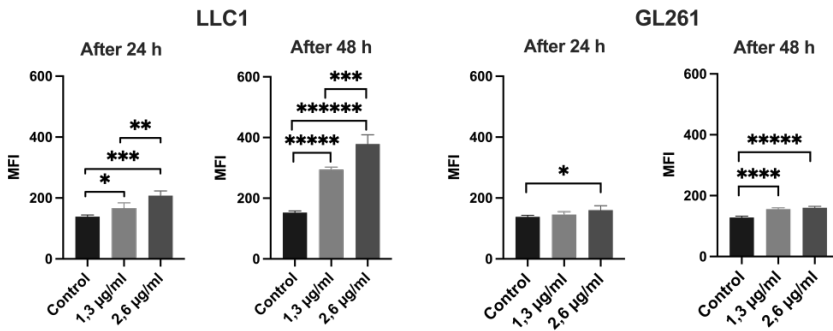


Figure 11. Flow cytometric evaluation of CY effect on surface calreticulin expression. LLC1 and GL261 cells were exposed to 1,3 or 2,6 µg/ml CY for 4 h, then replaced with fresh medium. Calreticulin expression was evaluated 24 and 48 h after exposure by labeling cells with anti-calreticulin-AlexaFluor647. Calreticulin MFI data are presented as mean±SD, n=4. MFI – mean fluorescence intensity. Significant differences are represented as *****, 0,000001 < p < 0,000001, *****, 0,000001 < p < 0,00001, *****, 0,00001 < p < 0,0001, ***, 0,0001 < p < 0,001, **, 0,001 < p < 0,01, *, 0,01 < p < 0,05.

Since CY is eliminated from mouse body within 4 h, to accurately reproduce the real conditions and evaluate the immunomodulatory effect of CY on LLC1 and GL261 cells, they were exposed to CY for 4 h *in vitro* after which the drug was removed and replaced with fresh medium.

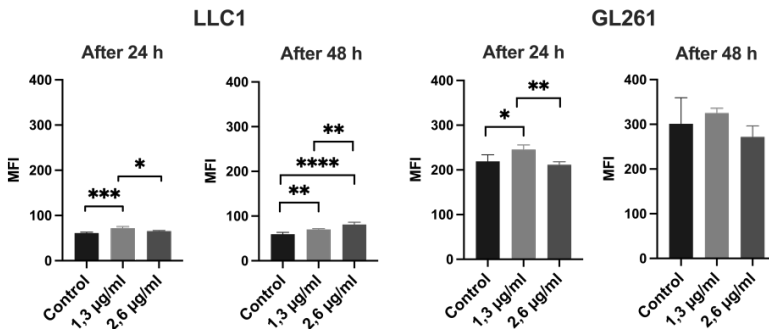


Figure 12. Flow cytometric evaluation of CY effect on surface MHC-I expression. LLC1 and GL261 cells were exposed to 1,3 or 2,6 µg/ml CY for 4 h, then replaced with fresh medium. Calreticulin expression was evaluated 24 and 48 hours after exposure by labeling cells with anti-MHC-I-PerCP-eFluor710. MHC-I MFI data are presented as mean±SD, n=4. MFI – mean fluorescence intensity. Significant differences are represented as *****, 0,00001 < p < 0,0001, ***, 0,0001 < p < 0,001, **, 0,001 < p < 0,01, *, 0,01 < p < 0,05.

CY's ability to induce immunogenic cell death was assessed by the expression of endoplasmic reticulum protein calreticulin on LLC1 and GL261 cell surfaces (Figure 11).

After 24 hours, calreticulin expression on LLC1 cells was significantly increased after exposure to 1,3 $\mu\text{g/ml}$ or 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY (control vs. 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,045$, vs. 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,0002$; 1,3 $\mu\text{g/ml}$ with 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,007$) and on GL261 cells after exposure to 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY (control vs. 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,04$). A further increase in calreticulin expression was observed 48 h after exposure to CY (LLC1 - control vs 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,000005$, vs. 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,0000001$; 1,3 $\mu\text{g/ml}$ vs. 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,0003$; GL261 - control with 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,00003$; control with 2,6 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,000008$). These results show that calreticulin expression on the cell surface increased over time and depended on the concentration of CY.

Evaluation of CY effect on APPM started with the measurement of MHC-I molecule expression on the surface of LLC1 and GL261 cells (Figure 12).

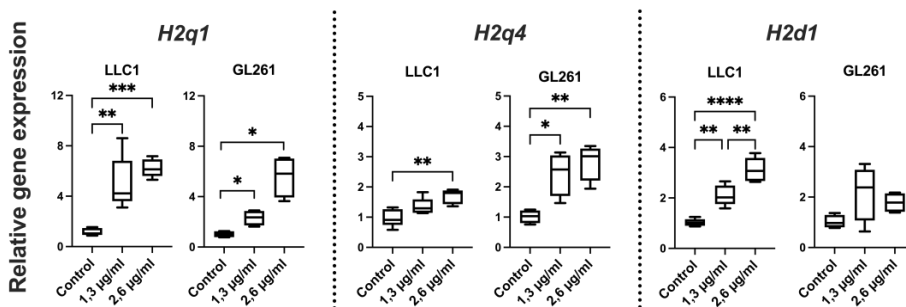


Figure 13. RT-PCR analysis of genes encoding MHC-I molecule expression in LLC1 and GL261 cells after exposure to CY *in vitro*. LLC1 and GL261 cells were exposed to 1,3 or 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY for 4 h, then replaced with fresh medium and gene expression was measured 48 h after exposure to CY. Results are presented in graphs as mean \pm SD, $n=5$. Significant differences are represented as **** $0,00001 < p < 0,0001$, *** $0,0001 < p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$.

After 24 h a significant increase in MHC-I expression was observed on the surface of LLC1 and GL261 cells exposed to 1,3 $\mu\text{g/ml}$ CY (LLC1 - control vs. 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,0006$; GL261 - control vs. 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,005$), which was more pronounced compared to cells treated with 2,6 $\mu\text{g/ml}$ CY (LLC1 2,6 $\mu\text{g/ml}$ vs. 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,02$; GL261 - 2,6 $\mu\text{g/ml}$ vs. 1,3 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,005$). CY-induced activation of MHC-I expression on the surface of

LLC1 cells remained significantly elevated 48 h after exposure and was dose-dependent. No changes in MHC-I expression were observed on GL261 cells 48 hours after exposure.

After 48 h post-exposure to CY increased expression of surface MHC-I on LLC1 cells was also confirmed by the expression of MHC-I encoding genes (Figure 13). *H2q1*, *H2q4* and *H2d1* expression significantly increased in LLC1 cells and depended on CY concentration. An analogous situation was observed in GL261 cells - 48 hours after exposure to CY, the expression of *H2q1* and *H2q4* significantly increased in GL261 cells, although no change in surface MHC-I was observed.

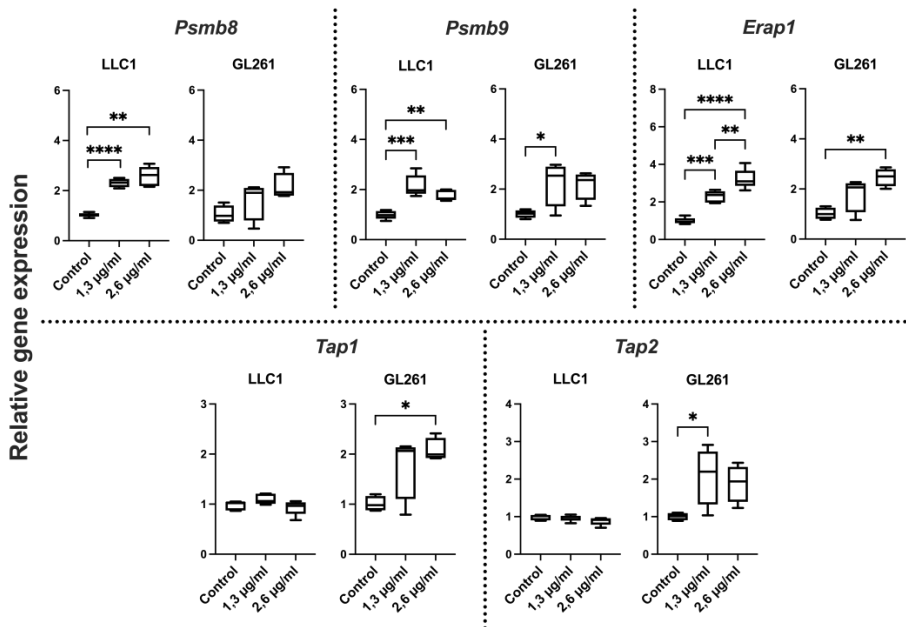


Figure 14. RT-PCR analysis of genes encoding APPM expression in LLC1 and GL261 cells after exposure to CY *in vitro*. LLC1 and GL261 cells were exposed to 1,3 or 2,6 µg/ml CY for 4 h, then replaced with fresh medium and gene expression was measured 48 h after exposure to CY. Results are presented in graphs as mean±SD, n=5. Significant differences are represented as **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

CY also had an activating effect on the expression of genes encoding APPM, such as *Psmb8*, *Psmb9*, *Erap1*, *Tap1*, and *Tap2* (Figure 14). After 48 h significantly increased expression of *Psmb8*, *Psmb9*, *Erap1* was observed in LLC1 cells exposed to 1,3 µg/ml or 2,6 µg/ml CY. Also significantly

increased *Tap2*, *Psmb9* expression was seen in GL261 cells after exposure to 1,3 µg/ml CY and *Tap1*, *Erap1* after exposure to 2,6 µg/ml CY.

The expression of genes encoding MHC-I and APPM is regulated by the transcription factors *Irf1* and *Nlcr5* (Figure 15). They belong to the group of interferon-controlled transcription factors. Exposure to CY led to a significant increase in the expression of transcription factors *Irf1* and *Nlcr5*, as well as the expression of interferons *Ifnb1*, *Ifna4* in LLC1 and GL261 cells. Genes expression changes were proportional to CY concentration. Results demonstrate that APPM changes in LLC1 cells are reversible and can be modulated with therapeutic agents.

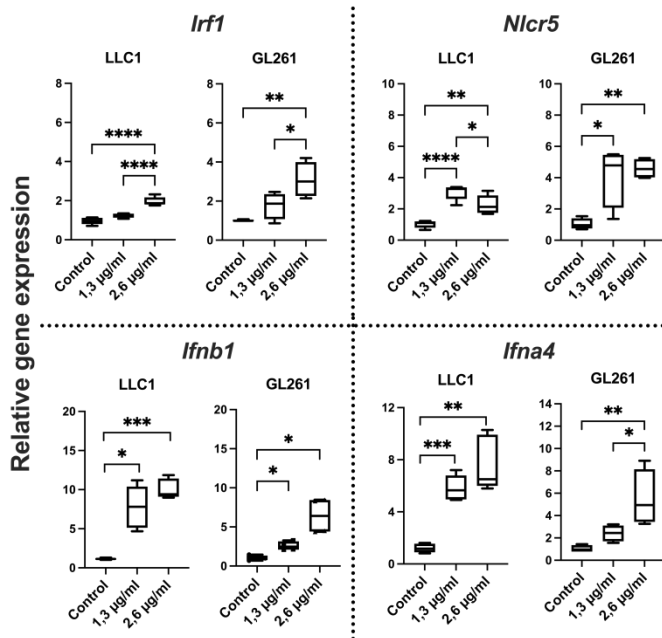


Figure 15. RT-PCR analysis of genes encoding APPM regulating transcription factors expression in cells after exposure to CY *in vitro*. LLC1 and GL261 cells were exposed to 1,3 or 2,6 µg/ml CY for 4 h, then replaced with fresh medium and gene expression was measured 48 h after exposure to CY. Results are presented in graphs as mean±SD, n=5. Significant differences are represented as **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Efficacy of cyclophosphamide in the treatment of mice with LLC1 and GL261 tumors

When s.c. LLC1 and GL261 tumors reached 50–100 mm³, treatment with optimal CY doses was initiated, according to the regimen shown in Figure 16.

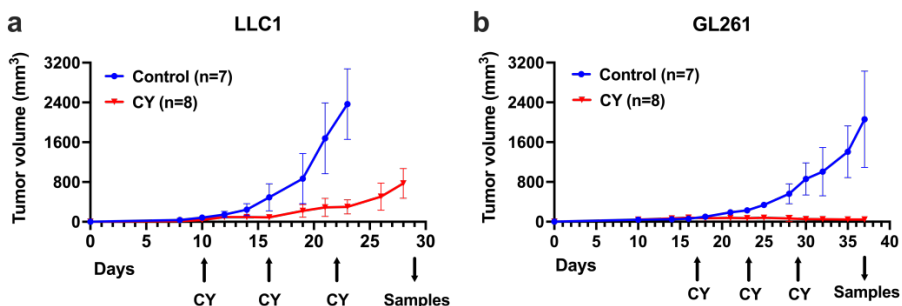


Figure 16. LLC1 and GL261 tumors response to CY treatment. Tumor size was measured every 2-3 days with a caliper. When tumors reached a volume of 50-100 mm³, CY treatment was started. In the graphs arrows indicate the days of CY injection. Mice bearing LLC1 tumors were given a dose of 140 mg/kg and mice bearing GL261 tumors were given a dose of 90 mg/kg CY. Results are presented in the graphs as the mean±SD.

CY significantly inhibited the development of LLC1 tumors (control vs. CY $p < 0,0001$) (Figure 16, a). On day 23 the TGI of CY for LLC1 tumors was 74%. Prior to CY experiments in mice, the optimal doses of CY for the treatment of mice with LLC1 or GL261 tumors were determined - 140 mg/kg \times 3 for LLC1 and 90 mg/kg \times 3 for GL261 (data not shown).

After treatment a significant increase in the number of CD4 T_{EM} lymphocytes was observed in LLC1 tumors (Figure 17). Also the expression of T lymphocyte activation markers *Tnfrsf9*, *Icos* and immune memory factors *Eomes* and *Il7r* significantly increased in LLC1 tumors, indicating CY-induced T lymphocyte activation and formation of T lymphocyte memory (Figure 18).

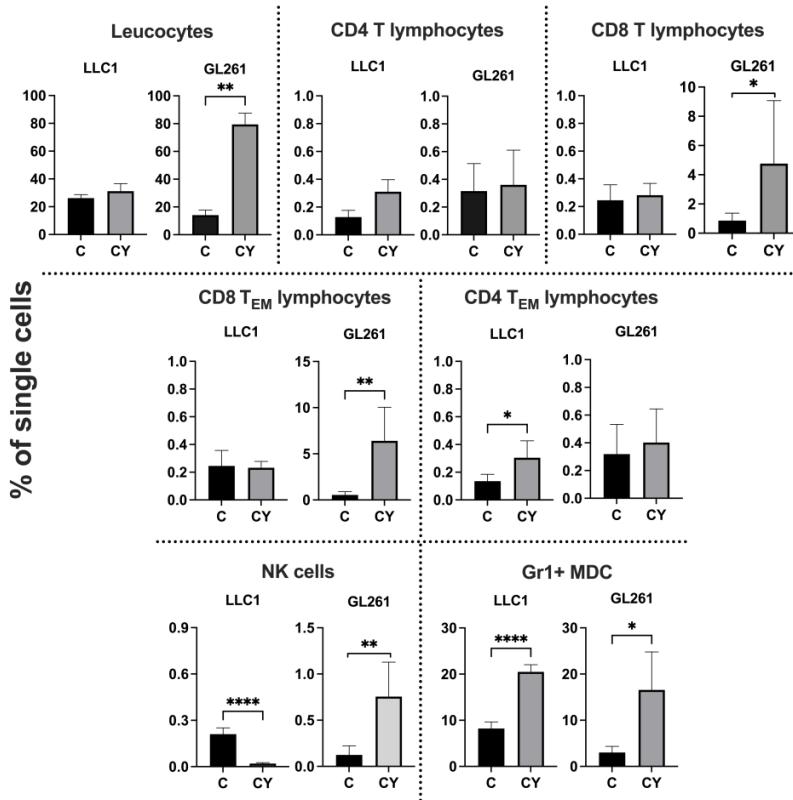


Figure 17. Flow cytometric analysis of immune cell infiltrates in LLC1 and GL261 tumors after CY treatment. Mice bearing LLC1 tumors were given a dose of 140 mg/kg and mice bearing GL261 tumors were given a dose of 90 mg/kg CY. Tumors from mice were harvested seven days after end of the treatment. C - control group, CY – cyclophosphamide group. Gr1⁺ MDC – cells of Gr1⁺ myeloid origin, CD4 T_{EM} lymphocytes – CD4 effector memory T lymphocytes, CD8 T_{EM} lymphocytes – CD8 effector memory T lymphocytes. Results are presented in graphs as mean±SD, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Significant differences are represented as **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

CY treatment significantly inhibited the development of GL261 tumors (control vs. CY p<0,0001). On day 37 TGI of CY for GL261 tumors was 99.9% (Fig. 16, b). After treatment a significant increase in leukocyte infiltration was observed (~80% of all cells in the tumor) (Figure 17). CY treatment also resulted in significantly higher CD8 T lymphocyte infiltration, their activation (*Tnfrsf9*, *Icos* expression) and cytotoxicity (*Ifng*, *Prfl* expression) (Figure 18). Also GL261 tumors showed a significant increase in

the number of CD8 T_{EM} lymphocytes and expression of immune memory-related *Il7r*.

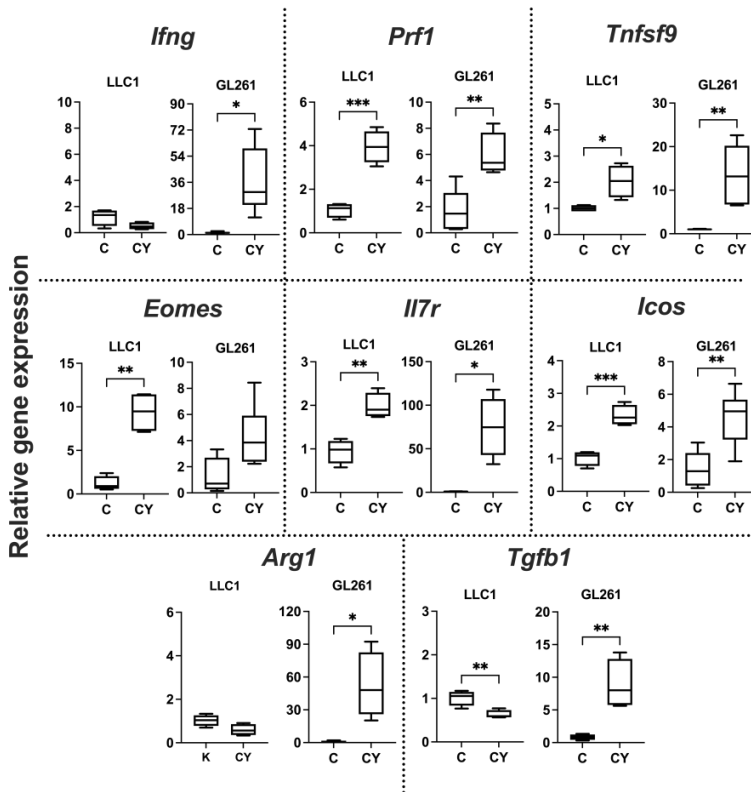


Figure 18. RT-PCR analysis of immune-related genes in LLC1 and GL261 tumors after CY treatment. Mice bearing LLC1 tumors were given a dose of 140 mg/kg and mice bearing GL261 tumors were given a dose of 90 mg/kg CY. Tumors were collected seven days after the end of the treatment. C – control group, CY – cyclophosphamide group. Results are presented in graphs as mean±SD, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Significant differences are represented as *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

CY treatment resulted in a significant increase in Gr1⁺ MDC infiltration to LLC1 and GL261 tumors. Also expression of suppressor cell-associated factors *Arg1* and *Tgfb1* were significantly upregulated in GL261 tumors. In GL261 tumors, CY induced a strong immune response, which could be controlled by activated suppressor immune cells. Activation of suppressor gene expression was not observed in LLC1 tumors.

To assess whether CY shows APPM-activating properties *in vivo*, the expression of genes encoding MHC-I - *H2q1*, *H2q4*, *H2d1* - was analyzed in

LLC1 and GL261 tumors after CY treatment (Figure 19). *H2q1*, *H2q4*, *H2d1* expression was significantly increased in LLC1 tumors, while *H2q4* and *H2d1* - in GL261 tumors. These results confirm that CY effect on the tumor APPM also occurs *in vivo*.

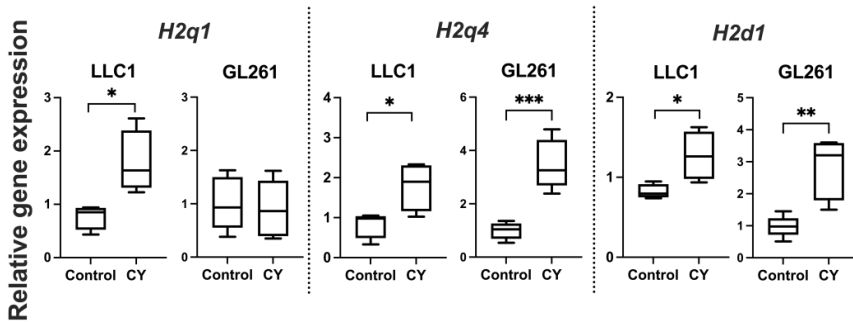


Figure 19. RT-PCR analysis of MHC-I encoding genes in LLC1 and GL261 tumors after CY treatment. Mice bearing LLC1 tumors were given a dose of 140 mg/kg and mice bearing GL261 tumors were given a dose of 90 mg/kg CY. Tumors were collected 7 days after the end of the treatment. Results are presented as mean±SD, LLC1 n=3-4, GL261 n=5-6. Significant differences are represented as *** 0.0001<p<0.001, ** 0.001<p<0.01, * 0.01<p<0.05.

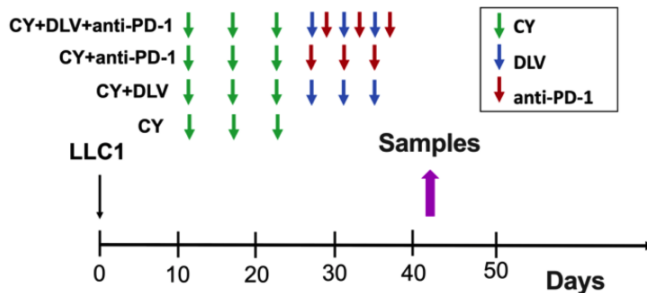
The immunomodulatory effect of CY on LLC1 and GL261 cells was observed - it induced immunogenic cell death and activated APPM. Also CY modulated tumor-infiltrating T lymphocytes – they were characterized by better activation, cytotoxicity, and immune memory properties. Such lymphocytes should more efficiently recognize and destroy tumor cells and provide immune protection when tumors relapse. This makes CY an attractive chemotherapy drug for combination with T-cell based immunotherapy.

Efficacy of cyclophosphamide and immunotherapy combinations in treating mice with LLC1 tumors

We aimed to investigate whether CY can create a favorable environment for immunotherapy and whether CY and immunotherapy can act synergistically in inducing and modulating antitumor immune response. 5 groups were formed: control – untreated mice; CY – mice treated with CY; CD - mice treated with CY and DCV; CP - mice treated with CY and anti-PD-1; CDP - mice treated with CY, DCV and anti-PD-1 (Figure 20,a). Although treatment with CY alone significantly inhibited LLC1 tumors

growth, more effective tumor suppression was observed in mice additionally treated with DCV, anti-PD-1, or their combination ($p < 0.001$) (Figure 20, b). No significant differences in tumor inhibition were observed between groups of mice treated with CY and immunotherapy ($p > 0.05$). On day 28 treatment induced TGI was 78% in CP group, 77% in CDP group, 73% in CD group, and 70% in CY group.

a



b

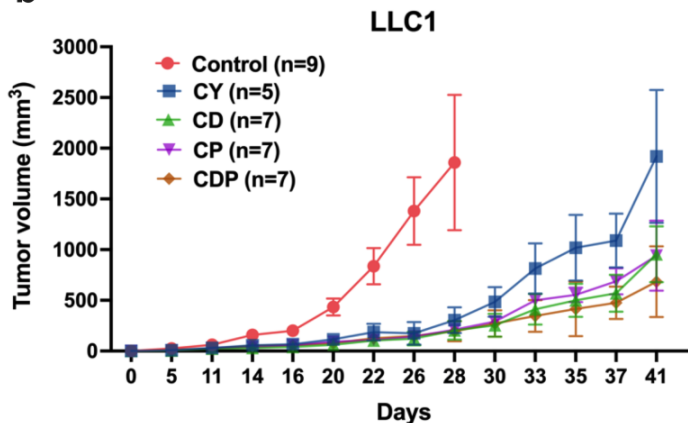


Figure 20. LLC1 tumors response to treatment with CY and CY combinations with DCV and anti-PD-1. a – Experiment scheme. b - tumor growth curves. CY - cyclophosphamide, DCV - dendritic cell vaccine, CD – a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP – a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP – a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1. Mice were given a dose of 140 mg/kg CY. Results are shown as mean±SD.

Compared with the control or CY groups, the combination of CY and immunotherapy resulted in significantly increased CD4 T lymphocytes infiltration into LLC1 tumors (Figure 21).

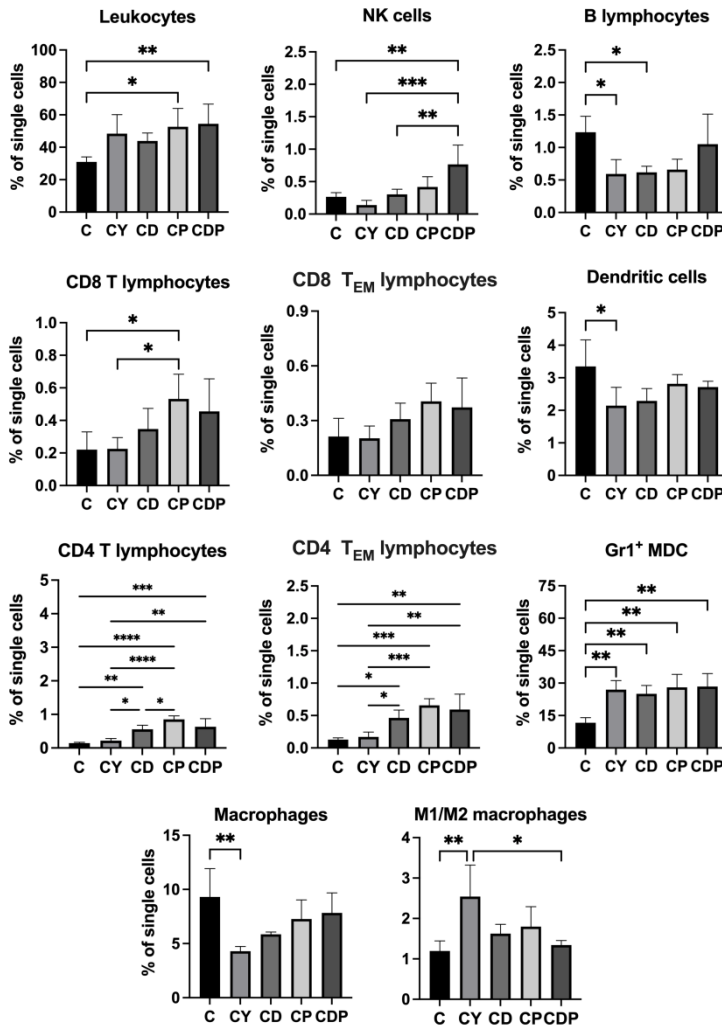


Figure 21. Flow cytometric analysis of immune cell infiltrates in LLC1 tumors after CY treatment and its combinations with immunotherapy. Tumor samples were collected seven days after the end of treatment. C - control group of mice. Gr1⁺ MDC – cells of Gr1⁺ myeloid origin, CD4 T_{EM} lymphocytes – CD4 effector memory T lymphocytes, CD8 T_{EM} lymphocytes – CD8 effector memory T lymphocytes. Results are presented in graphs as mean±SD, LLC1 n=3-4. Significant differences are represented as **** 0,00001<p<0,0001, *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Significantly upregulated *Ifng* expression in CD and CP groups indicates that treatment possibly induced Th1 polarization (Figure 22).

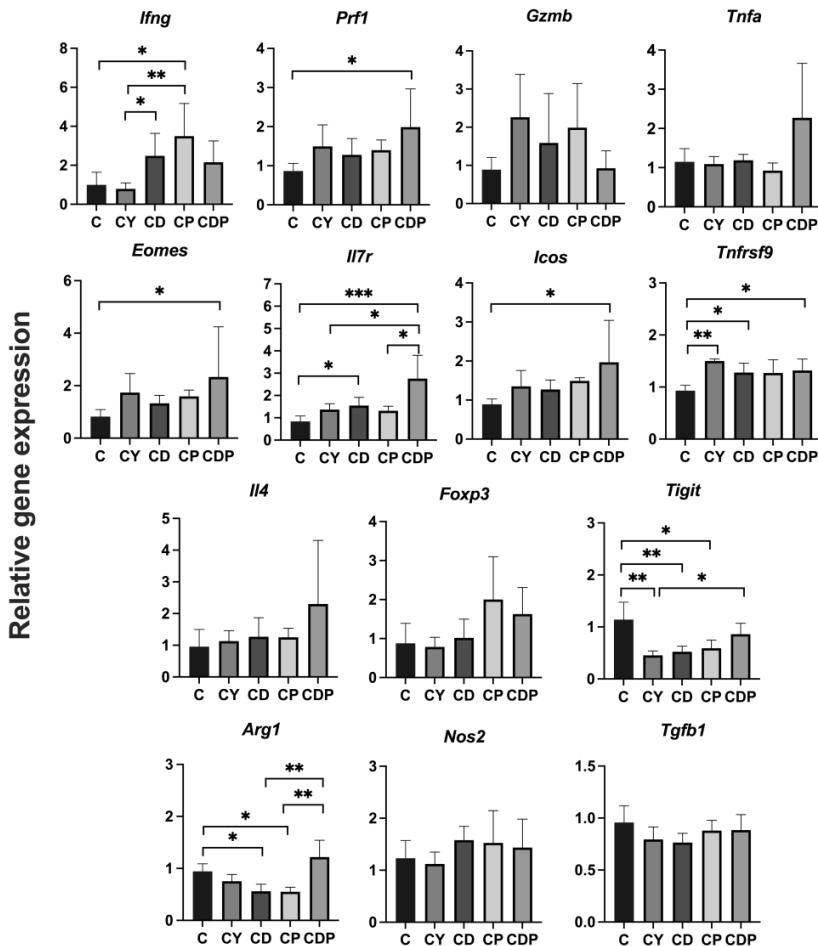


Figure 22. RT-PCR analysis of immune-related genes in LLC1 tumors after treatment with CY and its combinations with immunotherapy. Tumors were collected seven days after the end of the treatment. C – control group. CY - cyclophosphamide, CD – a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1. Mice were given a dose of 140 mg/kg CY. Data in graphs are presented as mean±SD, n=4. Significant differences are represented as *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Significantly increased tumor CD4 T_{EM} lymphocytes counts was observed in CD, CP and CDP groups compared to control or CY. Also expression of *Eomes* in CDP group and *Il7r* in CD and CDP groups were significantly upregulated.

Increased activation of tumor T lymphocytes was also observed after treatment. Significantly upregulated expression of activation marker *Tnfrsf9* was observed in CY, CD, CP, CDP groups and *Icos* in CDP group. Also in CY, CD and CP groups the expression of T lymphocyte suppression marker *Tigit* was significantly decreased compared to control.

Significant increase in Gr1⁺ MDC was observed in LLC1 tumors after treatment with CY or CY combinations with immunotherapy. However, analysis of *Nos2*, *Tgfb1* and *Arg1* expression showed that the increase of Gr1⁺ MDC is not related to the activation of cells with immunosuppressive properties.

Efficacy of cyclophosphamide and immunotherapy combinations in treating mice with GL261 tumors

An analogous experiment was performed with another tumor model - GL261 (Figure 23, a). Treatment with CY resulted in inhibition of tumor growth, which progressed to gradual tumor regression on days 33-36 (Figure 23, b). In the background of immunotherapy treatment, GL261 tumors continued to regress until finally, around day 50, tumors became unpalpable in groups of mice that received combined CY and immunotherapy treatment. Mice were additionally monitored for another 90 days, but the tumors did not regrow. However, in CY group, recovery of the primary tumors were observed at day 50 in one mouse and at day 90 in two mice.

Seven days after the end of the treatment *Ifng* expression, associated with CD8 T lymphocyte and NK cell cytotoxicity, was significantly upregulated in all treatment groups, and significant increase in *Prfl* expression was observed in CY, CP and CDP groups (Figure 24).

CY or CY combinations with immunotherapy showed a similar Th1 response polarizing effect - the expression of *Ifng* and *Tnfa* significantly increased after treatment. However, combinations of CY and immunotherapy showed a different polarizing effect of CD4 T helper lymphocytes to Th2 or Treg. Polarization of Th2 response was observed in CP group - *Il4* expression significantly increased after treatment compared to control or CD group. Polarization of Treg response was also observed in the CY and CP groups - after treatment, *Foxp3* expression in these groups was significantly higher than in control, CD, or CDP groups.

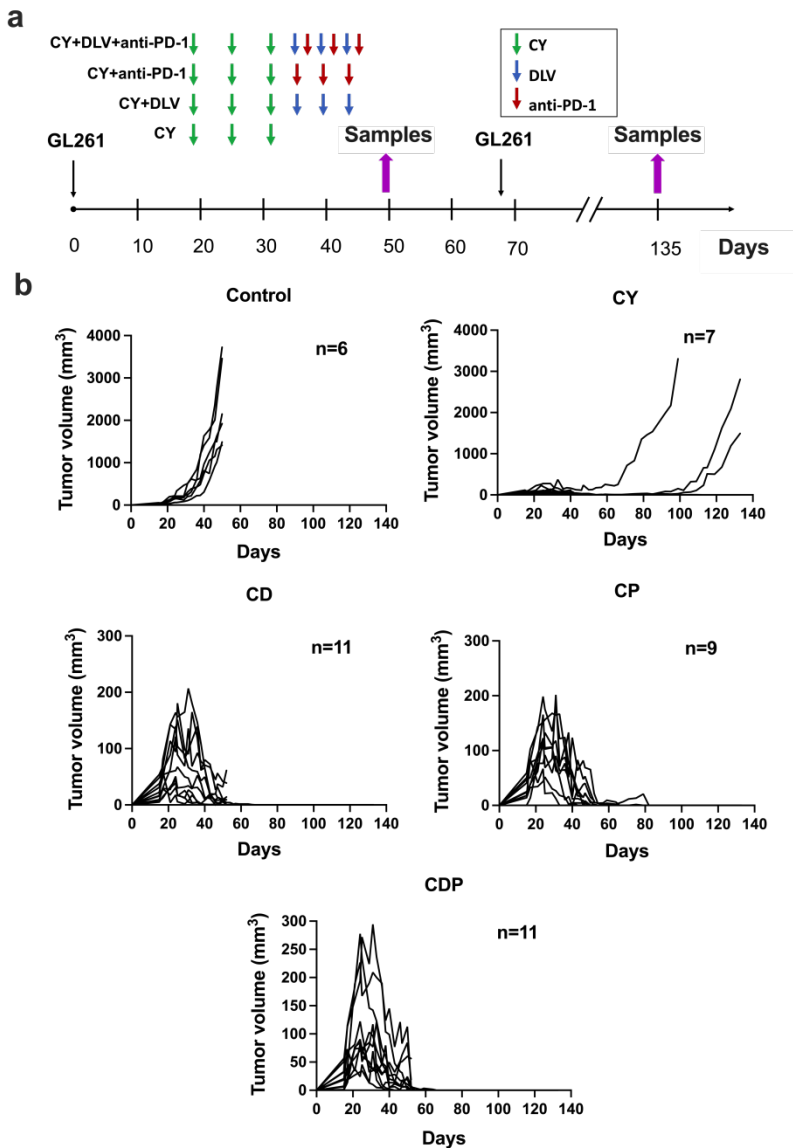


Figure 23. GL261 tumors response to treatment with CY and CY combinations with DCV and anti-PD-1. a - Mouse vaccination and sampling scheme. Treatment was initiated when tumors reached ~50–100 mm³. Mice were treated with 90 mg/kg CY followed by immunotherapy. b – GL261 tumor growth curves. CY - cyclophosphamide, DCV - dendritic cell vaccine, CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1.

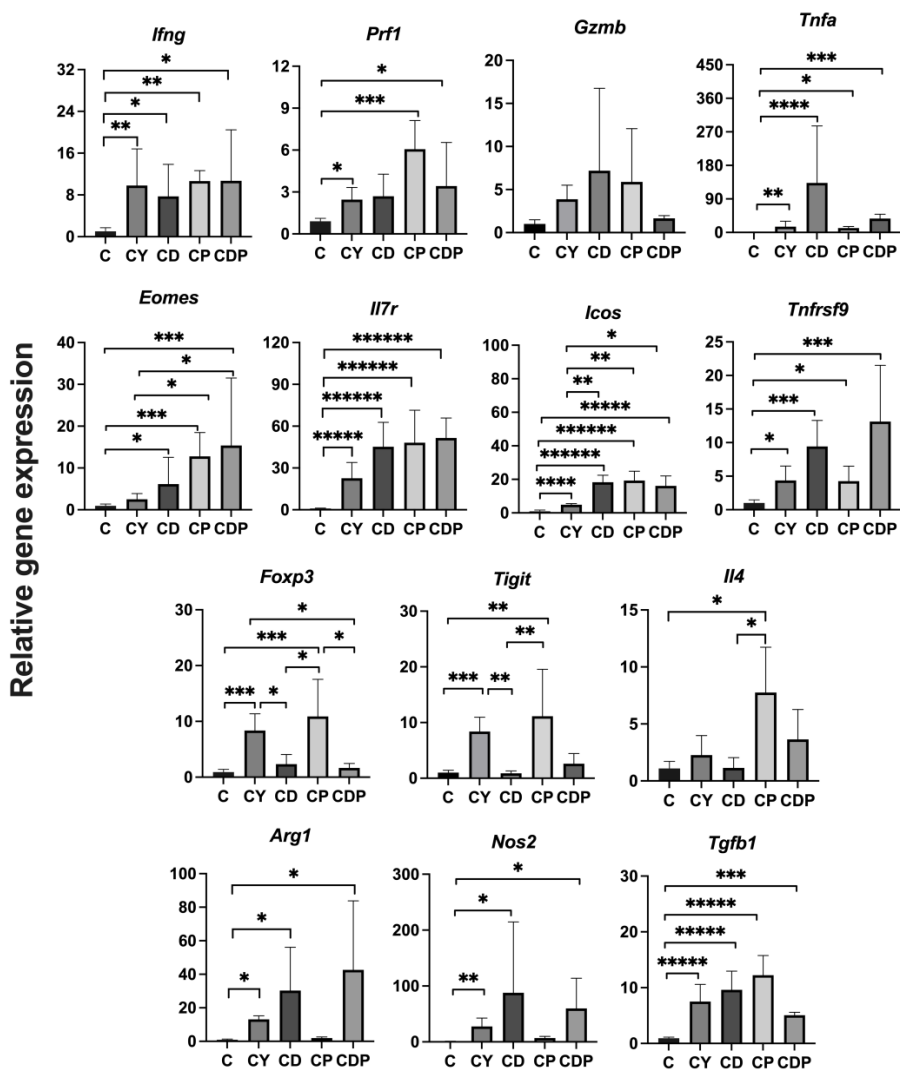


Figure 24. RT-PCR analysis of immune-related genes in GL261 tumors after treatment with CY and its combinations with immunotherapy. Tumors were collected seven days after the end of the treatment. C – control group. CY - cyclophosphamide, CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1. Mice were given a dose of 90 mg/kg CY. Data in graphs are presented as mean±SD, n=4-5. Significant differences are represented as *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

Activation of immune memory T cells was observed after treatment - *Il7r* and *Eomes* expression were upregulated in CD, CP, and CDP, compared to control or CY groups.

Although increased activation of T lymphocytes was observed after CY treatment, treatment with CY and immunotherapy combinations further increased it - *Icos* expression was significantly higher in CD, CP, CDP groups than in CY group.

The expression of immunosuppression-related *Arg1*, *Nos2* was significantly upregulated in CY, CD, and CDP groups, and significant increase in *Tgfb1* expression was observed in all treatment groups. However, it should be considered that treatment induced strong immune response, leading to the regression of GL261 tumors and the formation of an inflammatory environment. The inflammatory environment contains many factors, such as IL-1, IL-6, TNF- α , PGE-2, GM-CSF and TGF- β , which promote the recruitment and proliferation of MDSCs [188], [189].

Effect of cyclophosphamide and immunotherapy combinations on the systemic immune response

7 days after treatment, significantly increased percentage of CD8 T_{EM} lymphocytes was observed in the mice spleens of CD, CP and CDP groups compared to control and CY groups (Figure 25). A positive effect of CY and immunotherapy combinations on NK cells was also observed - their number increased significantly in CD, CP and CDP groups compared to control mice. Most commonly, NK cell activation is associated with the development of a Th1 response and production of IL-2, required for NK cell expansion [190].

An increased number of Gr1⁺ MDCs was also observed in the CY, CD, and CDP groups compared to the control. Changes in spleen Gr1⁺ MDC counts coincide with the expression of tumor *Arg1*, *Nos2*, and *Tgfb1* and suggest that immunosuppressive mechanisms may have been induced systemically as well.

Ability of cyclophosphamide and immunotherapy combinations to activate immune memory against GL261 cells

To assess whether treatment activated the formation of immune memory against GL261 cells, some mice were reinoculated with the same number of GL261 cells on day 68 (Figure 23, a). Tumors were induced on

the right side of the back, on the opposite side to the primary tumor. No additional treatment was applied.

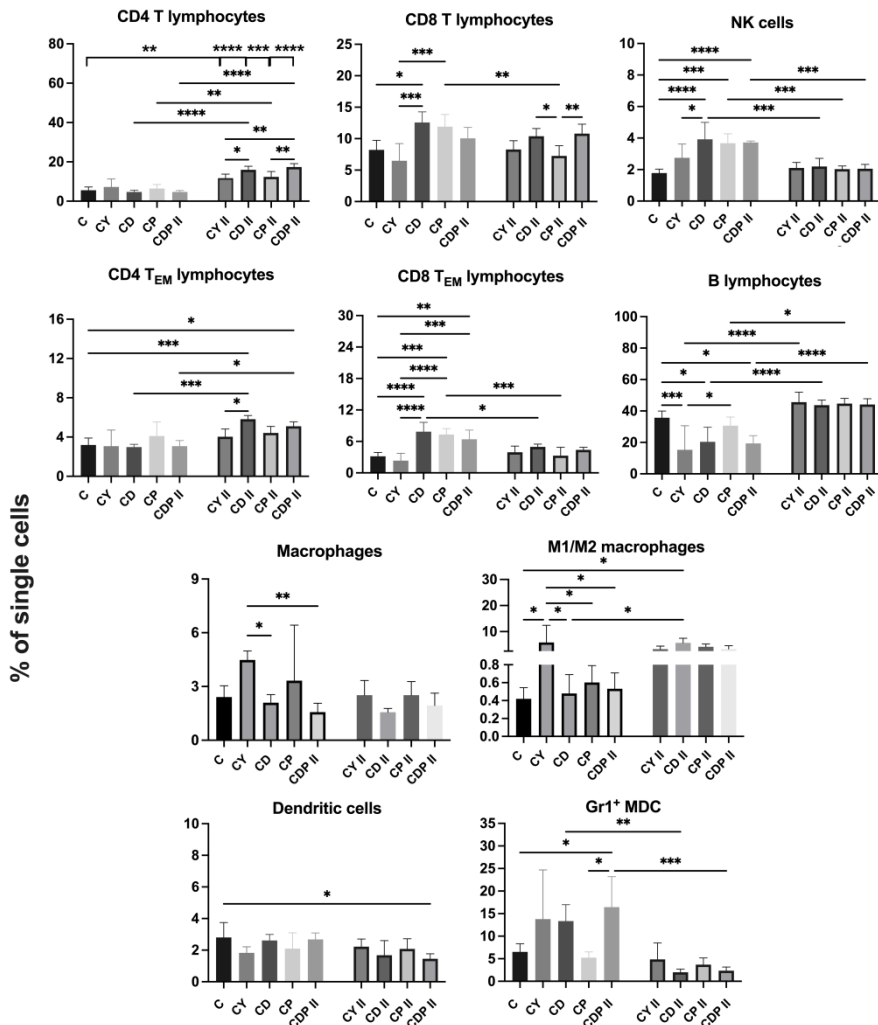


Figure 25. Flow cytometric analysis of mice spleen after CY treatment and its combinations with DCV and anti-PD-1. Spleen samples were collected seven days after the end of treatment. Abbreviations for groups without II labeling correspond to samples taken seven days after treatment. Corresponding treatment groups with II labeling represent samples taken at the end of the experiment. C – control group, CY – a group of mice treated with cyclophosphamide, CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with

cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1. Gr1⁺ MDC – cells of Gr1⁺ myeloid origin, CD4 T_{EM} lymphocytes – CD4 effector memory T lymphocytes, CD8 T_{EM} lymphocytes – CD8 effector memory T lymphocytes. The M1/M2 macrophage graph shows the ratio of the percentage of M1 to M2 macrophages in the tumor. Mice were administered a dose of 90 mg/kg CY. Data in graphs are presented as mean±SD, n=4-5. Significant differences are represented as **** 0.0001<p<0.0001, *** 0.0001<p<0.001, ** 0.001<p<0.01, * 0.01<p<0.05.

The development of newly induced tumors was observed in 4/4 mice in CD group and 4/4 mice in CP group (Figure 26).

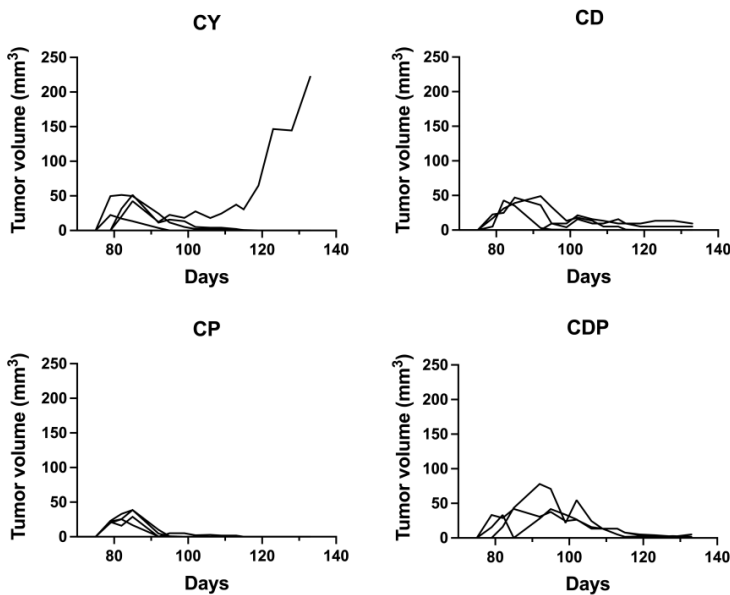


Figure 26. Growth of repeatedly induced GL261 tumors in mice. Tumors were re-injected into mice on day 68 of the experiment. Tumors were induced in mice on the right dorsal side, contralateral to the primary tumor, n=4. CY – a group of mice treated with cyclophosphamide, CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1.

In these groups, on day 83-85, when tumors reached 50 mm³, their regression was observed. In CDP group tumors developed in 3/4 mice, reached 50-80 mm³ and remained in dynamic equilibrium until day 100-105, after which regression of these tumors was observed. In CY group, tumors

developed in 4/4 mice, reached a size of 50 mm³ around day 85 and began to regress. However, in one mouse tumor escaped immune surveillance and began to grow rapidly. This indicates that treatment with CY and immunotherapy ensured the formation of effective immune memory compared to treatment with CY alone.

At the end of the experiment (day 135), mice spleen samples were collected and immune response changes since the end of the treatment were evaluated (Figure 25). A significant increase in the number of CD4 T lymphocytes was observed in the spleens of CY, CD, CP and CDP groups. This change was evident both in comparison with the control and across mice groups. The highest increase of CD4 T lymphocytes was found in CD and CDP groups. Also in CD and CDP groups significantly increased number of CD4 T_{EM} lymphocytes was observed. These results demonstrate that the combination of CY with DCV (CD and CDP) ensured a long-lasting CD4 T lymphocyte response and the formation of immune memory.

Based on these results, an analysis of the expression of T lymphocyte immune memory genes and factors associated with CD4 T lymphocyte subtypes was performed (Figure 27). Compared with the initial control data, the expression of *Eomes* and *Il7r* increased in all treatment groups and indicated the formation of long-term immune memory. Significant increase of *Ifng* expression indicates that CY and immunotherapy led to the polarization of Th1 CD4 T lymphocyte response. The absence of significant changes in *Il4* and *Foxp3* expression shows that treatment did not lead to the polarization of the Th2 or Treg CD4 lymphocyte response.

At the end of the experiment, a decrease in the amount of Gr1⁺ MDCs was observed - compared to the initial data, the number of these cells significantly decreased in the CD and CDP groups. GL261 cells secrete G-CSF, which promotes the development of myeloid cells, including MDSCs. A proportional increase in the number of MDSCs and DCs in the spleens of mice is also observed with the development of GL261 tumors [192]. Thus, the changes in the number of Gr1⁺ MDCs in mouse spleens are possibly related to the low or absence of tumor cells and possibly low G-CSF secretion.

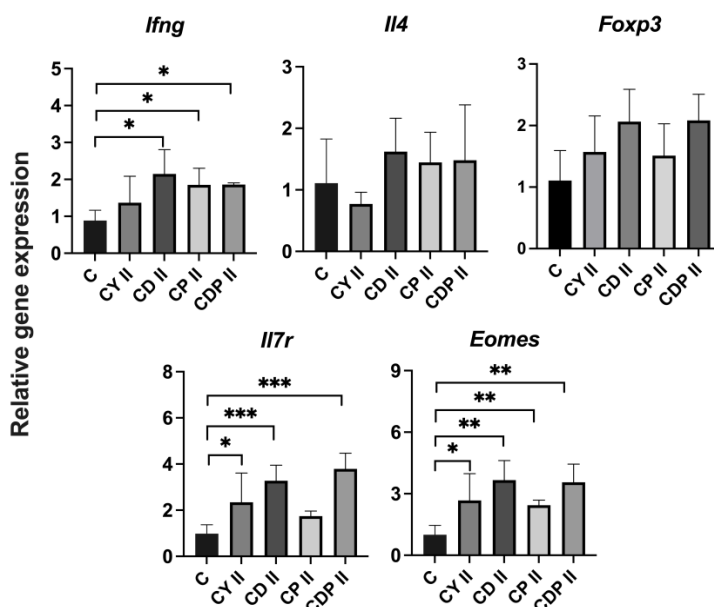


Figure 27. RT-PCR analysis of immune-related genes in the spleen of mice treated with CY and its combinations with immunotherapy. Spleen samples were collected at the end of the treatment C – control group, CY – a group of mice treated with cyclophosphamide, CD - a group of mice treated with cyclophosphamide and dendritic cell vaccines, CP - a group of mice treated with cyclophosphamide and anti-PD-1, CDP - a group of mice treated with cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1. Mice were given a dose of 90 mg/kg CY. Data in graphs are presented as mean±SD, n=4-5. Significant differences are represented as *** 0,0001<p<0,001, ** 0,001<p<0,01, * 0,01<p<0,05.

This study revealed a synergistic effect of CY, DCV, and anti-PD-1 in the treatment of mice with LLC1 and GL261 tumors. CY activated APPM in LLC1 tumors and sensitized them to DCV and anti-PD-1. In mice with LLC1 tumors chemoimmunotherapy showed a better tumor-inhibiting effect. In the case of LLC1 and GL261 tumors, compared to CY, treatment with chemoimmunotherapy combinations led to a more effective T lymphocyte response - T lymphocytes showed better activation, cytotoxic and immune memory properties after the treatment. Treatment with chemoimmunotherapy combinations also ensured effective regression of GL261 tumors and long-term control of these tumors.

DISCUSSION

In the last decade, the importance of anticancer immunotherapy in the treatment of oncological patients has been increasing. Although immunotherapy allows for impressive treatment results, low response to immunotherapy encourages a better understanding of resistance mechanisms and the search for ways to improve immunotherapy efficiency and achieve a higher therapeutic effect for a larger number of patients. In this study, using mouse tumor models, the impact of tumor dysfunctional APPM on the absence of antitumor immune response and resistance to DCV and anti-PD-1 is revealed.

Tumor Ag presentation via MHC-I on the surface of tumor cells is a critical factor that allows CD8 T lymphocytes to distinguish tumor cells from healthy ones and destroy them. For tumor Ag to be effectively presented via surface MHC-I to CD8 T lymphocytes, coordinated work of APPM proteins, PSMB8, PSMB9, PSMB10, TAP1, TAP2, CNX, TAPBP, CALR, ERAP1, ERAP2, B2M, is necessary, as it ensures Ag processing into peptides, binding to the MHC-I and bringing MHC I-Ag to the surface of the tumor cell [8]. By comparing C57BL/6 mouse syngeneic LLC1 and GL261 tumor models, significantly lower expression of *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m* and low surface MHC-I expression were found in LLC1 cells, indicating impaired APPM activity and inefficient presentation of tumor Ag to CD8 T lymphocytes.

Low infiltration of CD8 T lymphocytes and low *Ifng*, *Gzmb*, *Prfl* expression reveal the influence of APPM dysfunction on the lack of antitumor immune response. Correlation of impaired APPM with the absence of an antitumor CD8 T lymphocyte response has also been observed in other studies. The absence of T lymphocyte response has been linked to loss of tumor HLA-I (the human equivalent of MHC-I) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [10], decreased tumor tapasin expression and tumor progression in colorectal cancer patients [9] and impaired tumor B2M expression in melanoma patients [194]. Studies show that the loss or alteration of the expression of at least one of the coding genes can lead to inefficient Ag presentation and processing and the absence of a CD8 T lymphocyte response [8].

One of the most important results of this study is the observed correlation between APPM functionality in LLC1 and GL261 tumors and their response to DCV and anti-PD-1 treatment. In mouse studies DCV and anti-PD-1 therapeutic effect was not achieved in tumors with dysfunctional

APPM. In mice with LLC1 tumors, dysfunctional APPM becomes an obstacle for DCV-activated T lymphocytes to recognize and kill LLC1 cells. Anti-PD-1 therapy is based on unleashing the cytotoxic effects of T lymphocytes by inhibiting the PD-1/PD-L1 axis [196]. Due to the expression of PD-L1 on the surface of LLC1 cells and the high infiltration of MDSCs, theoretically anti-PD-1 could be effective in treating mice with LLC1 tumors. However, anti-PD-1 therapy becomes ineffective as T-lymphocyte responses are not developing in tumors with dysfunctional APPM.

APPM functionality in tumor cells is a critical determinant of the efficacy of T lymphocyte-based immunotherapy and reveals the predictive value of APPM gene expression in individualizing DCV and anti-PD-1 therapy. Other investigators have also demonstrated the predictive value of APPM gene expression for immunotherapy prescription. It has been shown that *Psm8* and *Psm9* expression can help to stratify melanoma patients for anti-CTLA-4 or anti-PD-1 therapy [11]. In another study the predictive value of HLA I expression for the individualization of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapy in patients with NSCLC has been revealed [10]. Also loss of B2m expression was associated with resistance to ICI treatment in NSCLC patients [198], but was not associated with response to anti-PD-L1 in rectal cancer patients [199].

Depending on the gene and tumor localization, APPM abnormalities are found in up to 85% of oncological patients and are characteristic of both solid and hematological malignancies [200]. It has been shown that the expression of individual APPM genes can help stratify patients for ICI [11], [10], [198]. However, some studies show that the expression individual APPM genes is not enough to predict patient response to ICI [199]. The expression of one or several different APPM-related genes can be altered and these changes vary between different tumors [8]. This partly explains the conflicting results of individual APPM element expression correlation with response to immunotherapy and suggests that a broader evaluation of APPM elements would better reflect the functionality of APPM and have a greater predictive power for individualizing immunotherapy treatment in patients.

Several studies reveal the predictive value of APPM gene set expression in individualizing ICI treatment in oncology patients [201], [202]. The results obtained in this study not only support these studies showing a relationship between changes in the expression of a set of APPM genes and sensitivity to anti-PD-1, but also reveal a relationship between APPM gene expression and sensitivity to treatment with DCV. To date, we have not been able to find any correlation in the literature between the functionality of the APPM mechanism in tumor cells and the efficacy of DCV treatment.

This study revealed the modulatory effects of chemotherapeutic drug cyclophosphamide on APPM in tumor cells *in vitro*. This effect occurred through CY-induced autocrine production of type I interferons - IFN- α and IFN- β - in LLC1 and GL261 cells. Although the effect of CY on type I IFN production in tumor cells has been shown in previous studies [207], the effect of CY on tumor cells APPM has not yet been investigated.

IFN activated the expression of APPM regulating transcription factors *Nlcr5* and *Irf1* and thus the APPM itself, as shown by the increased expression of the APPM elements *Psm8*, *Psm9*, *Erap1*, *Tap1*, *Tap2* and MHC-I elements *H2d1*, *H2q1*, *H2q4*. APPM was activated in both LLC1 and GL261 cells independently of APPM functionality. However, CY-induced APPM activation was only reflected on the surface of LLC1 cells, where a significant increase in surface MHC-I expression was observed. Interestingly, changes in surface MHC-I expression were not observed on the surface of GL261. This suggests that in the presence of functional tumor APPM, CY-induced activation of APPM gene expression may be controlled by post-translational modifications [201].

Treatment with CY significantly inhibited the development of LLC1 and GL261 tumors *in vivo*. Although this may be related to the direct cytotoxic effect on tumor cells, evaluation of immune-related factors in LLC1 and GL261 tumors revealed that CY treatment improved immunogenic properties of tumor cells and activated an immune response that could be additionally involved in tumor cell killing. The modulating effect of CY on APPM was also confirmed *in vivo* - significantly increased expression of genes encoding MHC-I *H2d1*, *H2q1*, *H2q4* was observed in LLC1 and GL261 tumors one week after treatment. This possibly resulted in an enhanced tumor cell ability to present tumor Ag to the immune system and elicit an antitumor immune response. Also, CY stimulated an antitumor immune response by inducing immunogenic death of LLC1 and GL261 cells, as shown by increased expression of surface calreticulin *in vitro* and an increase in total tumor leukocyte counts.

CY induced immune response differed between LLC1 and GL261 tumors, possibly due to different immunological properties characteristic to them. In GL261 tumors with functional APPM CD8 T lymphocyte response was observed and CY further enhanced this response. While in LLC1 tumors with dysfunctional APPM, where CD8 T lymphocyte response was absent, CY did not result in activation of T lymphocytes. This suggests that additional therapies are needed to stimulate T lymphocyte response against LLC1 cells. However, LLC1 and GL261 tumor-infiltrating T lymphocytes

were characterized by more pronounced cytotoxic and activation properties, which may lead to a more effective fight against tumor cells. This CY effect has not been extensively studied but has been observed in patients with metastatic colorectal cancer [208]. CY also induced the formation of T lymphocyte memory - the amount of CD4 T_{EM} lymphocytes increased significantly in LLC1 tumors, while CD8 T_{EM} lymphocytes - in GL261 tumors. CY's ability to induce memory T lymphocytes was also observed in previous studies - it was shown that CY induces the production of type I IFN, promotes the formation of CD4 and CD8 T_{EM} lymphocytes and polarizes Th1 response in murine tumor model [210]. CY likely induces an immunogenic environment in tumors, containing various factors such as IL-2, type I IFN, IL7, which activate antitumor immune response and immune memory [214].

CY APPM activating effect may render tumor cells more immunogenic and visible to the immune system, thus paving the way for T lymphocyte-based immunotherapy. Also, immune response induced by CY can be additionally modulated by immunotherapeutic agents and directed against tumor. Synergistic effect of CY, DCV and anti-PD-1 are revealed in this study. For LLC1, combination of CY and immunotherapy showed stronger tumor-inhibiting effect than CY or immunotherapy alone - induced infiltration of T lymphocytes and T_{EM} lymphocytes into LLC1 tumors, which was more evident in CD4 T lymphocyte population. The expression of cytotoxicity factor *Prfl* also indicates the immune response of T lymphocytes induced by CY and immunotherapy combination, activation factors *Tnfrsf9*, *Icos* and immune memory factors *Il7r*, *Eomes*, which tend to be significantly increased in CDP group. Although CD4 T lymphocytes have long been considered as helper cells that activate CD8 T lymphocytes, there is an increasing number of studies revealing the direct involvement of CD4 T lymphocytes in the elimination of tumor cells [217]–[221]. Cytotoxicity of CD4 T lymphocytes to tumor cells can occur in several ways - through Fas and Trail pathways [224] and cytotoxic factors - perforins and granulysins [225],[226]. However, in which cases the antitumor immune response of CD4 T lymphocytes is induced remains unclear.

In GL261 tumors, treatment with CY resulted in inhibition and regression of tumor growth. However, CY alone did not elicit a sufficiently effective immune response against GL261 cells, and GL261 tumor recurrence was observed in some mice during long-term follow-up. In CD, CP and CDP groups GL261 tumors did not regrow within 3 months and newly induced ones did not develop. Systemically increased levels of CD8 T lymphocytes and NK cells and increased expression of cytotoxicity factors

Pfr1 and *Ifng* in the tumor indicate activation of cytotoxic reaction. CY and immunotherapy also resulted in systemic and local activation of memory CD8 T lymphocytes that ensured an effective GL261 tumor control. Studies have shown that single treatment with CY or anti-PD-L1 failed to induce adequate T lymphocyte memory, which was only activated by combination therapy [229]. Interestingly, in all treatment groups, CD8 T_{EM} lymphocytes counts returned to normal and predominance of CD4 and CD4 T_{EM} lymphocyte responses were observed, especially in the CD and CDP groups. The importance of an activated CD4_{EM} T lymphocyte response has been demonstrated in various clinical trials and has been associated with a favorable response to ICI treatment and improved patient survival [231], [232], [233], [234]. This study reveals the importance of CD4 and CD4 T_{EM} lymphocytes response for a long-term successful antitumor immunity and effective immunotherapy.

During this study, the synergistic effect of cyclophosphamide, dendritic cell vaccines and anti-PD-1 was observed in mice with tumors of different APPM functionality. When treating mice with LLC1 tumors, having dysfunctional AAPM, the synergistic effect of CY and immunotherapy is achieved through the ability of CY to activate AAPM and render tumor cells visible for recognition and destruction by immunotherapy-activated T lymphocytes. In addition to impaired APPM, LLC1 tumors are also characterized by high aggressiveness and proliferative potential, which has a negative impact on achieving a therapeutic effect. This is a common model for evaluating chemotherapeutic drugs *in vivo* - after revealing the therapeutic effect of the chemotherapy drug vinorelbine in this model, the latter was successfully transferred to clinical trials [236]. Although complete treatment-induced destruction of LLC1 tumors was not achieved, the observed therapeutic effect shows the great potential of the combination of CY, DCV and anti-PD-1 in treating tumors with dysfunctional AAPM.

CONCLUSIONS

1. In tumors the expression of surface MHC-I and genes, encoding APPM elements *Psmb8*, *Psmb9*, *Psmb10*, *Tap1*, *Tap2*, *Erap1*, *B2m*, reflects APPM functionality. In GL261 cells high expression of these factors indicates active APPM, while in LLC1 cells low expression of them reflects nonfunctional APPM.

2. Formation of an immune response is observed in GL261 tumors in which APPM is active. Dysfunctional APPM may be a therapeutic target for inducing an immune response against LLC1 tumors.
3. Dysfunctional APPM results in LLC1 tumor resistance to dendritic cell vaccine and anti-PD-1 therapy. Expression of APPM factors predicts sensitivity to treatment with dendritic cell vaccine and anti-PD-1.
4. Cyclophosphamide activates APPM and thus enhances the activation and cytotoxic properties of tumor T lymphocytes and promotes the formation of T cell immune memory.
5. Combinations of cyclophosphamide, dendritic cell vaccine and anti-PD-1 have a synergistic effect:
 - cyclophosphamide activates APPM in LLC1 tumors and sensitizes the to dendritic cell vaccine and anti-PD-1 therapy;
 - chemoimmunotherapy provides long-term control of immunotherapy-sensitive GL261 tumors;
 - chemoimmunotherapy leads to the effective inhibition of tumor development, formation of T lymphocyte response and T lymphocyte immune memory. The combination of cyclophosphamide, dendritic cell vaccine, anti-PD-1 shows the best therapeutic effect.
 -

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Kraško JA, Žilionytė K, Darinskas A, Dobrovolskiene N, Mlynska A, Riabceva S, Zalutsky I, Derevyanko M, Kulchitsky V, Karaman O, Fedosova N, Symchych T, Didenko G, Chekhun V, Strioga M, Pašukonienė V. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in murine Lewis lung carcinoma model. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5098-5104.
2. Žilionytė K, Bagdzevičiūtė U, Mlynska A, Urbškaitė E, Paberalė E, Dobrovolskienė N, Kraško JA, Pašukonienė V. Functional antigen processing and presentation mechanism as a prerequisite factor of response to treatment with dendritic cell vaccines and anti-PD-1 in preclinical murine LLC1 and GL261 tumor models. *Cancer Immunol Immunother.* 2022 Apr 1.

PRANEŠIMAI MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

Stendiniai pranešimai:

- “Evaluation Of Immunogenicity Differences In LLC1 And GL261 Tumor Models For Effective Chemo-Immunotherapy Treatment”. Žilionytė K et al. “6th International conference of Cancer Immunotherapy & Immuno-monitoring (CITIM)”. Tbilisis, Sakartvelas, 2019 m. balandžio mėn. 29 d. - gegužės mėn. 2 d.
- “Molecular biomarkers of mouse tumor immunogenicity and prediction of response to dendritic cell vaccines and anti-PD-1 treatment”. Žilionytė K et al. 6th European Congress Immunology. Virtuali, 2021 m. rugsėjo mėn. 1 - 4 d.d.

Žodiniai pranešimai:

- „Evaluation of immunogenicity differences in LLC1 and GL261 tumor models for effective chemo-immunotherapy treatment”. Žilionytė K et al. 7th ImmunoTherapy of Cancer Conference. Virtuali, 2020 m. spalio mėn. 2 - 3 d.d.
- „Molekuliniai žymenys, leidžiantys išskirstyti pelių navikus pagal jų imunines savybes bei prognozuoti jų atsaką į gydymą priešvėžine imunoterapija - dendritinių ląstelių vakcinomis bei anti-PD-1“. Žilionytė K et al. „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Virtuali, 2020 m. gruodžio mėn. 4 d. Biotechnologijos ir biochemijos pranešimų sekcijoje užimta II vieta.
- “Molecular biomarkers of mouse tumor immunogenicity and prediction of response to dendritic cell vaccines and anti-PD-1 treatment”. Žilionytė K et al. 64th Open Readings. Virtuali, 2021 m. kovo mėn. 16-19 d.d.
- “Molecular biomarkers of mouse tumor immunogenicity and prediction of response to dendritic cell vaccines and anti-PD-1 treatment”. Žilionytė K et al. European Society for Clinical Cell Analysis ESCCA. Virtuali, 2021 m. balandžio mėn. 22 - 24 d.d.

CURRICULUM VITAE

KAROLINA ŽILIONYTĖ

1990-09-20

karolina.zilionyte@nvi.lt

IŠSILAVINIMAS

- 2009-2013 - biologijos bakalauras, Vilniaus universitetas.
- 2013-2015 - mikrobiologijos magistras, Vilniaus universitetas.

DARBO PATIRTIS

- 2014-2015 – inžinierė, Nacionalinio vėžio institutas.
- 2015-2019 – tyrėja, UAB „Innovita research“.
- 2015-dabar – jaunesnioji mokslo darbuotoja, Nacionalinio vėžio institutas.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS

1. Kraško JA, **Žilionytė K**, Darinskas A, Dobrovolskiene N, Mlynska A, Riabceva S, Zalutsky I, Derevyanko M, Kulchitsky V, Karaman O, Fedosova N, Symchych T, Didenko G, Chekhun V, Strioga M, Pašukonienė V. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in murine Lewis lung carcinoma model. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5098-5104.
2. **Žilionytė K**, Bagdzevičiūtė U, Mlynska A, Urbštaitė E, Paberalė E, Dobrovolskienė N, Krasko JA, Pašukonienė V. Functional antigen processing and presentation mechanism as a prerequisite factor of response to treatment with dendritic cell vaccines and anti-PD-1 in preclinical murine LLC1 and GL261 tumor models. *Cancer Immunol Immunother.* 2022 Apr 1.
3. Kraško JA, **Žilionytė K**, Darinskas A, Strioga M, Rjabceva S, Zalutsky I, Derevyanko M, Kulchitsky V, Lubitz W, Kudela P, Miseikyte-Kaubriene E, Karaman O, Didenko H, Potebnya H, Chekhun V, Pašukonienė V. Bacterial ghosts as adjuvants in syngeneic tumour cell lysate-based anticancer vaccination in a murine lung carcinoma model. *Oncol Rep.* 2017 Jan;37(1):171-178.
4. Mlynska A, Povilaitytė E, Zemleckaitė I, **Žilionytė K**, Strioga M, Krasko J, Dobrovolskienė N, Peng MW, Intaitė B, Pašukonienė V. Platinum sensitivity of ovarian cancer cells does not influence their

- ability to induce M2-type macrophage polarization. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Jun 14:e12996.
5. Dobrovolskienė N, Pašukonienė V, Darinskas A, Kraško JA, **Žilionytė K**, Mlynska A, Gudlevičienė Ž, Mišeikytė-Kaubrienė E, Schijns V, Lubitz W, Kudela P, Strioga M. Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Vaccine*. 2018 Jul 5;36(29):4171-4180.
 6. Mlynska A, Šalčiūnienė G, **Žilionytė K**, Garberytė S, Strioga M, Intaitė B, Barakauskienė A, Lazzari G, Dobrovolskienė N, Krasko JA, Pašukonienė V. Chemokine profiling in serum from patients with ovarian cancer reveals candidate biomarkers for recurrence and immune infiltration. *Oncol Rep*. 2019 Feb;41(2):1238-1252.
 7. Skeberdytė A, Sarapinienė I, Krasko JA, Barakauskienė A, **Žilionytė K**, Prokarenkaitė R, Sužiedėlis K, Bukelskienė V, Jarmalaitė S. Salinomycin and dichloroacetate synergistically inhibit Lewis lung carcinoma cell proliferation, tumor growth and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Mar 19;523(4):874-879.
 8. Mlynska A, Vaišnorė R, Rafanavičius V, Jocys S, Janeiko J, Petrauskytė M, Bijekis S, Cimperman P, Intaitė B, **Žilionytė K**, Barakauskienė A, Meškauskas R, Paberalė E, Pašukonienė V. A gene signature for immune subtyping of deserts, excluded, and inflamed ovarian tumors. *Am J Reprod Immunol*. 2020 Jul;84(1):e13244.
 9. Zaleskis G, Garberytė S, Pavliukevičienė B, Valinčius G, Characiejus D, Mauricas M, Kraško JA, **Žilionytė K**, Žvirblė M, Pašukonienė V. Doxorubicin uptake in ascitic lymphoma model: resistance or curability is governed by tumor cell density and prolonged drug retention. *J Cancer*. 2020 Sep 19;11(22):6497-6506.

MOKSLINĖ IR PEDAGOGINĖ VEIKLA

- 9 žodiniai ir stendiniai pranešimai mokslinėse konferencijose;
- Dalyvavimas 10 mokslinių projektų;
- Vadovavimas 4 baigiamiesiems studentų darbams;
- FELASA C kategorija.

APDOVANOJIMAI:

Apdovanojimas už pranešimą 13-oje jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Vilnius (Lietuva), 2020 gruodžio 4 d. *Biotechnologijos ir biochemijos pranešimų sekcijoje užimta II vieta.*

PADĖKA

Doktorantūros studijų metai buvo kupini ne tik džiaugsmingų akimirku, bet ir iššūkių. Iššūkių, užauginusių mane kaip mokslininkę ir kaip asmenybę. Esu dėkinga visiems, kurie tiesiogiai ar netiesiogiai padėjo šiuos iššūkius įveikti.

Dėkoju savo darbo vadovei prof. Vitai Pašukonienei už suteiktą galimybę įsijungti į Nacionalinio vėžio instituto Imunologijos laboratorijos veiklą. Ačiū Jums už nuolatinį rūpestį, tikėjimą ir pasitikėjimą manimi, už optimizmą, įkvėpimą, pagarbą ir kritiką.

Esu dėkinga visam Nacionalinio vėžio instituto Imunologijos laboratorijos kolektyvui geranoriškumą ir palaikymą. Ypač dėkoju dr. Agatai Mlynskai, kurios pagalba ir konsultacijos buvo neįkainojamos vertės. Taip pat esu labai dėkinga dr. Neringai Dobrovolskienei, dr. Jan Aleksander Krasko, doktorantei Emilijai Paberalei, Nijolei Matusevičienei bei studentėms Ugnei Bagdzevičiūtei ir Elenai Urbštaitei, kurių pagalba vykdant eksperimentus buvo nepakeičiama.

Labiausiai noriu padėkoti savo artimiausiems žmonėms – šeimai, Domantui ir draugams, kurie visada manimi tikėjo. Jūsų meilė ir palaikymas yra didžiausia mano motyvacija.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

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