

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.514>

<https://orcid.org/0000-0003-2288-8402>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Skaistė Tulytė

Cirkuliuojančių limfocitų pokyčių bei
tumoro mikroaplinkos faktorių įtaka
sergančiųjų pankreatine duktaline
karcinoma išgyvenamumo prognozei

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2023 metais Vilniaus universitete Medicinos fakultete

Mokslinis vadovas – prof. dr. Audrius Šileikis (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Eugenijus Lesinskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

doc. dr. Birutė Brasiūnienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Audronė Eidukaitė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Eligijus Poškus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

doc. dr. Sunil Kumar Saini, Technical University of Denmark.

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. rugsėjo 14 d. 13 val. VULSK Raudonojoje auditorijoje. Adresas: (Santariškių g. 2, E122, Vilnius, Lietuva), tel. + 370 614 80 726; el. paštas info@santa.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.514>

<https://orcid.org/0000-0003-2288-8402>

VILNIUS UNIVERSITY

Skaistė Tulytė

The influence of circulating lymphocyte changes and tumor microenvironment factors on survival prognosis of patients with pancreatic ductal carcinoma

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences

Medicine (M 001)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2023 at Vilnius University

Academic supervisor –

Prof. Dr. Audrius Šileikis (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Academic consultant – Prof. Habil. Dr. Name Surname (Name of institution, Research area, Research field, Field code).

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

Chairman – Prof. Dr. Eugenijus Lesinskas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Birutė Brasiūnienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Habil. Dr. Audronė Eidukaitė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Eligijus Poškus (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Professor Sunil Kumar Saini, Technical University of Denmark.

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13(hour)/ on 14 Sep 2023 in Room/meeting room E122 of the Vilnius University Hospital Santaros klinikos

Address: Santariškiu str., 2, E122, Vilnius, Lithuania

Tel. +37061480726; e-mail: info@santa.lt

The text of this dissertation can be accessed at Vilnius University Library as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	9
1. ĮVADAS.....	11
1.1. Problemos aktualumas.....	11
1.2. Disertacijos tikslas ir uždaviniai	12
1.3. Ginamieji teiginiai.....	13
1.4. Tyrimo naujumas	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
2.1. Kasos vėžio paplitimas bei rizikos veiksniai.....	14
2.2. Diagnostika, atrakinė patikra.....	14
2.3. Gydomo principai ir metodai	16
2.3.1. Chirurginio gydymo, radioterapijos galimybės	16
2.3.2. Adjuvantinės chemoterapijos nauda	18
2.3.3. Pažengusios ir metastazavusios PDAK sisteminis gydymas chemoterapija ir taikinių klasės preparatais.....	21
2.4. Chemorezistencijos mechanizmai gydant pankreatinę duktalinę karcinomą.....	23
2.5. Metabolizmo ypatumai kasos vėžio audinyje	25
2.6. Kasos adenokarcinomos molekulinis profilis.....	25
2.7. Kasos tumoro mikroaplinka (TMA).....	27
2.7.1. Stomos ir įvairių ląstelių vaidmuo	27
2.7.2. Imuninės sistemos ląstelių išsidėtymas tumoro mikroaplinkoje	32
2.7.3. Tumoro ir stomos santykis	38
2.7.4. Neoadjuvantinio gydymo įtaka TMA.....	39
2.8. Imuninės sistemos veiksniai, sergant kasos vėžiu.....	39
2.8.1. Molekulinių ir metabolinių faktorių įtaka imuninei sistemai	39
2.8.2. Imunoterapija, rezistentiškumas jai	40
2.8.3. Prognostiniai, predikciniai biožymenys atsako į gydymą vertinimui	42
2.8.4. Periferinio kraujo limfocitų reikšmė, įvertinimas kraujyje ir pokyčiai gydymo metu (serume ir TMA), įtaka prognozei, palyginimas su kitomis onkologinėmis ligomis	43
2.8.4.1. CD8+ T ląstelės.....	43
2.8.4.2. T reguliaciniai limfocitai.....	45
2.8.4.3. NK ląstelės	45

2.8.4.4. Į NK ląsteles panašios (angl. Natural Killer T-like Cells)	46
2.8.4.5. CD4/CD8 santykis.....	47
2.8.4.6. Dendritinės ląstelės	48
2.8.4.7. B ląstelės	48
2.8.4.8. Ryšys tarp cirkuliuojančių ląstelių ir TMA.....	48
3. METODAI	50
3.1 .Tyrimo organizavimas.....	50
3.2. Atitiktis bioetikos reikalavimams.....	50
3.3. Rinkti duomenys	51
3.4. Tiriamųjų gydymas	51
3.5. Pacientų tiriamosios medžiagos analizė	55
3.5.1. Demografinių duomenų, kraujo tyrimų rinkimas, ligos atsako vertinimas	55
3.5.2 .Tėkmės citometrijos tyrimas	55
3.5.3. Patologinės medžiagos analizė	58
3.6. Stastistinė analizė	58
4. REZULTATAI	60
4.1. Tiriamųjų atranka disertacijos darbui.....	60
4.2. Ryšys tarp cirkuliuojančių limfocitų subpopuliacijų ir kasos vėžio vystymosi	61
4.3. Pacientų charakteristikos.....	64
4.3.1. Ankstyvos ligos grupės pacientai	64
4.3.2. Pažengusios ir metastazavusios ligos grupės pacientai	68
4.3.3. Visų stadijų pacientų, kurių surinkti trijų vizitų duomenys, analizė.....	69
4.4. Periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijų sąsaja su klinikiniais ir naviko požymiais	70
4.4.1. Ankstyvos ligos pacientų grupė.....	70
4.4.2. Pažengusios ir metastazavusios ligos pacientų grupė.....	71
4.5. Taikyto gydymo įtaka periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijoms.....	74
4.5.1. Ankstyvos stadijos operuotųjų grupė (du vizitai).....	74
4.5.2. Pažengusios ligos grupė (du vizitai).....	75
4.5.3. Visų stadijų pacientai, kurių surinkti trijų vizitų duomenys..	77
4.6. Vėžio mikroaplinkos imuninių ląstelių ryšys su periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijomis	80

4.6.1. Pacientų charakteristikos, tumoro ir stromos santykio ryšys su klinikiniais požymiais.....	80
4.6.2. Tumoro ir stromos santykio ryšys su kraujyje cirkuliuojančių limfocitų subpopuliacijomis	80
4.7. Išgyvenimo rezultatai	82
4.7.1. Ankstyvos ligos grupės pacientų išgyvenimo rezultatai.....	82
4.7.2. Tumoro ir stromos santykio įtaka išgyvenamumui	87
4.7.3. Pažengusios ir metastazavusios ligos grupė	88
DISKUSIJA.....	94
IŠVADOS.....	103
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	104
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	105
PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMA	106
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	108
PRIEDAI	134
SANTRAUKA	135
ABBREVIATIONS.....	135
1. INTRODUCTION.....	136
1.1. Dissertation aims and objectives	137
1.2. Statements to be defended.....	137
2. MATERIALS AND METHODS	138
2.1. Study design, patients' selection and samples collection.....	138
2.2. ANALYSIS OF PATIENT SAMPLES.....	141
2.3. Statistics	142
3. RESULTS.....	143
3.1. Selection of research subjects for dissertation work	143
3.2. Relationship between circulating lymphocyte subpopulations and pancreatic cancer development	144
3.3. Characteristics of the patients	147
3.3.1. Early disease group.....	147
3.3.2. Group of patients with advanced and metastatic disease.....	150
3.3.3. Analysis of patients of all stages, whose data were collected from three visits.....	151

3.4. Correlation of peripheral blood lymphocyte subpopulations with clinical and tumor characteristics	152
3.4.1. Correlation in the early diseases' group.	152
3.4.2. Correlation in the group of patients with advanced and metastatic disease	154
3.5. Influence of the applied treatment on subpopulations of peripheral blood lymphocytes	156
3.5.1. Early stages, resectable group (two visits)	156
3.5.2. Advanced disease (two visits)	158
3.5.3. Patients of all stages, whose data were collected in three visits.....	160
3.6. Relationship of immune cells of the cancer microenvironment with subpopulations of peripheral blood lymphocytes.....	162
3.6.1. Patient characteristics, a relationship of tumor-stroma ratio with clinical signs	162
3.6.2. Relationship of the tumor-stroma ratio with the subpopulations of lymphocytes circulating in the blood	163
3.7. Survival results	163
3.7.1. Survival results in the early diseases group.....	163
3.7.2. The influence of the tumor-stroma ratio on survival	168
3.7.3. Survival results in the advanced and metastatic disease group.....	169
DISCUSSION	174
CONCLUSIONS	183
REFERENCES	183
PADĚKA.....	192

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- ABO** – kraujo grupių vertinimo sistema.
- BRCA** – krūties vėžio genas (angl. *breast cancer gene*).
- BI** – bendras išgyvenamumas.
- CA 19-9** – vėžio žymuo karbohidratinis antigenas 19-9.
- CD** – ląstelių paviršiaus žymenys (angl. cluster of diferentiation), būdingi tam tikrai ląstelių subpopuliacijai, jų diferenciacijos stadijai ar aktyvacijos būsenai.
- CTLA** – (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*) citotoksinis su T limfocitais asocijavęsis baltymas.
- DL** – dendritinės ląstelės.
- ECOG** – Rytų kooperatinės onkologijos grupės (angl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) skalė pacientų funkcinei būklei įvertinti.
- FOLFIRINOX** – chemoterapijos preparatų kombinacinis režimas: oksaliplatina, leukovorinas, irinotekanas, fluorouracilas.
- FOLFOX** – chemoterapijos preparatų kombinacinis režimas: oksaliplatina, leukovorinas, fluorouracilas.
- HCC** – hepatoceliulinė karcinoma.
- IBPL** – išgyvenamumas ligai neprogresuojant.
- IL** – interleukinas.
- IFN** – interferonas.
- IPMN** – intraduktalinė papilinė mucininė neoplazija.
- KRAS** – (angl. Kirsten rat sarcoma virus) RAS onkogenų šeimos genas.
- Ki 67** – proliferacinis aktyvumas, įvertinamas imunohistochemine raiška.
- KMI** – kūno masės indeksas.
- KT** – kompiuterinė tomografija.
- MDSC** – mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės (angl. Myeloid-derived suppressor cells).
- MRT** – magnetinio rezonanso tomografija.
- NK** – (angl. natural killers) ląstelės žudikės.
- OFF** – chemoterapijos režimas: oksaliplatina, leukovorinas, fluorouracilas.
- PALB** – geno pavadinimas.
- PDAK** – pankreatinė duktalinė adenokarcinoma.
- PARP** – poli (ADF ribozės) polimerazė.
- PD** – programuota žūtis (angl. programmed death).
- PI** – pasikliautinis intervalas.
- PET** – pozitronų emisijos tomografija.
- PPPDR** – prievartį išsauganti pankreatoduodenalinė rezekcija. 10

RCC – inkstų ląstelių karcinoma.

ROS – protoonkogeno pavadinimas.

RS – rizikos santykis.

RT – radioterapija.

SBRT – stereotaktinė kūno radioterapija (angl. stereotactic body radiotherapy).

SN – standartinis nuokrypis.

TACE – transarterinė chemoembolizacija.

TAM – su tumoru asocijuoti makrofagai.

TCR – T limfocitų receptoriai (angl. T-cell receptor).

Th – T helperiai.

TMA – tumoro mikroaplinka.

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Kasos vėžys (pankreatinė duktalinė adenokarcinoma, PDAK) – tai viena agresyviausių onkologinių ligų (1). Diagnostikos sunkumus ir blogą išgyvenamumą lemia ypatinga organo anatomija, greitas vėžio vystymasis, profilaktinių atrankos programų nebuvimas, įvairūs tumorų barjerai bei imuninės sistemos vangumas (2).

Kasos vėžys diagnozuojamas jau esant simptomams: gelta ar skausmui, tada daugumai pacientų operacinis gydymas, visiškai naviko pašalinimas jau nėra galimi (3). Taigi ankstyvų (pirmos, antros) stadijų navikai gali būti visiškai pašalinami, kai kuriems pacientams po operacijos dar rekomenduojama adjuvantinė chemoterapija (4, 5). Vietiškai pažengę (trečios stadijos) kasos navikai gydomi neoadjuvantine chemoterapija sumažinant apimtį ir invaziją į kraujagyslines struktūras ir šalinant likutines naviko mases (6, 7). Išplitusi ketvirtos stadijos liga gydoma sisteminio poveikio chemoterapinių vaistų kombinacijomis (8, 9).

PDAK gydymui įprastoje klinikinėje praktikoje rekomenduojama chemoterapija. Šios grupės efektyvių vaistų pasirinkimas pastaraisiais metais didėja, rekomenduojamos liposominės, su baltymais konjuguotos formos (10, 11). Tokios naujos galimybės kai kurių pacientų išgyvenamumą pagerina gana reikšmingai, tačiau proveržio ligos gydyme neįvyksta. Kitos klasės vaistai, taikinių terapijos preparatai, taip pat naudingi tik tam tikroms kasos vėžio pacientų grupėms, esant specifinėms mutacijoms (12). Kitų onkologinių ligų gydymui taikomi angiogenezės inhibitoriai, tirozinkinazių inhibitoriai yra menkai aktyvūs PDAK atveju. Imunoterapijos metodai, kardinaliai pakeitę kitų solidinių onkologinių ligų (melanos, plaučių vėžio) pacientų išgyvenimo tendencijas, kasos vėžyje, dėl ypač ryškios stromos ir mažo imuninių ląstelių kiekio navike, taip pat neefektyvūs. Žinoma, tęsiami tyrimai su naujais šios klasės vaistais, ieškoma naujų signalinių kelių, reikšmingų antigenų, stengiamasi suaktyvinti imuninį atsaką, įgalinti T ląsteles (13, 14).

Ieškant naujų gydymo būdų neabejotinai svarbu išaiškinti prognostinius ir predikcinius biožymenis. Kasdienėje klinikinėje praktikoje prognostiškai svarbus ir gydymo efektyvumo vertinimui bei stebėjimui dėl ligos atsinaujinimo naudojamas vienintelis CA 19-9 žymuo. Vis dėlto kai kurie pacientai jo tiesiog neišskiria, o cholangitas, kiti uždegiminiai procesai gali sąlygoti jo padidėjimą (15, 16). Vienintelis predikcinę vertę turintis žymuo

yra BRCA mutacijų tyrimas, rodantis didesnę jautrumą platinos preparatams ir taikinių terapijos PARP inhibitoriais galimą naudą (12).

Taigi naujų žymenų paieška, ypač imuninės sistemos faktorių vertinimas šiuo metu, kai ypatingas dėmesys skiriamas imunoonkologijai, išaiškinama chemoterapijos, kitų gydymo metodų įtaka imuninei sistemai, bandoma kombinuoti kelių klasių vaistus, yra itin svarbi. Jau yra žinoma, kad citotoksinių CD3+CD8+ limfocitų gausa ir išsidėstymas naviko centre lemia geresnę pacientų išgyvenamumą, natūralių žudikų (NK ląstelių), B ląstelių infiltracijos įtaka išgyvenamumui nėra aiški, o CD4+ helperių – neigiama. Cirkuliuojančių (periferinio kraujo) limfocitų pokyčiai gydant naujesniais chemopreparatais, poveikis išgyvenamumo rezultatams bei ryšys tarp periferinio kraujo ir TMA kiekių PDAK pacientų populiacijoje nėra aiškus (17, 18).

Šiuo disertacijos darbu siekiama išaiškinti pacientų imuninės sistemos faktorių, kitų naviko aplinkos elementų įtaką išgyvenimo prognozei ir galimą prediktyvinę vertę, o kartu ir šiuolaikinės chemoterapijos poveikį imuninei sistemai.

1.2. Disertacijos tikslas ir uždaviniai

Įvertinti periferinio kraujo limfocitų pradinių verčių ir pokyčių gydymo metu bei sąsajos su tumoru mikroaplinkos faktoriais įtaką pacientų, sergančių kasos vėžiu, bendro išgyvenimo trukmei.

1. Nustatyti B, T limfocitų reikšmes kraujyje prieš radikalią kasos vėžio operaciją ir po jos, pradėjus chemoterapinį gydymą.
2. Nustatyti kasos vėžio audinio savybes, jų sąsają su periferinio kraujo limfocitų duomenimis (pacientams, kuriems atliekamos radikali kasos rezekcinės operacijos).
3. Nustatyti B, T limfocitų reikšmes kraujyje gydymo tik sisteminė chemoterapija metu (esant indikacijoms šiems pacientams gali būti atliekamos paliatyvios operacijos).
4. Įvertinti B, T limfocitų pradinių verčių, pokyčių gydymo metu, tumoru aplinkos savybių įtaką išgyvenimui iki progresavimo ir bendram išgyvenimui.

1.3. Ginamieji teiginiai

1. Kasos vėžiui taikomas operacinis gydymas bei adjuvantinė chemoterapija turi įtakos limfocitų subpopuliacijų kiekio pokyčiams periferiniame kraujyje.
2. Egzistuoja ryšys tarp vėžio mikroaplinkos (tumoro ir stromos santykio) ir cirkuliuojančių periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijų.
3. Kasos vėžiui taikoma sisteminė chemoterapija keičia limfocitų subpopuliacijų kiekį periferiniame kraujyje sergantiesiems pažengusiu ir metastazavusiu kasos vėžiu.
4. Periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijų pradinės vertės (tiriant prieš bet kokią taikomą gydymą), pokyčiai gydymo metu, vėžio mikroaplinkos savybės yra susiję su išgyvenimo trukme.

1.4. Tyrimo naujumas

Pirmą kartą bandyta nustatyti galimą chemoterapijos FOLFIRINOX režimo įtaką kasos intraduktaline adenokarcinoma sergančiųjų imuninės sistemos komponentams – cirkuliuojantiems T limfocitams. Bandyta išvelgti imuninės sistemos predikcinę vertę – atrasti pacientų grupes, kurioms geriau tiktų vienas ar kitas chemoterapijos režimas dėl savo imunogeninio efekto. Ateityje kombinuojant chemoterapijos ir imunoterapijos klasių vaistus tokia prediktyvinė vertė būtų naudinga.

Iki šiol atliktuose tyrimuose dažniausiai vertinta gemcitabino įtaka, analizuota limfocitų vertė išgyvenamumui arba chemoterapijos įtaka imuninės sistemos ląstelėms ar bandyta išvelgti ryšį tarp cirkuliuojančių ir tumoro mikroaplinkos komponentų. Šioje analizėje palyginta cirkuliuojančių ir tumoro aplinkos faktorių, dviejų chemoterapijos režimų įtaka ligos atsinaujinimui ir paciento išgyvenamumui. Tyrime aiškiai išskiriamos dvi pacientų grupės: ankstyvos ir pažengusios ligos, jos nagrinėjamos imuninės sistemos aktyvumo požiūriu.

Lietuvoje pastaraisiais metais nebuvo atliekami tyrimai su periferinio kraujo imuninės sistemos komponentais sergantiems PDAK. Tad ši analizė atspindi ir pastarųjų metų kasos gydymo tendencijas mūsų šalyje.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

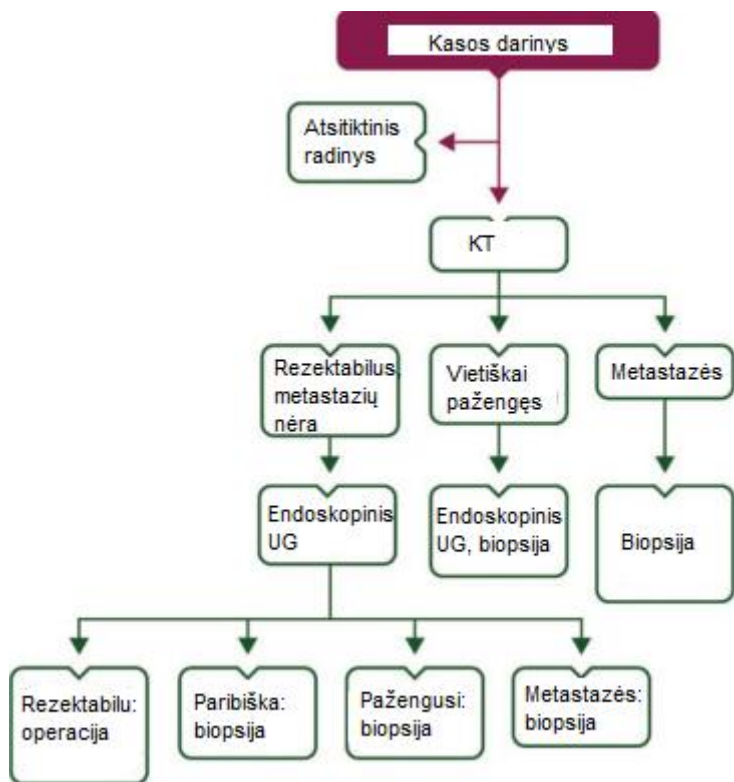
2.1. Kasos vėžio paplitimas bei rizikos veiksniai

Pankreatinė duktalinė adenokarcinoma (PDAK) yra agresyvios eigos ir mirtį sąlygojanti onkologinė liga, kylanti iš kasos duktalinių ląstelių ir sudaranti 90 % visų kasos vėžio atvejų (19). GLOBOCAN duomenimis, 2020 m. pasaulyje registruoti 495 773, mirė 466 003 žmonės, didžiausias sergamumas ir mirtingumas yra Azijoje ir Europoje, daugiau serga vyrai nei moterys (20). Kasos vėžys pagal sergamumą yra 11 vietoje tarp visų onkologinių ligų (21, 22), o penkerių metų išgyvenamumas susirgus siekia tik 10 % ir yra mažiausias iš visų vėžinių susirgimų (23). Lietuvos vėžio registro duomenimis, Lietuvoje 2017 m. nustatytas 561 kasos vėžio atvejis, t. y. 3 % vyrų ir 4 % moterų visų onkologinių ligų atvejų, mirė 506 žmonės, ir tai buvo ketvirta pagal dažnumą mirties nuo onkologinių ligų priežastis (24).

Predisponuojančiais faktoriais laikomi amžius, lytis, priklausymas etninei grupei, ABO kraujo grupė, mikrobiotos faktoriai, cukrinis diabetas, šeiminiai ir genetiniai faktoriai, rūkymas, alkoholio vartojimas, mitybos įpročiai, persirgtas pankreatitas, nutukimas, infekcijos, socioekonominiai ypatumai (1, 22).

2.2. Diagnostika, atrankinė patikra

Kasos vėžio stadijai įvertinti šiuo metu naudojama Amerikos jungtinio komiteto (angl. *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*) TNM stadizacija (8 leidimas, 2017). Ankstyvų stadijų (I–II) ligą aptikti sunku, nes pradžioje pacientas simptomų nejaučia ar jį vargina tik nežymus virškinimo sutrikimas (25). Pažengusi liga paprastai pasireiškia skausmu, gelta, nuovargiu, mitybos sutrikimais (26). PDAK diagnozuojamas įvertinus radiologiniais tyrimais, iš jų tiksliausiu laikoma kompiuterinė tomografija. Jos jautrumas siekia nuo 76 % iki 96 %, yra itin tinkama kraujagyslinėms struktūroms įvertinti (27). Kiti tyrimai: MRT vertingas kepenų metastazių patikslinimui ar PET-KT, kai KT duomenys neatspindi didelio ligos tūrio, o CA 19-9 reikšmės didelės (2). Kasos vėžio diagnostikos schema pavaizduota 1 pav.



1 pav. Kasos vėžio diagnostikos schema pagal Europos onkologų chemoterapeutų rekomendacijas (28)

CA 19-9 vėžio žymuo, aptinkamas serume, Lewiso kraujo grupės antigenas, kurio jautrumas ir specifiškumas 80–90 % (15), pradinei diagnostikai, juolab ankstyvai nėra tinkamas, nes 10 % žmonių populiacijos jo neekspresuoja, klaidingai didelis kiekis kraujyje gali cirkuluoti esant cholangitui (itin dažna būklė, sergant kasos galvutės adenokarcinoma) (2, 16). Visgi CA 19-9 gerai koreliuoja su naviko dydžiu, metastazėmis, paciento prognoze (15), yra itin tinkamas sisteminio gydymo efektyvumui vertinti ir diagnozavus ankstyvos stadijos ligą, tačiau, esant didelėms šio žymens vertėms, gydymą rekomenduojama pradėti nuo sisteminės terapijos (29).

Efektyvių atrankinės patikros programų nėra (22). Dėl ligos retumo, apsunkintos vizualizacijos radiologiniais tyrimais, greitos ligos eigos visos populiacijos atrankinė patikra neįmanoma (30, 31). Atrankinė patikra šiuo metu rekomenduojama tik turintiems padidėjusią riziką susirgti, t. y. pacientams, kurių pirmos eilės giminaičiai sirgo kasos vėžiu, yra paveldėję

Peutzo ir Jegherso sindromą ir turi BRCA2, p16, HNPCC bei PALB2 mutacijas (32).

2.3. Gydomo principai ir metodai

2.3.1. Chirurginio gydymo, radioterapijos galimybės

PDAK gydoma atsižvelgiant į stadiją, naviko invaziją į kraujagysles, tolimųjų metastazių buvimą. Dažniausiai I–II stadijos vėžys (rezektabilus) šalinamas, III stadijos (paribiškai operabilus arba vietiskai pažengęs) atveju taikomas priešoperacinis sisteminis ar (ir) lokalus gydymas, IV stadijos (jau aptinkama tolimųjų metastazių) ligai paprastai rekomenduojamas tik sisteminis gydymas. Kasos vėžio operabilumo vertinimas nurodytas 1 lentelėje (28).

1 lentelė. Kasos vėžio operabilumo vertinimas (28)

Rezektabilumas	Arterijos	Venos
Rezektabilus	Nėra kontakto su <i>tr. celiacus</i> , <i>a. mesenterica sup.</i> , <i>a. hepatica communis</i>	Nėra naviko kontakto su <i>v. mesenterica sup.</i> , <i>v. portae</i> ar kontaktas su vena $\leq 180^\circ$ su venos kontūro nelygumais
Paribiškai rezektabilus	Kasos galva: 1) naviko kontaktas su <i>a. hepatica communis</i> be perėjimo į <i>tr. celiacus</i> ar <i>a. hepatica</i> bifurkaciją; 2) naviko kontaktas su <i>a. mesenterica sup.</i> $\leq 180^\circ$ Kūnas / uodega: 1) naviko kontaktas su <i>tr. celiacus</i> $\leq 180^\circ$; (II) naviko kontaktas su <i>tr. celiacus</i> $> 180^\circ$ be peraugimo į aortą ir <i>a. gastroduodenalis</i>	1) naviko kontaktas su <i>a. mesenterica sup.</i> ar <i>v. portae</i> $> 180^\circ$; (II) naviko kontaktas $\leq 180^\circ$ su kontūro nelygumais ar venų tromboze, bet proksimaliau ir distaliau nepažeista, gali būti užtikrinta saugi ir visiška rezekcija bei venų rekonstrukcija); 3) naviko kontaktas su <i>v. cava inf.</i>

Rezektabilumas	Arterijos	Venos
Nerezektabilus	Kasos galva: 1) naviko kontaktas su <i>a. mesenterica sup.</i> > 180 °; 2) naviko kontaktas su <i>tr. celiacus</i> > 180 °; 3) naviko kontaktas su pirmąja tuščiosios žarnos <i>a. mesenterica sup.</i> šaka. Kūnas / uodega: 1) naviko kontaktas su <i>a. mesenterica sup.</i> ar <i>tr. celiacus</i> > 180°; 3) naviko kontaktas su <i>tr. celiacus</i> ir peraugimas į aortą	Kasos galva: 1) nerekonstruotina <i>v. mesentericasup.</i> / <i>v. portae</i> dėl naviko peraugimo ar okliuzijos (navikas ar trombas); 2) kontaktas su proksimaliausia drenuojančia į tuščiosios žarnos <i>v. mesenterica sup.</i> šaką. Kūnas / uodega: nerekonstruotina <i>v. mesenterica sup.</i> / <i>v. portae</i> dėl naviko peraugimo ar okliuzijos (tumoras ar trombas)

Tik apie 20 % visų pirmą kartą patenkančių pacientų gali būti išgydyti chirurginiu būdu (33). Nesant kraujagyslių invazijos, kai navikas nedidelis, tolimųjų metastazių nėra (3), atliekama distalinė kasos rezekcija, jei navikas kasos uodegoje (34), pankreatoduodenektomija Whipple'io būdu (34, 35) ar prievartį išsauganti pankreatoduodenektomija, jei kasos galvutėje (36), ir standartinė limfonodektomija, kai pašalinama > 15 limfmazgių (28, 37, 38).

Kai navikas yra paribiškai operabilus (39), galima taikyti neoadjuvantinę chemoterapiją ar spindulinę terapiją, sumažinti jo dydį, kraujagyslių invaziją ir paskui pašalinti radikaliai (6, 40, 41). Priešoperaciniu neoadjuvantiniu tikslu paribiškai operabiliam ar vietiškai pažengusiam vėžiui gydyti dažniausiai taikomas FOLFIRINOX režimas, labai padidinantis rezektabilumo galimybę ir pagerinantis pacientų prognozę (7), kiti galimi režimai: gemcitabino monoterapija, gemcitabino nab paklitakselio kombinacija (6).

Operacijos sėkmę lemia pašalinimo radikalumas, auglio faktoriai. Net gerai atrinkus pacientus, po operacijos bei adjuvantinės chemoterapijos vidutinis bendras išgyvenamumas (BI) siekia 20,1–28,0 mėn (4, 42). Svarbiausiais prognostiniais ilgalaikio išgyvenamumo faktoriais laikomi: neigiamas rezekcijos kraštas (R0 rezekcija), naviko genetinis profilis, mažas pirminio tumoro dydis ir metastazių sritiniuose limfazgiuose nebuvimas (43, 44).

Radioterapija pažengusios ligos atveju yra galima, klinikiniuose tyrimuose taikant įprastai frakcionuotą ir SBRT su chemoterapija fluoropirimidino junginiais ar gemcitabinu pasiektas 9,9 mėn. IBLP rodiklis ir 16 mėn. BI (45). Radioterapijos nauda neoadjuvantiniu tikslu buvo tirta trečios fazės atsitiktinių imčių klinikiniame tyrime PREOPANC. Taikant gemcitabiną, radioterapiją su gemcitabinu, operuojant ir skiriant pooperacinį gydymą gemcitabinu pavyko

reikšmingai padidinti R0 rezekcijų, sumažinti limfmazgių įtraukimą, limfovaskulinę ir perineurinę invaziją, atitolinti vietinį ligos recidyvą, nei operuojant pacientus iš karto. Tačiau BI tokia strategija nepagerino (46). Antros fazės klinikiniam tyrimo, kur vienoje šakoje pacientai gydyti 8-iais priešoperaciniais mFOLFIRINOX ciklais, paskui operuoti, arba 7-iais mFOLFIRINOX ciklais, stereotaktine kūno radioterapija ar hipofrakcionuota vaizdais valdoma RT, pavyko įrodyti teigiamą chemoterapijos įtaką išgyvenamumui, tačiau RT jo labiau nebepagerino (47). Šiuo metu vyksta PREOPANC-2 tyrimas, kuriame pacientai bus gydomi 8 ciklais neoadjuvantiniu FOLFIRINOX režimu, operuojami, paskui stebimi arba 3 ciklais neoadjuvantinio gemcitabino, hipofrakcionuota RT antro ciklo metu, operuojami ir paskui dar gydomi adjuvantinio gemcitabino 4 ciklais (48).

2.3.2. Adjuvantinės chemoterapijos nauda

Po operacijos rekomenduojami adjuvantinio gydymo režimai, paprastai skiriami esant IIB, III ligos stadijai. Daug metų buvo vartojamos fluorouracilo / leukovorino ar gemcitabino schemas, kurių vertė tirta ESPAC-3 klinikiniam tyrimo, gydant iki 6 mėn. po operacijos. Į tyrimą įtraukti 1 088 pacientai po operacijų, 65 % jų po R0 rezekcijų, apie 70 % aptikta metastazių sritiniuose limfmazgiuose, taigi apie 28 % antros ir apie 60 % trečios stadijos, apie 60 % po pankreatoduodenektomijos Whipple'io būdu ir apie 30 % po PPPDR, apie 80 % buvo atlikta venų rezekcija. Vidutinis bendras išgyvenamumas abiejose šakose siekė 23–23,6 mėn., šalutinių reiškinių gemcitabino grupėje buvo mažiau (13).

2017 m. ESPAC-4 klinikinis tyrimas įrodė gemcitabino ir kapecitabino derinio naudą. Tai trečios fazės atsitiktinių imčių klinikinis tyrimas, į kurį įtraukti 732 pacientai, kurių amžiaus mediana buvo 65 m., daugumos navikai buvo G2 (50 %) ir G3 (39 %) diferenciacijos, 80 % limfmazgiuose nustatyta metastazių, 89 % diagnozuota III stadijos liga, 51 % atlikta Whipple'io rezekcija, 34 % PPPDR, 14 % venų rezekcija. Kombinacinis šiek tiek pagerino vidutinį BI, jis buvo 28,0 mėn. (95 % PI 23,5–31,5), palyginti su 25,5 mėn. (22,7–27,9) gemcitabino grupėje (RS 0,82 [95 % PI 0,68–0,98], $p = 0,032$). Vertingiausias kapecitabino pridėjimas buvo šiose pacientų grupėse: kai priešoperacinis CA 19-9 viršijo 150 kU/l (RS 0,73 (0,59–0,91)), pasiekta R0 rezekcija (RS 0,68 (0,49–0,93)), esant blogos diferenciacijos (RS 0,76 (0,58–0,99)), mažesniems nei 30 mm (RS 0,67 (0,50–0,92)) navikams (42).

2018 m. paskelbti PRODIGE 24 klinikinio tyrimo rezultatai, kombinacinis mFOLFIRINOX pripažintas itin vertingu pooperaciniu režimu.

Į tyrimą įtraukti 493 pacientai, kurių amžiaus mediana 63 m., iki 76 % jų buvo nustatyta metastazių limfmazgiuose, iki 45 % rezekcija buvo neradikali, daugumos (iki 94 %) pradinis CA 19-9 buvo nedidelis, ≤ 90 U/mL, iki 50,8 % buvo G2 diferenciacijos ir tik iki 14,2 % G3, daugiausia buvo T3 navikų (iki 89,4 %), t. y. vyravo IIB stadija (iki 74,1 %), iki 73,7 % buvo intravaskulinė invazija, iki 92,8 % perineurinis plitimas, iki 82 % pacientų operuoti Whipple'io būdu ir iki 28 % atlikta venos rezekcija. Išgyvenamumo rezultatus naujasis režimas pagerino reikšmingai: vidutinis BI buvo 54,4 mėn. mFOLFIRINOX ir 35,0 mėn. gemcitabino grupėje (stratifikuotas mirties tikimybių dažnis 0,64; 95 % PI, 0,48–0,86; $P = 0,003$). Didžiausia mFOLFIRINOX nauda buvo N1 (RS 0,54, 0,42–0,69) bei R1 (RS 0,52 (0,37–0,72) pacientų grupėms (5). Vėlesnėje analizėje įvertintas 5 m. BI buvo atitinkamai 43,2 % vs 31,4 % mFOLFIRINOX ir gemcitabino grupėje (49).

Tad šiuo metu IIB, III stadijos pacientams, kurie prieš operaciją nėra gydyti chemoterapija, pooperaciniu laikotarpiu skiriama FOLFIRINOX, o esant vyresniam amžiui, blogesnei fizinei būklei apsiribojama gemcitabinu ar kombinaciniu jo režimu su kapecitabinu.

Adjuvantinės chemoterapijos gydymo režimų naudos santrauka pateikta 2 lentelėje (50).

2 lentelė. Pagrindiniai III fazės adjuvantinės chemoterapijos, taikomos PDAK, klinikiniai tyrimai (50)

Klinikinis tyrimas	Metai	n	Eksperimentinė šaka	Kontrolinė šaka	Išgyvenimas be ligos (mėn.)	BI (mėn.)
ESPAC-1	2004	289	5-FU	stebėjimas		20,1 vs. 15,5 RS 0,71, p: 0,009
CONKO-001	2013	354	GEM	stebėjimas	13,4 vs. 6,7 RS 0,55, p < 0,001	22,8 vs. 20,2 RS 0,76, p < 0,01
ESPAC-3	2010	1 088	GEM	5-FU	14,3 vs. 14,1 NR	23,6 vs. 23,0 NR
ESPAC-4	2017	732	GEM + kapecitabinas	GEM	13,9 vs. 13,1 NR	28,0 vs. 25,5 RS 0,8, p: 0,032
APACT	2019	866	GEM + nab-paklitakselis	GEM	19,4 vs. 18,8 NR	40,5 vs. 36,2 NR
CONKO-005	2017	436	GEM + erlotinibas	GEM	11,4 vs. 11,4 NR	24,5 vs. 26,5 NR
PRODIGE-24	2018	493	mFOLFIRINOX	GEM	21,6 vs 12,8 RS 0,58, p < 0,001	54,4 vs. 35,0 RS 0,64, p: 0,003

BI – bendras išgyvenamumas; 5-FU – 5 fluorouracilas; GEM – gemcitabinas; RS – rizikos santykis; NT – nereikšminga.

2.3.3. Pažengusios ir metastazavusios PDAK sisteminis gydymas chemoterapija ir taikinių klasės preparatais

Pažengusi (neoperabili ir metastazavusi liga) gydoma sisteminė chemoterapija. Operacinis gydymas: gastrojejunostomija atliekama tik simptomams mažinti – siekiant gerinti mitybą atrinktiems pacientams. Esant oligometastatinei ligai, kai kuriems pacientams naudinga chirurgiškai pašalinti metastazes ar taikyti kitus lokalaus gydymo metodus, pastaruoju metu vykdomi klinikiniai tyrimai, kurie atsakys, kokiai pacientų grupei siūlytinas toks gydymas (51).

Nepaisant blogos išgyvenimo prognozės, sisteminis gydymas esant vietiškai pažengusiai ar metastazavusiai ligai yra naudingas, tai įrodyta aprašyta metaanalizėje: septyniuose klinikiniuose tyrimuose tiriant 432 pacientus sisteminis gydymas pagerino bendrą jų išgyvenamumą, palyginti su geriausiu palaikomoju gydymu (RS = 0,64, 95 % CI 0,42–0,98, $p < 0,05$) (52).

Monoterapija gemcitabinu tapo gydymo standartu nuo 1997 m., kai trečios fazės klinikiniame tyrime, lyginant su 5-fluorouracilu (5-FU), gauti BI rezultatai atitinkamai: 5,6 vs. 4,4 mėn., log rank testu $p = 0,002$) (8). Vėlesniuose trečios fazės tyrimuose, kur gemcitabinas buvo pasirenkamas kaip kontrolinė šaka, atsako dažnis siekdavo tik 2,2–3,8 mėn., vidutinis BI 5–6,7 mėn. ir 1 metų išgyvenamumas 11–25 % (53).

2011 m. buvo pristatyti FOLFIRINOX, kaip pirmojo režimo metastazavusiam kasos vėžiui gydyti, teigiami rezultatai. Į tyrimą įtraukti 342 pacientai, kurių amžiaus mediana 61 m., ECOG 0–1, metastazės nustatytos vidutiniškai dviejuose organuose. Šiame tyrime gautas vidutinis IBLP 6,4 mėn. FOLFIRINOX ir 3,3 mėn. gemcitabino šakoje (rizikos, kad liga progresuos, santykis 0,47; 95 % CI, 0,37–0,59; $P < 0,001$). Vidutinis BI 11,1 mėn. FOLFIRINOX grupėje, palyginti su 6,8 mėn. gemcitabino (mirties rizikos santykis 0,57; 95 % CI, 0,45–0,73; $P < 0,001$). Didžiausia režimo nauda nustatyta esant dviem metastazių vietoms, kepenų metastazėms, normaliam CA 19-9 (54).

FOLFIRINOX režimo, skirto lokaliai pažengusiam kasos vėžiui gydyti, rezultatai pristatyti tik 2022 m. Į tyrimą įtraukta 170 pacientų, > 90 % buvo T4 navikų, apie 19 % įtartos metastazės limfmazgiuose, iki 54 % limfmazgių būklė neaiški. Stebint pacientus vidutiniškai 43,7 mėn. IBLP siekė 9,8 mėn. (95 % CI: 7,2; 11,7) FOLFIRINOX vs. 7,5 mėn. (95 % CI: 6,0; 9,2) gydytų gemcitabinu, stratifikuotas RS = 0,57 (95 % PI: 0,3; 1,08), $p = 0,0468$. Vidutinis BI buvo 15,1 mėn. (95 % PI: 11,9–20,3) FOLFIRINOX šakoje vs

15,6 mėn. (95 % PI: 11,7–18,6) gemcitabino, RS = 1,03 (95 % PI: 0,53–1,98), $p = 0,66$ (9).

Gerus išgyvenamumo rezultatus parodė ir nab-paklitakselio bei gemcitabino kombinacija. Daugiacentriame atsitiktinių imčių tyrime, į kurį buvo įtrauktas 861 pacientas, taip pat dauguma pacientų turėjo metastazių dviejuose ir daugiau organų, dažniausia metastatinė vieta buvo kepenys. Vidutinis BI buvo kur kas ilgesnis nab-paklitakselio ir gemcitabino kombinacijos grupėje nei gemcitabino monoterapijos ir siekė 8,7 vs 6,6 mėn. atitinkamai, RS 0,72, 95 %, PI = 0,62–0,83, $P < 0,001$) (55).

FOLFIRINOX ir nab-paklitakselio, gemcitabino kombinacija buvo palyginta 22 studijų metaanalizėje, iš viso apžvelgti 7 425 pacientų duomenys. 90 % jau aptiktos tolimosios metastazės, 57 % kepenų metastazės. Abu režimai buvo vienodai efektyvūs (BI: 1,13; 95 % PI: 0,78–1,63; IBPL: RS: 1,19; 95 % CI: 0,85–1,67) (10).

Pacientams, turintiems *BRCA/PALB2* mutacijų, cisplatinos / gemcitabino kombinacija galėtų būti efektyvi, nes parodė gerus atsako į gydymą (atsako dažnis 74,1 %) bei išgyvenamumo rezultatus antros fazės tyrime (vidutinis IBLP siekė 9,7 mėn., vidutinis BI 15,5 mėn.) (56). Tačiau šis režimas tiesiogiai su FOLFIRINOX nebuvo lygintas, tad kol kas tvirtų rekomendacijų, kad pirmaeiliam gydymui reikėtų taikyti skirtingus režimus, esant mutacijų, nėra (57).

Antraeiliam gydymui bandyta kombinuoti oksaliplatinos, fluorouracilo derinius (OFF, FOLFOX režimai). CONKO-003 klinikiniame tyrime OFF režimą lyginant su 5-FU–folinės rūgšties kombinacija, buvo vidutinis BI 5,9 versus 3,3 mėn. (RS, 0,66; $p = 0,01$) (58). Atlikus NAPOLI-1 tyrimą, kur tirtas nanoliposominio irinotekano efektyvumas, taikant monoterapiją ar drauge su fluorouracilu, kalcio folinatu, įrodžius vidutinio BI (6,1 mėn (95 % CI 4,8–8,9) vs 4,2 mėn. (3,3–5,3), (RS 0,67, 95 % CI 0,49–0,92; $p = 0,012$), po gemcitabino monoterapijos rekomenduojamas šis režimas (11).

Kitų onkologinių ligų gydymui plačiai taikomi taikinių terapijos grupės preparatai PDAK atveju mažai efektyvūs. Kiek svaresni įrodymai gauti 2007 m. erlotinibo klinikiniame tyrime, į kurį buvo įtraukti 569 pacientai, iki 24,3 %, esant lokaliai pažengusiai ir 75,7 % metastazavusiai ligai. Gauti patikimi išgyvenamumo rezultatai: vidutinis BI erlotinibo, gemcitabine šakoje buvo 6,24 mėn. vs 5,91 mėn., RS 0,82 (95 % PI, 0,69–0,99; $P = 0,038$). Didesnė nauda buvo jaunesnio < 65 m. amžiaus RS (95 % PI) 0,75 (0,58–0,96), blogesnės funkcinės (ECOG 2) būklės pacientams 0,61 (0,41–0,92) (53, 59). Tačiau apskaičiavus erlotinibo kainos efektyvumą, kiti gydymo režimai yra labiau pripažįstami (60).

Tikrų taikinių, lemiančių individualizuotą gydymo taktikos parinkimą, kasos vėžiu sergantiems pacientams nėra daug. Daugiausia ištirtas germinacinės BRCA1/2 mutacijos nulemtas PARP inhibicijos kelias (58). Manoma, kad apie 4–9 % pacientų turi BRCA1/2 (12, 61). Į olaparibo POLO klinikinį tyrimą buvo įtraukti 154 pacientai, jų vidutinis amžius – 57 m., 2/3 aptikta BRCA2, 1/3 BRCA1 mutacija, iki 86 % kaip pirmos eilės gydymas buvo skirta chemoterapija FOLFIRINOX režimu ir geriausias pasiektas šia pirma chemoterapijos eile atsakas buvo: 50 % – visiškas arba dalinis, 50 % – stabili liga. Vidutinis IBLP patikimai ilgesnis buvo olaparibo nei placebo grupėje 7,4 mėn. vs. 3,8 mėn.; mirties rizikos santykis buvo 0,53; 95 % PI, 0,35–0,82; P = 0,004. Atliekant tarpinę analizę, esant 46 % duomenų brandumui, skirtumo tarp tiriamojo vaisto ir placebo šakos nebuvo (18,9 mėn. vs. 18,1 mėn.; mirties rizikos santykis 0,91; 95 % PI, 0,56–1,46; P = 0,68) (12).

Rukaparibo duomenys kol kas gauti tik RUCAPANK tyrime, kur iš 19 pacientų (13 germinacinės, 3 somatinės mutacijos) ligos kontrolė pasiekta 31,6 % (61).

Kita vaistų klasė, veikianti per neurotropinės tirozino receptorių kinazės (NTRK) suliejimo genus, pastaraisiais metais pripažinta veiksminga gydant įvairias onkologines ligas, reikšminga ir nedidelei PDAK pacientų grupei. Šią mutaciją turi < 5 % kasos vėžio arba 1–3 % KRASwt pacientų (62). Į tris klinikinius tyrimus (LKA-372-001, STARTRK-1 ir STARTRK), kuriuose tirtas entrektinibo poveikis, buvo įtraukti trys pacientai, sergantys PDAK, dviem iš jų nustatytas atsakas į gydymą (13).

2.4. Chemorezistencijos mechanizmai gydant pankreatinę duktalinę karcinomą

Kasos vėžio atsparumą vaistams lemia daug molekulinį, metabolinių, imuninių veiksnių. Svarbiausiais pripažįstami: ląstelių signalų perteklius, kamieninių ląstelių vaidmuo, TMA ir desmoplastinė stroma (63). Chemorezistencija gali vystytis per skirtingus mechanizmus: imunosupresijos, kraujagyslinių indų remodeliavimo, metabolinio aktyvumo, signalinių DNR atkūrimo ir apoptozės kelių kitimo ar moduluojant vaisto pasisavinimą (64).

Gemcitabinas yra deoksicitidino nukleozido analogas, veikiantis DNR sintezę. Jis blokuoja ląstelės ciklą G1/S fazėje, jo veikimui būtinas intraląstelinis fosforilimas, o aktyvinimui ir transportavimui turi įtakos įvairūs enzimai. Pernešimui per plazminę membraną būtina hENT1 (angl. *human equilibrative nucleoside transporter*) ekspresija. Jai sumažėjus vėžinė

ląstelė tampa rezistentiška vaisto poveikiui. Intraląstelinis baltymas deoksicitidino kinazė (dCK) aktyvuoja ir metabolizuoja, tad trūkstant dCK taip pat vystosi rezistencija (65).

Be šių svarbiausių faktorių, į rezistentiškumo gemcitabinui mechanizmus dar įsitraukia epitelinė mezenchiminė tranzicija, kurioje dalyvauja tokie signaliniai keliai: Notch, tumoro nekrozės faktorius alfa (TNF α), transformuojantis augimo faktorius beta (TGF- β) ir hipoksiją sukkeliantis faktorius-1 alfa (HIF1 α) (14). Žvaigždžiškos kasos ląstelės, sekretuodamos ekstraceliulinius proteinus, pavyzdžiui, periostiną, taip pat prisideda prie rezistencijos mechanizmo. Moduluojant Notsch, Hedgedog signalinius kelius galbūt pavyktų šią rezistenciją įveikti (65). Aprašoma net miRNR raiškos kasos vėžyje įtaka rezistencijos vaistams formavimėsi. MikroRNR – tai maža nekoduojančių 19-25 nukleotidų, kurie neigiamai veikia genus potranskripciname lygmenyje, klasė (66). Gemcitabinas per įvairius signalinius kelius gali aktyvinti ar slopinti miRNR ir su tuo susijusių baltymų ekspresiją (65).

Gemcitabino rezistentiškumo mechanizmas dar siejamas su gliukozės, aminorūgščių ir lipidų metabolizmu, nes buvo nustatytas aiškus metabolomo skirtumas tarp gemcitabinui jautrių ir nejautrių ląstelių linijų (67, 68). Ilgą laiką veikiant gemcitabinui aktyvėja aerobinė glikolizė ir žemėja ROS lygis, tai skatina vėžio kamieninių ląstelių bei epitelinio tranzitinio fenotipo vyravimą ir chemorezistenciją (69). Be to, gemcitabinas dar skatina autofagiją, kuri kartu su maisto medžiagų stoka inhibuoja apoptozės procesą ir šitaip skatina chemorezistenciją (70).

Be to, rezistencijos gemcitabinui mechanizme dar dalyvauja imuninės sistemos ląstelės, pavyzdžiui, su vėžiu susiję makrofagai (TAMs) tiesiogiai per TGF- β 1/Gfi-1 ašį (71), veikdami citidindeaminazės aktyvumą (72). Gemcitabinas skatina granulocitų-makrofağų kolonijas stimuliuojančių faktorių atpalaidavimą, MDSC ląstelių diferenciaciją ir per šį mechanizmą – rezistentiškumą (73). Pastaruoju metu atsiranda duomenų ir apie mikrobiomo įtaką rezistencijos mechanizmuose. Manoma, kad *Escherichia coli* gali paveikti gemcitabino metabolizmą – paversti jį neaktyvia forma. Mikoplazmos, klebsielės taip pat išskiria faktorius, galinčius skatinti rezistenciją (74).

Atsparumo naujesniems chemoterapijos režimams mechanizmai nėra taip plačiai išnagrinėti. Ištyrus 10 pacientų (po penkis negydytų ir neoadjuvantiniu FOLFIRINOX režimu gydytų) organoidų linijų histologines, genetines, transkripcines charakteristikas ir atlikus mRNR-seq analizę įrodyta, kad įgyjamas rezistentiškumas FOLFIRINOX, irinotekano bei oksaliplatinos preparatams, o fluorouracilo – ne. Genominis

nestabilumas, metabolizmas bei įgimtas imunitetas galėtų būti tokio rezistentiškumo pagrindu (75). Mikrobiomo reikšmė išvelgiama ir rezistentiškumo fluoropirimidino junginiams mechanizmuose: *Mycoplasma hyorhinae* ir *Fusobacterium nucleatum* veikia nuo TLR4/MYD88 priklausomą autofagiją ir sutrikdo 5-FU sukeliama apoptozę (74).

2.5. Metabolizmo ypatumai kasos vėžio audinyje

Savitą kasos vėžio metabolizmą lemia specifinės mutacijos, audinio savybės ir tumoru aplinka (76). Net to paties paciento pirminiame ir metastatiniuose židiniuose gali būti išreikšti skirtingi genai, lemiantys metabolinius skirtumus (77).

Dėl tankios stromos, hipoksijos ir maisto medžiagų stokos kasos vėžinės ląstelės keičia metabolizmą. Tai vyksta trimis būdais: 1) viduląstelinės energijos – perprogramuojamas gliukozės, aminorūgščių lipidų metabolizmas; 2) perdirbami medžiagų apykaitos produktai; 3) bendradarbiaujama su kitais mikroaplinkos komponentais (78). Šiuo metu netgi išskiriamos keturios metabolinės PDAK subgrupės: tylioji, glikolitinė, cholesterogeninė ir mišri, lemiančios skirtingą išgyvenimo prognozę (79). Nuo oksidacinio fosforilinimo perėjus prie aerobinės glikolizės susidaro daugiau laktato, ekstraceliulinė aplinka rūgštėja. Hipoksija, rūgšti intraceliulinė terpė ir didelis intersticinio skysčio spaudimas svarbūs naviko progresavimui (63).

Pastebėta, kad sergantys metaboliniu sindromu nuolat patiria nedidelio laipsnio lėtinį uždegimą, dėl to jų imuninė sistema slopinama, tai veda prie PDAK vystymosi ir progresijos (80). Hiperglikemija TMA ląstelių kultūrose gali skatinti imuninį išsvengimą (81).

2.6. Kasos adenokarcinomos molekulinis profilis

Įvairias onkologines ligas įprasta skirstyti į subtipus, atsižvelgiant į vyraujančius genetinius ar imuninius žymenis, jei pastebima, kad tai lemia išgyvenimo prognozę.

Molekuliniu požiūriu galima išskirti du subtipus: klasikinį ir bazalinį. Pastarasis menkai reaguoja į chemopreparatus (82). Kai kurie autoriai dar išskiria normalios ir aktyvuotos stromos subtipus. Šią aktyvaciją nulemia su makrofagais asocijuoti genai: integrino (ITGAM), chemokino (CCL13 ir CCL18) ligandai (83).

Integruota 456 PDAK mėginių genomine analizė išaiškino 32 svarbius genus, kurie apima 10 signalinių kelių: *KRAS*, *TGF-β*, *WNT*, *NOTCH*,

ROBO/SLIT signalo, *G1/S* tranzicijos, *SWI-SNF*, chromatinio modifikacijos, DNR atkūrimo ir RNR apdorojimo. Tuo remiantis buvo išskirti keturi subtipai: 1) ragėjantis; 2) kasos pirmtakų; 3) imunogeninis; 4) neįprastai diferencijuotas endokrininis egzokrininis (angl. *aberrantly differentiated endocrine exocrine, ADEX*). Pirmo ragėjančio tipo navikai pasižymi *TP53* ir *KDM6A* mutacijomis, *TP63ΔN* transkripcijos tinklo išsireguliuavimu, kasos endoderminių ląstelių žūtį programuojančių genų hipermetiliniu, autofagija ir bloga prognoze. Pacientai, sergantys šiais navikais, išgyvena dvigubai trumpiau nei sergantys kitų tipų navikais (84, 85).

Kasos pirmtakų tipo navikai ekspresuoja genus, dalyvaujančius ankstyvame kasos vystymesi (*FOXA2/3*, *PDX1* ir *MNX1*) (84), o metaboliniu požiūriu jiems būdinga riebiųjų rūgščių oksidacija, steroidinių hormonų ir vaistų metabolizmas, glikozilimas. Šiam tipui būdingas IPMN vystymasis, ilgas išgyvenamumas (net iki ketverių metų) (85).

ADEX navikai pasižymi genų, įtrauktų į *KRAS* aktyvaciją, egzokrininės (*NR5A2* ir *RBPJL*) ir endokrininės diferenciacijos (*NEUROD1* ir *NKX2-2*) kelius, išsiderinimu (84).

O imunogeniniams navikams būdinga imuninių kelių disreguliacija, imunosupresija (84), apima su B ląstelių funkcija, antigeno prezentacija, CD4+ ir CD8+ T ląstelių, varpo formos receptorių (angl. *Toll-like receptors*) signaliniais keliais bei CTLA4 ir PD1 išsireguliuavimu susijusias aberacijas.

Pagaliau 2018 m. PDAK buvo suskirstyta į penkis klinikinius subtipus: grynąjį bazalinį, aktyvuotos stromos, desmoplastinį, grynąjį klasikinį ir klasikinį imuninį. Jie skiriasi imuninių ląstelių infiltracijos lygiu, stromos komponentais, imuninio atsako kontrolės taškų ekspresija ir atsaku į gydymą (86).

Iš onkogenų svarbiausia *KRAS* mutacija, aptinkama 92 % PDAK, dalyvauja įvairiuose procesuose: granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančių faktorių gamyboje, dėl to pritraukiamos MDSC ląstelės; fibrozinės, uždegiminės stromos formavimo ir palaikymo; PD-L1 išreguliuavimo per mRNR stabilizaciją; CD73 padidėjusios ekspresijos, o tai turi įtakos imunosupresinio ekstraceliulinio adenozino padidėjimui; didžiojo audinių suderinamumo komplekso 1 slopinimo ir T reguliacinių ląstelių gausėjimo; imunosupresinių Th17 ir gama-delta T ląstelių indukcijos (87).

Molekulinis profilis glaudžiai susijęs su metabolizmu. *KRAS* mutacijos kelia OXPHOS lygį, per autofagijos mechanizmą skatina PDAK proliferaciją (88, 89), per MAPK ir PI3K/AKT/mTOR signalinį kelią moduluoja glikolizę ir inhibuoja apoptozę (90). P53 mutacija skatina glikometabolizmą (91).

Apibendrinant – svarbiausių PDAK mutacijų faktiškai neįmanoma paveikti šiuo metu naudojamais medikamentais. Tik BRAC1/2 mutacijos

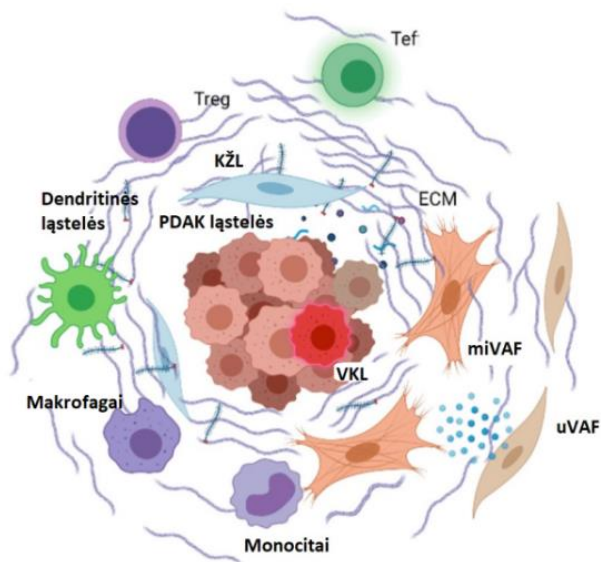
atveju rekomenduojami platinos preparatai ir PARP inhibitoriai, tačiau tokių pacientų yra labai mažai (82).

Be genetinių pokyčių, pastaruoju metu daug dėmesio skiriama epigenetinių mechanizmų tyrimams. PDAK kol kas nustatyta šių epigenetinių veiksnių reikšmė: palaikymo metiltransferazės enzimai (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), kurie pažymi CpG metilinimo žymenis ant DNR, susiję su blogesne prognoze; TET enzimai ištrina metilinimo žymes, pavyzdžiui, TET1 slopina kasos vėžio ląstelių proliferaciją, metastazavimą (92). Epigenetinius pokyčius tiria ir Lietuvos mokslininkai. Jie 2020 m. paskelbė, jog APAF-1 mRNA ir baltymo lygis PDAK sergančiųjų yra pažemėjęs, o APAF-1 metilinimo būseną susijusi su perineurinės invazijos išraiška navike. Decitabinas, vaistas, veikiantis per DNR metiltransferazės inhibiciją ir panaikinantį metilinimą bei atkuriantis genų priešvėžinį aktyvumą, nesugebėjo atkurti APAF-1 mRNA ir baltymo lygio ląstelėse (93).

2.7. Kasos tumoro mikroaplinka (TMA)

2.7.1. Stomos ir įvairių ląstelių vaidmuo

Kasos vėžio mikroaplinką formuoja intersticinis audinys, ekstraceliulinis matiksas su fibroblastais, kasos žvaigždiškėmis, uždegiminėmis, endotelio, nervinėmis ląstelėmis, fibroblastais ir kitais komponentais (2 pav.). PDAK TMA charakterizuoja profuzinė stomos reakcija, vadinama desmoplazija, sudaryta iš minėtų ląstelių komponentų ir kolageno, fibronektino, citokinų, augimo faktorių ekstraceliuliniame matiksme (63) ir apibūdinama kaip „lokalus uždegimas“ (86). Desmoplazija sudaro apie 80 % tumoro masės. Stomos perteklius būdingas PDAK, reikšmingas pacientų išgyvenamumui. Ligai progresuojant naviko stroma spaudžia kraujo indus, jiems susiaurėjus skatinama hipoksija. Hipoksijos indukuotas faktorius 1 (angl. *hypoxia-inducible factor 1* (HIF1A)) aktyvuoja įvairius signalus, pažeidžia metabolinius kelius, skatina vėžinių ląstelių invaziją, chemorezistenciją ir blogina prognozę (63). Įdomu, kad netgi metastaziniuose židiniuose vyrauja jungiamojo audinio proliferaciją skatinantys stomos komponentai: hialurono rūgštis ir kolagenas (86).



2 pav. Pankreatinės duktalinės adenokarcinomos (PDAK) mikroaplinka ir ląstelių sąveika. Remiantis (94), PDAK pasižymi dideliu ląstelių ir neląstelių komponentų heterogeniškumu. Naviko ląstelėse varijuoja mutacijų / genų ekspresijos profilis, tai veikia fibroblastus ir imunines ląsteles, o mikroaplinkos komponentai sąveikauja tarpusavyje ir su vėžinėmis ląstelėmis, jas palaiko. Treg – reguliaciniai T limfocitai, Tef – efektoriniai T limfocitai, KŽL – kasos žvaigždinės ląstelės, ECM – ekstraceliulinis matiksas, miVAF = miofibroblastiniai su vėžiu asocijuoti fibroblastai, uVAF = uždegiminiai su vėžiu asocijuoti fibroblastai, VKL – vėžio kamieninės ląstelės.

2022 m. išaiškinta dar keturių naujų parametrų įtaka TMA: atveriantis fenotipinis plastiškumas (ląstelių diferenciacijos pasikeitimas – dediferenciacija, užblokuota diferenciacija, transdiferenciacija į skirtingas ląstelių linijas), nuo mutacijų nepriklausantis epigenetinis perprogramavimas (ne genų, o juos veikiančių signalų disreguliacija), polimorfiški mikrobiomai (manoma, jog tumoros aplinkos mikrobiomas veikia naviko fenotipą) ir ląstelių senėjimas (ir vėžinių, ir kitų audinių ląstelių (pvz., fibroblastų) senėjimas skatina vėžio augimą) (95).

Žvaigždinės ląstelės – pagrindinis naviko stromos komponentas, neaktyvios normaliame audinyje, tačiau sekretuojamų faktorių $TNF\alpha$, $TGF\beta$, interleukinų 1, 2, 10 aktyvuojamos, aplink formuoja tankų matiksą, sekretuodamos kolageną, fibronektiną, lamininą (65). PDAK ląstelės stimuliuoja žvaigždinių ląstelių aktyvaciją, proliferaciją, migraciją,

išskirdamos citokinus ir augimo faktorius. O žvaigždiškos lątelės, išskirdamos parakrininius, epidermio augimo faktorius, stimuliuoja vėžinių ląstelių proliferaciją ir lėtina apoptozę (96). Žvaigždiškos ląstelės skatina invaziją ir metastazavimą per endotelio mezenchiminės tranzicijos fenotipo vystymąsi ir skatina angiogenezę, sekretuodamos kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) (63).

Kasos vėžys pritraukia kasos fibroblastus į TMA ir paverčia juose su vėžiu susijusiais fibroblastais (angl. *cancer-related fibroblasts*, CAFs), įjungdamas įvairius genetinius bei epigenetinius mechanizmus. Su vėžiu susiję fibroblastai yra aktyvuojami iš kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių, žvaigždiškų ląstelių ir neaktyvių fibroblastų įvairiais keliais, įskaitant ir endotelio mezenchiminės tranzicijos (97). Aktyvuoti jie vaidina pagrindinį vaidmenį stromos ekstraceliulinio matriksio sintezėje (63).

Šie fibroblastai sąveikauja su imuninėmis ląstelėmis: per mechaninius signalus, tiesiogiai per tarpląstelinį kontaktavimą ir sekretuodami tirpius imuninius mediatorius. Naudojant vienos ląstelės transkriptominę analizę išskirtos trys fibroblastų subpopuliacijos, jų erdvinis išsidėtymas ir funkcinės savybės skirtingos (98). Arčiausiai tumoro yra aktyvuoti fibroblastai, pasižymintys kontraktiškumu, ekspresuojantys alfa lygiųjų raumenų aktiną (angl. *alpha-smooth muscle actin*, α -SMA), vadinami miofibroblastais, reaguoja į tumoro išskiriamą TGF- β (63, 82). Imuninei sistemai svarbesni antro tipo fibroblastai, nutolę nuo vėžinių ląstelių, vadinami uždegiminiais, pasižymi IL-6 ir kitų uždegiminių mediatorių: IL1, IL21, LIF, CXCL1-3 gamyba (82). Neseniai išskirti ir trečio subtipo fibroblastai, ekspresuojantys MHCII, CD74, SLI, vadinami antigeną prezentuojančiais, gali aktyvuoti CD4+ ląsteles, bet dėl kostimuliacinių molekulių stokos nėra aišku, ar *in vivo* jų funkcija reikšminga (98). Pirmo tipo fibroblastai pasižymi labiau tumorą ribojančiu veikimu, jų randama priešvėžiniuose dariniuose, o antrojo – skatinančiu poveikiu, jų aptinkama vėlyvų stadijų PDAK. Eksperimentiniuose modeliuose pagausinus fibroblastų, suaktyvėjo angiogenezę ir infiltracija imunosupresuotais T reguliaciniais limfocitais. Su vėžiu asocijuoti fibroblastai gali slopinti tumorą infiltruojančių CD8+ T ląstelių citotoksinį pajėgumą tiesiogiai ir įgalindami antigeno prezentaciją per MHCI ir CD8+ limfocitų sukibimą bei PD-L2 ir FASL disreguliaciją, taip jie nuslopina ir sunaikina intratumorinius citotoksinius T limfocitus (82).

Kraujagyslių ląstelės PDAK taip pat pakinta. Pericitai gali migruoti iš kraujagyslių į TMA, tai vadinama pericitų ir miofibroblastų tranzicija. Endotelio ląsteles netiesiogiai, per proteazių sekreciją, aktyvina vėžio fibroblastai (63).

Mikroaplinkoje dominuoja trijų pagrindinių subtipų imuninės ląstelės: makrofagai (daugiausia M2 tipo), reguliaciniai T limfocitai (Tregai), mieloidinės kilmės supresuojančios ląstelės (angl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC).

Fracionuojant paaiškėjo, kad vyrauja įgimto, ne įgyto imuniteto ląstelės: makrofagai, MDSC, dendritinės ląstelės, o dėl fibrozės TMA įgyto imuniteto ląstelės ten patenka vangiai (99). Pelių modeliuose pastebėta, kad imunosupresinių ląstelių – su naviku susijusių makrofagų, MDSC, Tregų – atsiranda anksti, jau priešvėžiniuose dariniuose ir išlieka vystantis invaziniam navikui (100).

Makrofagai TMA dalyvauja tumorogenezės, imuninio išvengimo, intersticinės fibrozės, angiogenezės bei chemorezistencijos mechanizmuose (99). Makrofagai vykdo fagocitozę, gamina citokinus, proteolizinius enzimus, metabolitus, išsidėsto prie kraujagyslių arba fibroziniame riebaliniame audinyje; jų kiekis paprastai koreliuoja su kraujagyslių tankiu. Apskaičiuota, kad makrofagai gali sudaryti iki 50 % tumoros masės (86). Manoma, kad iš kaulų čiulpų kilę makrofagai labiau linkę ekspresuoti žmogaus leukocitų antigeną DR (HLA-DR), o jo nebuvimas nekeičia PDAK eigos (101). Embrioninės kilmės su vėžiu susiję makrofagai (angl. *tumor associated macrophages TAMs*) pasižymi ypatingu profibrotiniu aktyvumu, skatina vėžio progresavimą. Šie makrofagai kasos vėžyje turi CXCR4 chemokino receptorių (99, 102). Makrofagai kasos navike yra M2 fenotipo, jų tankis koreliuoja su PDAK progresavimu, atsinaujinimu, metastazavimu (103). M1 tipo makrofagai sekretuoja uždegimą skatinančius citokinus, pasižyminčius priešvėžiniu efektu. M2 tipo per priešuždegiminius signalus skatina vėžio progresavimą (82). Bendras makrofagų žymuo yra CD68, HLA-DR ir CD11c identifikuoja M1 makrofagus, o CD163 ir CD204 ekspresuojami M2 makrofagų (100). Makrofagai padeda išvengti imuninės sistemos ekspresuodami daugybę imunosupresinių faktorių (pvz., IL-10, transformuojantį augimo faktorių beta (TGF- β), chemokino C-C motyvo ligandą (CCL2) ir neigiamus imuninės kontrolės taškus (pvz., citotoksinį su T limfocitais asocijuotą proteiną 4 (CTLA-4) ir programuotos ląstelės žūties ligandą 1 (PD-L1) (104). Fibrozė skatinama makrofagams sekretuojant augimo faktorius (pvz., TGF β 1), citokinus (pvz., TNF α), chemokinus (pvz., CCL2), kurie aktyvuoja fibroblastus (105). Metastazavimo procesas skatinamas dėl makrofagų gebėjimo sekretuoti chemokinus (CCL20, CCL18), išreguluoti matriksinio metaloproteinazės 9 (MMP9), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės 1 (VCAM-1) ekspresiją ant kasos vėžio ląstelių (106). Makrofagai geba stimuliuoti ir citokinų (IL-6, IL-1 β , TNF- α) išsiskyrimą, taip palaiko uždegimą (88). Makrofagai sekretuoja ir endotelio

augimo faktorius VEGF, PLGF keičia angiogenezės procesą (89), pritraukia į TMA T reguliacinius limfocitus ir neigiamai veikia citotoksines T ląsteles (103). Taigi kasos vėžinės ląstelės aktyvina makrofagų diferenciaciją, funkciją, o jie skatina vėžio progresavimą: augimą, angiogenezę, stromos remodeliavimą ir metastazavimą (100).

Be to, makrofagai dalyvauja metabolizmo procesuose: M2 makrofagai skatina OXPHOS bei riebiųjų rūgščių oksidaciją ir aktyvina mitochondrijas bei per IL-4 – arginino metabolizmą (89). Peripankreatinis riebalinis audinys aktyvina uždegiminę reakciją, skatina makrofagų infiltraciją ir uždegimą indukuojančių citokinų išsiskyrimą (108). Pelių modeliuose infiltracija makrofagais aptinkama jau mažo laipsnio, preinvazinėse kasos vėžio užuomazgose ir persistuoja invazyviame vėžyje (100).

M1/M2 makrofagų didesnis santykis yra nepriklausomas prognostinis PDAK faktorius. M2 makrofagų vyravimas tumoro periferijoje susijęs su didesniu naviko skersmeniu, greitesniu limfogeniniu metastazavimu, vietiniu atsinaujinimu ir blogesniu BI (100).

Dendritinių ląstelių (ypač cDC1 klasės), palyginti su kitais vėžiais, PDAK yra mažiau, jos išsidėto tumoro periferijoje, jų branda, gebėjimas prezentuoti antigeną silpni (109). Nustatyta, kad toks dendritinių ląstelių neisavertiškumas būdingas jau kasos intraepitelinei neoplazijai, išlieka ligai progresuojant, priklauso nuo IL-6 sąlygotos apoptozės (110). Didesnis dendritinių ląstelių kiekis TMA lemia geresnę PDAK prognozę (111). Dendritinės ląstelės veikia tumorą infiltruojančius CD4+, CD8+ limfocitus, todėl yra pagrindinis veiksnys, skatinantis įgytą imunitetą (99).

Mastocitai sekretuoja granules, pasižyminčias imunomoduliaciniais, vazoaktyviais mediatoriais: augimo faktorius, proteazes, leukotrienus, citokinus, chemokinus, formuoja ląstelinę TMA, dalyvauja remodeliavime, angiogenezėje, uždegiminio atsako, imunosupresijos, ląstelių proliferacijos, išgyvenimo, sutelkimo, brendimo ir diferenciacijos procesuose (86). Mastocitai kasos vėžyje išsidėsto tumoro krašte, centre jų beveik nėra (86), susiję su blogesne prognoze (112), tačiau smulkesnės jų charakteristikos ir funkcijos dar nėra ištyrinėtos (99).

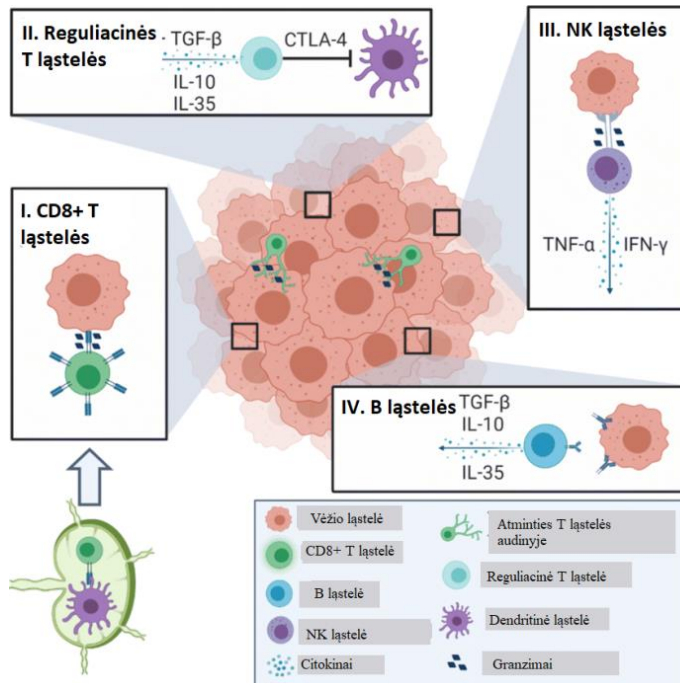
Iš mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių (angl. *Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) kasos vėžyje ir sergančiųjų periferiniame kraujyje vyrauja granulocitų (G-MDSC) subpopuliacija. Juose itin pasireiškia arginazė, tuo slopinama T ląstelių proliferacija ir aktyvacija (113), todėl granulocitai laikomi pagrindiniu priešvėžinio imuniteto inhibitoriumi (82). Jų žymenys yra IL-4Rα, CD11b, CD33 (100). Supresinis efektas CD4+ ir CD8+ limfocitams pasiekiamas per tiesioginį ląstelių kontaktą ir programuotos ląstelės žūties ligando 1 (PD-L1) išderinimą. PD-L1/PD-1

sąveika slopina T-ląsteles (82). MDSC stimuliuoja imunosupresinių T reguliacinių limfocitų ekspansiją per TGF- β bei IFN- γ sekreciją, priklausomą nuo IL-10 (114).

Nustatyta, kad PDAK pacientų MDSC ląstelių kiekis tiek TMA, tiek kraujyje padidėjęs (100). MDSC ląstelių kiekis koreliuoja su ligos stadija, infiltruojančių CD8⁺ ląstelių trūkumu (100), išlieka didelis periferiniame kraujyje ir pašalinus naviką, tai gali lemti mikrometastazių buvimą (115). Manoma, kad pačios MDSC ląstelės skatina metastazavimą, sukuria premetastatinę nišą (86).

2.7.2. Imuninės sistemos ląstelių išsidėstymas tumoro mikroaplinkoje

Sveikame kasos audinyje limfocitų beveik nėra (99). Anksčiau manyta, kad fibroblastai ir desmoplastinė stroma trikdo infiltraciją T ląstelėmis, dabar svarbesnis vaidmuo priskiriamas T ląstelių erdviniam išsidėstymui. Padėtis TMA, vyraujanti T limfocitų subpopuliacija ir makrofagų infiltracija yra svarbiausi faktoriai T ląstelių funkcijai užtikrinti (82). Limfocitų funkcijos priešvėžiniame atsake apibendrintos 3 pav., kur (I) „Naivios“ CD8⁺ T ląstelės aktyvuojamos kai prisijungia prie antigeną prezentuojančios dendritinės ląstelės limfmazgiuose. Aktyvuotos CD8⁺ efektorinės T ląstelės atpažįsta tumoro ląsteles ir prie jų prisijungia, sukeldamos granzimų atpalaidavimą ir apoptozę. (II) Reguliacinės T ląstelės slopina priešvėžinį imuninį atsaką, sekretuodamos imunosupresuojančius citokinus ir ribodamos dendritinių ląstelių aktyvumą (prijungia CTLA-4 prie CD80/86 ant dendritinių ląstelių). (III) NK ląstelės atpažįsta vėžines ląsteles kaip svetimas, prisijungia, sukelia apoptozę, išskirdamos granzimus į ląstelę, ir sekretuoja imunostimuliuojančius citokinus, kurie pritraukia CD8⁺ efektorines T ląsteles į TMA. (IV) B ląstelės sekretuoja tumoro antigenams specifinius IgG antikūnus, kurie prikimba prie navikinės ląstelės ir sukelia apoptozę, bet gali sekretuoti ir imunosupresuojančius citokinus TGF- β , IL-10 ir IL-35, skatinančius tumoro augimą (116).



3 pav. Limfocitų funkcijos priešvėžiniame atsake. Pagal (116) tumorą infiltruojančių limfocitų subpopuliacijos mikroaplinkoje (TMA)

Vėžines ląsteles atpažįsta ir naikina CD3+CD8+ (citotoksiniai) T limfocitai bei natūralios ląstelės žudikės (angl. *natural killer cells*, NK) (117). T ląstelės PDAK audinyje itin įvairios, išsidėsčiusios naviko periferijoje, kraujyje jų cirkuliuoja mažai. Pirmiausia T limfocitai, vyraujant CD3+ ląstelėms, aptikti limfoidiniuose folikuluose prie naviko audinio. CD4+ dominuoja, CD8+ yra mažiau. Tarp CD4+ dominuoja GATA3+ Th2 bei Foxp3+ Treg ląstelės (86). Dešimties studijų (įtrauktas 751 pacientas) metaanalizė patvirtino, kad gausi infiltracija CD3+ ląstelėmis taip pat susijusi su geresniu bendru išgyvenamumu (117).

Didžiausią CD8+ ląstelių dalį sudaro citotoksiniai limfocitai, produkuojantys IFN- γ , TNF ir molekules: perforiną, granzimą. Dėl savo specifiškumo ir citotoksiškumo prieš vėžines ląsteles citotoksiniai limfocitai yra geriausia efektorinė imuninės sistemos dalis, ilgai išlaiko atmintį, apsaugo nuo vėžio atsinaujinimo (82). Visgi tumoras išsekina citotoksinius T limfocitus, pablogindamas jų efektorinę funkciją, sutrumpindamas gyvavimą ir padidindamas slopinančių receptorių, įskaitant PD-1, CTLA-4 kiekį (118).

Kasos vėžiu sergančių pacientų CD8+ T limfocitų kiekis TMA skiriasi (119), gali būti labiau įvairialypis, nei manyta anksčiau (17). Kasos vėžys

paprastai diagnozuojamas pažengęs ar metastatinis, o TMA tyrimai atliekami naudojant ankstyvus, radikaliai pašalintus navikus (17). Įrodyta CD8+ T limfocitų erdvinio išsidėstymo šalia vėžinių ląstelių įtaka išgyvenamumui (120). Masės citometrijos, pavienių ląstelių RNR sekoskaitos ir dauginės fluorescencinės imunohistochemijos metodais nustatyta, kad citotoksinės T ląstelės PDAK pacientų TMA pasižymi išsekintu genų ekspresijos profiliu, ypač tai pastebima pažengusios ligos atveju. Specifinės imuninės kontrolės taškus koduojančių genų kombinacijos, išreikštos kiekvieno paciento CD8+ T ląstelėse, buvo unikalios. Tarp CD8+ T limfocitų vyravo ląstelės, ekspresuojančios genus, susijusius su T ląstelių išsekimu, ir tos ląstelės ekspresavo daugiau T ląstelių imunoglobulino ir ITIM domenų (TIGIT) imuninės kontrolės taškų (17). Žvaizdiškos ląstelės CD8+ migraciją slopina (100). Taigi, nors slopinamos naviko, CD8+ efektorinės T ląstelės yra vyraujanti PDAK T limfocitų subpopuliacija (100).

CD8+ ląstelių PDAK yra mažiau nei lėtinio pankreatito pažeistame audinyje. Priešvėžiniuose PanIn ir IPMN dariniuose jų būna mažiau, o ląstelėms piktybėjant mažėja (100).

25 studijų metaanalizė (buvo įtraukti 2 300 pacientų) įrodė, jog didelė infiltracija CD8+ limfocitais reikšmingai gerina sergančiųjų PDAK BI. Be to, įtaka buvo didžiausia, kai CD8+ ląstelės buvo išsidėsčiusios tumoro centre (117).

NK ląstelės sudaro 5–20 % cirkuliuojančių žmogaus limfocitų, atsiranda iš CD34+ hematopoetinių ląstelių pirmtakių kaulų čiulpuose, pasižymi T ląstelių receptorių trūkumu, nervų ląstelių adhezijos molekulių (angl. *neural cell adhesion molecule*, NCAM, žinoma kaip CD56) bei natūralių citotoksinių receptorių NKp46 ekspresija (82). NK ląstelėms būdinga citokinų (IL-3), TNF- α , GM-CSF bei IFN- γ sekrecija (100). Taigi, klasifikuojamos kaip CD56+CD3– ląstelės, NK dar skirstomos į dvi pagrindines efektorines populiacijas: imunomoduliuojančias CD56^{sviesias}CD16⁻, reguliuojančias funkciją per citokinų atpalaidavimą, ypač IFN- γ , ir citotoksines CD56^{blankias}CD16⁺ efektorines ląsteles (121). Aktyvuotos NK ląstelės formuoja imunologinę sinapsę su taikinine ląstele be specifinių išorinių signalų, autonomiškai (117), žudo navikines ląsteles tiesiogiai ir mobilizuodamos imuninę sistemą, išskirdamos citokinus. Sutikusios taikinį NK ląstelės sekretuoja perforiną, ardo ląstelių membraną ir atpalaiduoja granzimus, sukelia apoptozę per Fas/FasL ar TNF- α /TNFR-1 kelius (81). Jos dalyvauja nespecifiniame imuniniame atsake ir kaip reguliacinės ląstelės, sąveikaudamos su endotelio, dendritinių, T ląstelių, makrofagų receptoriais ir sekretuodamos citokinus (82). NK ląstelės kasos vėžyje eksponuoja nekokybiškus citotoksiškumo receptorius ir ekspresuoja

IL-10 (122). Aktyvuotos žvaigždinės ląstelės slopina NK funkcijas (123). *In vitro* tyrimai parodė, kad bazinis NK ląstelių aktyvumas ir atsakas į IFN- α stimuliaciją PDAK pacientams buvo sumažėję (100).

Infiltracija NK ląstelėmis yra labai maža, palyginti su sveiku audiniu, ir jų išsidėstymas navike yra pakitęs, šalia naviko jų mažiau nei stromoje (80, 100, 124). NK ląstelių aktyvumas reguliuojamas aktyvinančiais ir slopinančiais receptoriais. Būtent aktyvinančių receptorių NKG2D, NKp30, NKp46 sumažėja PDAK pacientams jau ankstyvose vėžio vystymosi stadijose (100).

Dvi studijos (iš viso įtraukta 150 pacientų) neparodė ryšio tarp infiltracijos NK ląstelėmis ir išgyvenamumo (1127). Bet *in vitro* studijoje izoliuotų tumorą infiltruojančių NK ląstelių proliferacijos greitis buvo susijęs su geresniu bendru išgyvenamumu (124).

Citokinai, produkuojami naviko ar imuninių ląstelių, aktyvuoja, kaip IL-12, IL-15, IL-2, ar slopina, kaip IL-18, IL-10, TGF- β , NK ląsteles. PDAK sergančiųjų TMA ir kraujyje aptinkama daug TGF- β , IL-10, tai paaiškina imuninį išvengimą (82).

Eksperimentiniuose pelių modeliuose gemcitabino priešvėžinis efektas priklausė nuo NK ląstelių infiltracijos padidėjimo ir MDSC sumažėjimo (125). Be to, gemcitabinas sužadina NK ląstelių sąlygotą žūtį, indukuodamas paviršiaus ligandų ekspresiją tumoro ląstelių receptorių NKG2D-L aktyvacijai (82). Gemcitabinas didina nuo MHC klasės I grandinės priklausomo proteino A ir B (MICA/B) ekspresiją, skatina žudantį NK ląstelių efektą (81).

Infiltracija NK ląstelėmis TMA yra nepriklausomas predikcinis neoadjuvantinės chemoterapijos veiksnys (126).

CD4+ ląstelės TMA gali skatinti vėžio augimą blokuodamos su CD8+ susijusį priešvėžinį atsaką ir taip reguliuodamos įgytą imuninį atsaką (63), be to, aktyvuoja makrofagus, moduliuoja B ląstelių funkciją (100). Veikiamos citokinų CD4+ T ląstelės gali diferencijuotis į imunosupresines FoxP3+ ląsteles (117).

CD4+ ląstelių PDAK audinyje aptinkama kur kas mažiau nei pažeistame lėtinio pankreatito (96). Dešimties studijų (įtraukti 856 pacientai) metaanalizė neparodė teigiamos CD4+ gausios infiltracijos įtakos išgyvenamumui (117). Nors infiltracija CD4+ T ląstelėmis yra nepriklausomas predikcinis faktorius neoadjuvantinės chemoterapijos veikimui (126).

CD4+ ląstelės skirstomos į keletą tipų, svarbiausi Th1, Th2, CD4+CD25+FoxP3+. Pirmo tipo Th1 ląstelės ekspresuoja T-BET ir gamina IFN- γ , citotoksines molekules, skatina pirmo tipo ląstelinį imunitetą,

aktyvuodamos ir pritraukdamos į TMA citotoksinius T limfocitus, M1 makrofagus, NK ląsteles. Th2 ląstelės, charakterizuojamos transkripcijos faktoriumi GATA3, sekretuoja IL-4, IL-5, IL-13, kontroliuoja humoralinį antro tipo imunitetą per M2 makrofagus (svarbu alerginių ligų patogenezėje). PDAC vyrauja Th2, ir Th2/Th1 santykis susijęs su naviko progresavimu (82). Kasos vėžio ląstelės slopina CD4+ T ląstelių proliferaciją ir migraciją (100).

CD4+CD25+FoxP3+ T reguliaciniai limfocitai – imuninės supresijos mediatoriai (117). Imunosupresinių jų poveikį lemia CTLA-4 ekspresija, IL-10 ir TGF- β sekrecija, gebėjimas slopinti CD4+, CD8+ T ląsteles, makrofagus, NK ir dendritines ląsteles TMA (100). Kasos vėžio ląstelės ekspresuoja didelį keikį chemokino receptoriaus 5 ligando (CCR5) o Tregai – CCR5, tai skatina jų migraciją į TMA (100).

Didesnis T reguliacinių limfocitų kiekis randamas jau intraduktalinėse papilinėse neoplazmose, PDAK prekursoriuose. Navikui piktybėjant T reguliacinių limfocitų / CD8+ santykis didėja (127). PDAK išsidėsto šalia naviko (100). T reguliaciniai limfocitai sukuria tolerantišką fenotipą (CD11c+ dendritinės ląstelės): sumažėja MHC II klasės, CD40 bei CD86 kostimuliacinių molekulių, indoleamino 2,3-dioksigenazės, mažėja IFN- γ produkcija ir citotoksinių T limfocitų aktyvacija (128). Sekretuodamos IL-10, TGF- β mažina CD8+, CD4+ aktyvumą, konkuruoja dėl dendritinių ląstelių prezentuojamų antigenų, taip skatina imunosupresiją (86). Treg ląstelės gali virsti Th17, taip skatinama tumorogenezė. 16 studijų (įtrauktas 1 791 pacientas) metaanalizėje patvirtinta, jog gausi infiltracija FoxP3+ limfocitais kasos vėžio TMA susijusi su blogesne išgyvenimo prognoze (106, 117, 129). O jų erdvinis išsidėstymas papildomos įtakos neturėjo (59). Tačiau yra pastebėta ir priešinga tendencija. Atliktame 122 pacientų PDAK medžiagos tyrime didesnė infiltracija FoxP3 reguliaciniais limfocitais lėmė geresnį pacientų išgyvenamumą. Apibendrinant – T reguliaciniai limfocitai gali skatinti naviko vystymąsi, slopindami T ląstelių aktyvumą per imunomoduliuojantį veikimą dendritinėms bei virsmą Th17 ląstelėmis, bet stabdyti aktyvindami su vėžiu susijusius fibroblastus ir darydami įtaką mieloidinėms TMA ląstelėms (82).

Tumorą infiltruojantys B limfocitai atpažįsta įvairius antigenus ir paprastai demonstruoja antigeno indukuotą humoralinį imunitetą, ekspresuojant imunoglobuliną G, tikslus vaidmuo vėžyje nėra aiškus (100). B limfocitai palaiko PDAK karcinogenezę stimuliuodami ląstelių proliferaciją, slopindami CD8+ ląsteles per Brutono tirozino kinazės kelią (117). Pelių modeliuose geba išreguliuoti uždegimą skatinančius genus ir sumažina IL-35 ir IL-10 imunomoduliuojančių genų ekspresiją (130).

Infiltracija B limfocitais krūties, kiaušidžių, skrandžio, nesmulkiašasteliniam plaučių vėžyje susijusi su geresniu išgyvenamumu. O B ląstelių trūkumas ar išsekėjimas sarkomos, storosios žarnos, melanomos, ragėjančių karcinomų pelių modeliuose taip pat lėmė geresnį išgyvenamumą (130).

PDAK B limfocitai keičia stromos aplinką: indukuoja fibroblastų vykdomą kolageno produkciją, išreguliuoja genus, susijusius su epitelio-mezenchimos tranzicija, išskiria profibrotinę molekulę – trombocitų augimo faktorių B (PDGF-B) (130).

Penkių studijų (iš viso 390 PDAK pacientų) metaanalizėje negauta statistiškai reikšmingo ryšio tarp CD20+ B limfocitų gausios infiltracijos ir BI (117). Įtaka prognozei priklauso nuo B limfocitų erdvinio išsidėtymo (jei sudaro aktyvias tretines limfoidines struktūras – lemia tumorą supresuojantį efektą, o jei išsibarsto stromoje – skatinantį) (130) ir kitų TMA komponentų įtakos B ląstelėms (131).

Neutrofilai PDAK gali būti dviejų tipų. N1 neutrofilai dėl negatyvios IFN- β reguliacijos galėtų naikinti vėžines ląsteles, tačiau stimuliuojant TGF- β ir G-CSF, neutrofilai aktyvuojami į provėžinio fenotipo N2 ląsteles (132). Kadangi PDAK dažniausiai uždegiminės kilmės, navikinės ląstelės sekretuoja TNF- α ir IL-12, taip pritraukia polimorfonuklearinius neutrofilus (82).

Neutrofilai prisideda prie auglio augimo ir invazijos išskirdami neutrofilų proteazes, kurios ardo ekstraceliulinę matricą (63), sekretuoja chemokinus, kad pritrauktų monocitus, dendritines ląsteles į TMA (82). Tokie su tumoru asocijuoti neutrofilai tampa pagrindiniu uždegiminiu citokinų TNF- α , IL-12, GM-CSF bei chemokinų šaltiniu ir reguliuoja vėžinių ir imuninių ląstelių migraciją. Per IL-10 ir TNF- α jie mažina limfocitų skaičių ir blogina jų funkciją (82), o atpalaiduodami CXCL-10 ir CCL-21 skatina vėžinių ląstelių migraciją nervinio pluošto link. Taip sukiamas skausmas (133).

Buvo bandoma neutrofilų ir limfocitų santykį laikyti predikciniu faktoriumi klinikiniuose tyrimuose, tačiau rezultatai kontroversiški (82).

Neutrofilai ankstyvose vėžio vystymosi stadijose išsidėsto tumoro kraštuose, o vėliau gausiai infiltruoja centrą. Neutrofilų aktyvacija yra pirmas molekulinis veiksnys, priklausomas nuo CD177 neutrofilų specifinio antigeno CD177, neigiamai veikiantis pacientų išgyvenamumą (134). Be to, neutrofilų citoplazmos granulių proteinai ardo ekstraceliulinę matricą. Pavyzdžiui, matrikso metaloproteinazė-9, atsipalaidavusi iš granulių, TMA veikia kataliziškai, skatina navikinių ir imuninių ląstelių invaziją, suriša ekstraceliulinio matrikso proteinus (kolageną, lamininą, fibronetiną), skatina angiogenezę, mobilizuodama kraujagyslių endotelio augimo faktorių.

Granulių arginazė-1 lemia CD3 indukuotą T ląstelių aktyvaciją ir proliferaciją (135).

Neutrofilai dar išskiria ekstraceliulinius DNR pluoštus, kurie gali dalyvauti metastazavimo procese, nors pagrindinė jų funkcija – kovoti su patogenais. Neutrofilų pluoštai gali pasižymėti ir tumorogenezę skatinančiu poveikiu bei būti barjeru T ląstelių penetracijai, taip sumažėja CD8+ patekimas į TMA ir NK ląstelių bei CD8+ T ląstelių indukuotas citotoksiškumas (86). Manoma, kad aktyvuodami su vėžiu susijusius fibroblastus neutrofilai gali skatinti mikrometastazių atsiradimą kepenyse. Galiausiai jie dalyvauja cirkuliuojančių vėžinių ląstelių ekstravazacijos procese, infiltracijoje į metastatinį organą, nors patys patiria apoptozę, bet išskiria minėtą DNR bei kitas medžiagas, sukuria palankią aplinką vėžinėms ląstelėms prigyti (82).

Taigi tankioje, fibrozinėje TMA vėžinės ląstelės, aktyvuodamos įvairius signalinius kelius, slopina įgimtą ir įgytą imuninę sistemą, mažindamos citotoksinių CD8+ T ląstelių ir didindamos imunosupresinių makrofagų (M2), neutrofilų (N2), T reguliacinių limfocitų skaičių (100). Sąveika tarp imuninių NK, CD4+, CD8+, CD20+ ir FoxP3+ limfocitų priešvėžiniame imunitete gali turėti didelę įtaką išgyvenamumui (136).

Imuniniu požiūriu taip pat galima išskirti PDAK subtipus. Jeigu atsižvelgtume į neoantigenus, stromos, TMA savybes, navikus galėtume suskirstyti į šaltus ir karštus, pasižyminčius mutacijų gausa ir jų stokojančius (137).

2.7.3. Tumoro ir stromos santykis

Jau kuris laikas bandoma suprasti, ar stromos tankis yra reikšmingas prognozei. Atlikti 66 pacientų patologinės medžiagos tyrimai atskleidė, kad esant didesniai stromos tankiui rezekuotoje PDAK tikėtinas ilgesnis IBPL ir BI (138). Kiti tyrėjai nustatė, kad 104 pacientams, gydytiems neoadjuvantine chemoterapija, mažas stromos santykis po šios terapijos buvo susijęs su kepenų metastazių atsiradimu ir aukštu Ki-67 (139). Tiriant kitomis onkologinėmis ligomis sergančius pacientus bandoma apskaičiuoti naviko ir stromos santykį, pavyzdžiui, jis svarbus BI HCC pacientams po kepenų transplantacijos (140). Žarnyno vėžio atveju aukštas tumoro ir stromos santykis susijęs su blogesniu BI (141). Siekiama išvelgti tumoro ir stromos santykio reikšmę krūties karcinomos atveju (142).

2.7.4. Neoadjuvantinio gydymo įtaka TMA

Gydymo įtaką TMA išsidėsčiusioms imuninės sistemos ląstelėms geriausiai atspindi tyrimai su neoadjuvantine terapija.

Klinikiniame tyrime, kuriame dalyvavo 74 pacientai (37 po įvairių režimų neoadjuvantinės chemoterapijos ir 37 tik po operacinio gydymo), įrodyta, kad gydymas vaistais lėmė T reguliacinių limfocitų ir MDSC ląstelių išsekimą, imuninių ląstelių susitelkimą peritumorozinėje erdvėje, sumažėjusį aktyvumą stromoje ir mažesnę perineurinę invaziją. Tokia imuninė remodeliacija susijusi su naviko dydžio sumažėjimu. O tumoro proliferacijos laipsnis (Ki67), stromos aktyvacija ir naviko infiltracija CD4+ T bei NK ląstelėmis buvo nepriklausomi BI nulemiantys faktoriai (126).

Kiti tyrėjai nagrinėjo 44 PDAK pacientų, gydytų neoadjuvantine chemoterapija ir radioterapija (18 iš jų) arba negydytų prieš operaciją, ir nustatė, jog infiltracija CD3+ T ląstelėmis (įskaitant CD3+CD8+ citotoksines, CD3+CD4+FOXP3- T helperius bei CD3+CD4+FOXP3+ T reguliacines ląsteles) neoadjuvantinio gydymo šakoje padidėjo, o CD68+ makrofagų kiekis nekito. Imunogenominė analizė šiame tyrime parodė genų, susijusių su antigeno prezentacija, T ląstelių aktyvacija bei uždegimu, padidėjusią raišką. Be to, ši PDAK medžiaga buvo palyginta su melanomos ir patvirtinta, kad po neoadjuvantinės terapijos T ląstelių infiltracija netgi didesnė nei šio imunogeniško naviko, tačiau fenotipas, erdvinis išsidėstymas greičiausiai lemia mažesnę T ląstelių efektyvumą. Patvirtinta ir T reguliacinių limfocitų gausos įtaka blogesniai išgyvenamumui (143).

Panašus chemospindulinio gydymo poveikis buvo ir kitų navikų atveju. Pavyzdžiui, pacientams, kuriems pasiektas visiškas atsakas po chemospindulinio gydymo dėl stemplės karcinomos, nustatytas kur kas didesnis infiltruojančių T limfocitų kiekis ir jie buvo išsidėstę arčiau tumoro ląstelių, nei dalinio atsako grupėje (144).

2.8. Imuninės sistemos veiksniai, sergant kasos vėžiu

2.8.1. Molekulinių ir metabolinių faktorių įtaka imuninei sistemai

Šiuo metu žinoma keletas mechanizmų, kaip metaboliniai procesai paveikia imuninę sistemą ir skatina rezistenciją imunoterapijai (67).

CD8+ efektorinių T ląstelių funkcijai ir tam, kad CD4+ T ląstelės galėtų produkuoti IFN- γ , būtinas aerobinės glikolizės, o CD4+ efektorinių T ląstelių (Th1, Th2 ir Th17), M1, M2 tipų makrofagams ir Tregams – lipidų oksidacijos procesas (67). MDSC ląstelės perprogramuojamos, kad vyktų

intensyvi riebiųjų rūgščių oksidacija ir glikolizė (145). Naviko išskiriamas laktatas keičia TMA: sužadina M2 fenotipo su tumoru susijusius makrofagus, slopina CD8+ citotoksinių ląstelių funkciją (146), išreguliuoja MDSC ir slopina natūralių žudikų aktyvumą, taip palaikydamas imunosupresiją vėžio aplinkoje (67).

Genų raiškos, vadinamos genetinės žymos, sąsaja su imuninių ląstelių aktyvumu įrodyta 172 PDAK pacientų tyrime. Pagal 13 genų raišką (ARNTL2, BHLHE40, FBXL17, FBXL8, PPP1CB, RBM4B, ADRB1, CCAR2, CDK1, CSNK1D, KLF10, PSPC1, SIAH2) pacientai buvo suskirstyti į gerą ir nepalankią prognostines grupes. CD8 T ir B ląstelių kiekis didelės rizikos grupėje buvo reikšmingai mažesnis, neutrofilų – padidėjęs (147).

2.8.2. Imunoterapija, rezistentiškumas jai

Kol kas vienintelis pacientams rekomenduojamas imunoterapijos preparatas yra pembrolizumabas, tik esant dideliame mikrosatelitų nestabilumui MSI-H ar klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo (MMR; angl. *Mismatch Repair*) sistemos sutrikimui. Mikrosatelitų nestabilumu vadinamos pažaidos mikrosatelitų sekose, atsiradusios dėl vieno ar daugiau pasikartojančių sekų iškritos ar intarpo; jos pasireiškia nenormaliai ilgais arba trumpais mikrosatelitais individo DNR ir gali būti ankstyvasis kancerogenezės įvykis. MSI-H subtipas sudaro ne daugiau kaip 2 % PDAK.

Anti-PD-1 ir anti-PD-L1 daugiausia veikia imuninėje naviko sandūroje, prisijungia prie atitinkamų receptorių ar ligandų, per PD-1/PD-L1 kelią apsaugo nuo tumoro ląstelių ir su tumoru susijusių makrofagų skatinamos T efektorinių ląstelių inaktyvacijos (86). PD-1 išreikštas ant T, NK ląstelių, PD-L1 ir PD-L2 ligandų randama ant aktyvuotų antigeną prezentuojančių, hematopoetinių, parenchimos ląstelių uždegiminėje mikroaplinkoje, navikuose (148). PD-1 prisijungiant prie tumoro ligandų PD-L1, PD-L2 išvengiama CD8+ T ląstelių prisijungimo prie taikinių ląstelių. Taigi šio kelio slopinimas leidžia gerai lokalizuotoms T ląstelėms pradėti imuninį atsaką (149).

Esant stabiliems mikrosatelitams, monoterapijos PD-1, CTLA4 inhibitoriais naudoti klinikiniai tyrimai nepatvirtino (bendro atsako dažnis klinikiniuose tyrimuose buvo 0 ir 3 % atitinkamai (87), tačiau taikant kombinacinius imuninę reguliaciją moduluojančius preparatus gali būti pasiekiamas geresnis efektas (122). PDAK rezistentiškumas imunoterapijai apibrėžiamas kaip imuninė tolerancija, vyksta bet kurioje stadijoje: iniciacijos, proliferacijos, diferenciacijos, kapacitacijos, įtraukimo,

palai komas ar net didėja sąveikaujant TMA ląstelėms, slopinantiems citokinams, chemokinams ir per imuninio atsako kontrolės taškus (86, 149). Šios imunoterapijos neveiksmumas PDAK daugiausia nulemtas mažo infiltruojančių PD-1⁺ T ląstelių kiekio ir neopitopų nepakankamumo (150). Ląstelių imunoterapija (CAR-T), kaip ir kitų solidinių navikų atveju, negalima dėl šios karcinomos antigenų heterogeniškumo (151).

Vienas iš faktorių, aiškinančių rezistentiškumą imunoterapijai: kasos vėžys mažai imunogeniškas (jame mažiau somatinių mutacijų) (90). Be to, PDAK pasižymi unikaliu genominiu rinkiniu, kuris skatina imunosupresiją, įgytą T ląstelių imunitetą, jau ankstyvose stadijose. O metastazėse imuniniai barjerai dar didesni (56). Tumorą infiltruojantys limfocitai produkuoja didelį programuotos ląstelių žūties proteino 1 (PD-1) kiekį ir sąveikauja su jo specifiniu ligandu, programuotos ląstelių žūties ligandu 1 (PDL-1), išreikštu ant PDAK ląstelių, o tai sąlygoja T limfocitų išekvojimą (152, 153). Tumoro infiltruojančių limfocitų buvimas ir TMA sudėtis yra pagrindiniai predikciniai atsako į imunoterapiją veiksniai (117). Gausi infiltracija CD8⁺ limfocitais būdinga imunologiškai karšties navikams, jie geriau atsako į gydymą imunoterapija (154). Tumoro infiltracijos kompetentiškais citotoksinais T limfocitais stimuliacija turėtų būti gydymo taikyns, įgalinantis „šaltus“ navikus paversti „karštais“ (117).

Pāčios kasos vėžinės ląstelės trikdo antigeno prezentavimo eigą ir slopina citotoksinius limfocitus. Jos selektyviai veikia MHC-1 molekules, skatina lizosomų degradaciją per autofagijos mechanizmą. Be to, PDAK ląstelės pasižymi CD47 raiška, dėl to yra apsaugotos nuo fagocitozės ir antigeno prezentavimo. Išskirdamos indolamino 2,3-dioksigenazę katalizuoja triptofano, kuris būtinas citotoksinių T ląstelių išgyvenimui ir aktyvacijai, degradaciją ir T limfocitų apoptozę bei neveiklumą. Galiausiai, tumoro ląstelės mažina žmogaus leukocitų antigeno DR izotipo ir CD40 ekspresiją, dendritinių ląstelių nebrandumą ir CD8⁺ efektorinių ląstelių supresiją (87).

PD-1/PD-L1 kelio perprogramavimas gali būti derinamas su kitais vaistais (pvz., chemokino receptorių CXCR4 inhibicija, anti-IL-20 monokloniniais antikūnais, chemoterapija) (86). Bandoma paveikti įvairius TMA komponentus bei lygmenis. Jau tiriami vaistai, slopinantys su vėžiu susijusius makrofagus, Gr-MDSC ląsteles, bandoma sumažinti T reguliacinių limfocitų kiekį (87). B ląstelės veikiamos Brutono tirozino kinazių inhibitoriais. Bandoma veikti kostimuliacinius receptorius (anti-CD40), pastimuliuoti CD8⁺ ląsteles (78). Stomos imunosupresinis poveikis gali būti sumažinamas imunoterapiją kombinuojant su vaistais, nukreiptais į stomos komponentus: transformuojantį augimo faktorių β (angl. *transforming growth factor-β*, TGF-β), židininės adhezijos kinazės signalus

(angl. *focal adhesion kinase*, FAK), glutamino metabolizmą (86). Daug tikimasi ir iš vakcinų. Chimerinių antigeno receptorių T ląstelių terapija, kai surenkamos ir *ex vivo* pagausinamos paciento tumoro antigeno specifinės T ląstelės, taip pat tiriamos PDAK pacientams (87).

2.8.3. Prognostiniai, predikciniai biožymenys atsako į gydymą vertinimui

Nuo seno CA 19-9, Lewis A kraujo grupės antigenas, serologinis žymuo, labiausiai naudojamas pirminei diferencinei diagnostikai, atsako ir recidyvo vertinimui. Jis nėra specifiškas, padidėja ir esant kepenų latakų vėžiui (159), neaptinkamas Lewis antigeno neturintiems, būna klaidingai teigiamas sergant cholangitu, esant tulžies latakų stazei, nebūtinai atspindi vėžį ar pažengusią ligą (156). Žymens jautrumas siekia nuo 79 iki 81 %, specifiškumas nuo 80 iki 90 % pacientams, kuriems jau išryškėję simptomai, ankstyvai diagnostikai nėra tinkamas (157). CA 19-9 koreliuoja su stadija, rezektabilumu ir yra vertingas pradiniam prognozės įvertinimui (154). Ir operabiliems, ir paliatyviąją chemoterapiją vartojantiems pacientams gali būti geras prognostinis (158) ir predikcinis faktorius (159, 160).

Priskaičiuojama iš viso apie 300 cirkuliuojančių medžiagų, kurių prognostinė vertė tirta PDAK pacientams: glikolipidai, proteinais, citokinai, chemokinai, serumo adhezijos molekulės, RNR bei DNR (160).

CEA asocijuotos ląstelių adhezijos molekulių (CEACAM) proteinais priklauso ląstelių adhezijos molekulių imunoglobulinų grupei. Būtent CEACAM6 yra naudingas diferencinei diagnostikai, o pacientams, gydytiems radikalia rezekcija ir adjuvantine chemoterapija, padidėjusi jo koncentracija serume lėmė blogesnę BI (160, 161)

Cirkuliuojančių ląstelių jautrumas ir specifiškumas PDAK laikomas nedideliu (74 ir 83 % atitinkamai), panašūs ir cirkuliuojančios DNR metanalizės rezultatai (64 ir 92 %) (160). Bandyta išmatuoti cirkuliuojančią DNR įvykus tikslinių mutacijų (^{mut}KRAS ctDNR), įrodytas ryšys su blogesniu BI (162). 106 pacientams, sirgusiems ankstyva PDAK, buvo tirta cirkuliuojančių ląstelių ir imuninių ląstelių prognostinė reikšmė. 37,5 % (12/32), 88,0 % (44/50) ir 100 % (24/24) atitinkamai esant II, III ir IV stadijoms, buvo aptikta cirkuliuojančių naviko ląstelių. Didesnis bendras, mišrus ir mezenchiminių cirkuliuojančių ląstelių kiekis stipriai susijęs su trumpesniu IBPL. Be to, pacientams, kuriems gausu cirkuliuojančių vėžio ląstelių kraujyje, aptikta mažiau CD4, NK ląstelių, IL-2 ir IFN γ , buvo mažesnis CD4/CD8 santykis (163).

Atsakui į imunoterapiją įvertinti naudingi yra mutacijų kiekio, CD8+ kiekio, PD-1 raiškos tyrimai. Esant PD-L1 neišreikštam, bet CD8+ gausiai

infiltracijai, prognozė yra geresnė, tačiau, jei PD-L1 išreikšta, PD-1 kelio blokavimas gali reaktyvuoti CD8+ ląsteles ir pagerinti prognozė (164). Periferinio kraujo imuninių ląstelių predikcinė vertė gydant anti PD1/PD-L1 bei anti CTLA kol kas nėra didelė (165).

2.8.4. Periferinio kraujo limfocitų reikšmė, įvertinimas kraujyje ir pokyčiai gydymo metu (serume ir TMA), įtaka prognozei, palyginimas su kitomis onkologinėmis ligomis

2.8.4.1. CD8+ T ląstelės

Viename tyrime nustatyta, jog sergančiųjų PDAK kraujyje procentinė CD8+ T ląstelių raiška mažesnė nei sveikų donorų, tačiau CD8+ perforin+ ląstelių kiekis nesiskiria (166), o kitame tyrime kaip tik aptikti didesni CD4+, CD8+, NK ląstelių kiekiai, palyginti su kontroline grupe (167). Abiejuose tyrimuose konstatuotas didėjimas gydymo metu: tiek praėjus pusantro mėnesio po kasos rezekcijos (166), tiek vartojant lenalidomidą (167).

Imunomoduliacinis įvairaus priešvėžinio gydymo veikimas nustatytas ir sergantiesiems kitomis onkologinėmis ligomis – 53 pacientams, gydytiems TACE, kartu su imunoterapija bei TKI dėl nerezektabilios HCC, praėjus 4 mėn. nuo gydymo pradžios, aptiktas cirkuliuojančių CD8+, CD3+ padidėjimas (be to, jiems daugėjo NK ląstelių ir mažėjo CD4+) (168).

Kitame tyrime, kuriame dalyvavo 24 kolorektinio vėžio pacientai, nustatyta, kad pacientams po rezekcijos CD8+ T ląstelių procentinis kiekis tarp visų T ląstelių padidėjo, bet to nepastebėta adjuvantinę chemoterapiją gavusiems pacientams (169).

Pacientams (iš viso į studiją įtraukta 220 tiriamųjų), sergantiems nosiaryklės vėžiu ir turintiems didelį Epsteino–Baro virusų kopijų skaičių, gydytiems sutaptiniu chemospinduliniu metodu, didesnė CD3+CD8+ procentinė vertė buvo nepriklausomas prognostinis faktorius (170).

Tyrime dalyvavusioms 126 kiaušidžių vėžiu sergančioms pacientėms CD3+CD8+ ir CD8+CD28+ T limfocitų kiekis kraujyje buvo mažesnis. Po operacinio gydymo pastarųjų kiekis mažėjo (171). Metaanalizės duomenimis, įvairių navikų gydymas radioterapija CD8+ ląstelių kiekiui periferiniame kraujyje įtakos neturėjo (172).

CD8+CD57+ ląstelės pasižymi itin didele IFN- γ , granzimo B, perforino ekspresija, jų padaugėja, sergant lėtine infekcija (ŽIV, CMV) dėl nuolatinės antigeno stimuliacijos. Tokia CD57 antigeno, sumažėjusi CD27 ir CD28 raiška, padidėjęs KLGR1 būdingi visiškai diferencijuotoms T ląstelėms.

CD28 netekimas yra ląstelių senėjimo žymuo, galintis paaiškinti imunosupresijos bei imunorezistentiškumo mechanizmus (173). Jos pasižymi dideliu citotoksiniu aktyvumu, bet negeba proliferuoti, stimuliuojant T ląstelių receptorius (174). Taigi CD57 gali būti traktuojamas kaip citotoksiškumo žymuo, padedantis diferencijuoti imunosupresines ir citotoksines CD8+CD28⁻ ląsteles (175). Reikšmė navikiniame augime nėra aiški. Tačiau keletas studijų parodė, jog CD8+CD57⁺ procentinės išraiškos kraujyje padidėjimas neigiamai veikė BI skrandžio, melanomos, inkstų vėžiu sergantiems pacientams (176–178), o burnos plokščiakūstelinio vėžiu sergantiems pacientams aptikta teigiama prognostinė įtaka (179). Studijoje, kurioje dalyvavo 73 nesmulkiakūstelinio vėžio pacientai, nustatyta, jog cirkuliuojančios CD57⁺ ląstelės ekspresavo daugiau PD-1, pasižymėjo visiška branda, citotoksiniu potencialu. O TMA ir dauguma sritinių limfmazgių CD8+CD57⁺ T limfocitai vis dar ekspresavo CD27 ir CD28, nebuvo aktyvūs nei citotoksiniu, nei proliferacijos aspektu. CD8+CD57⁺ ląstelės mažiau reaguoja į PD-1 blokadą nei CD8+CD57⁻, o IL-15 atkuria efektorinę jų funkciją (174). Tiriant metastazavusią urotelio karcinomą pastebėta, kad į gydymą anti-PD-L1 atezolizumabu (ne chemoterapija) reikšmingiau reagavo pacientai, kurių didesnis pradinis CD8+CD57⁺ ląstelių kiekis (180). Radioterapija, kaip pastebėta lokaliai pažengusiu nesmulkiakūstelinio plaučio vėžiu sergančių pacientų tyrime, pradžioje gali turėti įtakos CD8⁺ proliferacijai, jų senėjimui (CD28-CD57⁺ sąskaita), o vėliau kiekis mažėja, ląstelės galutinai diferencijuojasi. CD8⁺ tarsi sužadinamos spindulinio gydymo pabaigoje ir po jo galutinai išsenka (181). Kitame tyrime su NLPV nustatyta, kad pacientams, kurių cirkuliuojančių centrinių atminties ląstelių ir efektorinių CD8⁺ T ląstelių santykis buvo didesnis, gydytų nivolumabu, išgyvenamumas neprogresuojant ligai ilgesnis (182).

Galima išskirti dar ir imunosupresinę CD8+FOXP3⁺ reguliacinių limfocitų populiaciją, kuri svarbi imunotolerancijai, bet gali dalyvauti ir priešvėžiniame atsake, nors mechanizmai nėra aiškūs (183). Nustatyta, jog nosiaryklės vėžiu sergantiems jų kiekis periferiniame kraujyje didesnis nei sveikiesiems, aptinkama ir TMA (170).

CD8+CD122⁺ atminties ląstelės, laikomos dar vienu reguliacinių CD8⁺ subtipu, palaiko T ląstelių homeostazę, reguliuoja CD4⁺, CD8⁺ aktyvumą, skatina imunosupresiją. Tiriant 66 PDAK pacientus nustatyta, kad didelis CD8+CD122⁺ T ląstelių kiekis buvo susijęs su didesniu mirtingumu per 90 dienų, o sumažėjimas po chemoterapijos – su ligos stabilizacija (183).

2.8.4.2. T reguliaciniai limfocitai

Reguliaciniai (CD4+) limfocitai laikomi imuninę sistemą slopinančiomis ląstelėmis, geba inhibuoti efektorines T ląsteles. Vienas iš jų potipių, vadinamosios $\gamma\delta$ T ląstelės, vis dėlto gali stimuliuoti B limfocitų antikūnų produkciją, NK ląsteles bei dendritinių ląstelių brendimą, tačiau daugiausia veikia kaip $\gamma\delta$ FoxP3⁺ T reguliaciniai, skatina vėžio proliferaciją (18).

CD4⁺ T ląstelių kiekis PDAK pacientų kraujyje yra sumažėjęs (100). Tyrime, kuriame dalyvavo 100 pacientų, nustatytas sumažėjęs cirkuliuojančių CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ reguliacinių ląstelių kiekis sergantiesiems PDAK, palyginti su kontroline grupe. Mažiau jų buvo rezektabilios ligos atveju nei neoperabiliems pacientams. O pacientų po radiklios rezekcijos išgyvenamumas buvo geresnis, kai Treg ląstelių kiekis kraujyje buvo didesnis (184).

Tyrime dalyvavusiems 212 sirgusiųjų nerezektabilia PDAK ir gydytų gemcitabinu ar jo kombinaciniais režimais Treg ląstelių kiekio sumažėjimas po 2 ciklų nulėmė geresnę BI prognozę (185). FOLFIRINOX režimas, skirtas neoadjuvantiniu tikslu, T reguliacinių limfocitų kiekį sumažino, be to, jie pasižymėjo CD39 raiška, rodančia imunosupresines savybes. Šiame tyrime nustatyta, kad atsakiusiųjų į gydymą grupėje vyravo CD8⁺ T ląstelės, o T reguliacinių limfocitų buvo mažiau (186). Ortotopiniuose pelių modeliuose gemcitabinas mažino Treg akumuliaciją ir gerino išgyvenamumą (100). Po hibridinės minimaliai invazyvios kasos rezekcijos CD4⁺CD25⁺CD127^{blankių} T ląstelių sumažėja (184).

40 pacientų, sergančių nesmulkiąląstelinio plaučių vėžiu, tyrime stebėtas ryškus CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ir CD8⁺CD28⁻ Treg padidėjimas, palyginti su kontroline grupe, kiekis priklausė nuo naviko stadijos, o po chemoterapijos cisplatinos, gemcitabino pagrindu jų kiekis procentais labai sumažėjo, bet CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ III/IV stadijos sergančiųjų išliko didesnis nei kontrolinės grupės (188). 126 kiaušidžių vėžiu sergančių pacientų tyrime T reguliacinių limfocitų kiekis aptiktas padidėjęs ir paribiniuose navikuose, ir vėžyje (171). Metaanalizėje, apėmusioje 19 studijų, 877 pacientus, stebėtas CD3⁺ bei CD4⁺ limfocitų sumažėjimas kraujyje po radioterapijos (172).

2.8.4.3. NK ląstelės

NK ląstelės pasižymi nuo antigeno prezentacijos nepriklausomu citotoksinu poveikiu. NK ląstelių skaičiaus ir funkcijos sumažėjimas blogina IBLP ir BI (18). 54 PDAK pacientų klinikiniame tyrime nustatyta, kad periferiniame kraujyje jų skaičius nesiskiria nuo sveikų žmonių, tačiau pasižymi CD16^{sviesios}CD57^{sviesios} fenotipu ir NKG2D ligandų reikšmingu

sumažėjimu, mažu citotoksiniu aktyvumu bei nedidele IFN- γ ekspresija, gamina daug IL-10 (189). Kitame NK ląstelių aktyvumo tyrime, kuriame dalyvavo 203 PDAK pacientai, konstatuota, kad sergantiesiems jis mažesnis nei sveikiesiems, o esant išplitusiai ligai mažesnis nei operabilios atveju. Mažesnis aktyvumas buvo susijęs su blogesniu atsaku į chemoterapiją, progresavimu ir prastesniu išgyvenamumu. Tačiau priežastinis ryšys nėra aiškus: ar NK ląstelių aktyvumas sumažėja dėl PDAK karcinogenezės ir progresavimo, ar menkas veiklumas lemia greitesnę PDAK progresavimą (190).

NK ląstelių kiekio pokytis laikomas vienu iš prognostinių faktorių pacientams po operacijos, bet būdingos individualios skaičiaus variacijos, priklausančios nuo bendros paciento bei mitybos būklės (191). 378 pažengusių PDAK pacientų analizė parodė, jog NK ląstelių skaičius, paciento amžius, neutrofilų / limfocitų santykis ir metastazių nebuvimas yra nepriklausomi BI prognostiniai faktoriai (192). Greičiausiai reikšmingas ne tik kiekis, bet ir funkcinis subtipas (121).

Kasos vėžio rezekcija keičia NK ląstelių kiekį periferiniame kraujyje: kai kuriems pacientams jų kiekis padidėja (191). Po kasos vėžio rezekcijos pelėms suleidus gemcitabino aktyvuojamas NK ląstelių priešvėžinis veikimas, slopinamas vietinis naviko atsinaujinimas (125). NK ląstelių kiekis teigiamai koreliuoja su išgyvenamumu, mažina atsinaujinimo tikimybę (191).

Mažos gemcitabino dozės didina interferono- γ ekspresiją bei NK-ląstelių aktyvumą pelių plaučių vėžio modeliuose (193). Gydytas radioterapija mažino CD3-CD16CD56+ NK ląstelių kiekį kraujyje 31 stemplės vėžiu sergančio paciento tyrime (194).

2.8.4.4. Į NK ląsteles panašios (angl. Natural Killer T-like Cells)

Šis terminas, atsiradęs imunologijoje gana neseniai, apibūdina ląsteles, kurių didelis TCR-CD3 komplekso tankis, panašus į klasikinių T ląstelių šio komplekso tankį, ir mažas CD56 molekulių tankis, panašus į citotoksinių NK ląstelių molekulių tankį. Į NK ląsteles panašios sudaro mažiau nei 10 % cirkuliuojančių limfocitų, dauguma atitinka klasikinį $\alpha\beta$ TCR+ CD8 T ląstelių tipą, bet yra ir $\alpha\beta$ TCR+ CD4 T ląstelių. CD56 molekulę ekspresuoja ir NKT, MAIT, $\gamma\delta$ T ląstelės. Į NK panašios yra gerai diferencijuotos įprastos ir neįprastos T ląstelės, kurioms būdinga CD56 molekulės, kitų NKT koekspresija, ir antigenus atpažįsta nuo CD1d nepriklausomu keliu. Nuo NK ląstelių skiriasi tuo, kad ekspresuoja TCR-CD3 kompleksą, menkai ar visai neekspresuoja CD16 ir labai daug IL-2 receptorių-beta grandies (IL-

2Rβ). Nors, iš esmės, šių ląstelių populiacija labai heterogeniška, bet trys charakteristikos yra bendros: brandus fenotipas, NKR įgijimas ir granuliu būvimas (195).

Į NK panašių ląstelių nerandama kūdikių organizme ir daugėja su amžiumi. Taigi CD8+ į NKT panašios ląstelės kompensuoja nusilpusią tradicinių NK ląstelių ir CD8+ T ląstelių funkciją organizmui senstant. Dėl to manoma, kad šios ląstelės padeda kovoti su amžiaus nulemtomis ligomis, tarp jų ir vėžiu (195).

NK ląstelių vieta ir prognostinė reikšmė įvairių onkologinių ligų atveju mažai išnagrinėta. Pažengusio PDAK atveju cirkuliuojančių NK ląstelių kiekis sumažėja, o prieš gydymą išmatuotas skaičius teigiamai koreliuoja su išgyvenamumu (100), tačiau tai rodančios studijos atliktos seniai ir gydymo metodai bei naudojami vaistai yra pasikeitę, jų poveikis tirtinas. 25 pacientų, sergančių HCC, tyrime stebėtas į NKT panašių ląstelių augimas po stereotaktinės kūno radioterapijos, didesnės vertės buvo susijusios su geresne prognoze (196). 907 pacientų, sergančių kolorektiniu vėžiu, TMA tyrime nustatyta, kad vėžio aplinkoje į NCAM1+CD3+NKT panašių ląstelių yra mažai ir ryšio su išgyvenamumu neaptikta (197). Kitame tyrime, kuriame dalyvavo 24 kolorektiniu vėžiu sergantys pacientai, nustatyta, kad pacientams po rezekcijos į NKT ląsteles panašių ląstelių procentinė dalis visų periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių populiacijoje padidėjo, bet to nepastebėta pacientų, kuriems taikyta adjuvantinė chemoterapija, atveju (169). O CD16+ į NKT panašių ląstelių procentinis padidėjimas lėmė blogesnį išgyvenamumą kolorektinio vėžio tyrime, kuriame dalyvavo 71 tiriamasis (198). Skrandžio vėžiu sergančiųjų kraujyje šių ląstelių kiekis nesiskyrė nuo sveikųjų, o vėžio aplinkoje jų buvo mažai, be to, mažas kiekis koreliavo su ligos progresavimu bei blogesniu BI (199). O pacientų, sergančių ankstyvu plaučių vėžiu, periferiniame kraujyje cirkuliavo daugiau į NKT panašių ląstelių (195).

2.8.4.5. CD4/CD8 santykis

Didelis CD8+ tumorą infiltruojančių ląstelių kiekis ir pakankamas CD4+, kurios reikalingos pirmųjų funkcijai, yra būtinos, kad vyktų reikiamas imuninis atsakas. Taigi manoma, kad CD4+/CD8+ T ląstelių santykis yra svarbus, varijuoja tarp įvairios lokalizacijos navikų. O PDAK sergančių pacientų tyrime nustatyta, kad šio santykio sumažėjimas po gydymo chemoterapija gemcitabino pagrindu susijęs su geresne išgyvenimo prognoze (185).

2.8.4.6. Dendritinės ląstelės

DL PDAK sergančių pacientų periferiniame kraujyje aptinkama mažai, jos pasižymi sutrikusia stimuliacine funkcija. Jų kiekis teigiamai koreliuoja su išgyvenamumu pacientų, kuriems yra rezektabilūs ir pažengę navikai (200). Manoma, kad radikali rezekcija, sisteminė chemoterapija, chemospindulinis gydymas, imunochemoterapija gali didinti DL skaičių ir gerinti jų stimuliacinę funkciją (100, 166). Gemcitabino paveikta kasos vėžio ląstelė stimuliuoja DL brendimą, T ląstelių proliferaciją ir imuninį atsaką (201).

2.8.4.7. B ląstelės

Radioterapija mažina CD19+ B limfocitų kiekį stemplės vėžiu sergantiems pacientams (34). Sumažėjęs cirkuliuojančių B ląstelių kiekis kiaušidžių vėžiu sergančioms pacientėms buvo susijęs su itin agresyviu šviesių ląstelių histologiniu tipu, pažengusia stadija ir rezistencija platinai. Po operacijos šių ląstelių kiekis didėjo (171).

Reguliaciniai B limfocitai pasižymi imunosupresiniu veikimu, reguliuoja imuninę homeostazę, paprastai ekspresuoja CD24, CD1d, skirtingų lygių CD27, sudaro mažiau nei 10 % visų cirkuliuojančių B limfocitų. Be to, ekspresuoja daug PD-L1 ir *in vitro* sąveikauja su PD-1 ekspresuojančiais CD8+ T limfocitais (130). Cirkuliuojančių B reguliacinių limfocitų kiekis PDAK padidėjęs, palyginti su sveikų žmonių ir koreliuoja su stadija bei bloga prognoze (202).

2.8.4.8. Ryšys tarp cirkuliuojančių ląstelių ir TMA

Tyrimų, apžvelgiančių TMA ir cirkuliuojančių T limfocitų ryšį, nėra daug.

Klinikiniame tyrime, kuriame pacientėms buvo skirtas pembrolizumabas bei chemoterapija trejopai neigiamam krūties vėžiui gydyti, buvo aptiktas panašus T limfocitų išsekėjimas abiejose chemoterapijos (ir paklitakselio, ir kapecitabino) grupėse. O chemoterapiniai vaistai padidino T limfocitų klonų skaičių navike, bet ne periferiniame kraujyje (203). Kitame krūties vėžio tyrime, kuriame dalyvavo 62 pacientės, patvirtinta, kad tik infiltruojančių CD8+ ląstelių kiekis koreliavo su cirkuliuojančių. Kitų ląstelių: CD20 B limfocitų, T helperių bei reguliacinių, ryšio tarp naviko aplinkos ir periferinio kraujo verčių nenustatyta (204).

Tyrime, kuriame dalyvavo 11 RCC sergančių pacientų, gydytų nivolumabu, neaptikta ryšio tarp cirkuliuojančių ir TMA imuninių ląstelių (CD4+/CD8+ santykio, absoliučių šių ląstelių skaičiaus) (205). Skrandžio vėžio tyrime pastebėta, kad agresyviu laikomam difuziniam / mišriam adenokarcinomos tipui būdinga negausi infiltracija CD8+ T limfocitais bei sumažėjęs NK ir T reguliacinių ląstelių kiekis (206). Kitame tyrime, kuriame dalyvavo skrandžio vėžiu sergantys pacientai, nustatyta teigiama koreliacija tarp cirkuliuojančių ir TMA infiltravusių CD3+CD4+ ląstelių (207).

3. METODAI

Disertacijos darbo analizė atlikta naudojant duomenis iš VUL SK doktorantės inicijuoto tyrimo „Limfocitų subpopuliacijų ir kitų ląstelių pokyčių tyrimai ir jų poveikis kasos intraduktalinės adenokarcinomos atsinaujinimui ir išgyvenimo prognozei“.

Pacientus į tyrimą įtraukė tyrėjai, vadovaudamiesi toliau nurodytais įtraukimo kriterijais:

Įtraukimo kriterijai:

- Asmenys nuo 18 metų.
- Patvirtinta kasos intraduktalinė adenocarcinoma, IA, IB, IIA, IIB, III, IV ligos stadija.
- Pasirašyta informuoto sutikimo forma.
- ECOG 0–3.
- Galimas operacinis ir / ar chemoterapinis gydymas.

Neįtraukimo kriterijai:

- Negalima taikyti operacinio ir / ar chemoterapinio gydymo dėl sunkios būklės, gretutinių ligų, paciento nesutikimo.
- Sergantieji ne adenokarcinomos tipo navikais.
- Sergantieji autoimuninėmis ligomis ar infekcinėmis ligomis, galinčiomis turėti įtakos limfocitų subpopuliacijų kiekiui.

3.1 .Tyrimo organizavimas

Klinikinį ištyrimą atliko gydantys gydytojai ir tyrėjai, laboratoriniai tyrimai buvo atliekami VUL SK Laboratorinės medicinos centre, periferinių limfocitų subpopuliacijų tyrimai – jo padalinyje Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje. Pacientams buvo atliekami įprastai klinikinėje praktikoje pasitelkiami tyrimai bendrai būklei ir vėžio išplitimui įvertinti.

3.2. Atitiktis bioetikos reikalavimams

Tyrimą patvirtino Vilniaus bioetikos komitetas 2017 07 04, leidimo numeris Nr. 158200-17-935-437, bei pakitimus patvirtino 2020 06 30. Tyrimo protokolas atitinka Helsinkio deklaracijos principus. Visi tiriamieji sutiko dalyvauti tyrime ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą.

3.3. Rinkti duomenys

Tyrimo metu buvo renkami toliau nurodyti duomenys, kurie buvo panaudoti disertacijos darbo analizei:

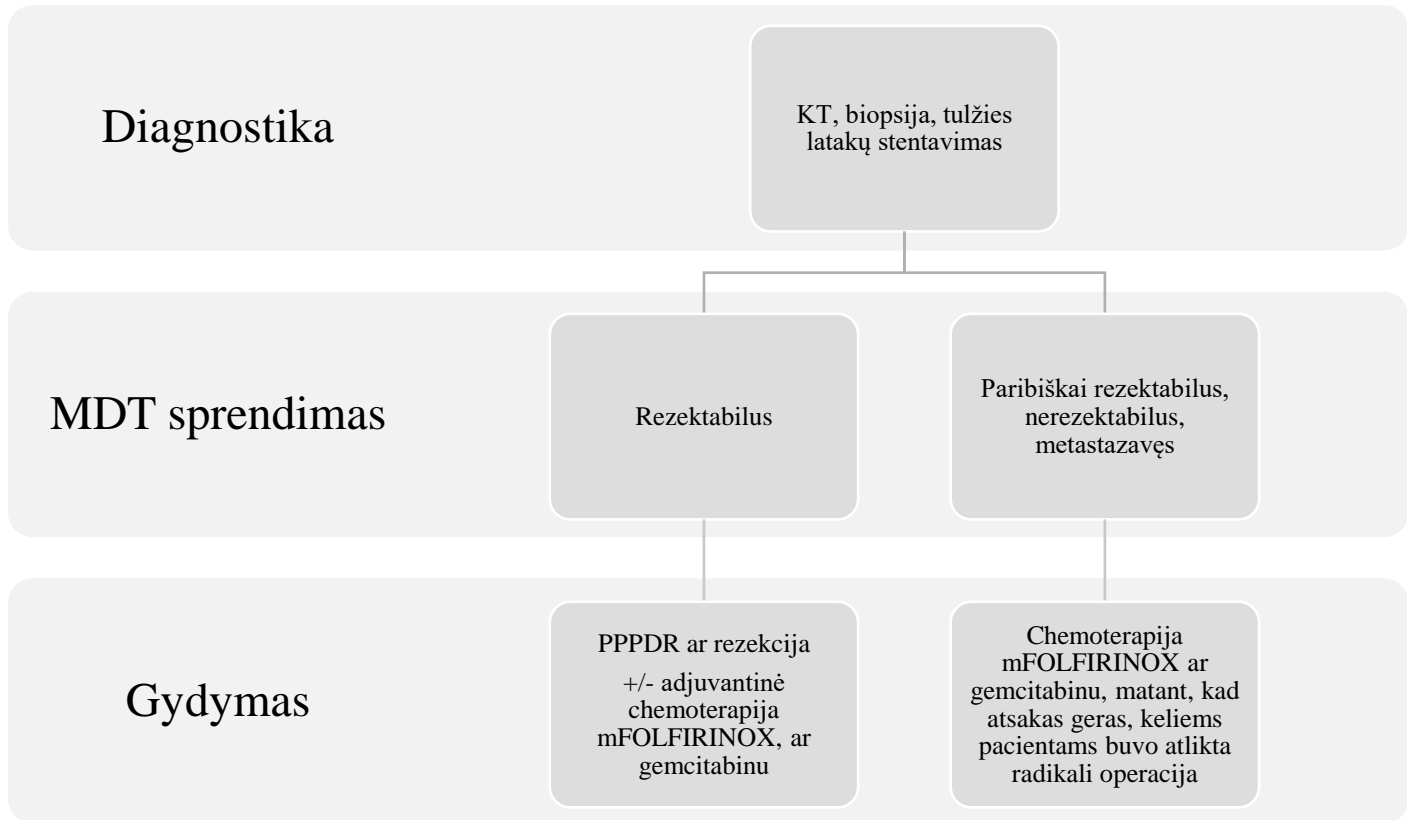
- Amžius.
- Lytis.
- Operacijos atlikimas.
- Chemoterapinio gydymo režimas.
- Naviko faktoriai: T, N, M kategorijos, stadija, histologinis potipis, limfovaskulinė, perineurinė invazija, rezekcijos radikalumas.
- Ūgis, svoris, KMI.
- Ascito buvimas.
- CA 19-9 reikšmės.
- Išgyvenamumo iki ligos progresavimo laikas.
- Bendro išgyvenamumo laikas.
- Taikytų sisteminio gydymo eilių skaičius.
- Mirties priežastis.
- Bendras leukocitų, limfocitų, subpopuliacijų, turinčių žymenų CD19+, CD3+, CD3+CD56+, CD8+CD57+, CD3+CD57+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD4-CD8-, CD3-CD56+CD16+, CD3-CD56+CD16-, CD3+CD4+CD25+CD127+/-, CD3+CD4+FoxP3+, CD3+CD8+CD25+CD127+/-, CD3+CD8+FoxP3+ absoliutus kiekis.
- Limfocitų, CD3+CD8+CD57+ bei CD3+CD8+CD57- procentinė raiška tarp CD3+CD8+ ląstelių.
- CD4+/CD8+ santykis.
- Naviko ir stromos santykis.

3.4. Tiriamųjų gydymas

Pacientai buvo gydyti pagal tuo metu įstaigoje patvirtintas gydymo rekomendacijas, diagnozavus kasos vėžį pagal biopsinės medžiagos histologinio tyrimo atsakymą, atlikus kompiuterinės tomografijos tyrimą ir aptarus daugiadalykiame konsiliume, dalyvaujant pilvo chirurgui, radiologui, onkologams radioterapeutui bei chemoterapeutui. Biopsinė medžiaga gauta atlikus perkutaninę stulpelinę biopsiją arba apeinamųjų jungčių formavimo operacijos metu atviru būdu. Į tyrimą įtraukti pacientai sąlyginai suskirstyti į dvi grupes. Vienai grupei priskiriami tiriamieji, kurių liga ankstyva ar nežymiai lokaliai pažengusi, jų navikas pirmiausia būdavo pašalinamas

(atliekama pankreatoduodeninė prievartį išsauganti rezekcija, pankreatikoduodenektomija (Whipple'io procedūra), pankreatektomija ar kasos rezekcija), paskui daliai pacientų skiriama chemoterapija 3–6 mėn. Kitai grupei priskiriami pacientai, kuriems buvo vietiškai pažengę, neoperabilūs navikai ir tolimosios metastazės. Keletas pacientų, kuriems navikai vertinti kaip neoperabilūs, paribiškai operabilūs, tačiau po gydymo chemoterapija gerokai sumažėjo ir buvo pašalinti, priskirti antrajai grupei. Navikas vertinamas kaip operabilus, kai neįtraukia jokių kraujagyslių struktūrų: pilvinio kamieno, viršutinės pasaito arterijos, bendrosios kepenų arterijos, nekontaktuoja su viršutine pasaito ar vartų venomis ar kontaktuoja su venomis mažiau nei 180°, nepažeisdamas jų kontūro. Kai kuriems pirmos grupės pacientams, jei liga manifestuodavo gelta, buvo atliekama endoskopinė retrogradinė cholangiopankreatografija ir tulžies lataukų stentavimas, palaukiama, kol gelta aprims ir tada atliekama operacija. Jei pacientams nustatyta pirma, antra ar operabili trečia ligos stadija, jie buvo operuojami ir po operacijos, atsižvelgiant į galutinę patologijos diagnozę, stebėti arba jiems taikyta adjuvantinė chemoterapija modifikuotu FOLFIRINOX režimu arba gemcitabino monoterapija. mFOLFIRINOX schema sudaryta iš oksaliplatinos (85 mg/m² KPP), irinotekano (150–180 mg mg/m² KPP), leukovorino (400 mg/m² KPP) ir fluorouracilo (2 400 mg/m² KPP), kartojant kas 2 sav. Buvo skiriami 6–12 ciklų (gydymo trukmė 3–6 mėn.). Gemcitabino monoterapija skiriama 1 000 mg mg/m² KPP 1, 8 ir 15 dieną, ciklas kartojamas kas 4 sav., skiriami 6 ciklai (gydymo trukmė 5,5 mėn.). Chemoterapijos režimas buvo parenkamas atsižvelgiant į paciento bendrą būklę, gretutinių ligų buvimą, vertinant subjektyviai, pagal gydančio gydytojo sprendimą. Kai kuriems antros grupės pacientams buvo atliekama paliatyvi apeinamųjų jungčių suformavimo operacija praeinamumui atkūrimui, geltos gydymui. Neoperuoti pacientai gydyti vienu iš režimų: mFOLFIRINOX (fluorouracilas, leukovorinas, irinotekanas, oksaliplatina) arba gemcitabino monoterapija, kaip rekomenduoja tarptautinės bei ligoninės gairės. Gydymo taktika pavaizduota 4 pav.

Režimas buvo parenkamas atsižvelgiant į paciento bendrą būklę, gretutines ligas. Režimą parenka ir dozę apskaičiuoja, modifikuoja gydantis onkologas chemoterapeutas. Chemoterapija pažengusios ligos atveju truko daugiausia 12 ciklų mFOLFIRINOX režimu ir šešis ciklus gemcitabino kassavaitiniu režimu. Dozės intensyvumas, cikliškumo išlaikymas šiame tyrime nevertinti.



4 pav. Į tyrimą įtrauktų pacientų standartinio gydymo taktika

Tiriamųjų duomenų rinkimo ir stebėjimo protokolas pateiktas 3 lentelėje.

3 lentelė. Tiriamųjų duomenų rinkimo ir stebėjimo protokolas

Tyrimo procedūros	Prieš operaciją, chemoterapinį gydymą	2 mėn.+/- (radikalios operacijos grupėje)	Radikalios operacijos grupėje: po 2 mėn., po to kas 3 mėn. Paliatyvus gydymo grupėje: kas 2 mėn.
Demografiniai duomenys	+		
Medicininė istorija	+		
Naviko histologinis ištyrimas	+		
Objektyvios paciento būklės įvertinimas (ECOG)	+	+	+
BKT (rutiniškai)	+	+	+
CA 19-9 tyrimas (rutiniškai)	+	+	+
Bilirubino, ALT, AST, ŠF (rutiniškai)	+	+	+
Radiologinis vertinimas (KT, VOE, MRT)	+		+
Kraujo paėmimas (imuninių žymenų tyrimui)	+	+	+

3.5. Pacientų tiriamosios medžiagos analizė

3.5.1. Demografinių duomenų, kraujo tyrimų rinkimas, ligos atsako vertinimas

Prieš bet kokį gydymą: operaciją ar pirmą chemoterapijos ciklą, buvo renkami duomenys apie demografinius ypatumus, gretutines ligas, būklę pagal ECOG, kūno masės indeksą (KMI), serumo hemoglobina, trombocitų skaičių, gliutamino oksaloacetinę transaminazę (GOT), gliutamino piruvatinę transaminazę (GPT), šarminę fosfatazę, CA 19-9.

Kraujo tyrimas limfocitų subpopuliacijų įvertinimui buvo atliekamas prieš bet kokį gydymą (pirmas vizitas), po 2 mėn. ir paskui kas 3 mėn. operuotųjų grupėje ir kas 2 mėn. pažengusios ligos grupėje.

Ligos eiga buvo vertinama radiologiniais metodais: trijų fazių, didelės rezoliucijos krūtinės, pilvo, dubens kompiuterinės tomografijos tyrimu. Ligos progresavimas apibrėžiamas kaip naujų metastatinių židinių atsiradimas, CA 19-9 serumo žymens didėjimas ar simptomų paryškėjimas, kaip vertinama kasdienėje klinikinėje praktikoje.

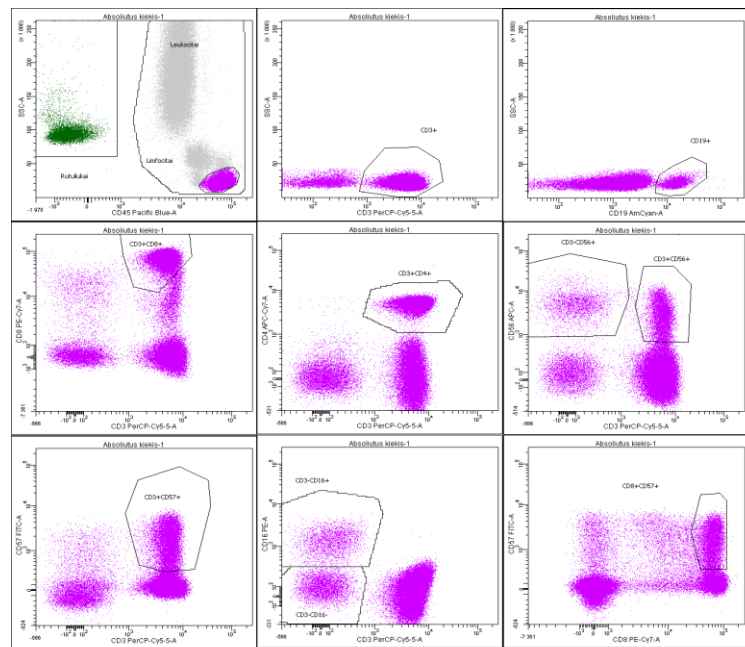
3.5.2. Tėkmės citometrijos tyrimas

Prieš tėkmės citometrijos analizę buvo atliekamas automatizuotas hematologinis tyrimas nustatyti bendram leukocitų kiekiui ir jų diferencijavimui. Leukocitų ir limfocitų kiekybinei analizei buvo naudojamas „Sysmex XN-1000“ (Japonija) hematologinis analizatorius. Vėliau pacientų mėginiai aštuonių spalvų citometrijos analizei paruošti dažant ląstelių paviršiaus ir vidinių struktūrų biožymenis monokloniniais antikūnais. Ląstelių intraceliulinių struktūrų dažymui buvo taikomas ląstelių membranos permeabilizavimo etapas. Siekiant nustatyti absoliutų ląstelių kiekį, mėginio dažymui ir inkubacijai naudota Lyse No Wash technika kai žinomas mikrosferų TruCount kiekis mėgintuvėliuose (Becton Dickinson, JAV). Antikūnai, kad būtų galima aptikti paviršinius ir intraląstelinis antigenus, buvo dedami į 100 µl periferinio etilendiamintetraacto rūgštimi antikoaguliuotą periferinį kraują: CD45-V450, CD19-V500, CD3-PerCP, CD4-APC-H7, CD8-PE-Cy7, CD25-FITC, CD127-PE, cFoxP3-APC, CD16-PE ir CD56-APC. Visą gamintojo metodo aprašymą galima rasti adresu <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>. Naudotų reagentų kokteiliai parodyti 4 lentelėje.

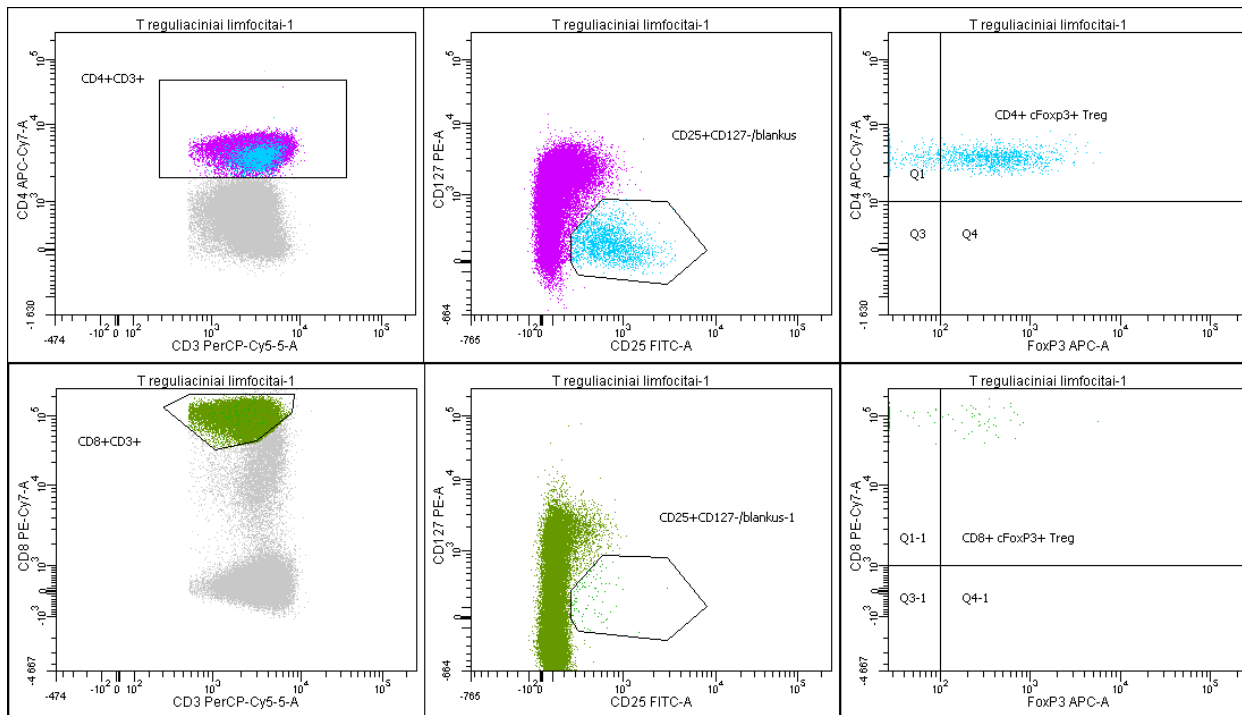
Dažyti mėginiai buvo vertinami „FACSCanto II“ tėkmės citometru („Becton Dickinson“, San Jose, CA, USA), duomenys analizuoti „FACS Diva version 8.0.2.“ programine įranga („Becton Dickinson“). Duomenų analizei naudota nuoseklaus pakopinio ląstelių populiacijų geitavimo technika, o rezultatai pavaizduoti biekspONENTINIuose taškiniuose grafikuose 5, 6 pav.

4 lentelė. Naudotų reagentų kokteiliai T limfocitų subpopuliacijų ir Treg ląstelių fenotipavimui

Mėgintuvėlio Nr.	FITC	PE	PerCP-Cy5,5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	AmCyan
1. Trucount	CD57	CD16	CD3	CD8	CD56	CD4	CD45	CD19
2. Citoplazminis	CD25	CD127	CD3	CD8	cFoxP3	CD4	–	–
3. Trucount	CD64	CD33	CD45	–	–	CD14	CD16	HLA-DR



5 pav. Pakopinio geitavimo būdu diferencijuotos įvairios T ir B limfocitų populiacijos



6 pav. Pakopinio geitavimo būdu diferencijuotos TregCD4 ir TregCD8 limfocitų populiacijos

CD4/CD8 ląstelių santykis, procentinės kai kurių populiacijų išraiškos buvo apskaičiuotos. Gauti duomenys suvesti į lenteles statistinei analizei.

3.5.3. Patologinės medžiagos analizė

TMA įvertinimui naudoti archyvuoti Valstybiniame patologijos centre mikroskopiniai preparatai, dažyti hematoksilinu ir eozinu, atrinkti reprezentatyviausi formaline fiksuoti parafine saugoti blokai, atspindintys tumoro ir šalia esančio kasos audinio struktūras. Iš atrinktų blokų pagaminti 3 µm storio mikrotominiai pjūviai, padėti ant objektyvių stiklelių, nudažyti CD3 antikūnais (Dako, clone C8/144B, dilution 1:100, Denmark). IHC reakcijos atliktos „Roche Ventana BenchMark ULTRA“ automatais („Ventana Medical Systems“, Tucson, JAV). Vizualizacijai naudotas ultraView Universal DAB Detection rinkinys („Ventana Medical Systems“). IHC preparatai skaitmeninti „ScanScope XT skaneriu“ („Leica Aperio Technologies“, Vista, CA, JAV), naudojant 20× objektyvą. Vaizdo analizės atliktos naudojant programinę įrangą HALO (version 3.0311.174; Indica Labs, Corrales, JAV). HALO AI gilaus mokymo tinklų pagrindu sukurtas audinių klasifikatorius, segmentuojantis naviko epitelį, strumą bei foną ir artefaktus, *and glass*). Iš gautų duomenų apskaičiuotas naviko epitelio ir stromos santykis.

3.6. Statistinė analizė

Demografinių, klinikinių, laboratorinių požymių įvertinimui naudota aprašomoji statistika (pasiskirstymas (%), mediana (interkvartilinis intervalas, Q1–Q3). Tolydžiųjų kintamųjų atitiktis normaliajam skirstiniui buvo patikrinta naudojant Shapiro–Wilko testą. Dauguma tirtų kintamųjų buvo nenormaliai pasiskirstę. Turint tai omenyje hipotezių tikrinimui taikyti neparametriniai statistiniai metodai.

Tikslusis Fišerio testas naudotas nustatyti demografinių ir klinikinių duomenų skirtumus tarp tiriamųjų grupių. Dviejų nepriklausomų grupių nenormaliai pasiskirstę tolydieji kintamieji buvo lyginami taikant Manno–Whitney–Wilcoxon rangų sumų kriterijų (taip įvertinta lyties, metastazių, limfovaskulinės, perineurinės invazijos buvimo įtaka, skirtumai tarp dviejų vizitų). Daugiau nei dviejų nepriklausomų grupių nenormaliai pasiskirstę tolydieji kintamieji buvo lyginami tarpusavyje taikant Kruskalo–Walliso ranginį kriterijų (taip vertintas ryšys tarp diferenciacijos laipsnių, stadijų ir subpopuliacijų). Koreliacija tarp dviejų tolydžiųjų kintamųjų buvo vertinta, apskaičiuojant Spearmano koeficientą. Taip įvertintas ryšys tarp amžiaus, CA 19-9, KMI ir įvairių limfocitų subpopuliacijų.

Siekiant nustatyti įvairių kintamųjų ryšį su tolydžiosiomis ir kategorinėmis vertinamosiomis baigtimis (išgyvenamumas neprogresuojant ligai, bendras išgyvenamumas), buvo atitinkamai sudaryti vieno kintamojo logistinės regresijos modeliai. Siekiant nustatyti kintamuosius, kurie yra nepriklausomai susiję su kategorinėmis vertinamosiomis baigtimis, buvo atitinkamai sudaryti daugybinių kintamųjų logistinės regresijos modeliai su žingsnine kintamųjų atranka.

Išgyvenamumas neprogresuojant ligai (IBLP) apibrėžiamas kaip laikotarpis nuo operacijos (operuotųjų grupėje) ar pirmo chemoterapijos leidimo (neoperuotųjų) iki ligos progresavimo ar mirties, jei jos priežastis buvo PDAK.

Bendras išgyvenamumas (BI) – kaip laikotarpis nuo operacijos (operuotųjų grupėje) ar pirmo chemoterapijos leidimo (neoperuotųjų) iki mirties. Pacientai laikyti cenzūruotais paskutinę stebėjimo dieną, jei liga neprogresavo (IBPL) ar jie liko gyvi (BI).

Išgyvenamumo tendencijos ir vidutinis (95 % pasikliautinumo intervalas, angl. *confidence interval* (CI)) išgyvenamumas analizuotas Kaplano–Meierio metodu, skirtumus vertinant *log-rank* ir Breslow testais. Kadangi galutinės ribos visiems analizuotiems žymenims nėra žinomos, tai išgyvenamumo analizėje limfocitų subpopuliacijos buvo suskirstytos į dvi ar keturias grupes (mažiau ir daugiau nei mediana arba pagal kvartiles) ir taip analizuoti išgyvenamumo skirtumai. p reikšmė $< 0,05$ buvo naudojama statistiškai reikšmingiems rezultatams apibrėžti. Statistinė analizė atlikta naudojant „IBM SPSS Statistics“ (versija 23.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

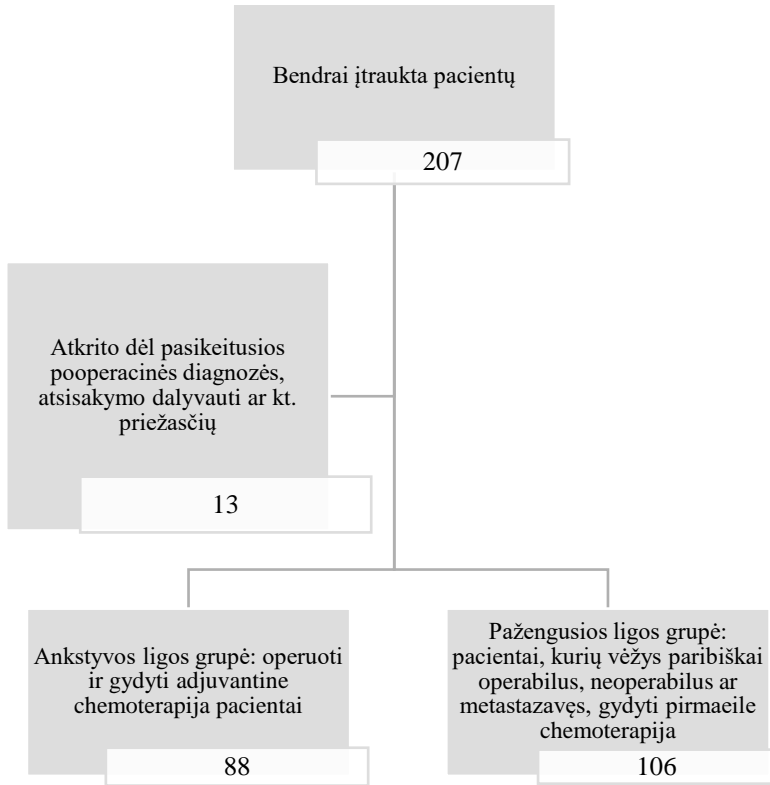
4. REZULTATAI

4.1. Tiriamųjų atranka disertacijos darbui

Į tyrimą įtraukti 209 tiriamieji, gydyti VUL SK Pilvo chirurgijos ir Hematologijos, onkologijos, transfuziologijos centruose nuo 2018 02 08 iki 2022 03 22.

Disertacijos darbe analizuoti 196 pacientų duomenys iš 207 įtrauktų į minėtą klinikinį tyrimą (7 pav.). Kiti pacientai neanalizuoti dėl įvairių priežasčių, kurios lėmė neatitiktį įtraukimo kriterijams: po operacijos pasikeitė histologinio tyrimo (keturi pacientai), pirminio naviko lokalizacijos vertinimas (du), atsisakė toliau dalyvauti tyrime (vienas), išaiškėjo lėtinės ligos, kurios gali keisti limfocitų skaitines vertes (du), sutrikusi laboratorijos veikla, neatliktas pirmo vizito kraujo ištyrimas (du), iš pradžių vertinta kaip operabili liga, tačiau atlikta tik apeinamųjų jungčių operacija, tad į analizę nebeįtraukti (du).

Analizuodami rezultatus visą studijos imtį padalijome į dvi grupes pagal ligos stadiją ir operabilumo galimybę bei gydymo tikslą (išgydymas ar tik ligos kontrolė). Tad visoje studijos imtyje vertinamos limfocitų subpopuliacijų pradinės vertės bei pokyčiai gydymo metu (po 2 mėn. nuo gydymo pradžios), o minėtose grupėse be to dar ir išgyvenimo rezultatai. 41 paciento buvo surinkti ir įvertinti trijų vizitų (po 2 mėn. bei po 4 ar 5 mėn.) duomenys.

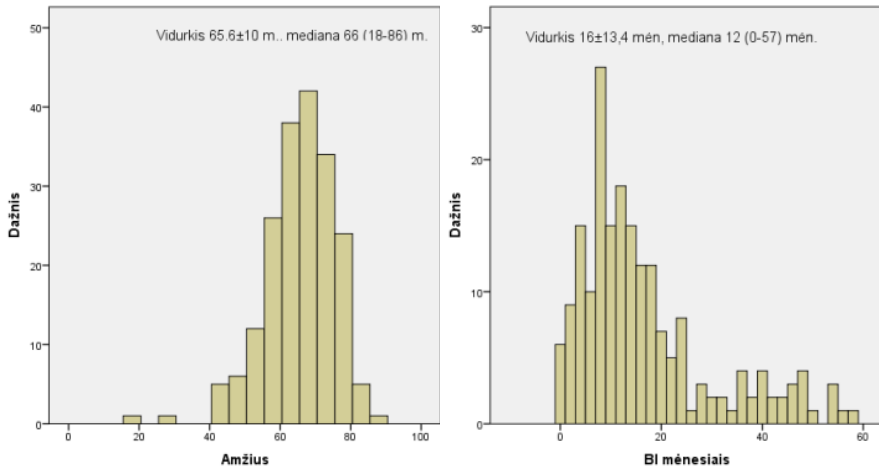


7 pav. Bendra tyrimo schema

4.2. Ryšys tarp cirkuliuojančių limfocitų subpopuliacijų ir kasos vėžio vystymosi

Įvertintas ryšys tarp lyties, amžiaus, ligos stadijos ir pirmo vizito (pirmą chemoterapijos skyrimo ar operacijos dieną) bendro limfocitų skaičiaus duomenų 196 pacientams.

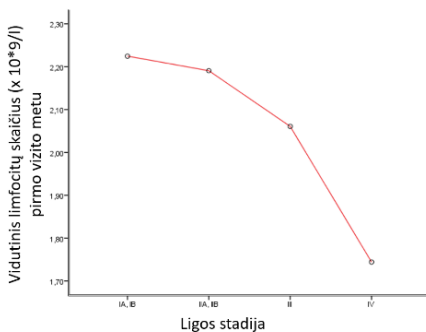
Amžiaus mediana visoje studijos populiacijoje buvo 66 (18–86) m., pasiskirstymas pagal amžių pavaizduotas historigrame (4a pav.). Įtraukta 110 (56,4 %) moterų ir 85 (43,6 %) vyrai. Visos tyrimo populiacijos BI mediana 12 (0–57) mėn. duomenys pavaizduoti historigrame (4b pav.), 9 pacientai mirė per pirmus du mėnesius nuo įtraukimo į tyrimą.



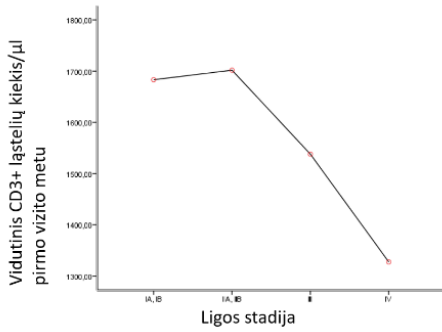
8 pav. Visos studijos pacientų pasiskirstymas pagal amžių (a) ir bendrą išgyvenamumą (b)

Tarp lyčių patikimai skyrėsi bendro leukocitų ($Z = -4,093$, $p < 0,0001$), B limfocitų CD19+ ($Z = -2,088$, $p = 0,037$), CD8+CD57+ ($Z = -2,17$, $p = 0,03$) kiekiai.

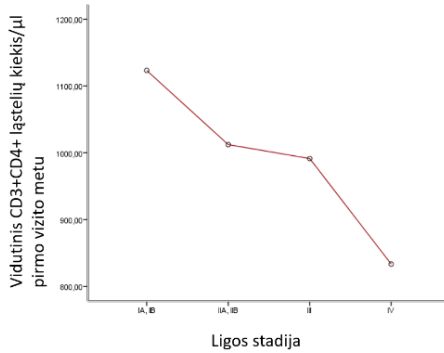
Gauta, kad mūsų kohortoje absoliutus limfocitų skaičius ($\chi^2 = 12,7$, $p = 0,013$, $df = 4$), CD19+ ($\chi^2 = 11,3$, $p = 0,023$, $df = 4$), visų CD3+ limfocitų ($\chi^2 = 10,6$, $p = 0,031$, $df = 4$) ir CD3+CD4+ ($\chi^2 = 9,4$, $p = 0,051$, $df = 4$) bei CD3+CD4-CD8- ($\chi^2 = 14,1$, $p = 0,007$, $df = 4$) subpopuliacijų kiekiai priklausė nuo ligos stadijos (diagnozės nustatymo metu), t. y. visų minėtų ląstelių IV stadijos pacientams aptinkama mažiausiai, o CD4+CD25+CD127+/- reikšmingai mažėjo su amžiumi ($r(193) = -0,195$, $p = 0,006$). Rezultatai pavaizduoti 9 pav.



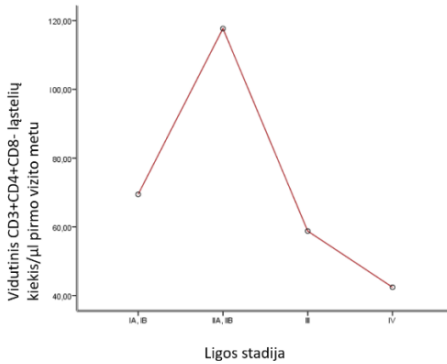
9a pav. Limfocitų kiekis pirmo vizito metu (prieš gydymą) priklauso nuo ligos stadijos



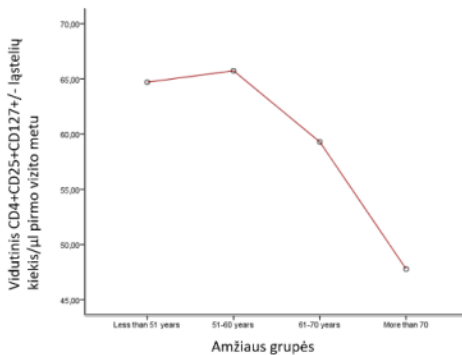
9b pav. CD3+ limfocitų subpopuliacijos kiekis pirmo vizito metu priklauso nuo ligos stadijos



9c pav. CD3+CD4+ limfocitų subpopuliacijos kiekis pirmo vizito metu priklauso nuo ligos stadijos



9d pav. CD3+CD4+CD8- limfocitų subpopuliacijos kiekis pirmo vizito metu priklauso nuo ligos stadijos



9e pav. CD4+CD25+CD127+/- limfocitų subpopuliacijos kiekis pirmo vizito metu priklauso nuo amžiaus

4.3. Pacientų charakteristikos

4.3.1. Ankstyvos ligos grupės pacientai

Į operacinio gydymo grupę buvo įtraukti 88 pacientai, jų amžiaus mediana 67 metai, jie nuo 18 iki 86 metų. Dauguma buvo moterys – jų 50 (56,8 %), geros funkcinės būklės pagal ECOG 0 ir 1 buvo visi pacientai, daugumos KMI buvo tarp 18,5 ir 30 kg/m², 64 (72,7 %). Vertinant ligos atžvilgiu: didžioji dauguma buvo G2 ir G3 diferenciacijos navikai – 84 (95,5 %), IIB ir III stadijų – 65 (73,9 %), 66 (75 %) stebėta limfovaskulinė invazija, 38 (43,2 %) perineurinė invazija, rezekcijos kraštas dažniau buvo švarus, R0 rezekcija pasiekta 53 (60,2 %), vėžys aptiktas kasos galvutėje 63 (71,6 %), kraujagyslių rezekcija neatlikta 74 (84,1 %). Iš histologinių variantų vyravo pankreatinės duktalinės karcinomos diagnozė, bet įtraukti keturi adenoplokščialastelinės, 3 mucininės cistadenokarcinomos, po vieną anaplastinės, „putotų“ ląstelių, dediferencijuotos bei acininių ląstelių karcinomos, CA 19-9 žymuo, vertinant prieš gydymą, buvo mažesni nei 1 000kU/l 68 (73,2 %).

Detalesnė apžvalga, kaip šios tiriamųjų grupės (pacientų, kuriems nebuvo skirta pooperacinė chemoterapija ir gydytų vienu iš chemoterapijos režimų) charakteristikos pasiskirstė, pateikta 5 lentelėje.

5 lentelė. Operuotų pacientų grupės (88 pacientai) klinikinių charakteristikų apžvalga, suskirsčius juos į tris grupes pagal skirtą pooperacinį gydymą

Požymis	Neskirta adjuvantinis Režimas (N = 25)	FOLFIRINOX (N = 30)	Gemcitabinas (N = 33)	P reikšmė
Amžius, metais				
Vidutinis	73	62,3	65,0	<0,001
Ribos	42–86	30–79	18–80	
Lytis, n (%)				
Moterys	17 (68)	13 (43,3)	20 (60,6)	0,391
Vyrai	8 (32)	17 (56,7)	13 (39,4)	
Pirminio naviko dydis (%)				
T1	4 (16)	–	1 (3)	0,137
T2	13 (52)	20 (66,7)	15 (45,5)	
T3	6 (24)	9 (30)	13 (39,4)	
T4	2 (8)	1 (3,3)	4 (12)	
Sritinių limfmazgių būklė, n (%)				
N0	17 (68)	5 (16,7)	3 (9,1)	< 0,001
N1	6 (24)	11 (36,7)	17 (51,5)	
N2	2 (8)	14 (46,7)	13 (39,4)	
Stadija — n (%)				
IA	4 (16)	–	–	< 0,001
IB	7 (28)	2 (6,7)	–	
IIA	5 (20)	2 (6,7)	2 (6,1)	
IIB	6 (24)	11 (36,7)	13 (39,4)	
III	3 (12)	15 (50)	17 (51,5)	
IV	–		1 (3)	

Požymis	Neskirta adjuvantinis Režimas (N = 25)	FOLFIRINOX (N = 30)	Gemcitabinas (N = 33)	P reikšmė
Rezekcijos radikalumas – n (%)				
R0	17 (68)	18 (60)	18 (54,5)	0,583
R1	8 (32)	12 (40)	15 (45,5)	
Histologinis potipis –n (%)				
Gryna adenokarcinoma	24 (96)	28 (93,3)	25 (75,8)	0,724
Kiti histologiniai tipai	1 (4)	2 (6,6)	8 (24,2)	
Limfovaskulinė invazija – n (%)	14 (56)	27 (90)	25 (75,8)	0,018
Perineurinė invazija – n (%)	11 (44)	15 (50)	12 (36,4)	0,545
Diferenciacijos laipsnis, n (%)				
G1	2 (8)	–	2 (6,1)	0,386
G2	15 (60)	15 (50)	15 (45,5)	
G3	8 (32)	15 (50)	16 (48,5)	
Naviko vieta kasoje				
Galvutė	15 (60)	24 (80)	24 (72,7)	0,544
Kūnas	3 (28)	4 (13,3)	5 (15,2)	
Uodega	7 (3)	2 (6,7)	4 (12,1)	
Operacija				
V. portae rezekcija – n (%)	5 (20)	0	6 (18,2)	0,016
Viršutinės pasaito venos rezekcija – n (%)	–	2 (6,7)		
Arterijų rezekcija – n (%)	–	0	1 (3)	
Būklė pagal ECOG n (%)				
0	23 (92)	26 (86,7)	28 (84,8)	0,785
1	2 (8)	4 (13,3)	5 (15,2)	
CA 19-9 (kU/L), n (%)				
< 37	12 (48)	9 (30)	13 (39,4)	0,308

Požymis	Neskirta adjuvantinis Režimas (N = 25)	FOLFIRINOX (N = 30)	Gemcitabinas (N = 33)	P reikšmė
37–1 000	9 (36)	13 (43,3)	15 (45,5)	
1 001–12 000	4 (16)	5 (16,7)	5 (15,1)	
> 12 000	–	3 (10)	–	
KMI (kg/m ²) kategorija, n (%)				
KMI < 18,5	1 (4)	–	2 (6,1)	0,471
18,5 ≤ KMI < 25,0	8 (32)	15 (50)	13 (39,4)	
25,0 ≤ KMI < 30,0	9 (36)	8 (26,7)	11 (33,3)	
30,0 ≤ KMI < 35,0	7 (28)	4 (13,3)	6 (18,2)	
35,0 ≤ KMI	–	3 (10)	1 (3)	

4.3.2. Pažengusios ir metastazavusios ligos grupės pacientai

Į šią analizę įtraukti 106 pacientai, penkiasdešimt šeši buvo gydyti mFOLFIRINOX ir 46 gemcitabino monoterapija. Keturi pacientai nebuvo gydyti dėl greito būklės blogėjimo. Pirmo vizito metu kraujo tyrimai atlikti 106 pacientams, o dviejų vizitų duomenys surinkti 46 pacientams: 25-iems FOLFIRINOX ir 21-am gemcitabino šakoje. Aštuoni pacientai po šios pirmosios chemoterapijos dar buvo gydyti operaciniu būdu. Pacientų charakteristikos abiejų chemoterapijos režimų šakose išdėstytos 6 lentelėje. Reikšmingai abi grupės skyrėsi tik būklės pagal ECOG įvertinimu.

6 lentelė. 102 lokaliai pažengusios ir metastazavusios ligos grupės pacientų, gydytų chemoterapija, klinikinės charakteristikos

Požymiai	FOLFIRINOX (N = 56)	Gemcitabinas (N = 46)	P reikšmė
Amžius, metais			
Vidutinis	61,5	70,0	0,086
Ribos	43–78	55–84	
Lytis, n (%)			
Moterų	37 (66,1)	22 (47,8)	0,104
Vyrų	19 (33,9)	24 (52,2)	
Tolimųjų metastazių buvimas, n (%)			
M0	22 (39,3)	17 (37,0)	0,929
M1	34 (60,7)	29 (63,0)	
Acitas, n (%)			
Buvo	52 (92,9)	6 (13,0)	0,191
Neuvo	4 (7,1)	40 (87,0)	
Diferenciacijos laipsnis, n (%)			
G1	1 (1,8)	1 (2,2)	0,178
G2	33 (58,9)	21 (45,7)	
G3	22 (39,3)	24 (52,2)	
Būklė pagal ECOG, n (%)			
0	37 (66,1)	18 (39,1)	0,004
1	17 (30,4)	20 (43,5)	
2	2 (3,6)	8 (17,4)	
CA 19-9 lygmuo (kU/l), n (%)			
$37 \leq \text{CA } 19-9 < 100$	9 (16,1)	7 (15,2)	0,833
$100 \leq \text{CA } 19-9 < 1\ 000$	16 (28,6)	17 (37,0)	

Požymiai	FOLFIRINOX (N = 56)	Gemcitabinas (N = 46)	P reikšmė
1 000 ≤ CA 19-9 < 12 000	19 (33,9)	11 (23,9)	
12 000 ≤ CA 19-9	12 (21,4)	11 (23,9)	
KMI (kg/m ²) grupės, n (%)			
BMI < 18,5	1 (1,8)	1 (2,2)	0,345
18,5 ≤ BMI < 25,0	27 (48,2)	23 (50,0)	
25,0 ≤ BMI < 30,0	13 (23,2)	17 (37,0)	
30,0 ≤ BMI < 35,0	12 (21,4)	4 (8,7)	
35,0 ≤ BMI	1 (1,8)	1 (2,2)	

4.3.3. Visų stadijų pacientų, kurių surinkti trijų vizitų duomenys, analizė

Vidutinis amžius tirtoje pacientų kohortoje buvo 63,0 ± 11,84 metų; 15 (36,6 %) pacientų dėl ankstyvos PDAK buvo gydyti operacija ir adjuvantine chemoterapija ir trys (7,5 %) tik operacija. 23 (56,1 %) pacientai gydyti vien chemoterapija dėl pažengusios ir / ar metastazavusios ligos. Trylika pacientų (34,2 %) gydyti FOLFIRINOX režimu ir 25 (65,8 %) vien gemcitabinu adjuvantiniu ar gydomuoju tikslu. Daugumos pacientų liga buvo agresyvi (G2, G3 diferenciacijos laipsnio). Pacientų charakteristikos išdėstytos 7 lentelėje.

7 lentelė. 41 paciento, įtraukto į trijų vizitų (kitimo gydymo metu) klinikinės charakteristikos

Požymis	Vertė
Kohortos dydis	41
Demografiniai duomenys	
Moterys (absoliutus kiekis, %)	25 (61 %)
Vyrai (absoliutus kiekis, %)	16 (39 %)
Vidutinis amžius diagnozuojant (metai)	63,0 (SN 11,84)
Tumoro vieta kasoje	
Galvutė	30 (73 %)
Kūnas	2 (5 %)
Uodega	9 (22 %)
Naviko stadija	
I	1 (2,4 %)
II	5 (12,2 %)
III	17 (41,5 %)
IV	18 (43,9 %)
Sritinių limfmazgių metastazės	
N0	11 (26,8 %)

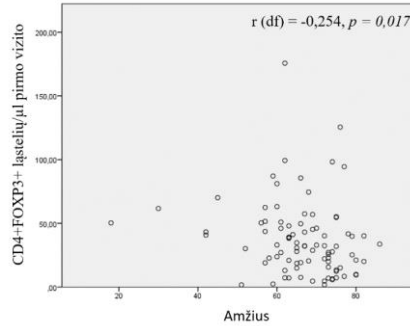
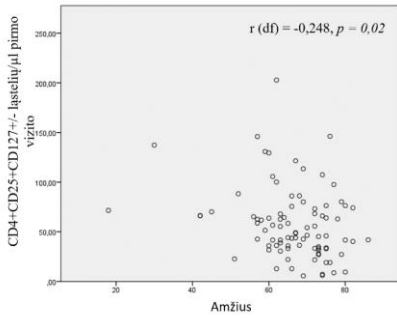
Požymis	Vertė
N+	30 (73,2 %)
Tolimosios metastazės	
M0	32 (78 %)
M1	9 (22 %)
Diferencijacijos laipsnis	
1	2 (4,9 %)
2	20 (48,8 %)
3	16 (39 %)
Neapibrėžtas laipsnis	1 (2,4 %)
Ne paprasta adenokarcinoma	1 anaplastinė, 2 neapibrėžtos, 1 acininė, 1 adenosplokščialąstelinė
Gydymo būdas	
Chirurgija	18 (43,9 %)
Adjuvantinė chemoterapija	15 (36,6 %)
Pirmos eilės chemoterapija	23 (56,1 %)
Chemoterapijos režimas	
mFOLFIRINOX	13 (34,2 %)
Gemcitabinas	25 (65,8 %)

4.4. Periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijų sąsaja su klinikiniais ir naviko požymiais

4.4.1. Ankstyvos ligos pacientų grupė

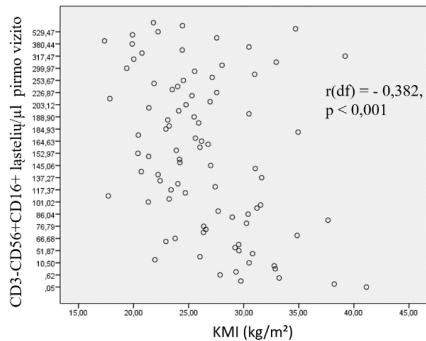
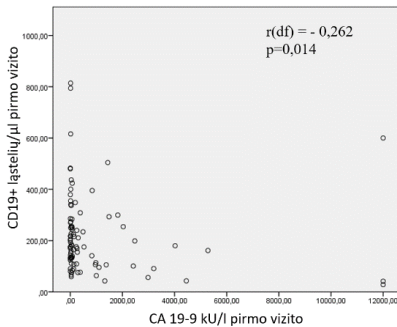
Toliau tirta, koks buvo ryšys tarp klinikinių charakteristikų ir atskirų limfocitų subpopuliacijų, gauti duomenys pavaizduoti 9 pav. Tarp amžiaus ir bendro leukocitų skaičiaus nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,233$, $p = 0,029$. Tarp amžiaus ir bendro limfocitų skaičiaus nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,219$, $p = 0,04$. Tarp amžiaus ir CD19 ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,232$, $p = 0,03$. Tarp amžiaus ir CD4+CD25+CD127+/- T reguliacinių ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,248$, $p = 0,02$ (9a pav.). Tarp amžiaus ir CD4+FOXP3+ T reguliacinių ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,254$, $p = 0,017$ (9b pav.). Tarp lyčių reikšmingai skyrėsi bendras leukocitų kiekis ($U = 688,00$, $p = 0,027$). Tarp CA 19-9 ir bendro limfocitų skaičiaus nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,215$, $p = 0,044$. Tarp CA 19-9 ir CD19+ ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,262$, $p = 0,014$ (9c pav.). Tarp CA 19-9 ir CD3+CD4+ ląstelių nustatyta neigiama

koreliacija, $r(df) = -0,223$, $p = 0,037$. Tarp CA 19-9 ir CD3-CD56+CD16- ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,227$, $p = 0,033$. Tarp KMI ir CD3-CD56+CD16+ NK ląstelių nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,382$, $p < 0,001$ (9d pav.). Tarp KMI ir CD3-CD56+CD16- ląstelių nustatyta teigiama koreliacija, $r(df) = -0,344$, $p = 0,001$.



9a pav. Neigiama koreliacija tarp amžiaus ir CD4+CD25+CD127+/- T reguliacinių ląstelių ankstyvos ligos grupėje

9b pav. Neigiama koreliacija tarp amžiaus ir CD4+FOXP3+ T reguliacinių ląstelių ankstyvos ligos grupėje



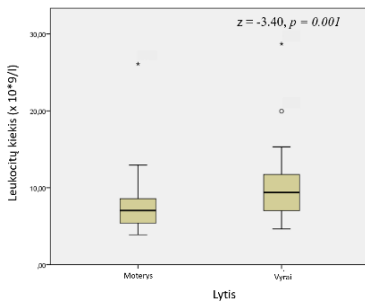
9c pav. Neigiama koreliacija tarp CA 19-9 ir CD19+ B ląstelių ankstyvos ligos grupėje

9d pav. Neigiama koreliacija tarp KMI ir CD3-CD56+CD16+ NK ląstelių ankstyvos ligos grupėje

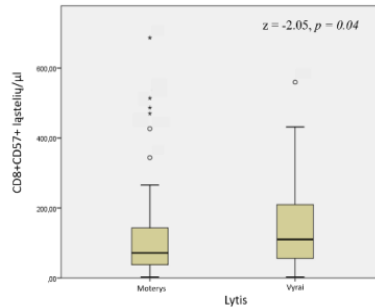
4.4.2. Pažengusios ir metastazavusios ligos pacientų grupė

Pirmiausia įvertintas ryšys tarp atskirų demografinių rodiklių ir limfocitų subpopuliacijų verčių pirmo vizito metu. Koreliacinė analizė neparodė sąsajos tarp kurios nors iš limfocitų subpopuliacijos kiekio ir paciento amžiaus. Tarp lyčių skyrėsi bendras leukocitų (U (moterys, N = 60; vyrai, N = 45) = 825,50,

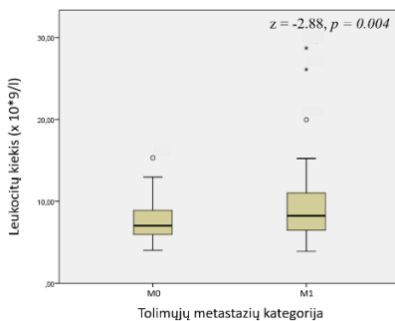
$z = -3,40$, $p = 0,001$), 10a pav., ir citotoksinių CD8+CD57+ limfocitų (U (moterys, N = 60; vyrai, N = 45) = 1,03300, $z = -2,05$, $p = 0,04$) skaičius, 10b pav. Pacientų, kuriems jau nustatytos tolimosios metastazės, ir tų, kuriems liga pažengusi tik vietškai, skyrėsi bendras limfocitų (U (M0, N = 40; M1, N = 65) = 863,50, $z = -2,88$, $p = 0,004$), 11a pav., B ląstelių CD19+ (U (M0, N = 40; M1, N = 65) = 902,00, $z = -2,63$, $p = 0,009$), 11b pav., T helperių CD3+CD4+ (U (M0, N = 40; M1, N = 65) = 946,00, $z = -2,34$, $p = 0,019$), 11c pav. ir CD3-CD56+CD16- (U (M0, N = 40, M1, N = 65) = 981,00, $z = -2,105$, $p = 0,035$) ląstelių skaičius, 11d pav. Bendras leukocitų skaičius (H [2] = 6,540, $p = 0,038$), 12a pav., T helperių CD3+CD4+ (H [2] = 6,277, $p = 0,043$), 12b pav., ir CD4+CD25+CD127+/- ląstelių (H [2] = 8,209, $p = 0,017$), 12c pav. kiekis buvo susijęs su naviko diferenciacijos laipsniu. Statistiškai reikšminga teigiama koreliacija aptikta tarp CA 19-9 lygio ir CD8+FOXP3+ kiekio ($r [100] = 0,239$, $p = 0,015$). Kūno masės indeksas taip pat teigiamai koreliuoja su į NKT panašiomis CD3+CD56+ ląstelėmis ($r [100] = 0,21$, $p = 0,032$), 13a pav., ir citotoksinais CD8+CD57+ T limfocitais ($r [100] = 0,23$, $p = 0,018$), 13b pav.



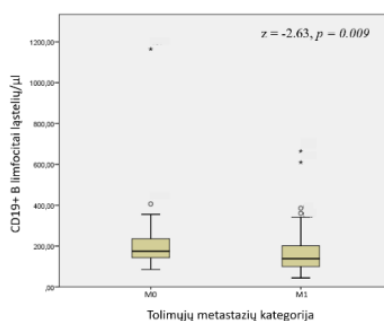
10a pav. Leukocitų kiekio skirtumai tarp lyčių neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu



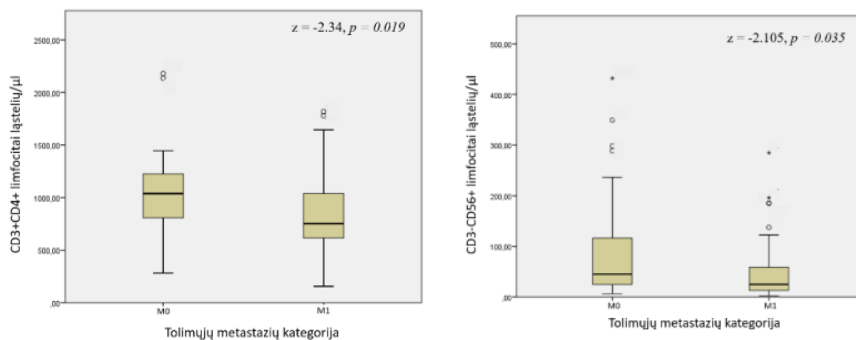
10b pav. CD8+CD57+ ląstelių/μl kiekio skirtumai tarp lyčių neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu



11a pav. Leukocitų kiekio skirtumai tarp vietškai pažengusia ir metastazavusia liga sergančiųjų pirmo vizito metu

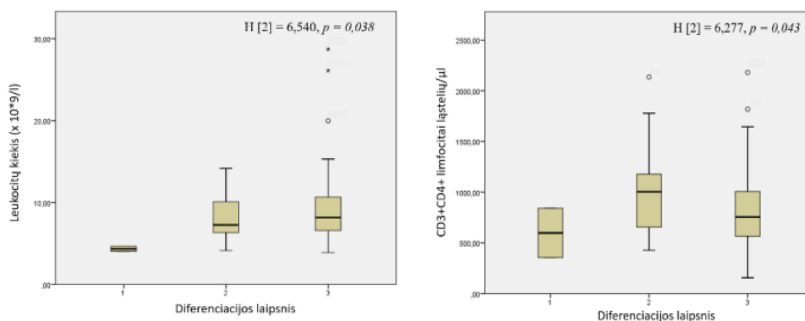


11b pav. CD19+ B limfocitų skirtumai tarp vietiskai pažengusia ir metastazavusia liga sergančiųjų pirmo vizito metu



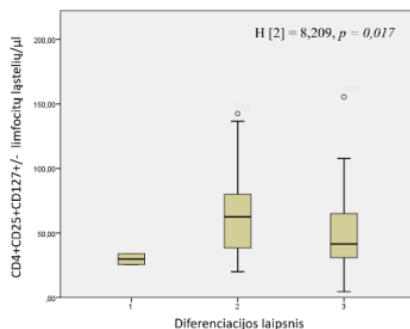
11c pav. CD3+CD4+ T helperių skirtumai tarp vietiskai pažengusia ir metastazavusia liga sergančiųjų pirmo vizito metu

11d pav. CD3-CD56+CD16- limfocitų skirtumai tarp vietiskai pažengusia ir metastazavusia liga sergančiųjų pirmo vizito metu

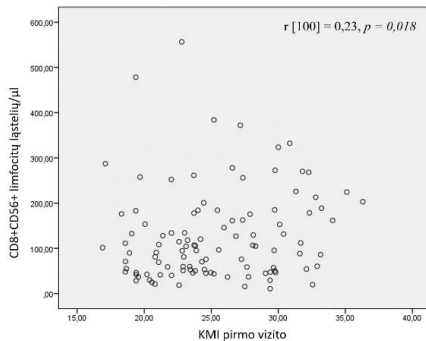
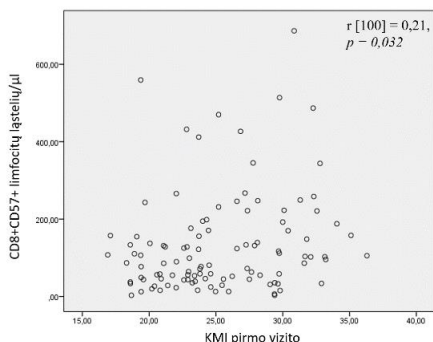


12a pav. Leukocitų kiekio skirtumai tarp skirtingų diferenciacijos laipsnių pirmo vizito metu neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu

12b pav. CD3+CD4+ helperių kiekio skirtumai tarp skirtingų diferenciacijos laipsnių pirmo vizito metu neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu



12c pav. CD4+CD25+CD127+/- T reguliacinių limfocitų kiekio skirtumai tarp skirtingų diferenciacijos laipsnių neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu



13a pav. CD8+CD57+ limfocitų kiekio koreliacija su KMI neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu

13b pav. CD8+CD56+ limfocitų kiekio koreliacija su KMI neoperuotųjų grupėje pirmo vizito metu

4.5. Taikyto gydymo įtaka periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijoms

4.5.1. Ankstyvos stadijos operuotųjų grupė (du vizitai)

Ištyrus pacientų kraują po 2 mėn. nuo gydymo pradžios, reikšmingai sumažėjo CA 19-9 žymens vertė, taip pat CD4+FOXP3+ T reguliacinių, CD8+CD25+CD127+/- ląstelių kiekis ir CD4/CD8 santykis, o padidėjo CD3+CD8+ T ląstelių (8 lentelė).

Šie pokyčiai buvo reikšmingi ne visose grupėse. CA 19-9, CD4+FOXP3+ T reguliacinių, CD8+CD25+CD127+/- ląstelių kiekis ir CD4/CD8 santykis labiausiai sumažėjo gydytiems chemoterapija. O CD3+CD8+ T ląstelių reikšmingai padaugėjo negydytų chemoterapija grupėje (9 lentelė).

8 lentelė Laboratoriniai rodikliai (CA 19-9, limfocitų subpopuliacijų) pokyčiai po dviejų mėnesių nuo gydymo pradžios. Pateikiami tik patikimi duomenys

Rodiklis	Pirmas vizitas Vidurkis (SN)	Antras vizitas Vidurkis (SN)	P reikšmė*
CA19-9 (kU/l)	805 (2179,37)	152,7 (422,92)	< 0,001
CD3+CD8+ (ląstelių/ μ l)	450,5 (212,83)	573,8 (449,94)	0,032
CD4+FOXP3+ (ląstelių/ μ l)	47,65 (29,55)	33,9 (19,31)	0,031
CD8+CD25+CD127+/- (ląstelių/ μ l)	0,50 (0,57)	0,37 (0,34)	< 0,001
CD4/CD8	2,5 (1,11)	2,2 (1,01)	0,004

*Įtraukti tik pacientai, kurių mėginiai paimti abiejų vizitų metu (N = 34).

9 lentelė. Reikšmingai po dviejų mėnesių nuo gydymo pradžios pakitusių visoje imtyje laboratorinių rodiklių (CA 19-9, limfocitų subpopuliacijų kiekiai) vertinimas skirtingą gydymą gavusių pacientų grupėse

Rodiklis / pirmo, antro vizito, P reikšmė / adjuvantinis gydymas	Be chemoterapijos N = 6 (17,6 %)	mFOLFIRINOX N = 8 (23,5 %)	Gemcitabinas N = 20 (58,8 %)
CA 19-9 (kU/l)	192,8 (378,76) 329,42 (779,02) P = 0,5	2038,4 (4258,6) 16,5 (15,48) P = 0,017	495,3 (818,63) 154,1 (364,97) P = 0,007
CD3+CD8+ (ląstelių/ μ l)	298,1 (121,74) 379,34 (126,92) P = 0,028	500,6 (201,6) 822,1 (842,05) P = 0,208	476,2 (225,18) 532,8 (215,6) P = 0,296
CD4+FOXP3+ (ląstelių/ μ l)	39,7 (32,73) 35,1 (21,51) P = 0,753	54 (25,4) 36,72 (19,1) P = 0,123	47,5 (30,98) 32,43 (19,62) P = 0,093
CD8+CD25+ CD127+/- (ląstelių/ μ l)	0,16 (0,110) 0,4 (0,27) P = 0,075	0,79 (0,69) 0,51 (0,36) P = 0,012	0,46 (0,54) 0,29 (0,34) P < 0,001
CD4/CD8	3,2 (1,56) 2,997 (1,179) P = 0,463	2,52 (0,67) 2,1 (0,93) P = 0,05	2,29 (1,06) 1,97 (0,9) P = 0,04

4.5.2. Pažengusios ligos grupė (du vizitai)

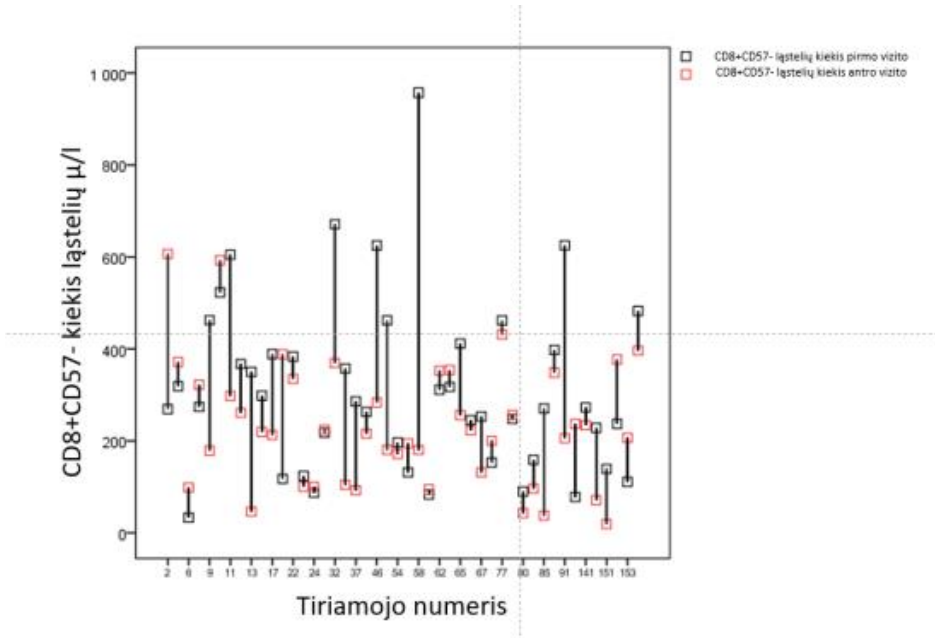
Palyginome dviejų vizitų visų subpopuliacijų vidurkius ir pastebėjome, kad kai kurie labai pakito. Šie skirtumai neturėjo įtakos IBLP ir BI. Keturiasdešimt šešių tiriamųjų periferinio kraujo mėginiai buvo įvertinti prieš gydymą (pirmas vizitas) ir po dviejų mėnesių. Absoliutus limfocitų kiekis, NK CD3-CD56+CD16+ ir CD3-CD56+CD16- bei T reguliacinių CD4+FOXP3+ ląstelių kiekis sumažėjo, o limfocitų procentinė išraiška ir CD3+CD56+ ląstelių skaičius padidėjo. Reikšmingi pokyčiai aptikti ir skirtingų chemoterapijų grupėse CD3+CD4+ ir CD3+CD56+ ląstelių – FOLFIRINOX šakoje bei CD8+CD57- ir CD4+FOXP3+ ląstelių gemcitabino šakoje. Atrodo, jog abu režimai reikšmingi CD3-CD56+CD16+ pokyčiui (10 lentelė). 14 pav. vaizduojama, kaip CD8+CD57- populiacijos vertė pakito tarp dviejų vizitų.

10 lentelė. Vidurkiai ir skirtumo patikimumas tarp dviejų vizitų CA 19-9 ir visų limfocitų subpopuliacijų, paskirsčius pagal chemoterapijos grupes. Pateikiami tik reikšmingi rezultatai

Parametras	FOLFIRINOX		<i>p</i> reikšmė*	Gemcitabino monoterapijos		<i>p</i> reikšmė*
	N = 26	N = 21		N = 26	N = 21	
	I vizitas vidurkis (SN)	II vizitas vidurkis (SN)		I vizitas vidurkis (SN)	II vizitas vidurkis (SN)	
CA 19-9 (kU/l)	3 752,44 4524,33	1 623,43 3 296,59	0,001	2 956,46 4 580,90	1 586,10 3 049,59	0,007
WBC ($\times 10^9/l$)	7,50 2,38	6,28 2,79	0,03	7,8433	7,48 5,30	0,375
CD3+CD56+ (ląstelių/ μ l)	118,04 81,51	156,89 130,07	0,019	114,38 93,99	124,22 77,58	0,092
CD8+CD57- (ląstelių/ μ l)	315,76 140,74	276,94 144,91	0,353	331,09 228,92	181,00 103,42	0,014
CD3+CD8+CD57+ (% nuo CD8+ ląstelių)	26,93 17,92	25,26 16,79	0,174	25,69 19,10	29,72 16,95	0,027
CD3+CD4+ (ląstelių/ μ l)	898,38 307,09	1 051,76 438,34	0,026	867,90 399,57	908,95 389,20	0,958
CD3-CD56+CD16+ (ląstelių/ μ l)	184,26 142,92	108,42 57,43	0,005	168,36 148,28	108,42 104,31	0,004
CD3-CD56+CD16- (ląstelių/ μ l)	58,59 79,63	48,12 69,56		76,05 80,20	41,20 43,64	0,004
CD4+FOXP3+ (ląstelių/ μ l)	36,21 21,28	31,62 16,47	0,158	37,58 28,79	24,50 14,23	0,046

* Skirtumo tarp dviejų vizitų vidurkių patikimumas.

CA 19-9 – vėžio antigenas CA 19-9; WBC – leukocitai; LYM – limfocitai; SN – standartinis nuokrypis



14 pav. CD8+CD57– subpopuliacijos pakitimas tarp pirmo ir antro vizito kai kuriems pacientams neoperuotųjų grupėje

Įdomu, kad NK CD3-CD56+CD16– ląstelių kiekis antro vizito metu išliko reikšmingas IBLP (HR, 0,994; 95 % CI: 0,987–1,000; $p = 0,047$), bet nereikšmingas BI (HR, 0,994; 95 % CI: 0,987–1,000; $p = 0,051$).

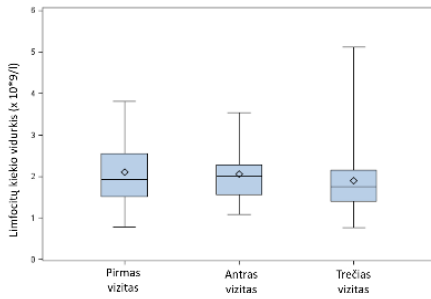
4.5.3. Visų stadijų pacientai, kurių surinkti trijų vizitų duomenys

Vėžio žymens CA 19-9, leukocitų, bendro limfocitų kiekio ir atskirų subpopuliacijų kitimo trijų vizitų metu rezultatai pavaizduoti 11 lefelėje.

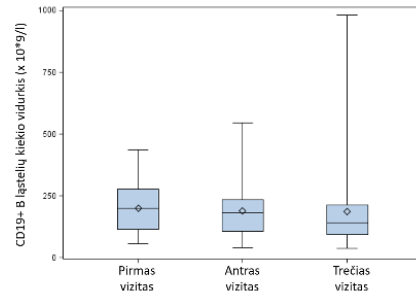
11 lentelė. Parametų (CA 19-9, leukocitų, bendro limfocitų ir subpopuliacijų) kitimas laikui bėgant: pirmą gydymo dieną, po 2 bei 4 mėn. neoperuotų šakoje ir po 3 bei 6 mėn. operuotų šakoje, 41 pacientas. Pateikiami tik reikšmingi duomenys

Parametras	I vizitas Vidurkis (SN)	II vizitas Vidurkis (SN)	III vizitas Vidurkis (SN)	<i>p</i> reikšmė
CA19-9 (kU/l)	1 047,06 (2 234,99)	848,39 (2173,91)	1081,53 (2 772,04)	0,002
WBC ($\times 10^9/l$)	7,47 (2,51)	6,85 (2,97)	6,04 (2,8)	0,012
LYM ($\times 10^9/l$)	2,1 (0,79)	2,05 (0,61)	1,90 (0,87)	0,011
CD19+ (ląstelių/ μ l)	201 (99,66)	190,09 (103,01)	185,09 (164,23)	0,012
CD3+CD56+ (ląstelių/ μ l)	122,86 (103,96)	152,95 (111,77)	128,52 (90,33)	0,012
CD3+CD8+ (ląstelių/ μ l)	432,09 (211,53)	498,31 (208,78)	482,56 (317,15)	0,005
CD3-CD56+CD16+ (ląstelių/ μ l)	195,6 (176,34)	143,878 (118,04)	103,25 (93,76)	< 0,001
CD4+FOXP3+ (ląstelių/ μ l)	44,67 (30,7)	30,98 (17,63)	30,656 (21,27)	0,004

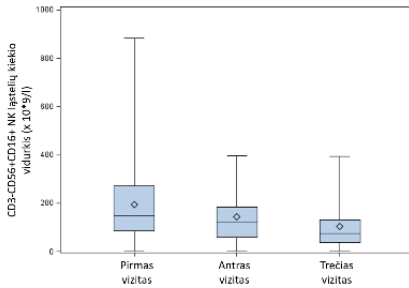
Stebint pacientus ir tiriant po 2 bei 4 mėn. nuo gydymo pradžios užfiksuotas CD19+ B limfocitų (nuo 201 (99,66) iki 190,09 (103,01) ir 185,09 (164,23) ląstelių/ μ l $p = 0,012$), NK CD3-CD56+CD16+ ląstelių (nuo 195,6 (176,34) iki 143,88 (118,04) ir 103,25 (93,76) ląstelių/ μ l $p < 0,001$), T reguliacinių CD4+FOXP3+ ląstelių (nuo 44,67 (30,69) iki 30,983 (17,63) ir 30,656 (21,27) ląstelių/ μ l, $p = 0,004$) mažėjimas. Į natūralias ląsteles žudikes panašių CD3+CD56+ ląstelių (nuo 122,85 (103,96) iki 152,95 (111,77) ir 128,52 (90,33) ląstelių/ μ l, $p = 0,012$) bei citotoksinių CD3+CD8+ T ląstelių (nuo 432,09 (211,53) iki 498,31 (208,78) ir 482,56 (317,15) ląstelių/ μ l, $p = 0,005$) kiekis didėjo po dviejų mėnesių ir mažėjo po keturių mėnesių. Statistiškai reikšmingi rezultatai parodyti 15 pav.



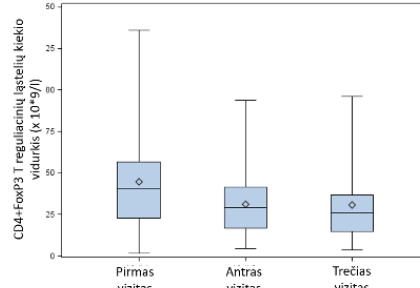
15a



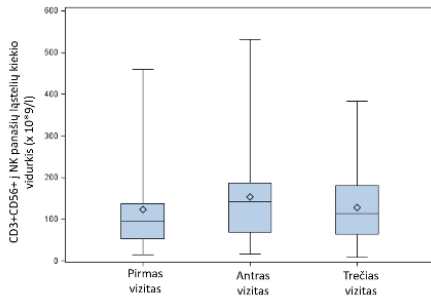
15b



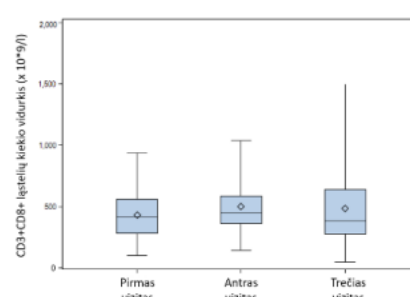
15c



15d



15e



15f

15 pav. Periferinio kraujo ląstelių kitimai, vertinant absoliučius skaičius 3 vizitų (pirmą gydymo dieną, po 2 bei 4 mėn. neoperuotų šakoje ir po 3 bei 6 mėn. operuotų šakoje). (a) Bendro limfocitų kiekio kitimas. (b) CD19+ B ląstelių kitimas. (c) CD3-CD56+CD16+ NK ląstelių kitimas. (d) CD4+FoxP3+ Treg ląstelių kiekio kitimas. (e) I NK ląstelių panašių CD3+CD56+ limfocitų kiekio kitimas. (f) CD3+CD8+ citotoksių ląstelių kitimas.

4.6. Vėžio mikroaplinkos imuninių ląstelių ryšys su periferinio kraujyje limfocitų subpopuliacijomis

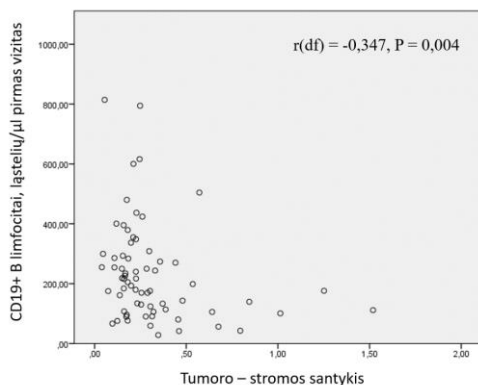
4.6.1. Pacientų charakteristikos, tumoro ir stromos santykio ryšys su klinikiniais požymiais

Į operacinės pataloginės medžiagos analizę įtraukti 68 pacientai, kurių vidutinis amžius buvo 66,5 m. (nuo 18 iki 86 m.), 56 % sudarė moterys, 44 % vyrai. Pagal auglio charakteristikas – didžioji dauguma buvo G2 34 (50 %) ir G3 32 (47,1 %) diferenciacijos navikai ir tik 2 (2,9 %) G1. Pagal stadijas pasiskirstė taip: IA – 4 (5,9 %), IB – 7 (10,3 %), IIA – 9 (13,2 %), IIB – 18 (26,5 %), III – 29 (42,6 %), IV – 1 (1,5 %). 48 (70,6 %) stebėta limfovaskulinė invazija, 30 (44,1 %) perineurinė invazija, rezekcijos kraštas dažniau buvo švarus, R0 rezekcija pasiekta 39 (57,4 %). Iš histologinių variantų vyravo pankreatinės duktalinės karcinomos diagnozė, bet į analizę pateko ir keturi adenoplokščialąstelinės, 3 mucininės cistadenokarcinomos, po vieną „putotų“ ląstelių, dediferencijuotos bei acininių ląstelių karcinomos. 19 (27,9 %) pacientų nebuvo gydyti chemoterapija, 22 (32,4 %) buvo gydyti FOLFIRINOX režimu ir 27 (39,7 %) gemcitabinu adjuvantiniu tikslu.

Koreliacijos tarp lyties, amžiaus, stadijos, pooperacinio gydymo taktikos, tumoro vietos kasoje, histologinio varianto, rezekcijos radikalumo, limfovaskulinės invazijos, CA 19-9 pradinės vertės perineurinės invazijos, BMI bei tumoro ir stromos santykio nenustatyta. Tarp G2 ir G3 diferenciacijos laipsnių tumoro ir stromos santykis skyrėsi reikšmingai ($U = 254,00$, $Z = -3,721$, $p < 0,000$).

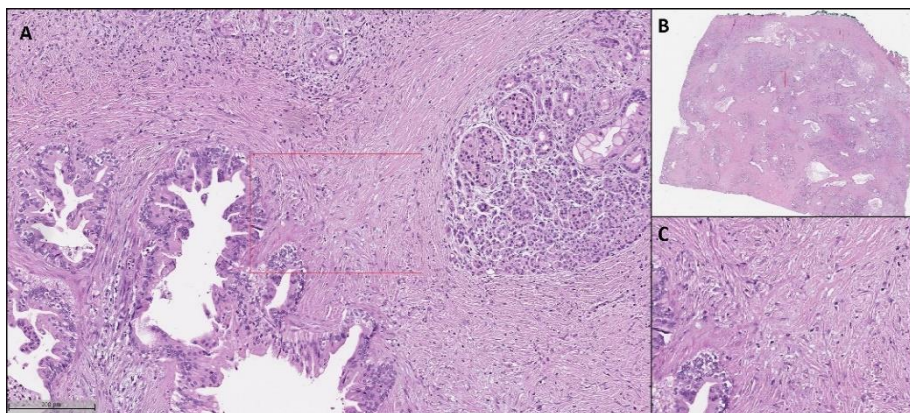
4.6.2. Tumoro ir stromos santykio ryšys su kraujyje cirkuliuojančių limfocitų subpopuliacijomis

Patikimai nebuvo susiję ir bendro leukocitų, limfocitų kiekio bei įvairių cirkuliuojančių limfocitų subpopuliacijų bei tumoro ir stromos santykio rodikliai. Tarp cirkuliuojančių B (CD19+) limfocitų bei tumoro ir stromos santykio nustatyta neigiama koreliacija, $r(df) = -0,347$, $P = 0,004$ (16 pav.). Ši tendencija išlieka ir vertinant antro vizito, po dviejų mėnesių nuo gydymo pradžios B (CD19+) limfocitų, tirtų tik 29 pacientams, rezultatus, $r(df) = -0,426$, $P = 0,021$.



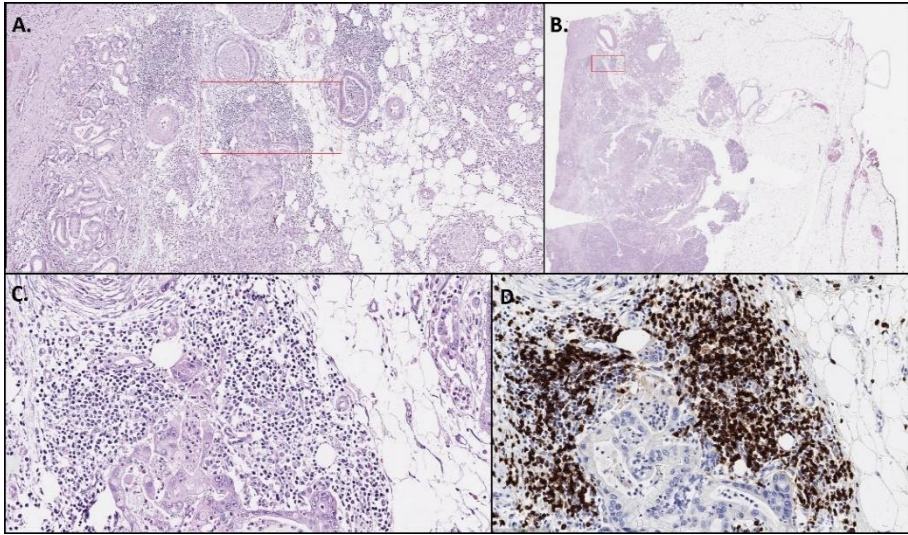
16 pav. Koreliacija tarp cirkuliuojančių B (CD19+) limfocitų bei tumoro ir stromos santykio

Paveiksluose vaizduojama, kaip vertinami kasos navikinio audinio, tumoro aplinkos ypatumai: liaukinės struktūros su būdinga desmoplazija, peripankreatinio audinio fibroze bei būdingu limfocitų išsidėstymu naviko kraštuose (17, 18 pav.).



17 pav. Fibrozės, desmoplazijos išraiška kasos navike (Valstybinio patologijos centro archyvas):

- A. HE x10. Naviko liaukinės struktūros su ženklią desmoplazija (apibrėžtas plotas parodytas mikrografijoje C).
- B. HE x0,8. Kasos audinys su žymia fibroze, atsitiktinai išsidėsčiusiomis liaukomis ir cistinėmis struktūromis (apibrėžtas plotas parodytas mikrografijoje A).
- C. HE x20. Desmoplastinė stroma stambiu planu, vaizduojami fibroblastai ir didelės kolageno sankaupos.



18 pav. Kasos naviko infiltracija į riebalinį audinį ir T limfocitų išsidėstymas (Valstybinio patologijos centro archyvas):

- D. HE x5. Navikas, infiltruojantis peripankretinį riebalinį audinį, viršuje centre matoma perineurinė dviejų stambių nervų invazija (apibrėžtas plotas vaizduojamas mikrografijose C ir D).
- E. HE x0,8. Kasos dalis su parenchimos ir perinavikinio riebalinio audinio fibroze (apibrėžtas plotas vaizduojamas mikrografijoje A).
- F. HE x20. Plati infiltracija limfocitais aplink naviką.
- G. CD3 x20. Imunohistocheminis dažymas CD3 žymeniui rodo, jog infiltruojančios perinavikinės ląstelės yra T limfocitai; atkreiptinas dėmesys, kad naviko parenchimoje limfocitų nėra.

4.7. Išgyvenimo rezultatai

4.7.1. Ankstyvos ligos grupės pacientų išgyvenimo rezultatai

Tiriamieji stebėti iš viso 20 mėn. (0–57 mėn.), o gyvieji 31 mėn. (7–57 mėn.). 30 (26,4 %) pacientų buvo gyvi analizės metu. 17 (15 %) pacientų liga nebuvo progresavusi. Vidutinis išgyvenimas neprogresuojant ligai (IBLP) buvo 10 mėn. (95 % PI: 8,01–11,99) ir vidutinis bendras išgyvenamumas (BI) buvo 15 mėn. (95 % PI: 11,03–18,97).

IBLP skyrėsi tarp chemoterapijos šakų ir buvo 34 (95 % PI: 0–77,79) mėn. negydytų chemoterapija pacientų, 10 (95 % PI: 8,78–11,23) mėn. mFOLFIRINOX ir 8 (95 % PI: 6,22–9,78) mėn. gemcitabino šakoje ($p =$

0,034, *log rank* testas); rizikos, kad liga progresuos, santykis buvo 1,468 (95 % PI: 1,066–2,021, $p = 0,019$). BI skyrėsi nepatikimai: buvo 35 (95 % PI: 8,2–61,8) mėn. negydytų chemoterapija pacientų, 14 (95 % PI: 11,03–16,97) mėn. mFOLFIRINOX vs. 13 (95 % PI: 4,03–21,97) mėn. gemcitabino šakoje ($p = 0,439$, *log rank* testas); mirties rizikos santykis buvo 1,223 (95 % PI: 0,89–1,68, $p = 0,215$).

Univariacinėje IBLP analizėje diferenciacijos laipsnis, sritinių limfmazgių įtraukimas, ligos stadija, limfovaskulinė invazija bei rezekcijos radikalumas (12 lentelė), taip pat CD8+CD25+CD127+/- ir CD8+FOXP3+ reguliacinių ląstelių kiekis prieš gydymą (pirmo vizito metu) (13 lentelė) buvo reikšmingi faktoriai ($p < 0,05$).

12 lentelė. Univariacinė Cox'o regresijos analizė IBLP: demografiniai ir klinikiniai požymiai, visa operuotųjų grupė (N = 88): gydyti vienu iš chemoterapijos režimų ir negydyti adjungantine chemoterapija

Požymis	RS	95% PI	P reikšmė
Paciento faktoriai			
Amžius	1,021	(0,995–1,049)	0,121
Vyriškoji lytis (ref. moteriškoji)	1,617	(0,970–2,696)	0,065
KMI (kg/m ²) (ref < 18,5)			
KMI kategorija 18,5–24,9	0,219	(0,019–2,502)	0,222
KMI kategorija > 25	0,488	(0,065–3,662)	0,486
Būklė pagal ECOG (ref. 0)			
ECOG 1	1,081	(0,491–2,383)	0,846
Naviko veiksniai			
Diferenciacijos laipsnis (ref G1)			
G2	0,122	(0,017–0,902)	0,039
G3	0,514	(0,307–0,861)	0,011
Pirminio naviko dydis (ref. T1)			
T2	0,374	0,072–1,936	0,241
T3	0,750	0,292–1,928	0,550
T4	0,819	0,307–2,186	0,690
Sritinių limfmazgių būklė (ref. N0)			
N1	0,28	0,135–0,584	0,001
N2	0,726	0,415–1,271	0,263
Stadija (ref. IA)			
IB	0,021	0,001–0,377	0,009
IIA	0,028	0,003–0,29	0,003
IIB	0,024	0,002–0,254	0,002
III	0,077	0,009–0,659	0,019

Požymis	RS	95% PI	P reikšmė
Rezekcijos radikalumas (ref. R0)			
R1	1,679	1,005–2,806	0,048
Limfovaskulinė invazija (ref. L0)			
L1	0,361	0,180–0,721	0,004
Perineurinė invazija (ref. nėra)			
Yra	1,654	0,996–2,748	0,052
Naviko vieta kasoje (ref. galvutės)			
Kūno	1,153	0,492–2,705	0,743
Uodegos	0,898	0,32–2,526	0,839
CA 19-9 kU/l (ref < 37)			
37–100	0,493	(0,240–1,013)	0,054
100–1 000	0,977	(0,445–2,148)	0,954
> 1 000	1,098	(0,537–2,248)	0,797

13 lentelė. Univariacinė Cox'o regresijos analizė IBLP: limfocitų subpopuliacijos pirmo vizito metu, visa operuotųjų grupė (N = 88), abi chemoterapijų grupės (mFOLFIRINOX ir gemcitabino monoterapija) ir negydyti adjuvantine chemoterapija. Pateikiami tik reikšmingi faktoriai

Požymis	RS	95% PI	P reikšmė
FC WBC	1,000	1,000–1,001	0,015
CD8+CD25+CD127+/-	1,350	1,042–1,749	0,023
CD8+FOXP3+	1,529	1,043–2,242	0,03

Univariacinėje BI analizėje lytis, diferenciacijos laipsnis, sritinių limfmazgių įtraukimas, limfovaskulinė invazija bei rezekcijos radikalumas (14 lentelė) ir CD8+FOXP3+ reguliacinių ląstelių kiekis prieš gydymą (pirmo vizito metu) RS 1,534, PI 95 % 1,007–2,336 buvo reikšmingi faktoriai (p = 0,046). Atmetus mirusius dėl kitų priežasčių, R, LVI, lytis, diferenciacijos laipsnis, N išlieka reikšmingi išgyvenamumui.

14 lentelė. Univariacinė Cox'o regresijos analizė BI: demografiniai ir klinikiniai požymiai, visa operuotųjų grupė (N = 88): gydyti vienu iš chemoterapijos režimų ir negydyti adjuvantine chemoterapija

Požymis	HR	95% PI	P reikšmė
Paciento faktoriai			
Amžius	1,030	(0,999–1,061)	0,055
Vyriškoji lytis (ref. moteriškoji)	0,447	(0,266–0,753)	0,002
KMI (kg/m ²) (ref. < 18,5)			
KMI kategorija 18,5–24,9	0,990	(0,235–4,163)	0,989

Požymis	HR	95% PI	P reikšmė
KMI kategorija > 25	1,408	(0,830–2,389)	0,204
ECOG būklė (ref. 0)			
ECOG būklė 1	0,612	(0,298–1,257)	0,182
Naviko veiksniai			
Diferenciacijos laipsnis (ref. G1)			
G2	0,139	(0,019– 1,028)	0,053
G3	0,381	(0,220–0,659)	0,001
Pirminio naviko dydis (ref. T1)			
T2	0,707	0,197–2,533	0,595
T3	0,656	0,273–1,577	0,346
T4	0,496	0,193–1,257	0,146
Sritinių limfmazgių būklė (ref. N0)			
N1	0,396	0,194–0,808	0,011
N2	0,843	0–471–1,507	0,564
Stadija (ref. IA)			
IB	0,362	0,037–3,583	0,385
IIA	0,125	0,013–1,233	0,075
IIB	0,143	0,015–1,324	0,087
III	0,360	0,047–2,743	0,324
Rezekcijos radikalumas (ref. R0)			
R1	2,284	1,350–3,865	0,002
Limfovaskulinė invazija (ref. L0)			
L1	2,554	1,280–5,097	0,008
Perineurinė invazija (ref. nėra)			
yra	1,303	0,778–2,183	0,314
Naviko loklaizacija (ref. galvutė)			
Kūnas	1,760	0,695–4,460	0,233
Uodega	1,896	0,656–5,478	0,237
CA 19-9 kU/l (ref. < 37)			
37–100	0,703	(0,341–1,450)	0,34
100–1 000	0,913	(0,394–2,117)	0,832
> 1 000	1,076	(0,513–2,256)	0,845

Univariacinėje analizėje išaiškinti reikšmingi faktoriai toliau vertinti multivariacinėje analizėje ir diferenciacijos laipsnis, metastazių sritiniuose limfmazgiuose buvimas, CD8+CD25+CD127+/- išlieka reikšmingi IBLP, o diferenciacijos laipsnis, rezekcijos radikalumas bei CD8+CD25+CD127+/- BI (15 lentelė).

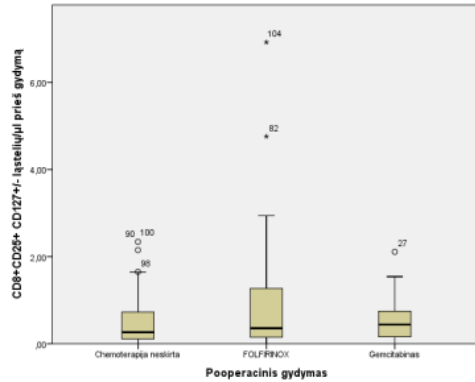
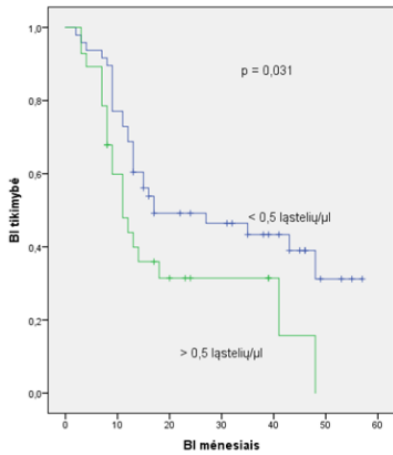
Analizuojant Kaplano–Meierio metodu, paskirsčius pacientus į dvi grupes pagal CD8+CD25+CD127+/- ląstelių/μl vidurkį (mažiau kaip 0,5 ir

> 0,5), patikimai skyrėsi BI duomenys, 17 (95 % PI: 1,7–32,3) vs. 11 (95 % PI: 7,1–14,9) mėn. ($p = 0,041$, Breslow), skirtumas patikimesnis į analizę neįtraukiant pacientų, mirusių dėl kitų priežasčių 17 (95 % PI: 0–39,5) vs. 11 (95 % PI: 7,4–14,6) mėn. ($p = 0,031$, *log rank*) (19 pav.).

15 lentelė. Nepriklausomi predikciniai faktoriai IBPL, BI vertinat multivariacinėje analizėje (operuotųjų grupė)

BI 1 modelis: tumoro faktoriai			
LR: 429,5, $p < 0,0001$, $N = 88$, $\chi^2 = 21,85$			
Kintamasis	RS	95 % PI	P reikšmė
Diferenciacijos laipsnis	2,422	1,456–4,029	0,001
Rezekcijos kraštas	1,997	1,168–3,415	0,011
BI 2 modelis: tumoro faktoriai ir limfocitų subpopuliacijos			
LR: 408,4, $p < 0,0001$, $N = 84$, $\chi^2 = 26,25$			
Diferenciacijos laipsnis	2,577	1,497–4,435	0,001
Rezekcijos kraštas	2,060	1,175–3,613	0,012
CD8+CD25+CD127+/- pirmo vizito kiekis	1,486	1,097–2,015	0,011
IBPL 3 modelis: tumoro faktoriai			
LR: 449,0, $p < 0,0001$, $N = 84$, $\chi^2 = 20,49$			
Diferenciacijos laipsnis	2,023	1,263–3,239	0,003
Limfmazgių įtraukimas	1,720	1,228–2,408	0,002
IBPL 4 modelis: tumoro faktoriai ir limfocitų subpopuliacijos			
LR: 417,67, $p < 0,0001$, $N = 81$, $\chi^2 = 25,849$			
Diferenciacijos laipsnis	2,497	1,483–4,203	0,001
Limfmazgių įtraukimas	1,693	1,193–2,402	0,003
CD8+CD25+CD127+/- pirmo vizito kiekis	1,457	1,107–1,918	0,007

IBLP skirtumo negauta. Ir tuo pačiu metodu, atskyrus dėl kitų priežasčių mirusius, panagrinėjus atskirus pogrupius (pacientus, kuriems neskirta chemoterapija, atskirų chemoterapijos režimų) gautas itin reikšmingas IBPL skirtumas FOLFIRINOX grupėje: pacientų, kurių mažas pradinis šių ląstelių kiekis, išgyvenamumo mediana 12 (95 % PI: 9,5–14,5), mėn. vs. kurių didelis kiekis 6 (95 % PI: 3,5–8,5) mėn., $p = 0,008$ *log rank* ir BI taip pat skiriasi reikšmingai 17 (95 % CI: 2–558) vs. 7 (95 % CI: 0–14,5), $p = 0,002$, *log rank*. Pirmo vizito CD8+CD25+CD127+/- ląstelių/μl reikšmių išsibarstymas chemoterapijų grupėse parodytas 20 pav.

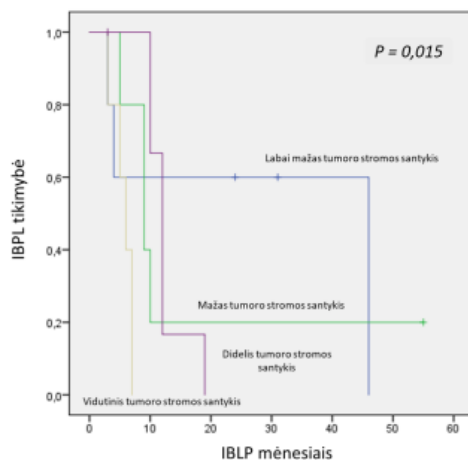


19 pav. BI skirtumas mažai ir daug CD8+CD25+CD127+/- ląstelių/μl turinčių pacientų pirmo vizito metu operuotųjų grupėje

20 pav. CD8+CD25+CD127+/- ląstelių/μl pirmo vizito metu išsibarstymas trijose adjuvantinio gydymo šakose

4.7.2. Tumoro ir stromos santykio įtaka išgyvenamumui

Cox'o regresijos, Kaplano–Meierio metodu analizuojant tumoro ir stromos santykio įtakos IBPL ir BI negauta. Tik suskirsčius pacientus į keturias grupes pagal tumoro ir stromos santykį ir išanalizavus FOLFIRINOX chemoterapija gydytų pacientų grupę, gaunamas IBLP skirtumas, kai tumoro ir stromos santykis labai mažas 46 (95 % PI: 0) mėn., mažas 9 (95 % PI: 4,7–13,3) mėn., vidutinis 6 (95 % PI: 3,9–8,2) mėn., didelis 12 (95 % PI: 10,8–13,2) mėn., $P = 0,015 \text{ log rank}$ (13 pav.). Iš viso ši grupė apima tik 22 pacientus: penkis pacientus, kurių labai mažas ($< 0,1621405305$), penkis pacientus, kurių mažas (nuo $0,1621405305$ iki $0,2272217600$), penkis pacientus, kurių vidutinis (nuo $0,2272217601$ iki $0,3431194908$) ir septynis pacientus, kurių didelis ($> 0,3431194908$) tumoro ir stromos santykis (**21 pav.**).



21 pav. Operuotų , gydytų FOLFIRINOX chemoterapijos režimu, IBLP rezultatai, suskirsčius juos pagal tumoro ir stromos santykį į keturias grupes (22 atvejai): labai mažo (< 0,1621405305), mažo (nuo 0,1621405305 iki 0,2272217600), vidutinio (nuo 0,2272217601 iki 0,3431194908) ir didelio (> 0,3431194908).

4.7.3. Pažengusios ir metastazavusios ligos grupė

Tiriamieji stebėti bendrai 27 mėn. (0–54 mėn.), o gyvieji 29 mėn. (13–54 mėn). Devyni (8,5 %) pacientai buvo gyvi analizės metu. Keturių (3,8 %) pacientų liga nebuvo progresavusi. Vidutinis išgyvenimas neprogresuojant ligai (IBLP) buvo 7 mėn. (95 % CI: 6,2–7,8) ir vidutinis bendras išgyvenamumas (BI) buvo 11 mėn. (95 % CI: 8,7–13,3).

IBLP skyrėsi tarp chemoterapijos šakų ir buvo 8,9 (95 % CI: 7,1–10,3) mėn. mFOLFIRINOX vs. 7,1 (95 % CI: 4,8–9,3) mėn. gemcitabino šakoje ($p = 0,029$, Breslow testas); rizikos, kad liga progresuos, santykis buvo 0,71 (95 % CI: 0,47–1,05, $p = 0,089$). BI taip pat skyrėsi: 15,1 (95 % CI: 12,3–18,0) mėn. mFOLFIRINOX vs. 12,7 (95 % CI: 8,96–16,5) mėn. gemcitabino šakoje ($p = 0,012$, Breslow testas); mirties rizikos santykis buvo 0,79 (95 % CI: 0,52–1,92, $p = 0,26$).

Univariacinėje IBLP analizėje tolimųjų metastazių, ypač kelete sričių, buvimas, būklė pagal ECOG bei absoliutaus leukocitų, limfocitų, citotoksinių CD3+CD8+, CD8+CD57– ir NK CD3-CD56+CD16– ląstelių kiekis prieš gydymą (pirmo vizito metu) buvo reikšmingi faktoriai ($p < 0,05$). Išskirsčius pacientus pagal chemoterapijos režimą visi minėti faktoriai tebėra reikšmingi mFOLFIRINOX grupėje, tačiau gemcitabino grupėje išlieka reikšmingas tik tolimųjų metastazių buvimas (16, 17 lentelės). Univariacinėje analizėje išaiškinti reikšmingi faktoriai toliau vertinti

multivariacinėje analizėje ir tolimųjų metastazių buvimas, ECOG apibrėžta būklės, CD8+CD57– kiekis prieš chemoterapiją išliko reikšmingi IBLP.

Univariacinėje BI analizėje reikšmingi faktoriai pasirodė amžius, ECOG būklė, diferenciacijos laipsnis, CA 19-9 ir absoliutus leukocitų, CD3+CD8+, labiausiai CD8+CD57– ląstelių, kiekis bei CD4/CD8 santykis. O paskirsčius pacientus pagal gautą chemoterapijos režimą BI reikšmės turėjo tik klinikiniai faktoriai (18 lentelė). Multivariacinėje analizėje BI, nepriklausomi prognostiniai faktoriai išliko būklė pagal ECOG, CA 19-9 reikšmė ir absoliutus leukocitų bei CD8+CD57– ląstelių kiekis prieš gydymą.

Toliau buvo tiriama, kaip skirtingos subpopuliacijos veikia išgyvenamumą, taikant Kaplano–Meierio metodą. Pacientai sugrupuoti į dvi ir keturias grupes pagal kiekvienos subpopuliacijos pirmo vizito verčių medianą arba kvartilius. Sugrupavę CD8+CD57– į dvi grupes pagal pirmo vizito duomenis (mažiau ir daugiau negu 194 ląstelės/ μ L), aptikome skirtumus IBLP (22a pav.) ir BI (22b pav.) visoje tyrimo imtyje ir subgrupėse: M0, M1, G2, G3, mFOLFIRINOX ir gemcitabino šakose.

Siekiant suprasti chemoterapijos įtaką išgyvenamumui esant skirtingoms CD8+CD57– vertėms; galbūt vienas iš režimų labiau tinkamas kuriai nors pacientų grupei. Dvidešimt penkių pacientų, kurių CD8+CD57– kiekis buvo mažas (< 194 ląstelės/ μ L) prognozė buvo blogesnė. Dešimt pacientų gydyti mFOLFIRINOX ir 15 vien gemcitabinu. Penki pacientai iš gemcitabino šakos išgyveno 8–24 mėn. (jų amžius buvo 64–78 metai, keturios moterys, vienas vyras, dviejų pacientų vėžys buvo G2, trijų pacientų G3 diferenciacijos laipsnio, dviem pacientams liga buvo metastazavusi; CA 19-9 varijavo nuo 241 kU/L iki > 12 000 kU/L. Būklės vertinimas pagal ECOG siekė 0–1 ir pacientai gavo 0–2 eilės gydymą dėl kasos vėžio).

Stebėta ir kitų subpopuliacijų reikšmė išgyvenamumui, tačiau tik kai kuriose pacientų grupėse. Absoliutus limfocitų skaičius pirmo vizito metu buvo reikšmingas IBLP ir BI mFOLFIRINOX ir gemcitabino šakose, esant tolimosioms metastazėms ir abiejose diferenciacijos laipsnio grupėse (12a pav.). CD4+FOXP3+ reguliacinių limfocitų pradinės vertės taip pat buvo reikšmingos BI; ribinė vertė buvo 49,57 ląstelės/ μ L (12b pav.), ta pati tendencija išryškėjo ir BI analizėje G3 grupėje, bet ne mFOLFIRINOX ar gemcitabino, atskirai vertinant pacientus, kuriems susidarė tolimųjų metastazių, ir tuos, kuriems jų nesusidarė, ne G2 navikams. CD3-CD56+CD16– turėjo įtakos IBLP (12c pav.).

16 lentelė. Išgyvenamumo neprogresuojant ligai univariacinė Cox'o regresijos analizė skirtingose chemoterapijos šakose (mFOLFIRINOX ir gemcitabino monoterapijos): demografiniai ir klinikiniai parametrai; visi neoperuoti pacientai (N = 102)

Požymis	Referentinė reikšmė	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabino monoterapija (N = 46)		
		HR	95 % CI	P-value	HR	95 % CI	P-value
Amžius		0,998	0,965–1,031	0,89	1,041	0,994–1,089	0,090
Lytis							
Vyrai	Moterys	0,594	0,329–1,072	0,084	1,037	0,576–1,868	0,903
KMI kategorija, kg/m ²							
18,5–24,9	< 18,5	1,444	0,192–10,866	0,721	2,412	0,313–18,597	0,398
>25	< 18,5	1,310	0,745–2,304	0,348	0,808	0,442–1,476	0,488
Būklė pagal ECOG							
1	0	0,019	0,003–0,138	< 0,001	0,432	0,180–1,039	0,061
2	0	0,029	0,004–0,217	0,001	0,742	0,325–1,691	0,477
Diferencijacijos laipsnis							
G2	G1	1,665	0,225–12,314	0,618	0,404	0,054–3,034	0,378
G3	G1	2,288	0,301–17,384	0,424	1,075	0,594–1,945	0,810
Tolimosios metastazės							
M1	M0	0,320	0,168–0,608	< 0,001	0,446	0,231–0,860	0,013
Ascitas							
Yra	Nėra	0,543	0,192–1,537	0,25	0,711	0,294–1,721	0,449
CA 19-9, kU/l							
37–100	< 37	2,588	1,191–5,623	0,016	0,564	0,227–1,399	0,217
100–1 000	< 37	1,164	0,402–3,375	0,779	0,486	0,166–1,427	0,189
> 1000	< 37	1,494	0,744–3,000	0,259	0,528	0,289–1,172	0,130

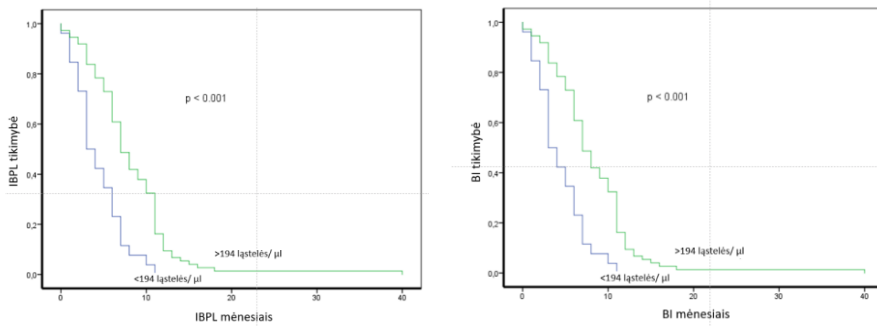
17 lentelė. Išgyvenamumo neprogresuojant ligai univariacinė Cox'o regresijos analizė skirtingose chemoterapijos šakose (mFOLFIRINOX ir gemcitabino monoterapijos): limfocitų subpopuliacijų reikšmės pirmo vizito metu; visi neoperuoti tieji pacientai (N = 102). Pateikti tik reikšmingi duomenys

Požymis	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabinas monoterapija (N = 46)		
	HR	95 % CI	P reikšmė	HR	95 % CI	P reikšmė
LYM kiekis	0,605	0,387–0,945	0,027	0,761	0,502–1,154	0,199
CD3+CD8+	0,998	0,996–1,000	0,039	1,000	0,998–1,001	0,362
CD3-CD56+CD16-	0,995	0,991–1,000	0,032	0,996	0,992–1,001	0,106

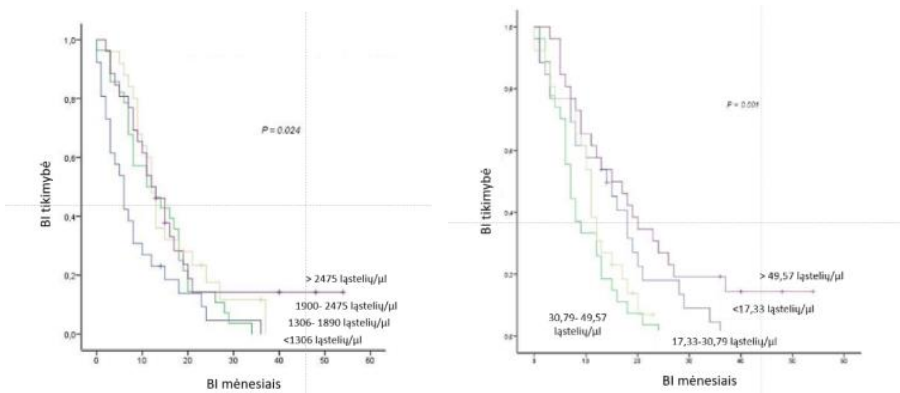
18 lentelė. Univariacinė Cox'o regresijos bendro išgyvenamumo analizė skirtingose chemoterapijos šakose (mFOLFIRINOX ir gemcitabino monoterapijos): demografiniai ir klinikiniai parametrai; visi neoperuoti tieji pacientai (N = 102)

Požymis	Referentinė reikšmė	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabino monoterapija (N = 46)		
		HR	95 % CI	P reikšmė	HR	95 % CI	P reikšmė
Amžius		1,002	0,969–1,036	0,898	1,044	0,994–1,096	0,088
Lytis							
Vyrai	Moterys	0,819	0,454–1,476	0,507	1,449	0,785–2,675	0,235
KMI kategorija, kg/m ²							
18,5–24,9	< 18,5	0,787	0,105–5,885	0,816	3,789	0,448–30,032	0,207
> 25	< 18,5	1,297	0,732–2,296	0,373	1,012	0,549–1,867	0,968
ECOG būklė							
1	0	0,010	0,001–0,116	< 0,001	0,393	0,165–0,934	0,034
2	0	0,014	0,001–0,166	0,001	0,519	0,222–1,215	0,519
Diferenciacijos laipsnis							

Požymis	Referentinė reikšmė	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabino monoterapija (N = 46)		
		HR	95 % CI	P reikšmė	HR	95 % CI	P reikšmė
G2	G1	0,192	0,024–1,513	0,117	0,380	0,050–2,880	0,349
G3	G1	0,468	0,263–0,832	0,010	0,987	0,538–1,814	0,967
Tolimosios metastazės							
M1	M0	0,520	0,289–0,935	0,029	0,579	0,308–1,087	0,089
Ascitas							
Yra	Nėra	0,447	0,158–1,266	0,130	0,635	0,266–1,519	0,308
CA 19-9, kU/L							
37–100	< 37	1,848	0,860–3,969	0,115	0,601	0,237–1,528	0,285
100–1 000	< 37	1,007	0,351–2,892	0,989	0,267	0,074–0,962	0,267
> 1000	< 37	0,773	0,373–1,605	0,490	0,645	0,317–1,312	0,645

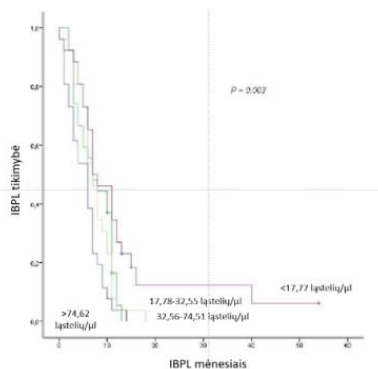


22 pav. Pacientų išgyvenamumo analizė Kaplan–Meierio metodu CD8+CD57– ląstelės suskirstant pagal 194 ląstelių/ μ l ribą. (A) IBPL rezultatai. (B) BI rezultatai (neoperuotųjų grupė).



23a pav. BI skirtumai absoliutų limfocitų skaičių suskirsčius į keturias grupes pagal pirmo vizito kvartilius, neoperuotųjų grupė

23b pav. BI skirtumai CD4+FOXP3+ reguliacinių limfocitų reikšmės suskirsčius į keturias grupes pagal pirmo vizito kvartilius, neoperuotųjų grupė



23c pav. IBPL skirtumai CD3-CD56+CD16– reikšmės suskirsčius į keturias grupes pagal pirmo vizito kvartilius, neoperuotųjų grupė

DISKUSIJA

Pagrindinis mūsų tyrimo tikslas buvo aptikti įvairių faktorių įtaką išgyvenamumui. Išgyvenimo prognozės požiūriu studijos imtis yra gana heterogeniška. Kasos vėžio prognozę lemia ligos išplitimas bei diferenciacijos laipsnis. Šios paties vėžio savybės įvairiose statistinėse analizėse yra svaresnės nei tumoro sekretuojami ar imuninės sistemos reguliuojami biožymenys.

Mūsų studijos populiacijoje amžiaus mediana buvo 66 m., tai yra kiek mažesnė nei pasauliniais duomenimis. Laikoma, kad kasos vėžio išsivystymas priklauso nuo amžiaus, dažniausiai susergama 70 m. ir beveik 90 % po 55 metų (21).

Mūsų tyrime dažniau sirgo moterys, nors apskritai Lietuvoje didesnė rizika susirgti PDAK yra vyrams, o pasaulyje pasiskirstymas tarp lyčių varijuoja: pavyzdžiui, Armėnijoje, Čekijoje, Vengrijoje daugiau serga vyrai, o Šiaurės Amerikoje, Vakarų ir Šiaurės Europoje moterys (21).

Mes suskirstėme studijos pacientus į operabilius ir neoperabilius, nes savo uždaviniu laikėme įvertinti, kaip pradinis gydymas veikia limfocitų subpopuliacijas kraujyje. Iš neoperabilių pacientų grupės vis dėlto kai kuriems buvo atlikta operacija, bet analizėje jie liko neoperabiliųjų kohortoje. Galbūt būtų racionalu skirstyti į tris grupes pagal operabilumą (tikrai operabilūs, paribiškai operabilūs, neoperabilūs), nes jų gydymo taktika ir prognozė skiriasi. Paribiškai operabilių neoperuotų, vietiskai pažengusių ir metastatinių būklių sujungimas galėjo turėti įtakos rezultatams.

Studijos pacientams buvo skirtas standartinis gydymas, remiantis tarptautinėmis rekomendacijomis, taikyti įprasti operaciniai metodai. Adjuvantiniu tikslu taikant FOLFIRINOX ar gemcitabino režimus IBPL mūsų tyrimo kohortoje siekė 10 ir 8 mėn. FOLFIRINOX ir gemcitabino šakose atitinkamai, nors PRODIGE-24 tyrime šie rezultatai buvo kur kas geresni, siekė 21,6 mėn. FOLFIRINOX ir 12,8 mėn. gemcitabino šakose. Taip pat ir BI mūsų kohortoje buvo 14 mėn. FOLFIRINOX šakoje bei 13 mėn. gemcitabino, o minėtame daugiacentriame atsitiktinių imčių tyrime atitinkami 54 ir 45 mėn. (5,49). Tokį didelį išgyvenamumo rezultatų nesutapimą paaiškina skirtingos šių tyrimų pacientų charakteristikos: į mūsų chemoterapija po operacijos gydytų pacientų grupę pateko daugiausia G2, G3 diferenciacijos navikų (o minėtame tyrime net 32 % buvo G1) ir daug įtraukėme III stadijos pacientų, o cituojamame tyrime jų buvo tik 0,4 %. Tad mūsų operuotųjų ir chemoterapija gydytų pacientų populiacija labiau atitinka PRODIGE 29-UCGI 26 (NEOPAN) tyrimo (9).

Pirmai gydymo eilei buvo skirtas kombinacinis FOLFIRINOX režimas arba monoterapija gemcitabinu, nors pagal šiandienines tarptautines rekomendacijas gemcitabinas dar galėtų būti derinamas su nab-paklitakseliu. Šioje šakoje gauti IBPL rezultatai 8,9 mėn. mFOLFIRINOX ir 7,1 mėn. gemcitabino yra netgi geresni už klinikinio tyrimo, išpopuliarinusio FOLFIRINOX režimą (6,4 mėn. ir 3,3 mėn. atitinkamai). Geresni ir BI duomenys – 15,1 mėn. mFOLFIRINOX, 12,7 mėn. gemcitabino šakoje mūsų tyrime, 11,1 mėn. ir 6,8 mėn. – minėtame atsitiktinių imčių tyrime (54). Į pastarąjį buvo įtraukti tik ketvirtos stadijos liga, kuriems aptikta tolimųjų metastazių, sergantys pacientai, tai ir nulemia išgyvenamumo rodiklių skirtumus.

Antrai ir vėlesnėms gydymo eilėms buvo skirti oksaliplatinos, liposominio irinotekano, fluorouracilo kombinaciniai režimai, remiantis tarptautinėmis gairėmis. Vykstant mūsų tyrimui gydymo galimybės Lietuvoje plėtėsi. Dalis pacientų, kurių funkcinė būklė buvo itin gera, mFOLFIRINOX režimu gydyti keletą kartų. Įrodžius liposominio irinotekano naudą, kai kurie pacientai antroje ar vėlesnėse eilėse gydyti jo kombinacija su fluorouracilu. Tad antros ir vėlesnių eilių gydymas mūsų studijos pacientams buvo nevienalytis ir galėjo turėti šiek tiek įtakos BI rezultatams.

Limfocitų kiekio pokyčiai didėjant amžiui buvo žinomi jau seniai. 1992 m. mokslininkai, tyrinėję jaunesnių nei 44 m. ir vyresnių nei 80 m. moterų kraują, pastebėjo, jog vyresniųjų grupės pacienčių periferiniame kraujyje aptikta mažiau aktyvių efektorinių ląstelių (CD3+CD4+CD25+; CD3+CD4+CD25+CD127+; CD3+CD4+CD25+ bei CD3+CD4+CD25highCD127+, o CD25^{lo}Foxp3⁺ fenotipų CD3+CD4+CD25^{lo}Foxp3⁺ bei CD3+CD4+CD25^{lo}CD127^{lo}Foxp3⁺ su amžiumi daugėjo (208). Navikai gali skatinti T ląstelių išsekimą ir senėjimą, tai svarbios savybės, pacientams būdingos kartu su vėžiu (209). T ląstelių disfunkcija laikui bėgant veikiama įvairių mechanizmų, ląstelės išsenka ir sensta, ne tik nebereaguoja į įprastus T ląstelių receptorių efektus, bet ir senėjančios ląstelės (SA-T) kaupiasi vėžio audinyje, skatina lėtinį audinių uždegimą, tumoro augimą, progresavimą (210). Mūsų visoje studijos populiacijoje CD4+CD25+CD127+/- priklausė nuo amžiaus, o ankstyvų stadijų pacientų grupėje su amžiumi buvo susijęs bendras leukocitų, CD19+ B limfocitų, CD4+CD25+CD127+/-, CD4+FOXP3 subpopuliacijų kiekis. Tai gali lemti tiesiog amžinis CD4+ ląstelių fenotipo pasikeitimas į labiau uždegiminį ar uždegimo procesus slopinantį Treg (211) arba tumoro ląstelių poveikis T reguliaciniams limfocitams: atpalaiduoja chemokinus, kurie pritraukia juos iš antrinių limfoidinių struktūrų į TMA arba skatina jų

prolifraciją, diferenciaciją versdamos nebrandžias dendritines ląsteles į TGF-β produkujančias (212). Su amžiumi B ląstelių mažėja, kinta jų subpopuliacijos, antikūnų atsakai (213).

Pažengusiųjų grupėje jokių sąsajų su amžiumi neaptikta, tai gali rodyti, kad tuomet imuninius procesus labiau lemia kiti, pavyzdžiui, su vėžiu, gausiai išreikštu navikiniu audiniu pakitusio metabolizmo faktoriai, bet ne amžiniai (67, 146).

Pradinis bendras limfocitų kiekis, B CD19+ ląstelių, CD3+ limfocitų subpopuliacijų, CD3+CD4+ bei CD3+CD4-CD8- priklausė nuo ligos stadijos. Stadija iš esmės atspindi naviko tūrį, vėžinių ląstelių kiekį. Ryšys tarp stadijos ir limfocitų kiekio aprašytas jau 1991 m., kai buvo pastebėta, kad skrandžio vėžio atveju, didėjant stadijai, mažėja bendras limfocitų kiekis, CD3+, CD4+, CD8+ limfocitų (214). CD4+ ląstelės veikia stipriai antinavikiškai, gali tiesiogiai atpažinti navikines ląsteles ir aktyvuoti mirtį skatinančius ligandus ir netiesiogiai per išskiriamus citokinus (215). Taigi mūsų rezultatai rodo, kad ir kasos vėžio atveju, didėjant tumoros masei, mažėja T helperių ir taip palaikomas vėžio vystymasis.

B limfocitų su žymeniu CD19+ mūsų studijoje skyrėsi analizuojant kas 2 ar 3 mėn. (patikimai mažėjo), neoperuotųjų grupėje jų kiekis buvo susijęs su tolimųjų metastazių buvimu, bendroje populiacijoje priklausė nuo stadijos (mažėjo jai didėjant) ir analizuojant operuotų pacientų grupę tarp cirkuliuojančių B (CD19+) limfocitų pirmo vizito metu bei tumoros ir stromos santykio nustatyta neigiama koreliacija. Tumorą infiltruojantys B limfocitai laikomi reikšmingomis ląstelėmis PDAK iniciacijai ir vystymuisi (216). Apskritai B ląstelės pasižymi protumorigeniniu ir net imunosupresiniu efektu, bet limfoidinėse struktūrose jų funkcija pasikeičia į naviką slopinančią ir imunostimuliacinę (217). Tumorą infiltruojantys B limfocitai įvairiuose solidiniuose navikuose (pvz., krūties, kiaušidžių) gali gerinti bendrą išgyvenamumą (216). Sergantieji vėžiu stokoja B ląstelių, kaip įrodyta nesmulkialąstelinio plaučių vėžio tyrimuose (218). Cirkuliuojančių CD19+ B ląstelių gausa sergantiesiems nosiaryklės karcinoma buvo susijusi su geresniu išgyvenamumu – penkerių metų, pasirodė kaip nepriklausomas prognostinis faktorius BI, IBLP (219). Preklinikiniuose PDAK modeliuose tumoros infiltruojančios B ląstelės vis dėlto lėmė progresiją (216). Be to, B ląstelės gali lemti ir fibrozės susidarymą, sekretuodamos kolageno produkciją stimuliuojančius faktorius PDAK pacientams (220). Priešvėžinis gydymas mažina cirkuliuojančių B ląstelių kiekį: tai parodė pacientų, sergančių stemplės (194) ir plaučių vėžiu (221), gydomų radioterapija, stebėjimas.

Taigi B ląstelių vaidmuo vėžio vystymesi neabejotinas, nors duomenų apie chemoterapijos ir cirkuliuojančių B ląstelių pokyčius nėra daug. Mūsų tyrime mažėjimas periferiniame kraujyje gydymo metu gali rodyti ryšį su vėžio išplitimu organizme: mažėjant ligos masei mažėja ir cirkuliuojančių B limfocitų, tam paantrina ir sąsajos su stadija bei tolimųjų metastazių buvimu nustatymas. Ir vyraujant tumorui prieš stromą (esant didesniai tumorui ir stromos santykiui) vėlgi periferinis B ląstelių aktyvumas gali būti sumažėjęs kaip reakcija į vėžio išskiriamas medžiagas. Įtakos išgyvenamumui įrodyti nepavyko, matyt, dėl kitų veiksnių per didelio poveikio.

Mūsų tyrime NK CD3-CD56+CD16- kiekis bendroje populiacijoje gydymo metu mažėjo, turėjo ryšį su metastazių buvimu grupių analizėje. Apie NK ląstelių vaidmenį solidiniuose navikuose ir PDAK konkrečiai žinoma daugiau. NK ląstelės veikia priešnavikiškai citotoksiškai (222). Didesnis NK ląstelių kiekis periferiniame rezekuotinių PDAK sergančiųjų kraujyje ir TMA susijęs su geresniu išgyvenamumu (191). Nors prognostinė vertė gali būti vertinama dvejopai, nes išplitusios ligos atveju nustatomas ryšys su blogesniu išgyvenamumu (190, 222). Operacijos įtaka NK ląstelėms išlieka neaiški (223). Pelių modeliuose vis dėlto rezekcija ir adjuvantinė chemoterapija gemcitabinu aktyvino NK ląsteles ir apsaugojo nuo ligos atsinaujinimo (125). Gemcitabinas greičiausiai turi teigiamą poveikį NK ląstelėms (224), šis efektas susidaro ir esant kitų lokalizacijų navikams, pavyzdžiui, plaučių (193). FOLFIRINOX poveikis šiai populiacijai dar nėra aiškus. Mums pavyko aptikti jų įtaką IBPL pažengusios-metastazavusios ligos grupėje vertinant visus pacientus ir tiriant FOLFIRINOX gydytus atskirai. Įdomu, kad operabilios ligos atveju NK CD3-CD56+CD16- kiekis buvo susijęs su KMI: ląstelių mažiau aptikta esant didesniai indeksui. Literatūros duomenimis, vaikų, sergančių nutukimu, NK ląstelės buvo aktyvuotos, metaboliškai pakitusios ir jų funkcija sutrikusi – jos negebėjo reaguoti į stimulus (225). Be to, jau žinomi mechanizmai, kaip NK ląstelių subpopuliacijos, pasiskirstymas, fenotipas, citokinų išskyrimas ir citotoksiškumas susiję su nutukimu ir kaip šie faktoriai vienas kitą papildo vystantis vėžiui (226).

Citotoksiniai T limfocitai ypač svarbūs PDAK mikroaplinkoje ir jų pagausėjimas yra geros prognozės ženklas. Mūsų tyrime aptiktas skaičiaus didėjimas po dviejų mėnesių bendroje populiacijoje ir operacinėje grupėje, kartojant tyrimą vėliau, tokio augimo nebuvo matyti. Tai rodytų ypatingą teigiamą operacinio gydymo įtaką šių ląstelių aktyvumui. Juolab kad gemcitabino įtaka CD3+CD8+ ląstelių kiekiui neaiški (227). Oksaliplatinos kombinacijos citotoksinių T ląstelių kiekį skrandžio TMA padidino (228). Analizuodami limfocitų subpopuliacijas pažengusios ir metastazavusios

ligos grupėje nustatėme, kad CD3+CD8+ ląstelių kiekis prieš gydymą buvo itin reikšmingas IBPL ir BI. Būtent CD3+CD8+CD57– buvo reikšmingi, o CD3+CD8+CD57+ ne. Mažas CD3+CD8+CD57– ląstelių skaičius prieš gydymą rodė blogesnę prognozę visoje studijos populiacijoje ir įvairiose subgrupėse. Cirkuliuojančių CD3+CD8+CD57– ląstelių prognostinė vertė nepriklausė nuo metastazių buvimo ir ligos agresyvumo (diferenciacijos laipsnio). Dėl mažo pacientų skaičiaus sunku atsekti chemoterapijos įtaką šių ląstelių pokyčiams ir pacientų prognozei. Visgi galime teigti, kad įvairūs gydymo režimai keičia pacientų, kurių pradinė CD3+CD8+CD57– vertė maža, prognozę šios subpopuliacijos vaidmuo gali būti predikcinis šiuolaikinės chemoterapijos eroje.

Tumoro infiltracija citotoksinėmis CD3+CD8+ ląstelėmis vėžiu sergantiesiems laikoma geros prognozės faktoriumi. Tai patvirtina nemažai pastarųjų metų studijų (227, 229, 230). O PDAK srityje atlikta metaanalizė atskleidė teigiamą CD3+ ir reikšmingą CD8+ ląstelių išsidėtymo naviko centre įtaką (165). Cirkuliuojančių CD3+CD8+ subpopuliacijų prognostinė vertė nėra aiški, bet pastaruoju metu, kai į areną ateina vis naujų priešvėžinių imunoterapijos klasės vaistų, susidomėjimas ja didėja (168, 204, 231, 232). Taigi CD8+ T ląstelės vaidina svarbų vaidmenį formuojantis įgytam priešvėžiniam imunitetui (232).

CD8+ citotoksinės T ląstelės yra pagrindiniai įgyto imuniteto aktyvinantys veiksniai ir jų vykdomi vėžiui specifiniai imuniniai atsakai įvardijami kaip pagrindiniai visų imunoterapijos preparatų taikiniai. CD8+ T ląstelių disfunkcija apima daug aspektų: toleranciją, anergiją, išsekimą ir senėjimą. T ląstelių senėjimas apibūdinamas kaip sumažėjusi CD28 ir padidėjusi CD57 antigenų ekspresija (173). Keletas šaltinių teigia, kad CD8+CD28– ir CD8+CD57+ T ląstelių subpopuliacijų lygis kyla periferiniame kraujyje ir TMA tiek solidinių, tiek hematologinių onkologinių ligų atveju (233). Mums nepavyko įrodyti neigiamos CD8+CD57+ T limfocitų įtakos PDAK pacientų išgyvenimui. Visgi CD8+CD57– T limfocitų periferiniame kraujyje prognostinė vertė leidžia teigti, kad nesenstantys T limfocitai yra lemiantys vėžio kontrolę pažengusios ir metastazavusios PDAC pacientams. Taigi T limfocitų senėjimo stabdymas tam, kad kontroliuotume kasos vėžio vystymąsi, gali labai praversti kuriant naujas gydymo strategijas (173). CD3+CD8+ ir CD8+CD57– kiekis buvo prognostiškai reikšmingas ir gemcitabino monoterapijos, ir FOLFIRINOX. Įdomu, kad pacientai, kurių pradinės šių ląstelių vertės buvo itin mažos, išgyveno ilgiau, kai buvo gydyti gemcitabinu. Gemcitabino įtaka *in vitro* buvo tiriama (168), bet apie imunostimuliaciją *in vivo* aiškių duomenų nėra. mFOLFIRINOX imunostimuliaciniai ar imunosupresiniai efektai juolab

nėra aiškūs ir plačiai studijuojami, nors neoadjuvantiniu tikslu skiriamas šis režimas parodė gebėjimą padidinti TMA infiltraciją CD8+ ląstelėmis (234, 235). Mūsų duomenimis, galime spėti, kad gemcitabinas geriau stimuliuoja CD8+CD57– skaičiaus didėjimą ir per tai gerina paciento išgyvenamumą.

Operacinės grupės pacientų išgyvenamumui nei CD3+CD8+ bendrai nei 57+/- subpopuliacijos atskirai jokios įtakos neturėjo, bet CD3+CD8+CD57– ląstelių reikšmingai sumažėja po operacijos.

Kai kurios studijos parodė, jog T reguliacinių limfocitų periferiniame kraujyje ir TMA PDAK sergantiems daugėja (236) ir tai blogina prognozę (237). Chemoterapija cisplatinos / gemcitabino pagrindu gali mažinti CD4+CD25+FOXP3+ kiekį sergantiems nesmulkiaūstelinio plaučių vėžiu (188). FOLFIRINOX režimas PDAK pacientams mažina T reguliacinių (FoxP3+) ląstelių tankį (234). Mūsų studija patvirtina T reguliacinių ląstelių sumažėjimą gydymo metu bendroje populiacijoje, daugiau pakrinta per pirmus du mėnesius. Ta pati mažėjimo tendencija stebėta ir operabilių bei neoperuotų pogrupiuose atskirai.

Neoperuotų pacientų grupėje pirmo vizito T reguliacinių CD4+FOXP3+ kiekis buvo reikšmingas, tačiau tik BI bendroje populiacijoje, G3 navikų grupėje. Tai leidžia manyti, kad šių ląstelių įtaka priklauso nuo tokių faktorių kaip bloga diferenciacija ir nėra savarankiškas prognostinis faktorius.

Operuotųjų šakoje reguliaciniai limfocitai CD4+CD25+CD127+/- bei CD4+FoxP3 buvo susiję su pacientų amžiumi, vyresniems jų kiekis buvo mažesnis, tačiau išgyvenamumo analizėje įtakos nebuvo išvelgta.

Analizuojant operacinio gydymo pacientų šaką, nustatyta CD8+ reguliacinių limfocitų pokyčiai ir reikšmė išgyvenamumui. Pirmiausia CD8+CD25+Foxp3+ aprašyti kaip pavienių CD8+ timocitų subpopuliacija, fenotipu ir funkciškai panaši į CD4+ reguliacinius limfocitus. Manoma, kad jie gali slopinti imuninę sistemą nespecifiškai arba antigenai specifiškai (virusinių, alogeninių antigenų) per ląstelių kontaktą. 2007 m. naudojantis konfokaline mikroskopija nustatytos prostatos vėžio TMA. 2009 m. studijoje, kurioje dalyvavo 40 žarnyno vėžiu sergančių pacientų, nustatytas padidėjęs CD8+CD25+Foxp3+ kiekis periferiniame kraujyje ir vėžio audinyje, palyginti su sveikais tiriamaisiais, ryšys su naviko stadija, o izoliavus T8reg ląsteles iš audinių *ex vivo* nustatytas jų gebėjimas slopinti autologinių CD4+CD25– T ląstelių proliferaciją ir Th1 produkciją (238). Periferinių CD8+CD25^{šviesios}FOXP3+ T limfocitų kiekis HCC sergančiųjų kraujyje taip pat padidėjęs ir FOXP3 ekspresija CD8+CD25^{šviesios} T ląstelėse yra didesnė nei CD8+CD25^{blankios} bei CD8+CD25^{neigiamos} T ląstelėse (239). Taigi šiuo metu laikoma, kad CD8+ Treg limfocitų fenotipui būdinga didelė IL-2 receptoriaus α grandinės C25 ir CD122 (IL-2, IL-15 receptorių β

grandinių), adhezijos molekules CD103, ektoenzimų CD39 bei CD73, inhibicijos receptorių CD152, CTLA-4, MHC-II-prisijungiančios molekules LAG-3, bei apopotozę skatinančios molekules FasL ekspresija. Be to, CD8+ T reguliaciniai limfocitai gali ekspresuoti ir tirpiai FoxP3, IFN- γ , IL-10, IL-34, IL-35 molekules. Reguliacinės funkcijos įvykdomos naudojantis keliais mechanizmais: skatinama tiesioginė taikininės ląstelės mirtis, neigiamų signalų per CTLA-4 ar PD1 perdavimas antigeną prezentuojančiai ląstelei, imunosupresinių citokinių IL-10 ir TGF- β išskyrimas (240). Supresinis poveikis CD4⁺ ir CD8⁺ efektoriniams T limfocitams naudingas transplanto prieš šeiminką bei autoimuninių ligų atvejais, o vėžio atveju slopinant šią populiaciją būtų galima keisti ligos eigą (241).

Literatūros duomenų apie šių ląstelių reikšmę kasos vėžiui nėra. Mūsų analizė atmeta CD8+CD25+CD127+/- ryšį su ligos išplitimu operuotųjų grupėje, bet pagrindžia jų reikšmę, kaip nepriklausomo faktoriaus BI. O tai, kad ligos metu jų sumažėja būtent chemoterapijų grupėse (FOLFIRINOX ir gemcitabino vertinant atskirai, sumažėjimas reikšmingas) parodo ir predikcinę reikšmę. Toks operacijos poveikis CD8+CD28- skaičiui nustatytas ir nesmulkią ląstelinio plaučių vėžiu sergantiems pacientams (242). Ypač reikšmingą CD8+CD25+CD127+/- skaičiaus įtaką FOLFIRINOX šakoje galima paaiškinti didesniu chemoterapijos veiksmingumu pacientams, kurių imuninė sistema slopinama mažiau.

Pastaruoju metu aprašomas ir į NK ląsteles panašių CD3+CD56+ vaidmuo vystantis vėžiui. Aptiktas jų padidėjimas HCC pacientams po stereotaktinės radioterapijos ir didesnis kiekis lėmė geresnę prognozę (196). Į NK ląsteles panašių PD-L1 ekspresija netgi gali būti laikoma potencialiu imunoterapijos taikiniu (242). Šios subpopuliacijos ląstelių daugėja kolorektiniu vėžiu sergantiems pacientams po operacijos (169). Procentinė į NK panašių CD16+ ląstelių raiška mėginiuose, paimtuose prieš operaciją, parodė trumpesnę išgyvenamumą neprogresuojant ligai (198). Skrandžio vėžiu sergantiesiems mažas šios subpopuliacijos ląstelių kiekis susijęs su blogu išgyvenamumu (199). Duomenų apie CD3+CD56+ ląstelių svarbą PDAK nėra. Mes nustatėme, kad gydymo metu jų kiekis reikšmingai kinta: padidėja po dviejų mėnesių gydymo visoje studijos populiacijoje ir neoperuotųjų šakoje, bet operacinėje grupėje – ne. Tai galėtų rodyti slopinančią naviko masės įtaką arba stimuliuojantį chemoterapijos poveikį. Įtakos išgyvenamumui nė vienoje studijos grupėje apčiuopti nepavyko.

Absolūtus limfocitų skaičius gali būti laikomas prognostiniu faktoriumi PDAK pacientams, tačiau duomenys įvairialypiai (235). Turint šiuolaikines ištyrimo galimybes siekiama tiksliau apibūdinti, kuri iš subpopuliacijų lemia bendro limfocitų skaičiaus kitimus ir yra prognostiškai vertingiausia. Mūsų

tyrimo duomenimis, bendras absoliutus limfocitų skaičius reikšmingai keitėsi gydymo metu. Pažengusios ligos šakoje šis skaičius buvo reikšmingas IBPL rodikliui – mažesnės pradinės vertės lėmė greitesnį ligos progresavimą. Ankstyvo vėžio šakoje išvelgta absoliutaus limfocitų kiekio prieš gydymą koreliacija su CA 19-9, o įtakos išgyvenamumui nenustatyta.

Operuotų pacientų patloginė medžiaga ištirta tumoro ir stromos santykio aspektu ir nustatytas ryšys tik su cirkuliuojančiais B limfocitais bei skirtumai tarp G2 ir G3 diferenciacijos laipsnių. Tumoro ir stromos santykis itin plačiai nagrinėjamas įvairių solidinių navikų studijose, tyrimo būdai varijuoja, standartizuoto metodo kol kas nėra ir prognostinė, predikcinė vertė dar turi būti tikslinama. 2019 m. 95 pacientų operacinėje PDAK medžiagoje, tumoro ir stromos santykį vertinant invazyvioje naviko dalyje, pacientus suskirsčius į dvi grupes, ryšio su dydžiu, stadija ir įtakos išgyvenamumo rodikliams negauta. Ryšio su periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijomis nebuvo tirta (243). TMA ir cirkuliuojančius imuninės sistemos komponentus, jų sąveiką bandoma tirti ir kitų vėžio lokalizacijų pacientams (204), tačiau tyrimai pavieniai, imtys mažos.

HCC atveju būtent mažesnis stromos kiekis lėmė geresnį išgyvenamumą po kepenų rezekcijos ar transplantacijos (140). Labai mažas tumoro ir stromos santykio paradoksinis efektas IBPL gali būti nulemtas imunogeninių ar kitų stromos savybių ankstyvuose navikuose, nors apskritai stromos vyravimas laikomas imunosupresiniu ir naviką palaikančiu faktoriumi (244). Minėtos cirkuliuojančios B ląstelės tiesioginės įtakos išgyvenamumui neturi, bet jų poveikis TMA gali būti reikšmingas (131).

Dauguma pastarųjų metų studijų tyrė tumorą infiltruojančių limfocitų aktyvumą, buvo retrospektyvinės, apsiribojo mažesniu pacientų skaičiumi ar susikoncentravo į vieną žymenį. Mes norėjome ištirti, ar imuninės sistemos būklė, kurią atspindi periferinio kraujo limfocitų aktyvumas, turi įtakos priešvėžinio gydymo efektyvumui, ar operacija, chemoterapija keičia vėžiu sergančių pacientų imuninės sistemos būklę. Žinoma, nors periferinio kraujo rodiklius galima lengvai įvertinti, jie gali neatspindėti tumoro aplinkos ypatybių.

Įrodėme, kad kai kurių limfocitų subtipų ląstelių kiekis gydymo metu kinta, tačiau tie pokyčiai nėra reikšmingi IBPL ir BI. Nustatyta kai kurių limfocitų subtipų prieš bet kokį gydymą įtaka išgyvenamumo rodikliams tiek ankstyvos, tiek pažengusios ligos grupėse, gydant šiandien pripažintais operacinio ir sisteminio gydymo metodais. Tai yra vienintelė studija, nagrinėjanti dviejų chemoterapijos režimų ryšį su imuninės sistemos pokyčiais ir viena iš nedaugelio sprendžiančių apie FOLFIRINOX režimo svarbą imuninei sistemai. Gauti duomenys gali būti panaudoti kuriant naujus

sisteminio gydymo metodus, kur CD8+CD25+ ląstelių kiekio mažinimas, CD8+CD57– didinimas būtų potencialus imunoterapijos veikimo mechanizmas.

Mūsų studijos ribotumas yra maža ir heterogeniška kohorta, trumpi intervalai tarp kraujo mėginių ėmimo, randomizacijos nebuvimas, o tai jau iš karto iškreipia išgyvenamumo rezultatus. Randomizacija bent pagal amžių, funkcinę būklę patikslintų įtakos išgyvenamumui vertę. Ilgesni intervalai tarp vizitų galėtų atskleisti ilgalaikius chemoterapijos efektus imuninei sistemai. Neigiami imuninių ląstelių pokyčių įtakos išgyvenamumui rezultatai gali būti paaiškinami per maža imtimi. Taigi ateityje į tyrimus reikėtų įtraukti platesnį imuninių ląstelių spektrą, pabandyti ir pažengusios ligos grupės pacientų periferinio kraujo subpopuliacijų tyrimus susieti su TMA, įvertinti naujesnių chemopreparatų įtaką.

IŠVADOS

1. Po 2 mėn. gydymo (atlikus kasos rezekcijos operaciją ir pradėjus adjuvantinę chemoterapiją) periferiniame kraujyje reikšmingai padidėja citotoksinių CD3+CD8+ ląstelių ir sumažėja T reguliacinių CD4+FoxP3+, CD8+CD25+ kiekis bei CD4/CD8 santykis.
2. Kasos audinio tumoro ir stromos santykis neigiamai koreliuoja su cirkuliuojančių B CD19+ limfocitų kiekiu kraujyje prieš radikalią operaciją.
3. Po 2 mėn. gydymo tik sisteminė chemoterapija (pažengusios ligos grupėje) reikšmingai sumažėjo NK CD3-CD56+CD16+, CD3-CD56+CD16-, T reguliacinių CD4+FoxP3 ir padidėjo į NK panašių CD3+CD56+ ląstelių.
4. Nustatyti šie prognostiniai rodikliai:
 - a. operuotųjų grupėje mažesnė pradinė T reguliacinių CD8+CD25+CD127+/- vertė susijusi su geresniu bendroju išgyvenamumu;
 - b. mažas tumoro ir stromos santykis lemia geresnį išgyvenamumą neprogresuojant ligai;
 - c. pažengusios ligos (neoperuotų) grupėje didesnė pradinė CD8+CD57 – ląstelių vertė susijusi su geresniu išgyvenamumu neprogresuojant ligai ir bendroju išgyvenamumu.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Atsižvelgdami į šios disertacijos išvadas siūlytume šias praktines rekomendacijas.

Ligoniams prieš radikalią operaciją dėl kasos vėžio rekomenduotume atlikti CD8+CD25+ kiekio kraujo serume ir operacinėje medžiagoje tumoro ir stromos santykio tyrimą. Sprendžiant dėl adjuvantinio gydymo reikėtų atsižvelgti į šiuos du rodiklius ir esant itin dideliame, $> 0,5$ ląstelių/ μl , ir didesniame nei $0,1621405305$ tumoro ir stromos santykiui būtinai taikyti pooperacinę chemoterapiją. Pacientams prieš sisteminę pirmos eilės chemoterapiją reikėtų atlikti CD8+CD57- ląstelių tyrimą ir, esant itin mažam kiekiui, < 194 ląstelės/ μl , rekomenduoti gemcitabino monoterapiją ar jo kombinacinius režimus.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Su disertacijos tema susijusios publikacijos

1. Tulyte S, Characiejus D, Matuzeviciene R, Janiulioniene A, Radzevicius M, Zvirblis T, Sileikis A. The Effects of Treatment on Peripheral Blood Immune Cell Profile in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Anticancer Res.* 2022 Jun; 42(6):3067–3073. doi: 10.21873/anticancerres.15794. PMID: 35641268.
2. Skaiste Tulyte, Dainius Characiejus, Reda Matuzeviciene, Ausra Janiulioniene, Mantas Radzevicius, Elena Jasiunaite, Tadas Zvirblis, Audrius Sileikis, Prognostic value of circulating T-lymphocyte subsets in advanced pancreatic cancer patients treated with mFOLFIRINOX or gemcitabine, *International Immunopharmacology*, Volume 115, 2023, 109722, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109722>

Kitos publikacijos

3. Atkinson, Victoria, Sandhu, Shahneen, Hospers, Geke, Long, Georgina V, Aglietta, Massimo, Ferrucci, Pier F, Tulytė, Skaistė, Cappellini, Gian Carlo Antonini, Soriano, Virtudes, Ali, Sayed, Poprach, Alexandr, Česas, Alvydas, Rodriguez-Abreu, Delvys, Lau, Mike, de Jong, Egbert, Legenne, Philippe, Stein, Dara, King, Brianna, & van Thienen, Johannes V. (2020). Dabrafenib plus trametinib is effective in the treatment of BRAF V600-mutated metastatic melanoma patients: analysis of patients from the dabrafenib plus trametinib Named Patient Program (DESCRIBE II). *Melanoma Research*, 30(3), 261–267. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000654>
4. Atkinson, Victoria G, Quaglino, Pietro, Aglietta, Massimo, Del Vecchio, Michele, Depenni, Roberta, Consoli, Francesca, Bafaloukos, Dimitrios, Ferrucci, Pier Francesco, Tulytė, Skaistė, Krajsová, Ivana, Ascierto, Paolo A, Gueli, Rossana, Arance, Ana, Gogas, Helen, Banerjee, Hiya, Saliba, Teddy, de Jong, Egbert, & Neyns, Bart. (2021). A retrospective analysis of dabrafenib and/or dabrafenib plus trametinib combination in patients with metastatic melanoma to characterize patients with long-term benefit in the individual patient program (Describe III). *Cancers*, 13(10:2466), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cancers13102466>

5. Cesas A, Urbonas V, Tulyte S, Janciauskiene R, Liutkauskiene S, Grabauskyte I, Gaidamavicius I. Sequential treatment of metastatic renal cell carcinoma patients after first-line vascular endothelial growth factor targeted therapy in a real-world setting: epidemiologic, noninterventional, retrospective-prospective cohort multicentre study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023 Feb 27. doi: 10.1007/s00432-023-04645-x. Epub ahead of print. PMID: 36847839.
6. Cibulskaitė, Gabrielė, Stulpinas, Rokas, Poškus, Eligijus, Tulytė, Skaistė, & Mickys, Ugnius. (2022). Storosios žarnos navikas, kuriam būdingas dominuojantis neuroendokrininis imunofenotipas: kur baigiasi adenokarcinoma? *Lietuvos chirurgija*, 21(1), 56–64. <https://doi.org/10.15388/LietChirur.2022.21.58>
7. Tulytė, S., Ivanauskas, A., & Diglys, D. (2021). Sisteminis kepenų ląstelių karcinomos gydymas: klinikinių atvejų apžvalga. *Onkologija: Žurnalo „Internistas“ priedas. Vilnius: „Baltijos ir idėjų grupė“ ir partneriai*, 2021, Nr. 2 (29).
8. Skaistė Tulytė, Raminta Lukšaitė-Lukštė, Daugiadalykis požiūris gydant onkologines ligas: kasos vėžio atvejo pristatymas ir analizė. *Onkologija: Žurnalo „Internistas“ priedas. Vilnius: „Baltijos ir idėjų grupė“ ir partneriai*, 2022, Nr. 2 (31).

Pranešimai disertacijos tema

9. Prognostic and predictive value of circulating T lymphocytes in pancreatic ductal adenocarcinoma, S.Tulyte, 7th Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring Conference CITIM-2023, Vilnius, 2023.
10. Correlation of circulating lymphocytes and pancreatic cancer advancement, Skaiste Tulyte, Dainius Characiejus, Reda Matuzeviciene, Audrius Šileikis, 22nd EAA Congress – 15th ISGA Congress – 5th International Conference of Evolutionary Medicine, 2022, Vilnius.
11. Prognostic value of CD3CD8 T lymphocytes in advanced and metastatic PDAC, Skaiste Tulyte, Audrius Sileikis, stendinis pranešimas WCGI kongrese, 2022, Barselonoje.
12. Kasos vėžys: ar skiriasi nuo kitų vėžių? Kaunas 2021, hibridinė Lietuvos onkologų chemoterapeutų draugijos konferencija.
13. Could peripheral T cells predict treatment response in solid tumors during immunotherapy era, ESCCA, 2021, virtual conference

14. Evaluation of cellular immune response to treatment in pancreatic ductal adenocarcinoma by flow cytometry: single- center experience, ESCCA, 2021.
15. Chemotherapy related changes of peripheral blood lymphocytes in advanced and metastatic PDAC S. Tulyte , I. Tamulyte, D. Diglys, D. Characiejus, R. Matuzeviciene, A. Janiulioniene, T. Zvirblis, A. Sileikis, Volume 31 – Issue S4 – 2020, *Annals of Oncology*, S952.
16. Treatment-related response of T regulatory cells and cytotoxic lymphocytes in early PDAC S. Tulyte, I. Tamulyte, G. Jonuskiene, R. Matuzeviciene, A. Janiulioniene, A. Sileikis, Volume 31 – Issue S3 – 2020, *Annals of Oncology*, S129.
17. Circulating T cell subsets differ in PDAC patients at initial diagnosis and after two months of treatment: a single institution prospective study, S. Tulyte et al., *Annals of Oncology*, Volume 30, Issue Supplement_4, July 2019, mdz155. 136, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz155.136> Published: 02 July 2019.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Hu, J. X., Zhao, C. F., Chen, W. B., Liu, Q. C., Li, Q. W., Lin, Y. Y., & Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World journal of gastroenterology*, 27(27), 4298–4321. doi.org/10.3748/wjg.v27.i27.4298
2. Laura D. Wood, Marcia Irene Canto, Elizabeth M. Jaffee, Diane M. Simeone, Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment, *Gastroenterology*, Volume 163, Issue 2, 2022, Pages 386–402.e1, ISSN 0016-5085, doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056
3. M. A. Tempero, M. P. Malafa, M. Al-Hawary, et al., Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, *J Natl Compr Canc Netw*, 19 (2021), pp. 439–457. doi: 10.6004/jnccn.2021.0017.
4. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, et al.; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Sep 8; 304(10):1073–1081. doi: 10.1001/jama.2010.1275.
5. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al.; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 20; 379(25):2395–2406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775.
6. Müller PC, Frey MC, Ruzza CM, Nickel F, Jost C, Gwerder C, Hackert T, Z'graggen K, Kessler U. Neoadjuvant Chemotherapy in Pancreatic Cancer: An Appraisal of the Current High-Level Evidence. *Pharmacology*. 2021; 106(3–4):143–153. doi: 10.1159/000510343.
7. Hackert, Thilo MD; Sachsenmaier, Milena; Hinz, Ulf MSc; Schneider, Lutz MD; Michalski, Christoph W. MD; Springfield, Christoph MD; Strobel, Oliver MD; Jäger, Dirk MD; Ulrich, Alexis MD; Büchler, Markus W. MD. Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Annals of Surgery* 264(3): 457–463, September 2016. doi: 10.1097/SLA.0000000000001850
8. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al.; Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997 Jun; 15(6):2403–2413. doi: 10.1200/JCO.1997.15.6.2403.
9. Ducreux, M. P., Desgrippes, R., Rinaldi, Y., et al. (2022). 1296MO PRODIGE 29-UCGI 26 (NEOPAN): A phase III randomised trial

- comparing chemotherapy with folfirinox or gemcitabine in locally advanced pancreatic carcinoma (LAPC). *Annals of Oncology*, 33, S1136.
10. Chen, J., Hua, Q., Wang, H., Zhang, D., Zhao, L., Yu, D., Pi, G., Zhang, T., & Lin, Z. (2021). Meta-analysis and indirect treatment comparison of modified FOLFIRINOX and gemcitabine plus nab-paclitaxel as first-line chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *BMC cancer*, 21(1), 853. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08605-x>
 11. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, et al.; NAPOLI-1 Study Group. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016 Feb 6; 387(10018):545–557. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00986
 12. Golan T, Hammel P, Reni M, et al.; Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Jul 25; 381(4):317–327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387.
 13. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al.; Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol*. 2020 Feb; 21(2):271–282. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30691-6.
 14. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2018 Feb; 182:80–94. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
 15. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol*. 1990 Apr; 85(4):350–355. PMID: 2183589.
 16. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 867:247–260. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_15.
 17. Steele NG, Carpenter ES, Kemp SB, et al.; Multimodal Mapping of the Tumor and Peripheral Blood Immune Landscape in Human Pancreatic Cancer. *Nat Cancer*. 2020 Nov; 1(11):1097–1112. doi: 10.1038/s43018-020-00121-4.
 18. Van der Sijde F, Mustafa DAM, Vietsch EE, Katsikis PD, van Eijck CHJ. Circulating Immunological Biomarkers: Prognosis of Pancreatic Cancer Patients Reflected by the Immune System. *Pancreas*. 2021 Aug 1; 50(7):933–941. doi: 10.1097/MPA.0000000000001862.
 19. Hackeng, W.M., Hruban, R.H., Offerhaus, G.J.A. et al. Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms. *Diagn Pathol* 11, 47 (2016). doi.org/10.1186/s13000-016-0497-z
 20. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and

- prevalence worldwide in 2020. [homepage on the internet]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
21. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(44):9694–9705. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
 22. Kurlinkus. (2022). Kasos adenokarcinomos diagnostinių ir prognostinių biožymenų paieška [Vilniaus universitetas. Prieiga per eLABa – nacionalinė Lietuvos akademinė elektroninė biblioteka]. <https://doi.org/10.15388/vu.thesis.270>
 23. Siegel, RL, Miller, KD, Fuchs, HE, Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022. doi.org/10.3322/caac.21708
 24. Lietuvos vėžio registras, <https://www.nvi.lt/uploads/pdf/Vezio%20registras/V%C4%97%C5%BEys%20Lietuvoje%202017.pdf>
 25. Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326(9), 851–862. doi.org/10.1001/jama.2021.13027
 26. Walter FM, Mills K, Mendonça SC, Abel GA, Basu B, Carroll N, Ballard S, Lancaster J, Hamilton W, Rubin GP, Emery JD. Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016 Dec; 1(4):298–306. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30079-6.
 27. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J*. 2017 Nov/Dec; 23(6):333–342. doi: 10.1097/PPO.000000000000290.
 28. Ducreux, A. Sa. Cuhna, C. Caramella, et al.; Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, Volume 26, Supplement 5, 2015, Pages v56-v68, ISSN 0923-7534, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv295>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419471780>)
 29. Maithel SK, Maloney S, Winston C, Gönen M, D'Angelica MI, Dematteo RP, Jarnagin WR, Brennan MF, Allen PJ. Preoperative CA 19-9 and the yield of staging laparoscopy in patients with radiographically resectable pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008 Dec; 15(12):3512–3520. doi: 10.1245/s10434-008-0134-5.
 30. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley JW, Kamel I, Nio Y, Schulick RS, Bassi C, Kluijft I, Levy MJ, Chak A, Fockens P, Goggins M, Bruno M; International Cancer of Pancreas Screening (CAPS) Consortium. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*. 2013 Mar; 62(3):339–347. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303108.

31. Lennon AM, Hruban RH, Klein AP. Screening for Pancreatic Cancer-Is There Hope? *JAMA Intern Med.* 2019 Oct 1; 179(10):1313–1315. doi: 10.1001/jamainternmed.2019.3323.
32. Younan G. Pancreas Solid Tumors. *Surg Clin North Am.* 2020 Jun; 100(3):565–580. doi: 10.1016/j.suc.2020.02.008.
33. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004 Mar 27; 363(9414):1049–1057. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15841-8.
34. Bachmann, J., Michalski, C. W., Martignoni, M. E., Büchler, M. W., & Friess, H. (2006). Pancreatic resection for pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 8(5), 346–351. doi.org/10.1080/13651820600803981
35. Gumbs AA, Rodriguez Rivera AM, Milone L, Hoffman JP. Laparoscopic pancreatoduodenectomy: a review of 285 published cases. *Ann Surg Oncol.* 2011 May; 18(5):1335–1341. doi: 10.1245/s10434-010-1503-4.
36. Brunner M, Krautz C, Maak M, Weber GF, Grützmann R. Pylorus-erhaltende partielle Pankreatoduodenektomie mit segmentaler Pfortaderresektion [Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy (PPPD) with Segmental Portal Vein Resection]. *Zentralbl Chir.* 2022 Jun;147(3):233-241. German. doi: 10.1055/a-1528–7927.
37. Masuda T, Dann AM, Elliott IA, Baba H, Kim S, Sedarat A, Muthusamy VR, Girgis MD, Joe Hines O, Reber HA, Donahue TR. A Comprehensive Assessment of Accurate Lymph Node Staging and Preoperative Detection in Resected Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2018 Feb; 22(2):295–302. doi: 10.1007/s11605-017-3607-7.
38. Aysal A, Agalar C, Cagaptay S, Safak T, Egeli T, Ozbilgin M, Unek T, Unek T, Sagol O. The Site of Lymph Node Metastasis: A Significant Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Turk Patoloji Derg.* 2022; 38(3):284–291. English. doi: 10.5146/tjpath.2022.01583.
39. Wei K, Hackert T. Surgical Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Apr 20; 13(8):1971. doi: 10.3390/cancers13081971.
40. Zhou Y, Liao S, You J, Wu H. Conversion surgery for initially unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma following induction therapy: a systematic review of the published literature. *Updates Surg.* 2022 Feb; 74(1):43–53. doi: 10.1007/s13304-021-01089-1.
41. Alva-Ruiz R, Yohanathan L, Yonkus JA, et al., Neoadjuvant Chemotherapy Switch in Borderline Resectable/Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2022 Mar; 29(3):1579–1591. doi: 10.1245/s10434-021-10991-2.
42. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al.; European Study Group for Pancreatic Cancer. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine

- with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Mar 11; 389(10073):1011–1024. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6.
43. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 2000 Nov-Dec; 4(6):567–579. doi: 10.1016/s1091-255x(00)80105-5.
 44. Holm MB, Verbeke CS. Prognostic Impact of Resection Margin Status on Distal Pancreatectomy for Ductal Adenocarcinoma. *Curr Oncol*. 2022 Sep 14; 29(9):6551–6563. doi: 10.3390/currenol29090515.
 45. Buss EJ, Kachnic LA, Horowitz DP. Radiotherapy for locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol*. 2021 Feb; 48(1):106–110. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.005.
 46. Versteijne E, Suker M, Groothuis K, et al.; Dutch Pancreatic Cancer Group. Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 1; 38(16):1763–1773. doi: 10.1200/JCO.19.02274.
 47. Katz MHG, Shi Q, Meyers J, et al. Efficacy of Preoperative mFOLFIRINOX vs mFOLFIRINOX Plus Hypofractionated Radiotherapy for Borderline Resectable Adenocarcinoma of the Pancreas: The A021501 Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2022 Sep 1; 8(9):1263–1270. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.2319.
 48. Janssen QP, van Dam JL, Bonsing BA, et al.; Dutch Pancreatic Cancer Group. Total neoadjuvant FOLFIRINOX versus neoadjuvant gemcitabine-based chemoradiotherapy and adjuvant gemcitabine for resectable and borderline resectable pancreatic cancer (PREOPANC-2 trial): study protocol for a nationwide multicenter randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2021 Mar 23; 21(1):300. doi: 10.1186/s12885-021-08031-z. PMID: 33757440; PMCID: PMC7989075.
 49. Conroy T, Castan F, Lopez A, et al.; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2022 Nov 1; 8(11):1571–1578. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.3829.
 50. Juan Bellido Luque, Angel Nogales Muñoz, *Recent Innovations in Surgical Procedures of Pancreatic Neoplasms*, Springer Cham, eBook ISBN978-3-031-21351-9 Published: 29 April 2023, p. 148, doi.org/10.1007/978-3-031-21351-9

51. Timmer FEF, Geboers B, Nieuwenhuizen S, Schouten EAC, Dijkstra M, de Vries JJJ, van den Tol MP, Meijerink MR, Scheffer HJ. Locoregional Treatment of Metastatic Pancreatic Cancer Utilizing Resection, Ablation and Embolization: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 31; 13(7):1608. doi: 10.3390/cancers13071608.
52. Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 20; 25(18):2607–15. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2551.
53. Rivera F, López-Tarruella S, Vega-Villegas ME, Salcedo M. Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev*. 2009 Jun; 35(4):335–339. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.11.007.
54. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12; 364(19):1817–1825. doi: 10.1056/NEJMoa1011923.
55. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Jan 31; 107(2):dju413. doi: 10.1093/jnci/dju413.
56. O'Reilly EM, Lee JW, Zalupski M, et al. Randomized, Multicenter, Phase II Trial of Gemcitabine and Cisplatin With or Without Veliparib in Patients With Pancreas Adenocarcinoma and a Germline BRCA/PALB2 Mutation. *J Clin Oncol*. 2020 May 1; 38(13):1378–1388. doi: 10.1200/JCO.19.02931.
57. Fazio N. Cisplatin Plus Gemcitabine as Standard of Care for Germline BRCA/PALB2-Mutated Pancreatic Adenocarcinoma: Are We Moving Too Fast? *J Clin Oncol*. 2020 Jul 20; 38(21):2466–2467. doi: 10.1200/JCO.20.00419.
58. Lambert, A., Schwarz, L., Borbath, I., Henry, A., Van Laethem, J. L., Malka, D., Ducreux, M., & Conroy, T. (2019). An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Therapeutic advances in medical oncology*, 11, 1758835919875568. <https://doi.org/10.1177/1758835919875568>
59. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2007 May 20; 25(15):1960-6. doi: 10.1200/JCO.2006.07.9525.

60. Bao K, Li X, He X, Jian L. Pharmacoeconomic Evaluation of Erlotinib for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Clin Ther.* 2021 Jun;43(6):1107-1115. doi: 10.1016/j.clinthera.2021.04.012.
61. Shroff RT, Hendifar A, McWilliams RR, et al.; Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious BRCA Mutation. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018:PO.17.00316. doi: 10.1200/PO.17.00316.
62. Huffman, B. M., Ellis, H., Jordan, et al.; Emerging Role of Targeted Therapy in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers*, 14(24), 6223. <https://doi.org/10.3390/cancers14246223>
63. Parente P, Parcesepe P, Covelli C, Olivieri N, Remo A, Pancione M, Latiano TP, Graziano P, Maiello E, Giordano G. Crosstalk between the Tumor Microenvironment and Immune System in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Potential Targets for New Therapeutic Approaches. *Gastroenterol Res Pract.* 2018 Dec 18; 2018:7530619. doi: 10.1155/2018/7530619.
64. Klemm F, Joyce JA. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* 2015 Apr; 25(4):198–213. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.006. Epub 2014 Dec 22.
65. Zeng S, Pöttler M, Lan B, Grützmann R, Pilarsky C, Yang H. Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 11; 20(18):4504. doi: 10.3390/ijms20184504.
66. Xiong G, Feng M, Yang G, Zheng S, Song X, Cao Z, You L, Zheng L, Hu Y, Zhang T, Zhao Y. The underlying mechanisms of non-coding RNAs in the chemoresistance of pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2017 Jul 1; 397:94–102. doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.020.
67. Qin C, Yang G, Yang J, Ren B, Wang H, Chen G, Zhao F, You L, Wang W, Zhao Y. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies. *Mol Cancer.* 2020 Mar 2; 19(1):50. doi: 10.1186/s12943-020-01169-7.
68. Fujimura Y, Ikenaga N, Ohuchida K, Setoyama D, Irie M, Miura D, Wariishi H, Murata M, Mizumoto K, Hashizume M, Tanaka M. Mass spectrometry-based metabolic profiling of gemcitabine-sensitive and gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 2014 Mar; 43(2):311–318. doi: 10.1097/MPA.0000000000000092.
69. Zhao H, Duan Q, Zhang Z, Li H, Wu H, Shen Q, Wang C, Yin T. Up-regulation of glycolysis promotes the stemness and EMT phenotypes in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2017 Sep; 21(9):2055–2067. doi: 10.1111/jcmm.13126.
70. Ma T, Chen W, Zhi X, Liu H, Zhou Y, Chen BW, Hu L, Shen J, Zheng X, Zhang S, Zhang B, Li H, Liang T. USP9X inhibition improves

- gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting autophagy. *Cancer Lett.* 2018 Nov 1; 436:129–138. doi: 10.1016/j.canlet.2018.08.010.
71. Xian G, Zhao J, Qin C, Zhang Z, Lin Y, Su Z. Simvastatin attenuates macrophage-mediated gemcitabine resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the TGF- β 1/Gfi-1 axis. *Cancer Lett.* 2017 Jan 28; 385:65–74. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.006.
 72. Weizman N, Krelin Y, Shabtay-Orbach A, Amit M, Binenbaum Y, Wong RJ, Gil Z. Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene.* 2014 Jul 17; 33(29):3812–3819. doi: 10.1038/onc.2013.357.
 73. Zhao X, Li Z, Gu Z. A new era: tumor microenvironment in chemoresistance of pancreatic cancer. *J Cancer Sci Clin Ther.* 2022; 6(1):61–86. doi: 10.26502/jcsct.5079146.
 74. Nista EC, Del Gaudio A, Del Vecchio LE, Mezza T, Pignataro G, Piccioni A, Gasbarrini A, Franceschi F, Candelli M. Pancreatic Cancer Resistance to Treatment: The Role of Microbiota. *Biomedicines.* 2023 Jan 7; 11(1):157. doi: 10.3390/biomedicines11010157.
 75. Farshadi EA, Chang J, Sampadi B, Doukas M, Van 't Land F, van der Sijde F, Vietsch EE, Pothof J, Koerkamp BG, van Eijck CHJ. Organoids Derived from Neoadjuvant FOLFIRINOX Patients Recapitulate Therapy Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2021 Dec 1; 27(23):6602–6612. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1681.
 76. Mayers JR, Vander Heiden MG. Nature and Nurture: What Determines Tumor Metabolic Phenotypes? *Cancer Res.* 2017 Jun 15; 77(12):3131–3134. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0165.
 77. Chaika NV, Yu F, Purohit V, Mehla K, Lazenby AJ, DiMaio D, Anderson JM, Yeh JJ, Johnson KR, Hollingsworth MA, Singh PK. Differential expression of metabolic genes in tumor and stromal components of primary and metastatic loci in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One.* 2012; 7(3):e32996. doi: 10.1371/journal.pone.0032996.
 78. Halbrook CJ, Lyssiotis CA. Employing Metabolism to Improve the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell.* 2017 Jan 9; 31(1):5–19. doi: 10.1016/j.ccell.2016.12.006.
 79. Karasinska JM, Topham JT, Kalloger SE, et al.; Altered Gene Expression along the Glycolysis-Cholesterol Synthesis Axis Is Associated with Outcome in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020 Jan 1; 26(1):135–146. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1543.
 80. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017 Feb 8; 542(7640):177–185. doi: 10.1038/nature21363.

81. Peng X, Chen L, Jiao Y, Wang Y, Hao Z, Zhan X. Application of natural killer cells in pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2021 Sep; 22(3):647. doi: 10.3892/ol.2021.12908.
82. Huber M, Brehm CU, Gress TM, Buchholz M, Alashkar Alhamwe B, von Strandmann EP, Slater EP, Bartsch JW, Bauer C, Lauth M. The Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 3; 21(19):7307. doi: 10.3390/ijms21197307.
83. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, et al.; Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet.* 2015 Oct; 47(10):1168–1178. doi: 10.1038/ng.3398.
84. Bailey P, Chang DK, Nones K, et al.; Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* 2016 Mar 3; 531(7592):47–52. doi: 10.1038/nature16965.
85. Torres C, Grippo PJ. Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine. *Ann Med.* 2018 Jun;50(4):277–287. doi: 10.1080/07853890.2018.1453168.
86. Zhu YH, Zheng JH, Jia QY, Duan ZH, Yao HF, Yang J, Sun YW, Jiang SH, Liu DJ, Huo YM. Immunosuppression, immune escape, and immunotherapy in pancreatic cancer: focused on the tumor microenvironment. *Cell Oncol (Dordr).* 2023 Feb; 46(1):17–48. doi: 10.1007/s13402-022-00741-1.
87. Ullman NA, Burchard PR, Dunne RF, Linehan DC. Immunologic Strategies in Pancreatic Cancer: Making Cold Tumors Hot. *J Clin Oncol.* 2022 Aug 20; 40(24):2789–2805. doi: 10.1200/JCO.21.02616.
88. Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun; 144(6):1199–209.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.007.
89. Yang J, Li Y, Sun Z, Zhan H. Macrophages in pancreatic cancer: An immunometabolic perspective. *Cancer Lett.* 2021 Feb 1; 498:188–200. doi: 10.1016/j.canlet.2020.10.029.
90. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, et al.; Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 2012 Apr 27; 149(3):656–670. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.058.
91. Rajeshkumar NV, Dutta P, Yabuuchi S, et al.; Therapeutic Targeting of the Warburg Effect in Pancreatic Cancer Relies on an Absence of p53 Function. *Cancer Res.* 2015 Aug 15; 75(16):3355–3364. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0108.
92. Pandey S, Gupta VK, Lavania SP. Role of epigenetics in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Epigenomics.* 2023 Jan 17. doi: 10.2217/epi-2022-0177.

93. Lukosiute-Urboniene A, Mazeike A, Kazokaite M, Silkuniene G, Silkunas M, Barauskas V, Barauskas G, Gulbinas A, Dauksa A, Dambrauskas Z. Epigenetic Regulation of APAF-1 Through DNA Methylation in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2020 Jul; 40(7):3765–3779. doi: 10.21873/anticancer.14366.
94. Truong, L.-H.; Pauklin, S. Pancreatic Cancer Microenvironment and Cellular Composition: Current Understandings and Therapeutic Approaches. *Cancers* 2021, 13, 5028. <https://doi.org/10.3390/cancers13195028>
95. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan; 12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
96. Zhan HX, Zhou B, Cheng YG, Xu JW, Wang L, Zhang GY, Hu SY. Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett.* 2017 Apr 28; 392:83–93. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.041.
97. von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol.* 2017 Mar 28; 10(1):76. doi: 10.1186/s13045-017-0448-5.
98. Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al.; Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* 2019 Aug; 9(8):1102–1123. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094.
99. Ye L, Shi S, Chen W. Innate immunity in pancreatic cancer: Lineage tracing and function. *Front Immunol.* 2023 Jan 16; 13:1081919. doi: 10.3389/fimmu.2022.1081919.
100. Chang JH, Jiang Y, Pillarisetty VG. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: An updated review. *Medicine (Baltimore).* 2016 Dec; 95(49):e5541. doi: 10.1097/MD.0000000000005541.
101. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, et al.; Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity.* 2017 Aug 15; 47(2):323–338.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.014.
102. Bockorny B, Semenisty V, Macarulla T, et al.; BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial. *Nat Med.* 2020 Jun; 26(6):878–885. doi: 10.1038/s41591-020-0880-x.
103. Yang S, Liu Q, Liao Q. Tumor-Associated Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Origin, Polarization, Function, and Reprogramming. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 11; 8:607209. doi: 10.3389/fcell.2020.607209

104. Poh AR, Ernst M. Tumor-Associated Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Therapeutic Opportunities and Clinical Challenges. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 8; 13(12):2860. doi: 10.3390/cancers13122860.
105. Shi C, Washington MK, Chaturvedi R, et al.; Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction. *Lab Invest*. 2014 Apr; 94(4):409–421. doi: 10.1038/labinvest.2014.10.
106. Shi F, Sun MH, Zhou Z, Wu L, Zhu Z, Xia SJ, Han BM, Zhao YY, Jing YF, Cui D. Tumor-associated macrophages in direct contact with prostate cancer cells promote malignant proliferation and metastasis through NOTCH1 pathway. *Int J Biol Sci*. 2022 Oct 3; 18(16):5994–6007. doi: 10.7150/ijbs.73141.
107. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2011 May 15; 167(2):e211–219. doi: 10.1016/j.jss.2009.05.026.
108. Maertin S, Elperin JM, Lotshaw E, Sandler M, Speakman SD, Takakura K, Reicher BM, Mareninova OA, Grippo PJ, Mayerle J, Lerch MM, Gukovskaya AS. Roles of autophagy and metabolism in pancreatic cancer cell adaptation to environmental challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017 Nov 1; 313(5):G524–G536. doi: 10.1152/ajpgi.00138.2017.
109. Hegde S, Krisnawan VE, Herzog BH, et al.; Dendritic Cell Paucity Leads to Dysfunctional Immune Surveillance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Mar 16; 37(3):289–307.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2020.02.008.
110. Lin JH, Huffman AP, Wattenberg MM, Walter DM, Carpenter EL, Feldser DM, Beatty GL, Furth EE, Vonderheide RH. Type 1 conventional dendritic cells are systemically dysregulated early in pancreatic carcinogenesis. *J Exp Med*. 2020 Aug 3; 217(8):e20190673. doi: 10.1084/jem.20190673.
111. Plesca I, Benešová I, Beer C, et al.; Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 26; 14(5):1216. doi: 10.3390/cancers14051216.
112. Ammendola M, Currò G, Laface C, et al.; Mast Cells Positive for c-Kit Receptor and Tryptase Correlate with Angiogenesis in Cancerous and Adjacent Normal Pancreatic Tissue. *Cells*. 2021 Feb 19; 10(2):444. doi: 10.3390/cells10020444.
113. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of

- pancreatic cancer patients. *J Immunol Res.* 2014; 2014:879897. doi: 10.1155/2014/879897.
114. Siret C, Collignon A, Silvy F, Robert S, Cheyrol T, André P, Rigot V, Iovanna J, van de Pavert S, Lombardo D, Mas E, Martirosyan A. Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Immunol.* 2020 Jan 22; 10:3070. doi: 10.3389/fimmu.2019.03070.
115. Karakhanova S, Link J, Heinrich M, Shevchenko I, Yang Y, Hassenpflug M, Bunge H, von Ahn K, Brecht R, Mathes A, Maier C, Umansky V, Werner J, Bazhin AV. Characterization of myeloid leukocytes and soluble mediators in pancreatic cancer: importance of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology.* 2015 Jan 22; 4(4):e998519. doi: 10.1080/2162402X.2014.998519.
116. Nelson MA, Ngamcherdtrakul W, Luoh SW, Yantasee W. Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2021 Jun; 40(2):519–536. doi: 10.1007/s10555-021-09968-0. Epub 2021 May 7. PMID: 33963482; PMCID: PMC8424653.
117. Orhan A, Vogelsang RP, Andersen MB, Madsen MT, Hölmich ER, Raskov H, Gögenur I. The prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2020 Jun; 132:71–84. doi: 10.1016/j.ejca.2020.03.013.
118. Zhang Y, Lazarus J, Steele NG, et al.; Regulatory T-cell Depletion Alters the Tumor Microenvironment and Accelerates Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Discov.* 2020 Mar; 10(3):422–439. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0958.
119. Stromnes IM, Hulbert A, Pierce RH, Greenberg PD, Hingorani SR. T-cell Localization, Activation, and Clonal Expansion in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2017 Nov; 5(11):978–991. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0322.
120. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, Barua S, Wang H, Rao A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun.* 2017 Apr 27; 8:15095. doi: 10.1038/ncomms15095.
121. Fincham REA, Delvecchio FR, Goulart MR, Yeong JPS, Kocher HM. Natural killer cells in pancreatic cancer stroma. *World J Gastroenterol.* 2021 Jun 28; 27(24):3483–3501. doi: 10.3748/wjg.v27.i24.3483.
122. Marcon F, Zuo J, Pearce H, Nicol S, Margielewska-Davies S, Farhat M, Mahon B, Middleton G, Brown R, Roberts KJ, Moss P. NK cells in pancreatic cancer demonstrate impaired cytotoxicity and a regulatory IL-

- 10 phenotype. *Oncoimmunology*. 2020 Nov 19; 9(1):1845424. doi: 10.1080/2162402X.2020.1845424.
123. Huang Q, Huang M, Meng F, Sun R. Activated pancreatic stellate cells inhibit NK cell function in the human pancreatic cancer microenvironment. *Cell Mol Immunol*. 2019 Jan; 16(1):87–89. doi: 10.1038/s41423-018-0014-2.
124. Lim SA, Kim J, Jeon S, Shin MH, et al.; Defective Localization With Impaired Tumor Cytotoxicity Contributes to the Immune Escape of NK Cells in Pancreatic Cancer Patients. *Front Immunol*. 2019 Apr 9; 10:496. doi: 10.3389/fimmu.2019.00496.
125. Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, Brooks J, et al.; Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural Killer Cells. *Gastroenterology*. 2016 Aug; 151(2):338–350.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2016.05.004.
126. Mota Reyes C, Teller S, Muckenhuber A, Konukiewitz B, Safak O, Weichert W, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. Neoadjuvant Therapy Remodels the Pancreatic Cancer Microenvironment via Depletion of Protumorigenic Immune Cells. *Clin Cancer Res*. 2020 Jan 1; 26(1):220–231. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1864.
127. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15; 12(18):5423–5434. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0369.
128. Nasca V, Chiaravalli M, Piro G, Esposito A, Salvatore L, Tortora G, Corbo V, Carbone C. Intraductal Pancreatic Mucinous Neoplasms: A Tumor-Biology Based Approach for Risk Stratification. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 2; 21(17):6386. doi: 10.3390/ijms21176386.
129. Su KF, Peng Y, Yu HC. Prognostic value of regulator T cells in patients with pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Apr; 26(8):2906–2917. doi: 10.26355/eurrev_202204_28622.
130. Minici C, Testoni S, Della-Torre E. B-Lymphocytes in the Pathophysiology of Pancreatic Adenocarcinoma. *Front Immunol*. 2022 Mar 14; 13:867902. doi: 10.3389/fimmu.2022.867902.
131. Delvecchio FR, Goulart MR, Fincham REA, Bombadieri M, Kocher HM. B cells in pancreatic cancer stroma. *World J Gastroenterol*. 2022 Mar 21; 28(11):1088–1101. doi: 10.3748/wjg.v28.i11.1088.
132. Gaida MM, Steffen TG, Günther F, Tschaharganeh DF, Felix K, Bergmann F, Schirmacher P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated

- degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *Eur J Immunol*. 2012 Dec; 42(12):3369–3380. doi: 10.1002/eji.201242628.
133. Felix K, Gaida MM. Neutrophil-Derived Proteases in the Microenvironment of Pancreatic Cancer -Active Players in Tumor Progression. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 28; 12(3):302–313. doi: 10.7150/ijbs.14996.
 134. Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, Horng W, Fridlender G, Albelda SM, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology*. 2016 Sep 13; 5(11):e1232221. doi: 10.1080/2162402X.2016.1232221.
 135. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 18; 104(51):20262–20267. doi: 10.1073/pnas.0706438104.
 136. Galon J, Bruni D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity*. 2020 Jan 14; 52(1):55–81. doi: 10.1016/j.immuni.2019.12.018.
 137. Huang X, Zhang G, Liang T. Subtyping for pancreatic cancer precision therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2022 Jun; 43(6):482–494. doi: 10.1016/j.tips.2022.03.005.
 138. Bever KM, Sugar EA, Bigelow E, Sharma R, Laheru D, Wolfgang CL, Jaffee EM, Anders RA, De Jesus-Acosta A, Zheng L. The prognostic value of stroma in pancreatic cancer in patients receiving adjuvant therapy. *HPB (Oxford)*. 2015 Apr; 17(4):292–298. doi: 10.1111/hpb.12334.
 139. Kawahara K, Takano S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Ohtsuka M. The effect of the low stromal ratio induced by neoadjuvant chemotherapy on recurrence patterns in borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2022 Apr; 39(2):311–322. doi: 10.1007/s10585-021-10142-7.
 140. Lv Z, Cai X, Weng X, Xiao H, Du C, Cheng J, Zhou L, Xie H, Sun K, Wu J, Zheng S. Tumor-stroma ratio is a prognostic factor for survival in hepatocellular carcinoma patients after liver resection or transplantation. *Surgery*. 2015 Jul; 158(1):142–150. doi: 10.1016/j.surg.2015.02.013.
 141. Strous MTA, Faes TKE, Gubbels ALHM, van der Linden RLA, Mesker WE, Bosscha K, Bronkhorst CM, Janssen-Heijnen MLG, Vogelaar FJ, de Bruïne AP. A high tumour-stroma ratio (TSR) in colon tumours and its metastatic lymph nodes predicts poor cancer-free survival and chemo resistance. *Clin Transl Oncol*. 2022 Jun; 24(6):1047–1058. doi: 10.1007/s12094-021-02746-y.

142. Hagens SC, Vangangel KMH, Van Pelt GW, Karancsi Z, Tollenaar RAEM, Green AR, Rakha EA, Kulka J, Mesker WE. Standardization of the tumor-stroma ratio scoring method for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat.* 2022 Jun; 193(3):545–553. doi: 10.1007/s10549-022-06587-3.
143. Gartrell RD, Enzler T, Kim PS, Fullerton BT, Fazlollahi L, Chen AX, Minns HE, Perni S, Weisberg SP, Rizk EM, Wang S, Oh EJ, Guo XV, Chiuhan C, Manji GA, Bates SE, Chabot J, Schroppe B, Kluger M, Emond J, Rabadán R, Farber D, Remotti HE, Horowitz DP, Saenger YM. Neoadjuvant chemoradiation alters the immune microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology.* 2022 May 5; 11(1):2066767. doi: 10.1080/2162402X.2022.2066767.
144. Goedegebuure RSA, Harrasser M, de Klerk LK, et al.; Pre-treatment tumor-infiltrating T cells influence response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal adenocarcinoma. *Oncoimmunology.* 2021 Aug 4; 10(1):1954807. doi: 10.1080/2162402X.2021.1954807.
145. Hossain F, Al-Khami AA, Wyczechowska D, Hernandez C, Zheng L, Reiss K, Valle LD, Trillo-Tinoco J, Maj T, Zou W, Rodriguez PC, Ochoa AC. Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res.* 2015 Nov; 3(11):1236–1247. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0036.
146. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014 Sep 25; 513(7519):559–563. doi: 10.1038/nature13490.
147. Jin Y, Gong S, Shang G, Hu L, Li G. Profiling of a novel circadian clock-related prognostic signature and its role in immune function and response to molecular targeted therapy in pancreatic cancer. *Aging (Albany NY).* 2023 Jan 9; 15(1):119–133. doi: 10.18632/aging.204462.
148. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016 May; 16(5):275–287. doi: 10.1038/nrc.2016.36.
149. Hopkins AC, Yarchoan M, Durham JN, Yusko EC, Rytlewski JA, Robins HS, Laheru DA, Le DT, Lutz ER, Jaffee EM. T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma. *JCI Insight.* 2018 Jul 12; 3(13):e122092. doi: 10.1172/jci.insight.122092.

150. Robatel S, Schenk M. Current Limitations and Novel Perspectives in Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 16; 14(4):985. doi: 10.3390/cancers14040985.
151. Yeo D, Giardina C, Saxena P, Rasko JEJ. The next wave of cellular immunotherapies in pancreatic cancer. *Mol Ther Oncolytics*. 2022 Feb 1; 24:561–576. doi: 10.1016/j.omto.2022.01.010.
152. Feng M, Xiong G, Cao Z, Yang G, Zheng S, Song X, You L, Zheng L, Zhang T, Zhao Y. PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2017 Oct 28; 407:57–65. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.006.
153. Zhang J, Wolfgang CL, Zheng L. Precision Immuno-Oncology: Prospects of Individualized Immunotherapy for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Jan 30; 10(2):39. doi: 10.3390/cancers10020039.
154. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Mar; 18(3):197–218. doi: 10.1038/s41573-018-0007-y.
155. Safi F, Roscher R, Bittner R, Schenkluhn B, Dopfer HP, Beger HG. High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas*. 1987; 2(4):398–403. doi: 10.1097/00006676-198707000-00006.
156. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 867:247–260. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_15.
157. Huang Z, Liu F. Diagnostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Aug; 35(8):7459–7465. doi: 10.1007/s13277-014-1995-9.
158. O'Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 14; 27(26):4045–4087. doi: 10.3748/wjg.v27.i26.4045.
159. DiPeri TP, Newhook TE, Prakash LR, Ikoma N, Maxwell JE, Kim MP, Lee JE, Katz MHG, Tzeng CD. Prognostic significance of preoperative and postoperative CA 19-9 normalization in pancreatic adenocarcinoma treated with neoadjuvant therapy or surgery first. *J Surg Oncol*. 2022 Nov; 126(6):1021–1027. doi: 10.1002/jso.26989.
160. Hartlapp I, Valta-Seufzer D, Siveke JT, et al.; German Pancreatic Cancer Group (AIO-PAK) and NEOLAP investigators. Prognostic and predictive value of CA 19-9 in locally advanced pancreatic cancer treated with multiagent induction chemotherapy: results from a prospective, multicenter phase II trial (NEOLAP-AIO-PAK-0113). *ESMO Open*. 2022 Aug; 7(4):100552. doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100552.

161. Kurlinkus, B.; Ger, M.; Kaupinis, A.; Jasiunas, E.; Valius, M.; Sileikis, A. CEACAM6's Role as a Chemoresistance and Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer: A Comparison of CEACAM6's Diagnostic and Prognostic Capabilities with Those of CA19-9 and CEA. *Life* 2021, *11*, 542. <https://doi.org/10.3390/life11060542>.
162. Dayimu A, Di Lisio L, Anand S, Roca-Carreras I, Qian W, Al-Mohammad A, Basu B, Valle JW, Jodrell D, Demiris N, Corrie P. Clinical and biological markers predictive of treatment response associated with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2023 Feb 22. doi: 10.1038/s41416-023-02170-9.
163. Xing Y, Zhang X, Qin F, Yang J, Ai L, Wang Q, Zhai Y. The clinical significance of circulating tumor cells and T lymphocyte subtypes in pancreatic cancer patients. *Bioengineered*. 2022 Feb; 13(2):2130–2138. doi: 10.1080/21655979.2021.2023800.
164. Danilova L, Ho WJ, Zhu Q, Vithayathil T, De Jesus-Acosta A, Azad NS, Laheru DA, Fertig EJ, Anders R, Jaffee EM, Yarchoan M. Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) and CD8 Expression Profiling Identify an Immunologic Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas with Favorable Survival. *Cancer Immunol Res*. 2019 Jun; 7(6):886–895. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0822.
165. Wang C, Wang HN, Wang L. Biomarkers for predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Cancer*. 2022 Jan 1; 13(2):481–495. doi: 10.7150/jca.65012.
166. Yu, X., Ji, S., Xu, J., Yao, W., Qu, B., Zhu, W., ... & Xu, Y. (2012). CD8+ T Cells are compromised in human pancreatic cancer. *Transl Med*, 2(105), 2161-1025.
167. Ullenhag GJ, Mozaffari F, Broberg M, Mellstedt H, Liljefors M. Clinical and Immune Effects of Lenalidomide in Combination with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *PLoS One*. 2017 Jan 18; 12(1):e0169736. doi: 10.1371/journal.pone.0169736. PMID: 28099502; PMCID: PMC5242484
168. Yang F, Xu GL, Huang JT, Yin Y, Xiang W, Zhong BY, Li WC, Shen J, Zhang S, Yang J, Sun HP, Wang WS, Zhu XL. Transarterial Chemoembolization Combined With Immune Checkpoint Inhibitors and Tyrosine Kinase Inhibitors for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Efficacy and Systemic Immune Response. *Front Immunol*. 2022 Feb 18; 13:847601. doi: 10.3389/fimmu.2022.847601.
169. Krijgsman D, De Vries NL, Andersen MN, Skovbo A, Tollenaar RAEM, Bastiaannet E, Kuppen PJK, Hokland M. The effects of tumor resection and adjuvant therapy on the peripheral blood immune cell profile in

- patients with colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Oct;69(10):2009–2020. doi: 10.1007/s00262-020-02590-z.
170. Zhu J, Fang R, Pan Z, Qian X. Circulating lymphocyte subsets are prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2022 Jun 29; 22(1):716. doi: 10.1186/s12885-022-09438-y.
 171. Ye S, Chen W, Zheng Y, Wu Y, Xiang L, Li T, Ping B, Zhang X, Yang H. Peripheral lymphocyte populations in ovarian cancer patients and correlations with clinicopathological features. *J Ovarian Res.* 2022 Apr 11; 15(1):43. doi: 10.1186/s13048-022-00977-3.
 172. Wang Q, Li S, Qiao S, Zheng Z, Duan X, Zhu X. Changes in T Lymphocyte Subsets in Different Tumors Before and After Radiotherapy: A Meta-analysis. *Front Immunol.* 2021 Jun 16; 12:648652. doi: 10.3389/fimmu.2021.648652.
 173. Huff WX, Kwon JH, Henriquez M, Fetcko K, Dey M. The Evolving Role of CD8+CD28- Immunosenescent T Cells in Cancer Immunology. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 8; 20(11):2810. doi: 10.3390/ijms20112810.
 174. Huang B, Liu R, Wang P, Yuan Z, Yang J, Xiong H, Zhang N, Huang Q, Fu X, Sun W, Li L. CD8+CD57+ T cells exhibit distinct features in human non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 2020 Jun; 8(1):e000639. doi: 10.1136/jitc-2020-000639.
 175. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011 Sep; 134(1):17–32. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x.
 176. Akagi J, Baba H. Prognostic value of CD57(+) T lymphocytes in the peripheral blood of patients with advanced gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008 Dec; 13(6):528–535. doi: 10.1007/s10147-008-0789-8.
 177. Characiejus D, Pasukoniene V, Jonusauskaite R, Azlauskaite N, Aleknavicius E, Mauricas M, Otter WD. Peripheral blood CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr; 28(2B):1139–1142. PMID: 18505049.
 178. Characiejus D, Pasukoniene V, Kazlauskaite N, Valuckas KP, Petraitis T, Mauricas M, Den Otter W. Predictive value of CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002 Nov-Dec; 22(6B):3679–3683. PMID: 12552976.
 179. Fang J, Li X, Ma D, Liu X, Chen Y, Wang Y, Lui VWY, Xia J, Cheng B, Wang Z. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2017 May 26; 17(1):375. doi: 10.1186/s12885-017-3317-2.

180. Fehlings M, Kim L, Guan X, et al.; Single-cell analysis reveals clonally expanded tumor-associated CD57+ CD8 T cells are enriched in the periphery of patients with metastatic urothelial cancer responding to PD-L1 blockade. *J Immunother Cancer*. 2022 Aug; 10(8):e004759. doi: 10.1136/jitc-2022-004759.
181. Kim KH, Pyo H, Lee H, et al.; Dynamics of Circulating Immune Cells During Chemoradiotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Support Earlier Administration of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2022 Jun 1; 113(2):415–425. doi: 10.1016/j.ijrobp.2022.02.003.
182. Manjarrez-Orduño N, Menard LC, Kansal S, et al.; Circulating T Cell Subpopulations Correlate With Immune Responses at the Tumor Site and Clinical Response to PD1 Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2018 Aug 3; 9:1613. doi: 10.3389/fimmu.2018.01613.
183. Teramatsu K, Oono T, Oyama K, Fujimori N, Murakami M, Yasumori S, Ohno A, Matsumoto K, Takeno A, Nakata K, Nakamura M, Ogawa Y. Circulating CD8+CD122+ T cells as a prognostic indicator of pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2022 Nov 4; 22(1):1134. doi: 10.1186/s12885-022-10207-0.
184. Yamamoto, Tomohisa MD; Yanagimoto, Hiroaki MD; Satoi, Sohei MD; Toyokawa, Hideyoshi MD; Hirooka, Satoshi MD; Yamaki, So MD; Yui, Rintaro MD; Yamao, Jun MD; Kim, Songtae MD; Kwon, A-Hon MD. Circulating CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas* 41(3):p 409–415, April 2012. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182373a66
185. Liu C, Cheng H, Luo G, Lu Y, Jin K, Guo M, Ni Q, Yu X. Circulating regulatory T cell subsets predict overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 2017 Aug; 51(2):686-694. doi: 10.3892/ijo.2017.4032.
186. Peng H, James CA, Cullinan DR, Hogg GD, Mudd JL, Zuo C, Takchi R, Caldwell KE, Liu J, DeNardo DG, Fields RC, Gillanders WE, Goedegebuure SP, Hawkins WG. Neoadjuvant FOLFIRINOX Therapy Is Associated with Increased Effector T Cells and Reduced Suppressor Cells in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 2021 Dec 15; 27(24):6761–6771. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0998.
187. Himmelsbach R, Landerer A, Hipp J, Hopt UT, Fichtner-Feigl S, Wittel UA, Ruess DA. Immunological effects of hybrid minimally invasive versus conventional open pancreatoduodenectomy - A single center cohort study. *Pancreatology*. 2021 Aug; 21(5):965–974. doi: 10.1016/j.pan.2021.03.014.

188. Chen C, Chen Z, Chen D, Zhang B, Wang Z, Le H. Suppressive effects of gemcitabine plus cisplatin chemotherapy on regulatory T cells in nonsmall-cell lung cancer. *J Int Med Res.* 2015 Apr; 43(2):180–187. doi: 10.1177/0300060514561504.
189. Marcon F, Zuo J, Pearce H, Nicol S, Margielewska-Davies S, Farhat M, Mahon B, Middleton G, Brown R, Roberts KJ, Moss P. NK cells in pancreatic cancer demonstrate impaired cytotoxicity and a regulatory IL-10 phenotype. *Oncoimmunology.* 2020 Nov 19; 9(1):1845424. doi: 10.1080/2162402X.2020.1845424.
190. Lee HS, Leem G, Kang H, Jo JH, Chung MJ, Jang SJ, Yoon DH, Park JY, Park SW, Song SY, Bang S. Peripheral natural killer cell activity is associated with poor clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021 Feb; 36(2):516–522. doi: 10.1111/jgh.15265.
191. Lee leem M, Aoki T, Matsushita H, Karasaki T, Hosoi A, Odaira K, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Ohara O, Arita J, Hasegawa K, Kakimi K, Kokudo N. NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jan 8; 495(2):2058–2065. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.083.
192. Yang C, Cheng H, Zhang Y, Fan K, Luo G, Fan Z, Huang Q, Lu Y, Jin K, Wang Z, Yu X, Liu C. Anergic natural killer cells educated by tumor cells are associated with a poor prognosis in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Dec; 67(12):1815–1823. doi: 10.1007/s00262-018-2235-8.
193. Zhang X, Wang D, Li Z, Jiao D, Jin L, Cong J, Zheng X, Xu L. Low-Dose Gemcitabine Treatment Enhances Immunogenicity and Natural Killer Cell-Driven Tumor Immunity in Lung Cancer. *Front Immunol.* 2020 Feb 25; 11:331. doi: 10.3389/fimmu.2020.00331.
194. Lv Y, Song M, Tian X, Yv X, Liang N, Zhang J. Impact of radiotherapy on circulating lymphocyte subsets in patients with esophageal cancer. *Medicine (Baltimore).* 2020 Sep 4; 99(36):e20993. doi: 10.1097/MD.0000000000020993.
195. Almeida JS, Casanova JM, Santos-Rosa M, Tarazona R, Solana R, Rodrigues-Santos P. Natural Killer T-like Cells: Immunobiology and Role in Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 1; 24(3):2743. doi: 10.3390/ijms24032743. PMID: 36769064;
196. Li TT, Sun J, Wang Q, Li WG, He WP, Yang RC, Duan XZ. The effects of stereotactic body radiotherapy on peripheral natural killer and CD3+CD56+ NKT-like cells in patients with hepatocellular carcinoma.

Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2021 Jun; 20(3):240–250. doi: 10.1016/j.hbpd.2020.12.015.

197. Väyrynen JP, Haruki K, Lau MC, et al.; Spatial Organization and Prognostic Significance of NK and NKT-like Cells via Multimarker Analysis of the Colorectal Cancer Microenvironment. *Cancer Immunol Res.* 2022 Feb; 10(2):215–227. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0772.
198. Krijgsman D, de Vries NL, Skovbo A, Andersen MN, Swets M, Bastiaannet E, Vahrmeijer AL, van de Velde CJH, Heemskerk MHM, Hokland M, Kuppen PJK. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Jun; 68(6):1011–1024. doi: 10.1007/s00262-019-02343-7.
199. Peng LS, Mao FY, Zhao YL, Wang TT, Chen N, Zhang JY, Cheng P, Li WH, Lv YP, Teng YS, Guo G, Luo P, Chen W, Zou QM, Zhuang Y. Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23; 7(34):55222–55230. doi: 10.18632/oncotarget.10484.
200. Hirooka S, Yanagimoto H, Satoi S, Yamamoto T, Toyokawa H, Yamaki S, Yui R, Inoue K, Michiura T, Kwon AH. The role of circulating dendritic cells in patients with unresectable pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2011 Nov; 31(11):3827–3834. PMID: 22110205.
201. Pei Q, Pan J, Zhu H, Ding X, Liu W, Lv Y, Zou X, Luo H. Gemcitabine-treated pancreatic cancer cell medium induces the specific CTL antitumor activity by stimulating the maturation of dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2014 Mar; 19(1):10–16. doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.022.
202. Zhao Y, Shen M, Feng Y, He R, Xu X, Xie Y, Shi X, Zhou M, Pan S, Wang M, Guo X, Qin R. Regulatory B cells induced by pancreatic cancer cell-derived interleukin-18 promote immune tolerance via the PD-1/PD-L1 pathway. *Oncotarget.* 2017 Dec 7; 9(19):14803–14814. doi: 10.18632/oncotarget.22976.
203. Chun B, Pucilowska J, Chang S, Kim I, Nikitin B, Koguchi Y, Redmond WL, Bernard B, Rajamanickam V, Polaske N, Fields PA, Conrad V, Schmidt M, Urba WJ, Conlin AK, McArthur HL, Page DB. Changes in T-cell subsets and clonal repertoire during chemoimmunotherapy with pembrolizumab and paclitaxel or capecitabine for metastatic triple-negative breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2022 Jan; 10(1):e004033. doi: 10.1136/jitc-2021-004033.
204. Verma R, Hanby AM, Horgan K, Verghese ET, Volpato M, Carter CR, Hughes TA. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating

- lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Aug; 183(1):49–59. doi: 10.1007/s10549-020-05757-5.
205. Bersanelli M, Gnetti L, Vaglio A, Sverzellati N, Campanini N, Incerti M, Galetti M, Varotti E, Corrado M, Parziale R, Bottarelli L, Azzoni C, Silini EM, Leonardi F, Buti S. Correlations between tumor-infiltrating and circulating lymphocyte subpopulations in advanced renal cancer patients treated with nivolumab. *Acta Biomed.* 2019 Dec 23; 90(4):468–474. doi: 10.23750/abm.v90i4.7057.
206. Pernot S, Terme M, Radosevic-Robin N, et al.; Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. *Gastric Cancer.* 2020 Jan; 23(1):73–81. doi: 10.1007/s10120-019-00983-3.
207. Suh KJ, Kim JW, Kim JE, Sung JH, Koh J, Kim KJ, Kim JW, Ahn SH, Park DJ, Kim HH, Lee HS, Lee KW. Correlation between tumor infiltrating immune cells and peripheral regulatory T cell determined using methylation analyses and its prognostic significance in resected gastric cancer. *PLoS One.* 2021 Jun 4; 16(6):e0252480. doi: 10.1371/journal.pone.0252480.
208. Cruvinel Wde M, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Samazi KC, Kállas EG, Cendoroglo MS, Andrade LE. Abnormal phenotypic distribution of regulatory and effector T cells in octogenarian and nonagenarian women. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2015 Aug; 61(4):329–335. doi: 10.1590/1806-9282.61.04.329.
209. Kaiser M, Semeraro MD, Herrmann M, Absenger G, Gerger A, Renner W. Immune Aging and Immunotherapy in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(13):7016. Published 2021 Jun 29. doi:10.3390/ijms22137016
210. Minato N, Hattori M, Hamazaki Y. Physiology and pathology of T-cell aging. *Int Immunol.* 2020 Apr 12; 32(4):223–231. doi: 10.1093/intimm/dxaa006.
211. Elyahu Y, Hekselman I, Eizenberg-Magar I, Berner O, Strominger I, Schiller M, Mittal K, Nemirovsky A, Eremenko E, Vital A, Simonovsky E, Chalifa-Caspi V, Friedman N, Yeger-Lotem E, Monsonogo A. Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes. *Sci Adv.* 2019 Aug 21; 5(8):eaaw8330. doi: 10.1126/sciadv.aaw8330.
212. Reem Saleh, Eyad Elkord, FoxP3+ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets, *Cancer Letters*, Volume 490, 2020, Pages 174–185, ISSN 0304-3835, doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.022.

213. de Mol J, Kuiper J, Tsiantoulas D, Foks AC. The Dynamics of B Cell Aging in Health and Disease. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:733566. doi: 10.3389/fimmu.2021.733566.
214. Hong WS, Hong SI, Kim CM, Kang YK, Song JK, Lee MS, Lee JO, Kang TW. Differential depression of lymphocyte subsets according to stage in stomach cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1991 Apr; 21(2):87–93. doi: 10.1093/oxfordjournals.jjco.a039451.
215. Bernard D, Ventresca MS, Marshall LA, Eveleigh C, Wan Y, Bramson JL. Processing of tumor antigen differentially impacts the development of helper and effector CD4+ T-cell responses. *Mol Ther*. 2010 Jun; 18(6):1224–1232. doi: 10.1038/mt.2010.30.
216. Roghanian A, Fraser C, Kleyman M and Chen J: B Cells Promote Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov* 6(3): 230–232, 2016. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16- 0100
217. Melzer MK, Arnold F, Stifter K, Zengerling F, Azoitei N, Seufferlein T, Bolenz C and Kleger A: An immunological glance on pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* 21(9): 3345, 2020. doi: 10.3390/ijms21093345
218. Wang Y, Zhou N, Zhu R, Li X, Sun Z, Gao Y, Liu W, Meng C, Ge Y, Bai C, Li T and Liu H: Circulating activated immune cells as a potential blood biomarkers of non-small cell lung cancer occurrence and progression. *BMC Pulm Med* 21(1): 282, 2021. doi: 10.1186/s12890-021-01636-x
219. Shen DS, Yan C, Liang Y, Chen KH and Zhu XD: Prognostic significance of circulating lymphocyte subsets before treatment in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Manag Res* 13: 8109–8120, 2021. doi: 10.2147/CMAR.S334094
220. Minici C, Rigamonti E, Lanzillotta M, et al.; B lymphocytes contribute to stromal reaction in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 9(1): 1794359, 2020. doi: 10.1080/2162402X2020.1794359
221. Chen Y, Jin Y, Hu X and Chen M: Effect of chemoradiotherapy on the proportion of circulating lymphocyte subsets in patients with limited-stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 70(10): 2867–2876, 2021. doi: 10.1007/s00262-021-02902-x
222. Wu SY, Fu T, Jiang YZ and Shao ZM: Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 19(1): 120, 2020. doi: 10.1186/s12943-020-01238-x
223. Iannone F, Porzia A, Peruzzi G, Birarelli P, Milana B, Sacco L, Dinatale G, Peparini N, Prezioso G, Battella S, Caronna R, Morrone S, Palmieri G, Mainiero F and Chirletti P: Effect of surgery on pancreatic tumor-dependent lymphocyte asset: modulation of natural killer cell frequency

- and cytotoxic function. *Pancreas* 44(3): 386–393, 2015. doi: 10.1097/MPA.0000000000000288
224. Van Audenaerde JRM, Roeyen G, Darcy PK, Kershaw MH, Peeters M and Smits ELJ: Natural killer cells and their therapeutic role in pancreatic cancer: A systematic review. *Pharmacol Ther* 189: 31–44, 2018. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.003
225. Tobin LM, Mavinkurve M, Carolan E, Kinlen D, O'Brien EC, Little MA, Finlay DK, Cody D, Hogan AE, O'Shea D. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight*. 2017 Dec 21; 2(24):e94939. doi: 10.1172/jci.insight.94939.
226. Bähr I, Spielmann J, Quandt D, Kielstein H. Obesity-Associated Alterations of Natural Killer Cells and Immunosurveillance of Cancer. *Front Immunol*. 2020 Mar 13;11:245. doi: 10.3389/fimmu.2020.00245.
227. Lohneis P, Sinn M, Bischoff S, Jühling A, Pelzer U, Wislocka L, Bahra M, Sinn BV, Denkert C, Oettle H, Bläker H, Riess H, Jöhrens K and Striefler JK: Cytotoxic tumour-infiltrating T lymphocytes influence outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 83: 290–301, 2017. doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.016 32
228. Wei Q, Xu Q, Yuan X, Li JJ, Chen L, Luo C, Zhu X and Ying JE: Immunological impact of chemotherapy on the tumor microenvironment in gastric cancer. *J Surg Oncol* 123(8): 1708–1715, 2021. doi: 10.1002/jso.26449
229. L. Sams, S. Kruger, V. Heinemann, D. Bararia, S. Haebe, S. Alig, M. Haas, et al., Alterations in regulatory T cells and immune checkpoint molecules in pancreatic cancer patients receiving FOLFIRINOX or gemcitabine plus nab–paclitaxel, *Clin Transl Oncol* 23 (11) (2021) 2394–2401, <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02620-x>.
230. A. Gabrielson, Y. Wu, H. Wang, J. Jiang, B. Kallakury, Z. Gatalica, et al.,
231. Intratumoral CD3 and CD8 T-Cell Densities Associated with Relapse Free Survival in HCC, *Cancer Immunol Res*. 4 (5) (2016) 419–430, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0110>.
232. S. Tolaney, D.R. Ziehr, H. Guo, et al., Phase II and Biomarker Study of Cabozantinib in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Patients, *Oncologist* 22 (2017) 25–32, doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0229.
233. H. Raskov, A. Orhan, J.P. Christensen, I. Gögenur, Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy, *Br. J. Cancer* 124 (2021) 359–367, doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4.
234. V. Tedeschi, G. Paldino, M. Kunkl, M. Paroli, R. Sorrentino, L. Tuosto, M.T. Fiorillo, CD8+ T Cell Senescence: Lights and Shadows in Viral Infections, Autoimmune Disorders and Cancer, *Int J Mol Sci* 23 (6) (2022) 3374, doi.org/10.3390/ijms23063374.

235. T. Michelakos, L. Cai, V. Villani, F. Sabbatino, F. Kontos, C. Fernandez-del Castillo, et al., Tumor microenvironment immune response in pancreatic ductal
236. adenocarcinoma patients treated with neoadjuvant therapy, *Natl. Cancer Inst.* 113 (2) (2021) djaa073, doi.org/10.1093/jnci/djaa07.
237. J. Allen, C. Cernik, S. Bajwa, R. Al-Rajabi, A. Saeed, et al., Association of
238. Neutrophil, Platelet, and Lymphocyte Ratios with the Prognosis in Unresectable and Metastatic Pancreatic Cancer, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 3283, doi.org/10.3390/jcm9103283
239. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS and Linehan DC: Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169(5): 2756–2761, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2756
240. Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, Ni B, Lu B and Wang H: An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 9(3): e91551, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091551
241. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Ménégaux F, Rosenzweig M, Lemoine F, Klatzmann D, Taieb J. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut*. 2009 Apr; 58(4):520–529. doi: 10.1136/gut.2008.158824.
242. Zahran AM, Nafady-Hego H, Mansor SG, Abbas WA, Abdel-Malek MO, Mekky MA, Hetta HF. Increased frequency and FOXP3 expression of human CD8+CD25High+ T lymphocytes and its relation to CD4 regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Immunol.* 2019 Jul; 80(7):510–516. doi: 10.1016/j.humimm.2019.03.014.
243. Vieyra-Lobato MR, Vela-Ojeda J, Montiel-Cervantes L, López-Santiago R, Moreno-Lafont MC. Description of CD8+ Regulatory T Lymphocytes and Their Specific Intervention in Graft-versus-Host and Infectious Diseases, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res.* 2018 Aug 5; 2018:3758713. doi: 10.1155/2018/3758713.
244. Chen C, Chen D, Zhang Y, Chen Z, Zhu W, Zhang B, Wang Z, Le H. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol.* 2014 Feb; 18(2):255–261. doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.004.

245. Tao L, Wang S, Kang G, Jiang S, Yin W, Zong L, Li J and Wang X: PD-1 blockade improves the anti-tumor potency of exhausted CD3+CD56+ NKT-like cells in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 10(1): 2002068, 2021. doi: 10.1080/2162402X.2021.2002068.
246. Leppänen J, Lindholm V, Isohookana J, et al.; Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2019 Jan; 48(1):43–48. doi: 10.1097/MPA.0000000000001195.
247. Liu X, Xu J, Zhang B, Liu J, Liang C, Meng Q, Hua J, Yu X, Shi S. The reciprocal regulation between host tissue and immune cells in pancreatic ductal adenocarcinoma: new insights and therapeutic implications. *Mol Cancer*. 2019 Dec 13; 18(1):184. doi: 10.1186/s12943-019-1117-9.

PRIEDAI

Priedas Nr. 1. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS
Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. info@jcr.vu.lt
Daktarėnys kaupiami ir suaugusi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810
Fakulteto daktarėnys: M.K. Čiurlionis g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. m@mf.vu.lt
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
M.K. Čiurlionis g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ

2017-07-04 Nr.158200-17-935-437

Tyrimo pavadinimas:

Limfocitų subpopuliacijų ir kitų ląstelių pokyčių tyrimai ir jų poveikis kasos intraduktalinės adenokarcinomos atsinaujinimui ir išgyvenimo prognozei

Protokolo Nr.:	1
Versija:	3.0
Data:	2017-07-03
Informuoto asmens sutikimo forma:	2 2017-06-29
Pagrindinis tyrėjas:	Audrius Šileikis
Įstaigos pavadinimas: Adresas:	VUL Santaros klinikos Santariškių g. 2, Vilnius
Leidimas galioja iki:	2020-08

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2017/07), vykusio 2017 m. liepos 4 d. sprendimu.

Pirmininkas



Saulius Vosylus

SANTRAUKA

SUMMARY

The influence of circulating lymphocyte changes and tumor microenvironment factors on survival prognosis of patients with pancreatic ductal carcinoma

ABBREVIATIONS

BMI – body mass index

BRCA – breast cancer gene

BSA – body surface area

CA 19-9 – tumor marker carbohydrate antigen 19-9

CD – a cluster of differentiation.

CI – confidence interval

CT – computed tomography

ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group

FOLFIRINOX – chemotherapy regimen of oxaliplatin, leucovorin, irinotecan, fluorouracil

FOLFOX – chemotherapy regimen of oxaliplatin, leucovorin, fluorouracil

GOT – glutamine oxaloacetate transaminase

GPT – glutamine pyruvate transaminase

HCC – hepatocellular carcinoma

HR – hazard ratio

LYM – lymphocytes

NK – natural killers

OS – overall survival

PD-L – Programmed death-ligand

PARP – Poly (ADP-ribose) Polymerase

PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma

PFS – progression-free survival

SD – standard deviation

TME – tumor microenvironment

VUHSK – Vilnius University Hospital Santaros klinikos

WBC – white blood cell

1. INTRODUCTION

Pancreatic cancer (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) is one of the most aggressive oncological diseases (1). The unique anatomy of the organ determines diagnostic difficulties and poor survival, the rapid development of cancer, the absence of preventive screening programs, various tumor barriers, and the sluggishness of the immune system (2).

Pancreatic cancer is usually diagnosed already with symptoms: of jaundice or pain; then, for most patients, surgical treatment and complete removal of the tumor is no longer possible (3). Thus, early-stage tumors can be removed entirely; adjuvant chemotherapy is still recommended for most patients after surgery (4). Locally advanced pancreatic tumors are treated with neoadjuvant chemotherapy to reduce volume and invasion of vascular structures and remove residual tumor masses (5). Metastatic stage IV disease is treated with combinations of systemic chemotherapy drugs (6).

Chemotherapy is recommended for the treatment of PDAC in routine clinical practice. The selection of effective drugs for this group has increased recently, and liposomal, protein-conjugated forms are recommended (7,8). Such new possibilities significantly improve the survival of some patients, but breakthroughs in treating the disease do not occur. Another class of drugs, targeted therapies, appear helpful only in specific groups of pancreatic cancer patients with particular mutations. Angiogenesis inhibitors treat other oncological diseases, and tyrosine kinase inhibitors are poorly active in PDAC. Immunotherapy methods, which have radically changed the survival trends of patients with other solid oncological diseases (melanoma, lung cancer), are also ineffective in pancreatic cancer due to the particularly expressed stroma and low amount of immune cells in the tumor. Of course, research with new drugs of this class continues, new signaling pathways and significant antigens are sought, and efforts are made to activate the immune response to enable T cells (9,10).

Elucidation of prognostic and predictive biomarkers is essential in searching for new treatments. In daily clinical practice, the single marker CA 19-9 is used prognostically and for the assessment of treatment efficiency and monitoring for disease recurrence. However, some patients do not secrete it, and cholangitis and other inflammatory processes can cause an increase (11,12). The only marker with predictive value is the study of BRCA mutations, which shows increased sensitivity to platinum agents and the potential benefit of targeted therapy with PARP inhibitors (13).

Thus, the search for new markers, especially the evaluation of the factors of the immune system at this time, when special attention is paid to immunoncology, the influence of chemotherapy and other treatment methods on the

immune system is clarified, and the combination of several classes of drugs is tried to be essential. It is already known that the abundance and location of cytotoxic CD3+CD8+ lymphocytes in the center of the tumor leads to better patient survival, the influence of natural killer (NK cells), B cell infiltration on survival is not apparent, and CD4+ helpers - harmful. Changes in circulating lymphocytes during treatment with newer chemotherapy agents, the effect on survival outcomes, and the relationship between peripheral blood and TME levels in the PDAC patient population are unclear (14-18).

This dissertation aims to clarify the influence of the factors of the patient's immune system and other elements of the tumor environment on the prognosis of survival and the possible predictive value, as well as the effect of modern chemotherapy on the immune system.

1.1. Dissertation aims and objectives

To assess the initial values and changes of peripheral blood lymphocytes during treatment and the relationship with factors of the tumor microenvironment, the influence on the survival of patients with pancreatic cancer

1. The evaluation of B and T lymphocyte values in the blood before and after radical surgery for pancreatic cancer after starting chemotherapy treatment.
2. The evaluation of the properties of pancreatic cancer tissue and their relationship with peripheral blood lymphocyte data (for patients undergoing radical pancreatic resection operations).
3. The evaluation of the values of B and T lymphocytes in the blood during treatment with palliative chemotherapy (if indicated, palliative operations can be performed for these patients).
4. Identification of the influence of initial values of B and T lymphocytes, changes during treatment, and characteristics of the tumor environment on survival until progression and overall survival.

1.2. Statements to be defended

1. Surgery and adjuvant chemotherapy for pancreatic cancer affect changes in the number of lymphocyte subpopulations in peripheral blood.

2. There is a relationship between the cancer microenvironment (tumor-stroma ratio) and circulating peripheral blood lymphocyte subpopulations.
3. Systemic chemotherapy applied to pancreatic cancer changes the amount of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of patients with advanced and metastatic pancreatic cancer.
4. Baseline values of peripheral blood lymphocyte subpopulations (when studied before any applied treatment), changes during treatment, and characteristics of the cancer microenvironment are related to survival.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study design, patients' selection and samples collection

The dissertation work was analyzed using data from the study initiated by a VUHSK doctoral student, "Research on lymphocyte subpopulations and other cell changes and their effect on recurrence and survival prognosis of intraductal adenocarcinoma of the pancreas".

The study included 209 subjects treated at VUHSK Abdominal Surgery and Hematology, Oncology, and Transfusion Centers from 02.08.2018 to 03.22.2022.

Patients were enrolled in the study by investigators based on the following inclusion criteria: persons from 18 years of age; Confirmed pancreatic intraductal adenocarcinoma, disease stage IA, IB, IIA, IIB, III, IV; Signed an informed consent form; ECOG 0-3; possible surgical and chemotherapy treatment. Exclusion criteria: surgery with or without chemotherapy cannot be used; suffering from tumors other than adenocarcinoma; suffering from autoimmune diseases or infectious diseases that may affect the number of lymphoid subpopulations.

The clinical examination was carried out by treating doctors and researchers; laboratory tests were carried out at VUHSK Laboratory Medicine Center, and peripheral lymphocyte subpopulation tests were performed at its department in the Laboratory of Hematology and General Cytology. The patients were subjected to the usual tests used in clinical practice to assess the general condition and the spread of cancer.

The Vilnius Bioethics Committee approved the study on July 4, 2017, with permit number 158200-17-935-437, and the changes were approved on June 30, 2020. The study protocol complies with the principles of the

Declaration of Helsinki. All subjects agreed to participate in the study and signed an informed consent form.

The data of 196 patients out of 209 included in the mentioned clinical trial were analyzed in the Dissertation work. Other patients were not analyzed for various reasons that led to non-compliance with the inclusion criteria: after surgery, the assessment of the histological examination, primary tumor localization changed, they refused to continue participating in the study, and chronic diseases that could change the numerical values of lymphocytes were revealed.

During the research, the following data were collected, which were used for the analysis of the dissertation work: age, gender, surgery performed, chemotherapy regimen, tumor factors: T, N, M categories, stage, histological subtype, lymphovascular, perineural invasion, the radicality of resection; height, weight, BMI; the presence of ascites; values of CA 19-9; survival time to disease progression; overall survival time; number of applied for systemic treatment courses; cause of death; total leukocytes, lymphocytes, subpopulations with markers CD19+, CD3+, CD3+CD56+, CD8+CD57+, CD3+CD57+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD4-CD8-, CD3-CD56+CD16+, CD3+CD56+, absolute amount of CD16-, CD3+CD4+CD25+CD127+/-, CD3+CD4+FoxP3+, CD3+CD8+CD25+CD127+/-, CD3+CD8+FoxP3+; percentage expression of lymphocytes, CD3CD8+CD57+ and CD3+CD8+CD57- (out off CD3+CD8+); CD4+/CD8+ ratio; tumor-stroma ratio.

The patients were treated according to the treatment recommendations approved at the institution at that time after pancreatic cancer was diagnosed according to the histological examination of the biopsy material, and a computerized tomography examination was performed and discussed in a multidisciplinary council with the participation of abdominal surgeon, radiologist, medical and radiation oncologists. Biopsy material was obtained after a percutaneous core biopsy or during bypass surgery. Patients included in the study are conditionally divided into two groups. One group comprises subjects whose disease is early or slightly locally advanced; their tumor was first removed (pancreatoduodenal force-preserving resection or pancreatic resection), after which some patients were given chemotherapy for 3-6 months. The other group includes patients with locally advanced, inoperable tumors and distant metastases. A few patients whose tumors were assessed as inoperable, marginally operable, but after treatment with chemotherapy, significantly decreased and were removed were assigned to the second group. Cancer is considered operable when it does not involve any vascular structures: abdominal trunk, superior saphenous artery, or common hepatic

artery, does not contact the superior saphenous or portal veins, or contacts the veins less than 180° without damaging their contour. In the first groups of some patients, if the disease manifested itself in jaundice, endoscopic retrograde cholangiopancreatography and stenting of the bile ducts were performed, waiting until jaundice subsided and surgery was performed. If patients had first, second, or operable stage three disease, they underwent surgery and, depending on the final pathology diagnosis, were followed up or received adjuvant chemotherapy with a modified FOLFIRINOX regimen or gemcitabine monotherapy. The regimen of mFOLFIRINOX consists of oxaliplatin (85 mg/m² BSA), irinotecan (150-180 mg/m² BSA), leucovorin (400 mg/m² BSA), and fluorouracil (2400 mg/m² BSA), repeated every two weeks. 6-12 cycles were prescribed (treatment duration 3-6 months). Gemcitabine monotherapy was prescribed 1000 mg/m² BSA on days 1, 8, and 15, repeating the cycle every four weeks; six cycles were prescribed (treatment duration 5.5 months). The chemotherapy regimen was selected, considering the patient's general condition and the presence of concomitant diseases, subjectively assessed, according to the attending physician's decision. Some patients in the second group underwent palliative bypass surgery to restore patency and treat jaundice. Non-operated patients were treated with one of the regimens: mFOLFIRINOX (fluorouracil, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin) or gemcitabine monotherapy, as recommended by international and hospital guidelines.

The regimen was selected considering the patient's general condition and concomitant diseases. The regimen is selected, and the treating medical oncologist calculates and modifies the dose. Chemotherapy in advanced disease lasted a maximum of 12 cycles in the mFOLFIRINOX regimen and six cycles in the weekly gemcitabine regimen. Dose intensity and maintenance of cyclicity were not evaluated in this study.

The general scheme of the study is presented in Figure 1. A total of 196 patients were included in the study, and a four-group analysis was performed. First, all patients included in the study were analyzed as indicators of lymphocyte subpopulations related to age and disease stage. Later, changes in lymphocyte subpopulations were evaluated after 2 and 4 months from the start of any treatment (surgery or chemotherapy). Finally, we analyze the impact on survival in the inoperable and operated patient groups. The final analysis assessed the relationship between circulating lymphocyte subpopulations and tumor stromal ratio, the latter's influence on survival.

2.2. Analysis of patient samples

Demographic characteristics, comorbidities, ECOG status, BMI, serum hemoglobin, platelet count, GOT, and GPT were collected before any treatment: surgery or first cycle of chemotherapy, alkaline phosphatase, CA 19-9.

A blood test for the evaluation of lymphocyte subpopulations was performed before any treatment (first visit) after two months. And then every three months. in the operated group and every two months in the advanced disease group.

The course of the disease was assessed by radiological methods: three-phase, high-resolution computed tomography of the chest, abdomen, and pelvis. Disease progression is defined as the appearance of new metastatic foci, an increase in the CA 19-9 serum marker, or a worsening of symptoms, as assessed in daily clinical practice.

Before flow cytometry analysis, an automated hematological assay was performed to determine the total leukocyte count and their differentiation. A Sysmex XN-1000 (Japan) hematology analyzer was used to analyze leukocytes and lymphocytes quantitatively. Later, patient samples were prepared for eight-color cytometry analysis by staining biomarkers of cell surface and internal structures with monoclonal antibodies. The cell membrane permeabilization step was used to stain the intracellular structures of the cells. In order to determine the absolute cell count, Lyse No Wash technique was used for sample staining and incubation with a known amount of TruCount microspheres in tubes (Becton Dickinson, USA). Antibodies for detecting surface and intracellular antigens were added to 100 μ l of peripheral blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid: CD45-V450, CD19-V500, CD3-PerCP, CD4-APC-H7, CD8-PE-Cy7, CD25-FITC, CD127-PE, cFoxP3-APC, CD16-PE, and CD56-APC.

Stained samples were evaluated with a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), and data were analyzed by FACS Diva version 8.0.2. software (Becton Dickinson). A sequential stepwise gating technique for cell populations was used for data analysis, and the results were presented in biexponential dot plots. The ratio of CD4/CD8 cells and percentages of extracts of some populations were calculated. The obtained data are tabulated for statistical analysis.

Microscopic preparations, stained with hematoxylin and eosin, archived at the State Pathology Center, and the most representative blocks preserved in formalin, fixed in paraffin, reflecting the structures of the tumor and nearby pancreatic tissue, were selected for TME evaluation. Microtome

sections of 3 μm thickness were made from the selected blocks, placed on object slides, and stained with CD3 antibodies (Dako, clone C8/144B, dilution 1:100, Denmark). IHC reactions were performed on Roche Ventana BenchMark ULTRA machines (Ventana Medical Systems, Tucson, USA). The ultraView Universal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems) was used for visualization. IHC preparations were digitized with a ScanScope XT scanner (Leica Aperio Technologies, Vista, CA, USA) using a 20 \times objective. Image analyses were performed using HALO software (version 3.0311.174; Indica Labs, Corrales, USA). HALO AI is a tissue classifier based on deep learning networks that segment tumor epithelium, stroma, background and artifacts, and glass).

2.3. Statistics

Descriptive statistics (distribution (%), median (interquartile range, Q1–Q3) were used to assess demographic, clinical, and laboratory characteristics). Continuous variables were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Most of the studied variables were non-normally distributed. Considering this, the hypotheses' non-parametric statistical methods are used for verification.

Fisher's exact test was used to determine demographic and clinical data differences between study groups. Abnormally distributed continuous variables of two independent groups were compared using the Mann–Whitney–Wilcoxon rank sum criterion (in this way, the influence of gender, metastasis, presence of lymphovascular, perineural invasion, and differences between two visits was evaluated). Non-normally distributed continuous variables of more than two independent groups were compared using the Kruskal–Wallis rank criterion (this is how the relationship between degrees of differentiation, stages, and subpopulations was assessed). The correlation between two continuous variables was assessed by calculating Spearman's coefficient. This evaluated the association between age, CA 19–9, BMI, and various lymphocyte subpopulations.

In order to determine the relationship of various variables with continuous and categorical endpoints (progression-free survival, overall survival), univariate logistic regression models were constructed accordingly. In order to identify variables that are independently associated with categorical outcomes, multivariable logistic regression models with stepwise selection of variables were constructed accordingly.

Progression-free survival (PFS) is defined as the period from surgery (in the operated group) or first chemotherapy (in the non-operated group) to disease progression or death if the cause was PDAC.

Overall survival (OS) - as the period from surgery (in the operated group) or the first dose of chemotherapy (in the non-operated group) to death. Patients were censored at the last follow-up day if the disease did not progress (PFS) or remained alive (OS).

Survival trends and mean (95% confidence interval [CI]) survival were analyzed by the Kaplan–Meier method, with log-rank and Breslow tests for differences. Since the final cut-offs for all analyzed markers are unknown, in the survival analysis, lymphocyte subpopulations were divided into two or four groups (less than and more significant than the median or by quartiles) to analyze differences in survival. A p-value < 0.05 was used to define statistically significant results. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics (version 23.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. RESULTS

3.1. Selection of research subjects for dissertation work

The study included 209 subjects treated at VULSK Abdominal Surgery and Hematology, Oncology and Transfusion Medicine Centers from 02.08.2018 to 03.22.2022.

The data of 196 patients out of 207 included in the aforementioned clinical trial were analyzed in the Dissertation work (Fig. 1). Other patients were not analyzed due to various reasons that led to non-compliance with the inclusion criteria: changes in the histological examination after surgery (four patients), evaluation of the localization of the primary tumor (two), refusal to continue participating in the study (one), chronic diseases that can change the numerical values of lymphocytes (two), impaired laboratory activity, no blood test at the first visit (two), initially assessed as an operable disease, but only bypass joint surgery was performed, so no longer included in the analysis (two).

When analyzing the results, we divide the entire study sample into two groups according to the stage of the disease and the curative surgery performed, and the goal of treatment (cure or only control of the disease). Therefore, the initial values of lymphocyte subpopulations and changes during treatment (after two months from the initiation of therapy) are evaluated in the entire study sample and the survival results in the mentioned

groups. For 41 patients, the data from three visits (after two months and after 4 or 5 months) were collected and evaluated.

3.2. Relationship between circulating lymphocyte subpopulations and pancreatic cancer development

The relationship between sex, age, disease stage, the first visit (the first day of chemotherapy administration or surgery), and the total number of lymphocytes in 195 patients were evaluated.

The median age of the entire study population was 66 years. It ranged from 18 to 86 years. The age distribution is shown in the histogram (Fig.2a). Study included 110 (56.4%) women and 85 (43.6%) men. The median overall survival of the entire study population was 12 months (0-57). Survival data are shown in the histogram (Fig. 2b). Nine patients died within the first two months of inclusion in the study.

Total leukocytes ($Z=-4.093$, $p<0.0001$), B lymphocytes CD19+ ($Z=-2.088$, $p=0.037$), CD8+CD57+ ($Z=-2.17$, $p=0.03$) levels reliably differed between sexes.

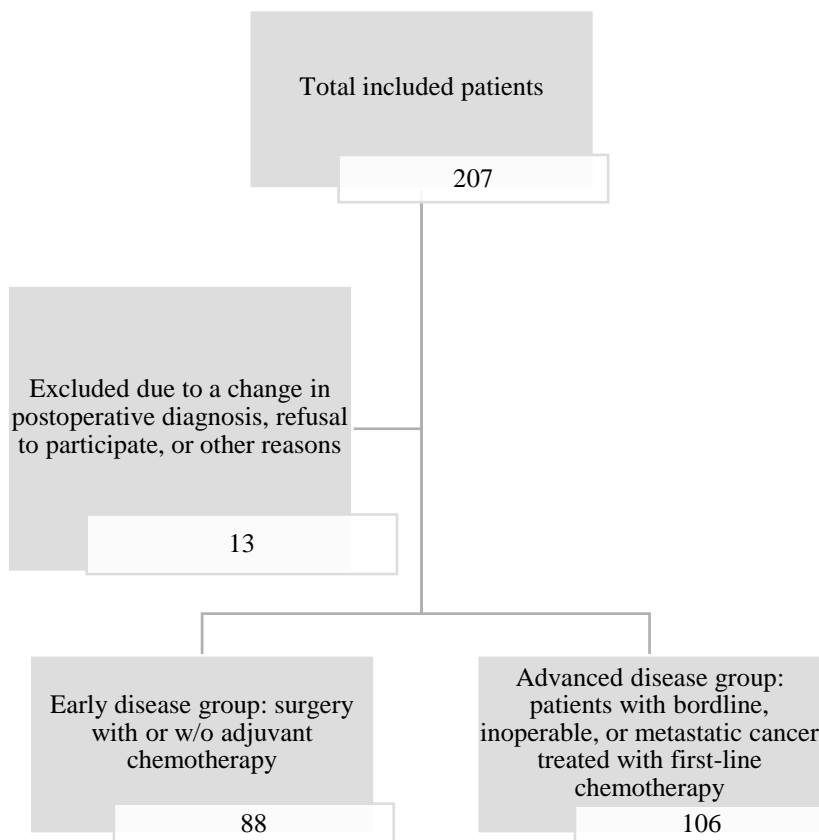


Fig. 1: Distribution of all patients included in the study for the various analyses

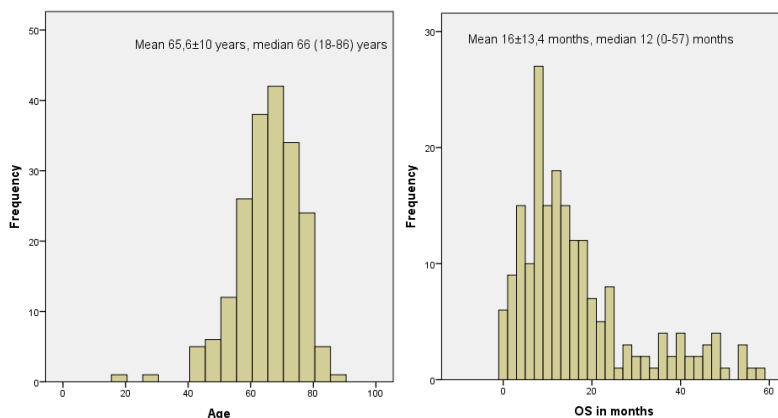
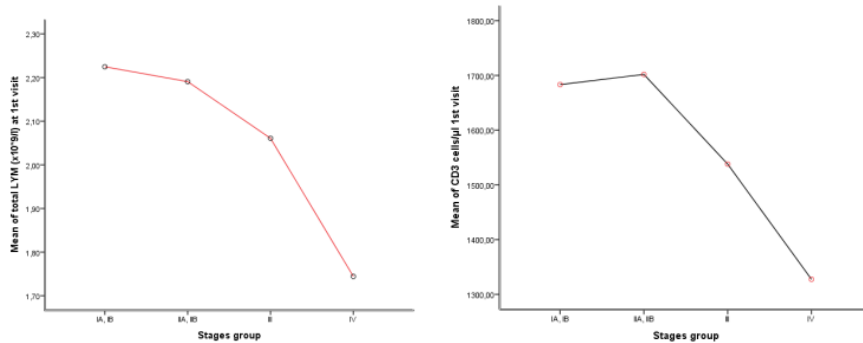


Fig. 2: Distribution of patients in the entire study by age (a) and survival (b).

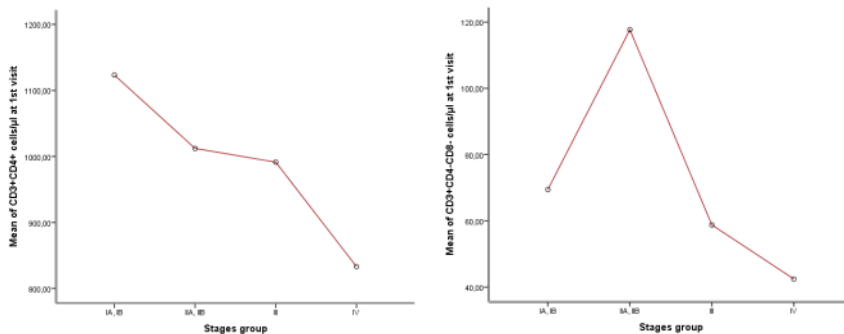
It was found that in our cohort, the absolute number of lymphocytes ($\chi^2=12.7$, $p=0.013$, $df=4$), CD19+ ($\chi^2=11.3$, $p=0.023$, $df=4$), all CD3+

lymphocytes ($\chi^2= 10, 6, p=0.031, df = 4$) and CD3+CD4+ ($\chi^2= 9.4, p = 0.051, df = 4$) and CD3+CD4-CD8- ($\chi^2= 14.1, p=0.007, df = 4$) the amounts of subpopulations depended on the stage of the disease (at the time of diagnosis), i.e., all the cells mentioned above were found to be the least in stage IV patients, and CD4+CD25+CD127+/- decreased significantly with age ($r(193)= -0.195, p = 0.006$). The results are reflected in Fig. 3.



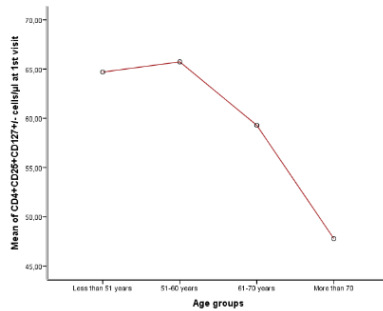
3a) The number of lymphocytes at the first visit depends on the stage of the disease.

3b) The level of the CD3+ lymphocyte subpopulation at the first visit depends on the stage of the disease.



3c) The amount of the CD3+CD4+ lymphocyte subpopulation at the first visit depends on the stage of the disease.

3d) The amount of the CD3+CD4-CD8- lymphocyte subpopulation at the first visit depends on the stage of the disease.



3e) CD4+CD25+CD127+/- lymphocyte subpopulation levels at the first visit were age-dependent.

3.3. Characteristics of the patients

3.3.1. Early disease group

Eighty-eight patients with a median age of 67 (SD = 10.86) years, ranging from 18 to 86 years, were included in the surgical treatment group. The majority were women, 50 (56.8%), all patients had an excellent functional status according to ECOG 0 and 1, and the BMI of the majority was between 18.5 and 30kg/m², 64 (72.7%). Concerning the disease: the vast majority were tumors of G2 and G3 differentiation 84 (95.5%), stages IIB and III 65 (73.9%), the lymphovascular invasion was observed in 66 (75%), 38 (43.2%)) perineural invasion, the resection margin was more often negative, R0 resection was achieved in 53 (60.2%), cancer was detected in the pancreatic head in 63 (71.6%), vascular resection was not performed in 74 (84.1%). Among the histological variants, the diagnosis of pancreatic ductal carcinoma prevailed but included four adenosquamous cells, three mucinous cystadenocarcinomas, one each of anaplastic, "foam" cell, dedifferentiated and acinic cell carcinoma, CA 19-9 marker, when evaluated before treatment, was lower than 1000kU/l in 68 pts (73.2%).

A more detailed overview of how these characteristics were distributed by the study group (patients who did not receive postoperative chemotherapy and received one of the chemotherapy regimens) is presented in Table 1.

Table 1. Overview of the clinical characteristics of the group of resectable patients (88 patients), dividing them into three groups according to the postoperative treatment

Characteristics	No chemotherapy (N = 25)	FOLFIRINOX (N = 30)	Gemcitabine (N = 33)	P value
Age, years				
Median	73	62.3	65.0	<0.001
Range	42–86	30–79	18–80	
Sex, n (%)				
Female	17 (68)	13 (43.3)	20 (60.6)	0.391
Male	8 (32)	17 (56.7)	13 (39.4)	
Size of the primary tumor (%)				
T1	4 (16)	–	1 (3)	0.137
T2	13 (52)	20 (66.7)	15 (45.5)	
T3	6 (24)	9 (30)	13 (39.4)	
T4	2 (8)	1 (3.3)	4 (12)	
Status of the regional lymph nodes, n (%)				
N0	17 (68)	5 (16.7)	3 (9.1)	<0.001
N1	6 (24)	11 (36.7)	17 (51.5)	
N2	2 (8)	14 (46.7)	13 (39.4)	
Stage group — no. (%)				
IA	4 (16)	–	–	<0.001
IB	7 (28)	2 (6.7)	–	
IIA	5 (20)	2 (6.7)	2 (6.1)	
IIB	6 (24)	11 (36.7)	13 (39.4)	
III	3 (12)	15 (50)	17 (51.5)	
IV	–	–	1 (3)	
Resection margin — no. (%)				
R0	17 (68)	18 (60)	18 (54.5)	0.583
R1	8 (32)	12 (40)	15 (45.5)	
Histological subtype — no (%)				
Pure adenocarcinoma	24 (96)	28 (93.3)	25 (75.8)	0.724
Other subtypes	1 (4)	2 (6.6)	8 (24.2)	

Characteristics	No chemotherapy (N = 25)	FOLFIRINOX (N = 30)	Gemcitabine (N = 33)	P value
Lymphovascular invasion — no (%)	14 (56)	27 (90)	25 (75.8)	0.018
Perineural invasion— no (%)	11 (44)	15 (50)	12 (36.4)	0.545
Diferentiation grade, no (%)				
G1	2 (8)	–	2 (6.1)	0.386
G2	15 (60)	15 (50)	15 (45.5)	
G3	8 (32)	15 (50)	16 (48.5)	
Tumor localisation				
Head	15 (60)	24 (80)	24 (72.7)	0.544
Body	3 (28)	4 (13.3)	5 (15.2)	
Tail	7 (3)	2 (6.7)	4 (12.1)	
Surgery				
V. portae resection — no (%)	5 (20)	0	6 (18.2)	0.016
V mesenterica superior resection— no (%)	–	2 (6,7)		
Arterial resection — no (%)	–	0	1 (3)	
ECOG status- no (%)				
0	23 (92)	26 (86.7)	28 (84.8)	0.785
1	2 (8)	4 (13.3)	5 (15.20)	
CA19-9 (kU/L), no (%)				
< 37	12 (48)	9 (30)	13 (39.4)	0.308
37 - 1000	9 (36)	13 (43.3)	15 (45.5)	
1001 - 12000	4 (16)	5 (16.7)	5 (15.1)	
>12000	–	3 (10)	–	
BMI (kg/m ²) category, no (%)				
BMI < 18.5	1 (4)	–	2 (6.1)	0.471
18.5 ≤ BMI < 25.0	8 (32)	15 (50)	13 (39.4)	
25.0 ≤ BMI < 30.0	9 (36)	8 (26.7)	11 (33.3)	
30.0 ≤ BMI < 35.0	7 (28)	4 (13,3)	6 (18.2)	
35.0 ≤ BMI	–	3 (10)	1 (3)	

3.3.2. Group of patients with advanced and metastatic disease

A total of 106 patients were enrolled in the study. Fifty-six patients were treated with mFOLFIRINOX, and 46 were treated with gemcitabine monotherapy. Four patients could not be treated because of rapid deterioration. Baseline (visit one) samples were collected from 106 patients, and 46 patients' data from two visits were available: 25 patients from the FOLFIRINOX arm and 21 from the gemcitabine arm. The patient characteristics in both group of chemotherapy regimens are depicted in Table 2. Only the ECOG status was significantly different between the groups.

Table 2. Summary of clinical characteristics of 102 unresectable patients treated with chemotherapy

Characteristic	FOLFIRINOX (N = 56)	Gemcitabine (N = 46)	P value
Age, years			
Median	61.5	70.0	0.086
Range	43–78	55–84	
Sex, n (%)			
Female	37 (66.1)	22 (47.8)	0.104
Male	19 (33.9)	24 (52.2)	
Evidence of distant metastasis, n (%)			
M0	22 (39.3)	17 (37.0)	0.929
M1	34 (60.7)	29 (63.0)	
Ascites presented, n (%)			
Yes	52 (92.9)	6 (13.0)	0.191
No	4 (7.1)	40 (87.0)	
Tumour grade, n (%)			
G1	1 (1.8)	1 (2.2)	0.178
G2	33 (58.9)	21 (45.7)	
G3	22 (39.3)	24 (52.2)	
ECOG performance status score, n (%)			
0	37 (66.1)	18 (39.1)	0.004
1	17 (30.4)	20 (43.5)	
2	2 (3.6)	8 (17.4)	
Level of CA 19-9 (kU/L), n (%)			
$37 \leq \text{CA 19-9} < 100$	9 (16.1)	7 (15.2)	0.833
$100 \leq \text{CA 19-9} < 1000$	16 (28.6)	17 (37.0)	

Characteristic	FOLFIRINOX (N = 56)	Gemcitabine (N = 46)	P value
1000 ≤ CA 19-9 < 12000	19 (33.9)	11 (23.9)	
12000 ≤ CA 19-9	12 (21.4)	11 (23.9)	
BMI (kg/m ²) category, n (%)			
BMI < 18.5	1 (1.8)	1 (2.2)	0.345
18.5 ≤ BMI < 25.0	27 (48.2)	23 (50.0)	
25.0 ≤ BMI < 30.0	13 (23.2)	17 (37.0)	
30.0 ≤ BMI < 35.0	12 (21.4)	4 (8.7)	
35.0 ≤ BMI	1 (1.8)	1 (2.2)	

3.3.3. Analysis of patients of all stages, whose data were collected from three visits

The median age in the selected cohort was 63.0±11,84 years; 15 (36.6%) individuals underwent surgery and adjuvant chemotherapy, and three (7.5%) surgery alone for early PDAC. Twenty-three (56.1%) individuals were treated with chemotherapy alone for advanced or metastatic disease. Thirteen individuals (34,2%) received the FOLFIRINOX regimen, and 25 (65,8%) gemcitabine alone in the adjuvant or metastatic setting. Most patients in our cohort had aggressive disease (G2, G3). The results of tumor marker CA 19-9, white blood cells, lymphocyte count, and an analysis across subpopulations are shown in Table 3.

Table 3. Summary of clinical characteristics of all 41 patients

Characteristics	Value
Cohort size	41
Demographics	
Female (no., %)	25 (61%)
Male (no., %)	16 (39%)
Median age at diagnosis (years)	63.0 (SD 11.84)
Localisation of tumor	
Head	30 (73%)
Body	2 (5%)
Tail	9 (22%)
Tumour stage	
I	1 (2.4%)
II	5 (12.2%)
III	17 (41.5%)
IV	18 (43.9%)
Lymph node status	
N0	11 (26.8%)

Characteristics	Value
N+	30 (73.2%)
Distant metastasis	
M0	32 (78%)
M1	9 (22%)
Tumour grade	
Grade 1	2 (4.9%)
Grade 2	20 (48,8%)
Grade 3	16 (39%)
Indeterminate grade	1 (2.4 %)
Not adenocarcinoma histologies	1 anaplastic, 2 indeterminate, 1 acinar, 1 adenosquamous
Type of treatment	
Surgery	18 (43,9%)
Adjuvant chemotherapy	15 (36.6%)
Chemotherapy 1st line	23 (56.1%)
Chemotherapy regimen	
mFOLFIRINOX	13 (34.2%)
Gemcitabine	25 (65.8%)

3.4. Correlation of peripheral blood lymphocyte subpopulations with clinical and tumor characteristics

3.4.1. Correlation in the early diseases' group.

The relationship between clinical characteristics and individual lymphocyte subpopulations was further investigated, and the obtained data are shown in Figure 5.

A negative correlation was found between age and the total number of leukocytes ($r(df) = -0.233, p=0.029$). A negative correlation was found between age and the total number of lymphocytes ($r(df) = -0.219, p=0.04$). A negative correlation was found between age and CD19 cells ($r(df) = -0.232, p=0.03$). A negative correlation was found between age and CD4+CD25+CD127+/- T regulatory cells ($r(df) = -0.248, p=0.02$) (Fig. 4a). A negative correlation was found between age and CD4+FOXP3+ T regulatory cells ($r(df) = -0.254, p=0.017$) (Fig. 4b). There was a significant difference between the sexes in the total leukocyte amount ($U = 688.00, p=0.027$). A negative correlation was found between CA19-9 and absolute lymphocyte count ($r(df) = -0.215, p=0.044$). A negative correlation was

found between CA 19-9 and CD19+ cells ($r(df) = -0.262, p=0.014$) (Fig. 4c). A negative correlation was found between CA 19-9 and CD3+CD4+ cells ($r(df) = -0.223, p=0.037$). A negative correlation was found between CA 19-9 and CD3-CD56+CD16- cells ($r(df) = -0.227, p=0.033$). A negative correlation was found between BMI and CD3-CD56+CD16+ NK cells ($r(df) = -0.382, p<0.001$) (Fig. 4d). A positive correlation was found between BMI and CD3-CD56+CD16- cells ($r(df) = -0.344, p=0.001$).

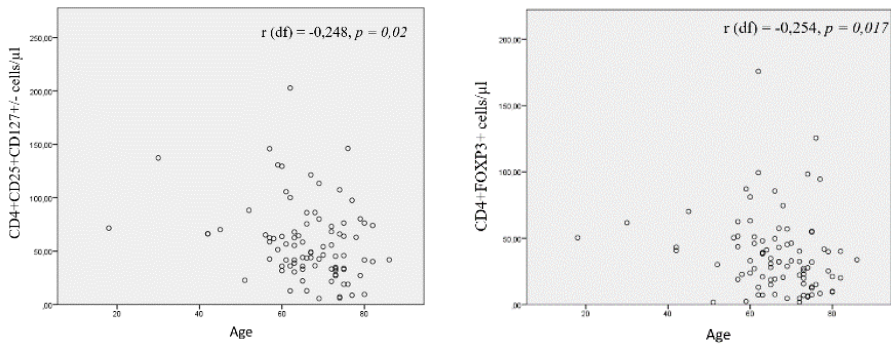


Fig. 4a Negative correlation between age and CD4+CD25+CD127+/- T regulatory cells in the resectable patients' group

Fig. 4b Negative correlation between age and CD4+FOXP3+ T regulatory cells in the resectable patients' group

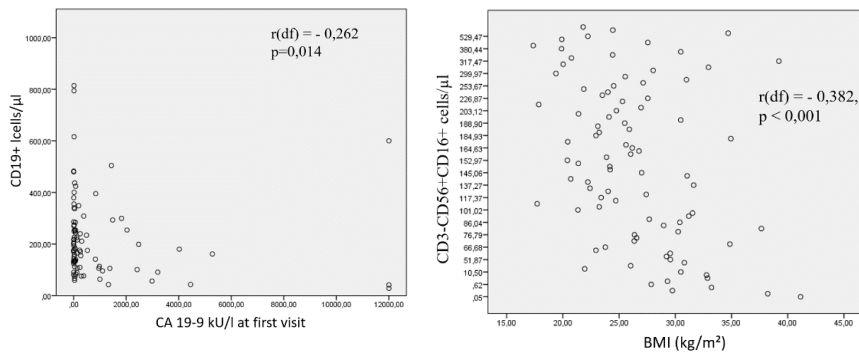


Fig. 4c Negative correlation between CA 19-9 and CD19+ B cells in the resectable patients' group

Fig. 4d Negative correlation between BMI and CD3-CD56+CD16+ NK cells in the resectable patients' group

3.4.2. Correlation in the group of patients with advanced and metastatic disease

The association between individual demographic indicators and lymphocyte subpopulations was assessed at the first visit. Correlation analysis revealed no relationship between the circulating subset counts and patient age. There were differences in total WBC (U [females, N = 60; males N = 45] = 825.50, $z = -3.40$, $p = 0.001$) (Fig. 5a) and cytotoxic CD8+CD57+ (U [females, N = 60; males, N = 45] = 1,033.00, $z = -2.05$, $p = 0.04$) (Fig. 5b) counts according to sex. Total lymphocytes (U [M0, N= 40; M1, N = 65] = 863.50, $z = -2.88$, $p = 0.004$) (Fig. 6a), B cells CD19+ (U [M0, N= 40; M1, N = 65] = 902.00, $z = -2.63$, $p = 0.009$) (Fig. 6b), T helper CD3+CD4+ (U [M0, N= 40; M1, N = 65] = 946.00, $z = -2.34$, $p = 0.019$) (Fig. 6c) and CD3-CD56+CD16- (U [M0, N= 40, M1, N = 65] = 981.00, $z = -2.105$, $p = 0.035$) (Fig. 6d) cell counts differed between patients with and without distant metastases. Total WBC (H [2] = 6.540, $p = 0.038$), (Fig. 7a) T helper CD3+CD4+ (H [2] = 6.277, $p = 0.043$) (Fig. 7b), and CD4+CD25+CD127+/- (H [2] = 8.209, $p = 0.017$) counts correlated with tumor differentiation grade. A statistically significant positive correlation was observed between CA 19-9 level and CD8+FOXP3+ count ($r [100] = 0.239$, $p = 0.015$). Body mass index was also positively correlated with NKT-like CD3+CD56+ cells ($r [100] = 0.21$, $p = 0.032$) (Fig. 8a) and cytotoxic CD8 + CD57 + T cells ($r [100] = 0.23$, $p = 0.018$) (Fig. 8b).

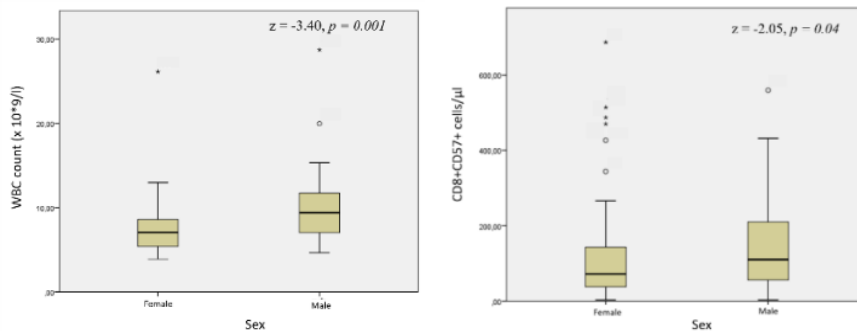


Fig. 5a Differences in the amount of leukocytes between the sexes in the unresectable patients' group, at visit 1

Fig. 5b Differences in the number of CD8+CD57+ cells/ μ l between sexes in the unresectable patients' group at visit 1

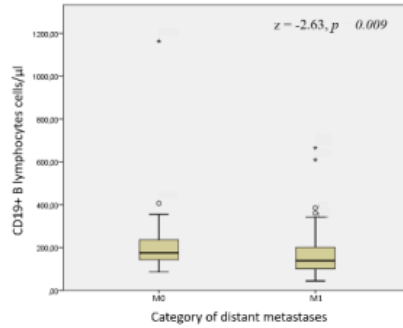
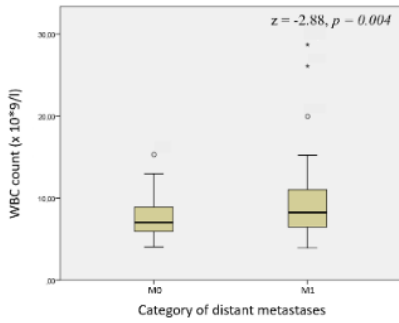


Fig. 6a Differences in leukocyte counts between patients with locally advanced and metastatic disease at visit 1

Fig. 6b Differences in CD19+ B lymphocytes between patients with locally advanced and metastatic disease at visit 1

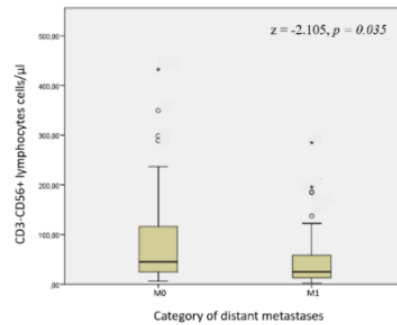
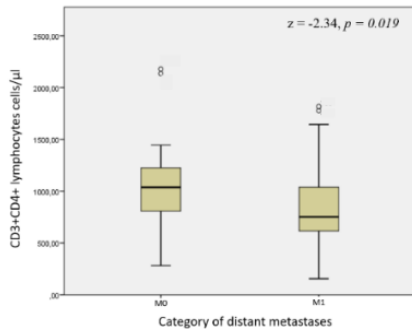


Fig. 6c CD3+CD4+ T helper differences between patients with locally advanced and metastatic disease at visit 1

Fig. 6d Differences in CD3-CD56+ lymphocytes between patients with locally advanced and metastatic disease at visit 1

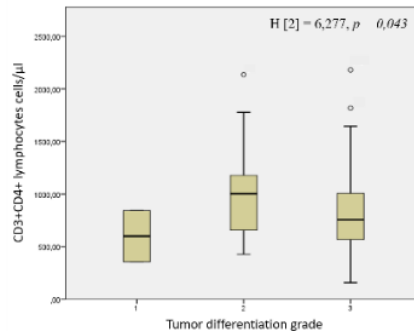
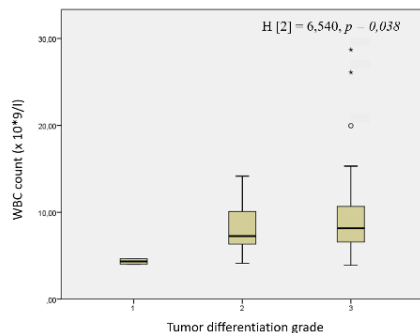


Fig. 7a Differences in the number of leukocytes between different degrees of differentiation, in the unresectable patients' group, at visit 1

Fig. 7b Differences in the amount of CD3+CD4+ helpers between different degrees of differentiation, in the unresectable patients' group, at visit 1

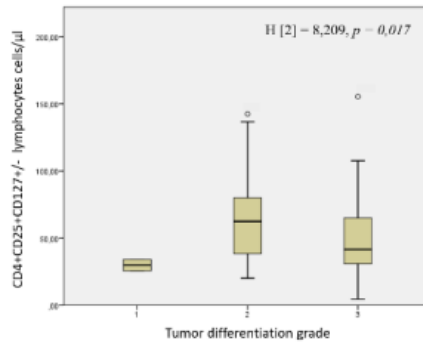


Fig. 7c Differences in the amount of CD4+CD25+CD127+/- T regulatory lymphocytes between different degrees of differentiation, in the unresectable patients' group, at visit 1

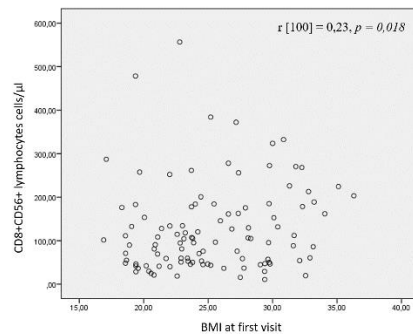
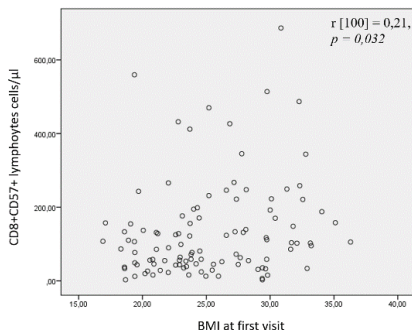


Fig. 8a Correlation of the amount of CD8+CD57+ lymphocytes at visit 1 with BMI in the unresectable group

Fig. 8b Correlation of the amount of CD8+CD56+ lymphocytes at visit 1 with BMI in the unresectable group

3.5. Influence of the applied treatment on subpopulations of peripheral blood lymphocytes

3.5.1. Early stages, resectable group (two visits)

After examining the patients' blood after two months. Since the start of treatment, the value of the CA 19-9 marker and the amount of CD4+FOXP3+ T regulatory,

CD8+CD25+CD127+/- cells and the CD4/CD8 ratio have significantly decreased, CD3+CD8+ T cells have increased (Table 4).

These changes were not significant in all groups. The amount of CA 19-9, CD4+FOXP3+ T regulatory cells, CD8+CD25+CD127+/- cells, and

CD4/CD8 ratio decreased the most in those treated with chemotherapy. And CD3+CD8+ T cells significantly increased in the untreated with chemotherapy group (Table 5)

Table 4. Changes in laboratory indicators (CA 19-9, lymphocyte subpopulations) two months after the start of treatment in the resectable group

*Only patients with samples collected at both visits were included (N = 34). Only cases with significant changes.

Feature	1st visit	2nd visit	P value*
	Mean (SD)	Mean (SD)	
CA19-9 (kU/l)	805 (2179.37)	152.7 (422.92)	<0.001
CD3+CD8+ (cells/μl)	450.5 (212.83)	573.8 (449.94)	0.032
CD4+FOXP3+ (cells/μl)	47.65 (29.55)	33.9 (19.31)	0.031
CD8+CD25+CD127+/- (cells/μl)	0.50 (0.57)	0.37 (0.34)	<0.001
CD4/CD8	2.5 (1.11)	2.2 (1.01)	0.004

Table 5. Evaluation of laboratory indicators (CA 19-9, levels of lymphocyte subpopulations) that changed significantly two months after the start of treatment in the entire sample in groups of patients who received different treatments

Feature/ numbers at first, second visit/ P-value/ adjuvant treatment	No adjuvant treatment N = 6 (17.6%)	FOLFIRINOX N = 8 (23.5%)	Gemcitabine N = 20 (58.8%)
CA19-9 (kU/l)	192.8 (378.76) 329.42 (779.02) P = 0.5	2038.4 (4258.6) 16.5 (15.48) P = 0.017	495.3 (818.63) 154.1 (364.97) P = 0.007
CD3+CD8+ (cells/μl)	298.1 (121.74) 379.34 (126.92) P = 0.028	500.6 (201.6) 822.1 (842.05) P = 0.208	476.2 9 (225.18) 532.8 (215.6) P = 0.296
CD4+FOXP3+ (cells/μl)	39.7 (32.73) 35.1 (21.51) P = 0.753	54 (25.4) 36.72 (19.1) P = 0.123	47.5 (30.98) 32.43 (19.62) P = 0.093
CD8+CD25+ CD127+/- (cells/μl)	0.16 (0.110) 0.4 (0.27) P = 0.075	0.79 (0.69) 0.51 (0.36) P = 0.012	0.46 (0.54) 0.29 (0.34) P < 0.001
CD4/CD8	3.2 (1.56) 2.997 (1.179) P = 0.463	2.52 (0.67) 2.1 (0.93) P = 0.05	2.29 (1.06) 1.97 (0.9) P = 0.04

3.5.2. Advanced disease (two visits)

The means between the two visits were compared, and differences were confirmed for some subsets. However, these findings needed to be more reliable for PFS and OS results. We subsequently examined differences in the frequencies of T cell subsets before treatment and after two months of chemotherapy (N = 46). We observed a decrease in the absolute numbers of NK CD3-CD56+CD16+ and CD3-CD56+CD16- and T regulatory CD4+FOXP3+ cells and an increase in lymphocyte percentage and CD3+CD56+ cells). Significant differences in CD3+CD4+ and CD3+CD56+ cells were observed in the FOLFIRINOX arm and in CD8+CD57- and CD4+FOXP3+ cells in the gemcitabine arm. Both regimens tended to affect CD3-CD56+CD16+ counts (Table 6). Fig.9 demonstrates how the CD8+CD57- population counts changed between the two visits.

Interestingly NK CD3-CD56+CD16- cells count at the second visit remained significant for PFS (HR, 0.994; 95% CI: 0.987–1.000; p = 0.047) and not significant for OS (HR, 0.994; 95% CI: 0.987–1.000; p = 0.051).

Table 6 The means and significance of differences between means of the two visits for CA 19-9 and all lymphocyte subsets in the resectable group. Only significant results included.

Parameters	FOLFIRINOX		N = 26	p Value*	Gemcitabine		N = 21	p Value*
	Visit 1 Mean (SD)	Visit 2 Mean (SD)			Visit 1 Mean (SD)	Visit 2 Mean (SD)		
CA 19-9 (kU/L)	3752.44 4524.33	1623.43 3296.59		0.001	2956.46 4580.90	1586.10 3049.59		0.007
WBC ($\times 10^9/L$)	7.50 2.38	6.28 2.79		0.03	7.8433 2.58	7.48 5.30		0.375
CD3+CD56+ (cells/ μ L)	118.04 81.51	156.89 130.07		0.019	114.38 93.99	124.22 77.58		0.092
CD8+CD57- (cells/ μ L)	315.76 140.74	276.94 144.91		0.353	331.09 228.92	181.00 103.42		0.014
CD3+CD8+CD57+ (% out of CD8+)	26.93 17.92	25.26 16.79		0.174	25.69 19.10	29.72 16.95		0.027
CD3+CD4+ (cells/ μ L)	898.38 307.09	1051.76 438.34		0.026	867.90 399.57	908.95 389.20		0.958
CD3-CD56+CD16+ (cells/ μ L)	184.26 142.92	108.42 57.43		0.005	168.36 148.28	108.42 104.31		0.004
CD3-CD56+CD16- (cells/ μ L)	58.59 79.63	48.12 69.56			76.05 80.20	41.20 43.64		0.004
CD4+FOXP3+ (cells/ μ L)	36.21	31.62		0.158	37.58	24.50		0.046
	21.28	16.47			28.79	14.23		

* Differences in means between the two visits

CA 19-9 – carcinoma antigen CA 19-9, WBC – white blood cell, LYM – lymphocytes, SD – standard deviation

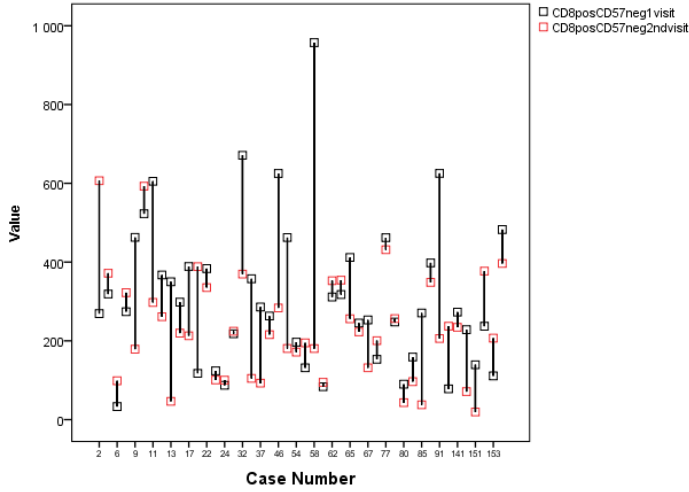


Figure 9. CD8+CD57- population counts changed between the two visits in some individual patients in the unresectable group

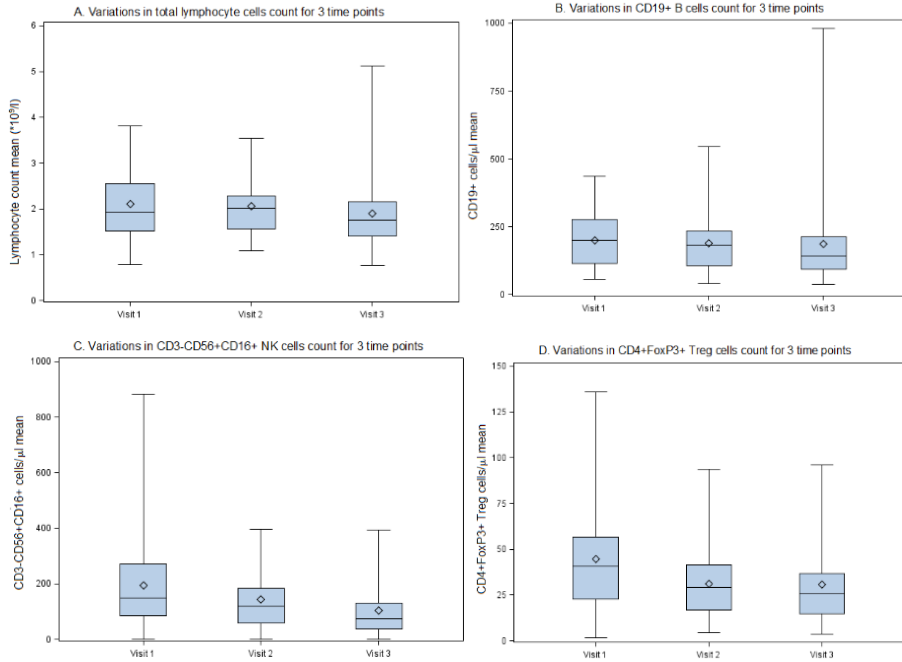
3.5.3. Patients of all stages, whose data were collected in three visits

The results of the change of the cancer marker CA 19-9, leukocytes, total lymphocytes, and individual subpopulations during the three visits are shown in Table 7.

The decline in CD19+ B lymphocytes [from 201.0 (99.66) to 190.09 (103.01) and 185.09 (164.23) cells/ μ l $p=0.012$], NK cells CD3-CD56+CD16+ [from 195.6 (176.34) to 143.88 (118.04) and 103.25 (93.76) cells/ μ l $p<0.001$], T regulatory cells CD4+FOXP3+ [from 44.67 (30.69) to 30.983 (17.63) and 30.656 (21.27) cells/ μ l, $p=0.004$] was observed at two and four months of follow up. Natural killer T (NKT)-like cells CD3+CD56+ [from 122.85 (103.96) to 152.95 (111.77) and 128.52 (90.33) cells/ μ l, $p=0.012$], cytotoxic T cells CD3+CD8+ [from 432.09 (211.53) to 498.31 (208.78) and 482.56 (317.15) cells/ μ l, $p=0.005$] tended to increase after two months and decrease thereafter. Statistically significant changes in parameters are shown in Fig. 10.

Table 7: Changes in parameters over time. Only significant parameters included

Parameters	Visit 1 Mean (SD)	Visit 2 Mean (SD)	Visit 3 Mean (SD)	p Value
CA19-9 (kU/l)	1047.06 (2234.99)	848.39 (2173.91)	1081.53 (2772.04)	0.002
WBC ($\times 10^9/l$)	7.47 (2.51)	6.85 (2.97)	6.04 (2.8)	0.012
LYM ($\times 10^9/l$)	2.1 (0.79)	2.05 (0.61)	1.90 (0.87)	0.011
CD19 (cells/ μ l)	201 (99.66)	190.09 (103.01)	185.09 (164.23)	0.012
CD3+CD56+ (cells/ μ l)	122.86 (103.96)	152.95 (111.77)	128.52 (90.33)	0.012
CD3+CD8+ (cells/ μ l)	432.09 (211.53)	498.31 (208.78)	482.56 (317.15)	0.005
CD3-CD56+CD16+ (cells/ μ l)	195.6 (176.34)	143.878 (118.04)	103.25 (93.76)	<.001
CD4+FOXP3+ (cells/ μ l)	44.67 (30.7)	30.98 (17.63)	30.656 (21.27)	0.004



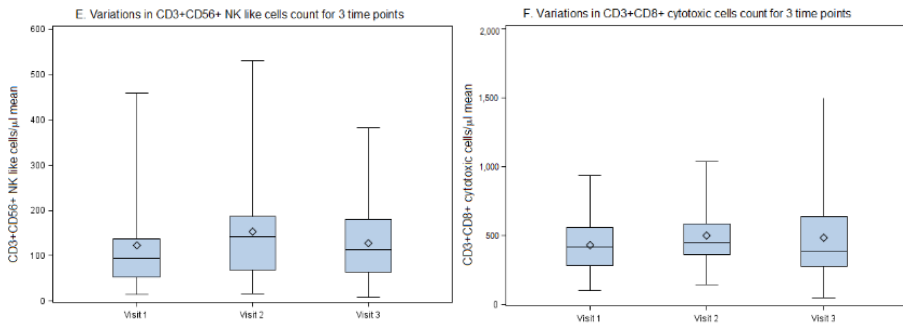


Fig. 10. Variations in peripheral blood cells absolute counts mean values at three- time points. A) Variations in total lymphocyte cells count at three-time points. B) Variations in CD19+ B cells count for 3-time points. C) Variations in CD3-CD56+CD16+ NK cells count for three-time points. D) Variations in CD4+FoxP3+ Treg cells count for three-time points. E) Variations in CD3+CD56+ NK-like cell count for three-time points. F) Variations in CD3+CD8+ cytotoxic cells count for three-time points.

3.6. Relationship of immune cells of the cancer microenvironment with subpopulations of peripheral blood lymphocytes

3.6.1. Patient characteristics, a relationship of tumor-stroma ratio with clinical signs

Sixty-eight patients, whose average age was 66.5 years, were included in the analysis of the operative pathological material. (from 18 to 86 years old), 56% consisted of women and 44% of men. According to tumor characteristics: the vast majority were G2 34 (50%) and G3 32 (47.1%) differentiated tumors, and only 2 (2.9%) were G1. The distribution according to stages was as follows: IA - 4 (5.9%), IB - 7 (10.3%), IIA - 9 (13.2%), IIB - 18 (26.5%), III - 29 (42.6%), IV – 1 (1.5%). Lymphovascular invasion was observed in 48 (70.6%), perineural invasion in 30 (44.1%), the resection margin was more often clean, and R0 resection was achieved in 39 (57.4%). Among the histological variants, the diagnosis of pancreatic ductal carcinoma prevailed. Still, four adenosquamous cells, three mucinous cystadenocarcinomas, one "foam" cell, and dedifferentiated and acinic cell carcinoma were also included in the analysis. 19 (27.9%) patients were not treated with chemotherapy, 22 (32.4%) were treated with the FOLFIRINOX regimen, and 27 (39.7%) with gemcitabine for adjuvant purposes.

No correlation was found between sex, age, stage, postoperative treatment tactics, tumor location in the pancreas, histological variant,

resection margin, lymphovascular invasion, CA 19-9 baseline value of perineural invasion, BMI, and tumor-stroma ratio. Tumor-stroma ratio significantly differed between G2 and G3 differentiation grades [U = 254.00, Z -3.721, p<0.000].

3.6.2. Relationship of the tumor-stroma ratio with the subpopulations of lymphocytes circulating in the blood

Indicators of total WBC, lymphocytes, various circulating lymphocyte subpopulations, and tumor-stroma ratio were not reliably related. A negative correlation was found between circulating B (CD19+) lymphocytes and the tumor-stroma ratio, $r(df) = -0.347$, $P = 0.004$ (Fig. 11). This trend also persists in the assessment of the second visit after two months from the start of treatment, B (C19+) lymphocytes were tested in only 29 patients, $r(df) = -0.426$, $P = 0.021$.

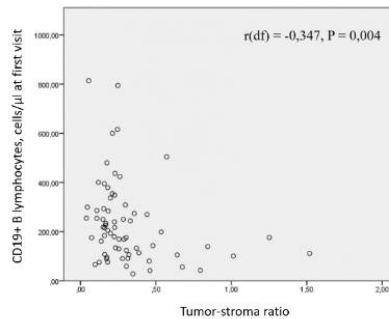


Fig. 11 Correlation between circulating B (CD19+) lymphocytes and tumor-stroma ratio

3.7. Survival results

3.7.1. Survival results in the early diseases group

The subjects were observed for a total of 20 months. (0-57 months), and living for 31 months. (7-57 months). 30 (26.4%) patients were alive at the time of analysis. In 17 (15%) patients, the disease did not progress. The median PFS was ten months (95% CI: 8.01–11.99), and median OS was 15 months (95% CI: 11.03–18.97).

PFS differed between chemotherapy arms and was 34 (95% CI: 0–77.79) months in chemotherapy-naïve patients, 10 (95% CI: 8.78–11.23) months in mFOLFIRINOX and 8 (95% CI: 6.22–9.78) months in the gemcitabine arm ($p = 0.034$, log-rank test), the HR for disease progression was 1.468 (95% CI: 1.066–2.021, $p = 0.019$). The OS was not reliably different: 35 (95% CI:

8.2–61.8) months in chemotherapy-naïve patients, 14 (95% CI: 11.03–16.97) months in the mFOLFIRINOX vs. 13 (95% CI: 4.03–21.97) months in the gemcitabine arm ($p = 0.439$, log-rank test); the hazard ratio for death was 1.223 (95% CI: 0.89–1.68, $p = 0.215$).

In the univariate analysis of PFS, the degree of differentiation, regional lymph node involvement, disease stage, lymphovascular invasion, and resection margin (Table 8), and CD8+CD25+CD127+/-, and CD8+FOXP3+ regulatory T cell levels before treatment (at the first visit) (Table 9) were significant factors ($p < 0.05$).

In univariate OS analysis, sex, degree of differentiation, involvement of regional lymph nodes, lymphovascular invasion and resection margin (Table 10), and the amount of CD8+FOXP3+ regulatory cells before treatment (at the first visit) HR 1.534, CI 1.007-2.336, $p = 0.046$ was a significant factor. After excluding deaths from other causes, R, LVI, sex, and degree of differentiation, N remained substantial for survival.

The significant factors revealed in the univariate analysis were further evaluated in the multivariate analysis, and the degree of differentiation, the presence of metastases in the regional lymph nodes, CD8+CD25+CD127+/- remained significant in PFS, while the degree of differentiation, the resection margin, and CD8+CD25+CD127+/- in OS (Table 11).

When analyzed by the Kaplan Majer method, after dividing the patients into two groups according to the mean CD8+CD25+CD127+/- cells/ μ l (less than 0.5 and > 0.5), there was a reliable difference in OS data, 17 (95% CI: 1.7-32.3) vs. 11 (95% CI: 7.1-14.9) months ($p = 0.041$, Breslow). The difference is more reliable when excluding patients who died from other causes than cancer in the 17 (95% CI: 0-39.5) analysis vs. 11 (95% CI: 7.4-14.6) months ($p = 0.031$, log-rank test) (Fig. 12a). No difference was found in PFS. And by the same method, after separating those who died for other reasons, and after examining different subgroups (patients without chemotherapy, different chemotherapy regimens), an extremely significant difference in PFS was obtained in the FOLFIRINOX group: the median survival of patients with a low initial amount of these cells was 12 (95% CI: 9.5- 14.5) months vs. with high amount 6 (95% CI: 3.5-8.5) months ($p = 0.008$, Log Rank) and OS also differed significantly 17 (95% CI: 2-55) vs. 7 (95% CI: 0-14.5) months ($p = 0.002$, log-rank test). The scatterplot of first-visit CD8+CD25+CD127+/- cells/ μ l values across chemotherapy groups is shown in (Fig. 12b).

Table 8 Univariate Cox Regression Analysis for PFS: demographic and clinical characteristics, all operable group (N = 88): treatment with one chemotherapy regimen and no treatment with adjuvant chemotherapy

Characteristics	HR	95% CI	P value
Patient factors			
Age	1.021	0.995–1,049	0.121
Male (ref. female)	1.617	0.970–2.696	0.065
BMI (kg/m ²) (ref<18.5)			
BMI category 18.5–24.9	0.219	0.019–2.502	0.222
BMI category >25	0.488	0.065–3.662	0.486
ECOG status (ref. 0)			
ECOG 1	1.081	0.491–2.383	0.846
Tumor features			
Differentiation grade (ref G1)			
G2	0.122	0.017–0,902	0.039
G3	0.514	0.307–0.861	0.011
Size of the primary tumor (ref. T1)			
T2	0.374	0.072–1.936	0.241
T3	0.750	0.292–1.928	0.550
T4	0.819	0.307–2.186	0.690
Status of the regional lymph nodes (ref. N0)			
N1	0.28	0.135–0.584	0.001
N2	0.726	0.415–1.271	0.263
Stage group (ref. IA)			
IB	0.021	0.001–0.377	0.009
IIA	0.028	0.003–0.29	0.003
IIB	0.024	0.002–0.254	0.002
III	0.077	0.009–0.659	0.019
Resection margin (ref. R0)			
R1	1.679	1.005–2.806	0.048
Lymphovascular invasion (ref. L0)			
L1	0,361	0.180–0.721	0.004
Perineural invasion (ref. no)			
Yes	1.654	0.996–2.748	0.052
Tumor localisation (ref. head)			
Body	1.153	0.492–2.705	0.743
Tail	0.898	0.32–2.526	0.839
CA19-9 kU/l (ref <37)			
37-100	0.493	0.240–1.013	0.054
100-1000	0.977	0.445–2.148	0.954
>1000	1.098	0.537–2.248	0.797

Table 9. Univariate Cox regression analysis for PFS: lymphocyte subpopulations at the first visit, resectable group (N = 88), both chemotherapy groups (mFOLFIRINOX and gemcitabine monotherapy), and no adjuvant chemotherapy. Only significant findings are included.

Feature	HR	95% CI	P value
WBC	1.000	1.000-1.001	0,015
CD8+CD25+CD127+/-	1.350	1.042-1.749	0,023
CD8+FOXP3+	1.529	1.043-2.242	0,03

Table 10. Univariate Cox regression analysis OS: demographic and clinical characteristics, all patients of the resectable group (N = 88): treated with one chemotherapy regimen and no adjuvant chemotherapy.

Feature	HR	95% CI	P value
Patients' factors			
Age	1.030	0.999–1.061	0.055
Male sex (ref female)	0,447	0.266–0.753	0.002
BMI (kg/m ²) (ref<18.5)			
BMI category 18.5 - 24.9	0.990	0.235–4.163	0.989
BMI category >25	1.408	0.830–2.389	0.204
ECOG status (ref 0)			
ECOG category 1	0.612	0.298–1.257	0.182
Tumour factors			
Differentiation grade (ref G1)			
G2	0.139	0.019–1.028	0.053
G3	0.381	0.220–0.659	0.001
Primary tumor size (ref. T1)			
T2	0.707	0.197–0.533	0.595
T3	0.656	0.273–1.577	0.346
T4	0.496	0.193–1.257	0.146
Lymph node status presented (ref. N0)			
N1	0.396	0.194–0.808	0.011
N2	0.843	0.471–1.507	0.564
Tumor stage (ref. IA)			
IB	0.362	0.037–3.583	0.385
IIA	0.125	0.013–1.233	0.075
IIB	0.143	0.015–1.324	0.087
III	0.360	0.047–2.743	0.324
Status of surgical margins (ref. R0)			
R1	2.284	1.350–3.865	0.002
Lymphovascular invasion (ref. L0)			
L1	2.554	1.280–5.097	0.008

Feature	HR	95% CI	P value
Perineural invasion (ref. absent)			
persist	1.303	0.778–2.183	0.314
Tumor localisation (ref. Head)			
Body	1.760	0.695–4.460	0.233
Tail	1.896	0.656–5.478	0.237
CA19-9 kU/l (ref <37)			
37-100	0.703	0.341–1.450	0.34
100-1000	0.913	0.394–2.117	0.832
>1000	1.076	0.513–2.256	0.845

Table 11. Independent predictive factors of PFS and OS evaluated in multivariate analysis (the resectable group)

OS model 1: tumor features LR: 429.5, $p < 0.0001$, $N = 88$, $\chi^2=21.85$			
Feature	HR	95% CI	P value
Differentiation grade	2.422	1.456–4.029	0.001
Resection margin	1.997	1.168–3.415	0.011
OS model 2: tumor features and lymphocyte subpopulations LR: 408.4, $p < 0.0001$, $N = 84$, $\chi^2=26.25$			
Differentiation grade	2.577	1.497–4.435	0.001
Resection margin	2.060	1.175–3.613	0.012
CD8+CD25+CD127+/- at first visit	1.486	1.097–2.015	0.011
PFS model 3: tumor features LR: 449.0, $p < 0.0001$, $N = 84$, $\chi^2=20.49$			
Differentiation grade	2.023	1.263–3.239	0.003
Lymph node status	1.720	1.228–2.408	0.002
PFS model 4: tumor features and lymphocyte subpopulations LR: 417.67, $p < 0.0001$, $N = 81$, $\chi^2=25.849$			
Differentiation grade	2.497	1.483–4.203	0.001
Lymph node status	1.693	1.193–2.402	0.003
CD8+CD25+CD127+/-at first visit	1.457	1.107–1.918	0.007

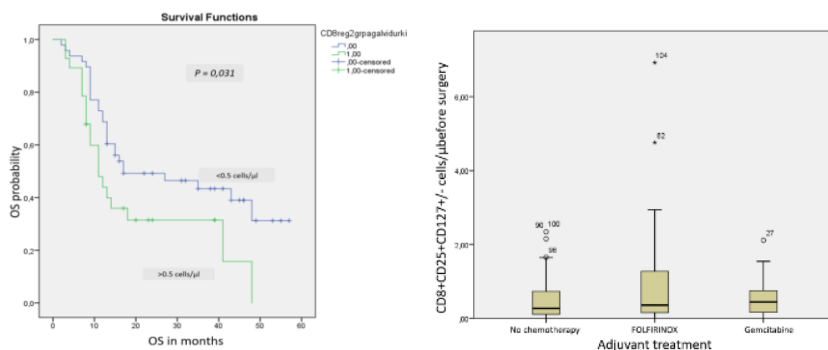


Fig. 12a The difference in OS between groups of patients with low and high CD8+CD25+CD127+/- cells/μl of the resectable arm

Fig. 12b Distribution of CD8+CD25+CD127+/- cells/μl at the first visit in the three arms of adjuvant treatment.

3.7.2. The influence of the tumor-stroma ratio on survival

Cox regression and Kaplan Maier analysis of the tumor-tumor ratio revealed any influence on PFS and OS. Only dividing patients into four groups according to tumor-stromal ratio and analyzing the group of patients treated with FOLFIRINOX chemotherapy yielded a difference in PFS with tumor–stromal ratio very low at 46 (95% CI: 0) months, low at 9 (95% CI: 4.7–13.3) months, median 6 (95% CI: 3.9–8.2) months, high 12 (95% CI: 10.8–13.2) months ($P = 0.015$, log-rank) (Figure 13). In total, this group includes only 22 patients: five patients with very low (<0.1621405305), five patients with low (from 0.1621405305 0.2272217600), five patients with moderate (from 0.2272217601 to 0.3431194908) and seven patients with a high (> 0.3431194908) tumor stroma ratio.

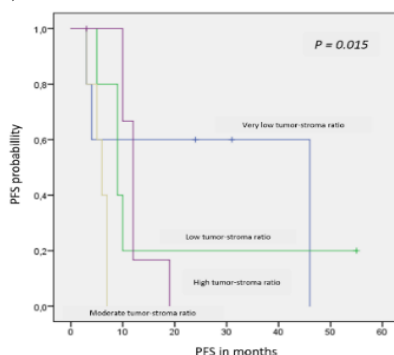


Fig. 13. Results of PFS in operated patients treated with FOLFIRINOX chemotherapy regimen, divided by tumor stroma ratio into four groups (22 cases): very low (<0.1621405305), low (from 0.1621405305 0.2272217600), moderate (from 0.2272217601 to 0.3431194908) and high (> 0.3431194908).

3.7.3. Survival results in the advanced and metastatic disease group

The median follow-up periods for all and for alive patients were 27 months (range 0–54) and 29 months (range 13–54), respectively. Nine (8.5%) patients survived at the last follow-up. Four (3.8%) patients showed no disease progression. The median PFS was seven months (95% CI: 6.2–7.8), and the median OS was 11.0 months (95% CI: 8.7–13.3).

Progression-free survival differed and was 8.9 (95% CI: 7.1–10.3) months in mFOLFIRINOX vs. 7.1 (95% CI: 4.8–9.3) months in the gemcitabine arm ($p = 0.029$, Breslow test); the HR for disease progression was 0.71 (95% CI: 0.47–1.05, $p = 0.089$). The OS differed and was 15.1 (95% CI: 12.3–18.0) months in mFOLFIRINOX vs. 12.7 (95% CI: 8.96–16.5) months in gemcitabine arm ($p = 0.012$, Breslow test); the HR for death was 0.79 (95% CI: 0.52–1.92, $p = 0.26$).

In the univariate survival analysis for PFS, the factors with significant results ($p < 0.05$) included the presence of distant metastases, particularly in multiple sites, ECOG status, and the levels of absolute WBC counts, lymphocyte count, cytotoxic CD3+CD8+, CD8+CD57- cells, and NK CD3-CD56+CD16- cells before treatment. However, we divided the patients according to chemotherapy arms, and the above-mentioned factors remained significant in the FOLFIRINOX group, but the presence of distant metastases alone remained essential in the gemcitabine group (Tables 12 and 13). Factors identified as significant during univariate analysis were studied using multivariate analysis. The presence of distant metastases, ECOG status, and CD8+CD57- count before chemotherapy remained valuable for PFS.

In the univariate survival analysis for OS, age, ECOG status, differentiation grade, CA 19-9, and the levels of absolute WBC counts, CD3+CD8+, mainly CD8CD57- cells and CD4/CD8 ratio were significant. Nevertheless, only the clinical factors remained significant when the chemotherapy regimen was considered (Tables 14). In multivariate analysis for OS, independent prognostic factors included ECOG status, CA 19-9 level, and absolute WBC and CD8+CD57- cell counts before treatment initiation.

Subsequently, we investigated the influence of individual subsets on survival using the Kaplan–Meier method, thereby distinguishing between two and four groups of each sub-population according to the median value or quartiles. After grouping CD8+CD57- into two groups at the first visit (less and more than 194 cells/mL), we detected differences in PFS (Figure 8A)

and OS (Figure 8B) in the whole study population and subgroups M0, M1, G2, G3, FOLFIRINOX, and gemcitabine arm.

We tried to understand the effect of chemotherapy on survival at different CD8+CD57- values; perhaps one of the regimens is superior to the other in a particular group of patients. Twenty-five patients with a low CD8+CD57-count (<194 cells/mL) and worse prognosis were analysed. Ten patients received FOLFIRINOX and 15 were treated with gemcitabine alone. Five patients from the gemcitabine arm survived for 8–24 months (age 64–78 years, four female, one male, two patients with G2 tumours, three patients with G3 tumours, and two patients with metastatic disease; their CA 19-9 varied between 241 kU/L and >12000 kU/L. The ECOG status at diagnosis was 0–1, and the patients received 0–2 subsequent chemotherapy lines).

Absolute lymphocyte count at baseline demonstrated significant PFS and OS in the mFOLFIRINOX and gemcitabine arms, metastatic groups, and differentiation grade arms. CD4+FOXP3+ cells also demonstrated significance in terms of OS; the cut-off was 49.57 cells/ μ L, and there was significant OS in differentiation grade 3, but not PFS, not in mFOLFIRINOX or gemcitabine, different metastatic statuses, and G2 tumours. CD3-CD56+CD16- had an impact on PFS and was divided into two groups.

Table 12. Univariate Cox regression analysis for progression-free survival in different chemotherapy groups (mFOLFIRINOX or gemcitabine monotherapy): demographic and clinical parameters, resectable group (N = 102).

Parameter	Reference value	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabine (N = 46)		
		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
Age		0.998	0.965-1.031	0.89	1.041	0.994-1.089	0.090
Sex							
Male	Female	0.594	0.329-1.072	0.084	1.037	0.576-1.868	0.903
BMI category, kg/m ²							
18.5-24.9	<18.5	1.444	0.192-10.866	0.721	2.412	0.313-18.597	0.398
>25	<18.5	1.310	0.745-2.304	0.348	0.808	0.442-1.476	0.488
ECOG status							
1	0	0.019	0.003-0.138	<0.001	0.432	0.180-1.039	0.061
2	0	0.029	0.004-0.217	0.001	0.742	0.325-1.691	0.477
Tumor differentiation grade							
G2	G1	1.665	0.225-12.314	0.618	0.404	0.054-3.034	0.378
G3	G1	2.288	0.301-17.384	0.424	1.075	0.594-1.945	0.810
Distant metastases							
M1	M0	0.320	0.168-0.608	<0.001	0.446	0.231-0.860	0.013
Ascites							
Present	Absent	0.543	0.192-1.537	0.25	0.711	0.294-1.721	0.449
CA19-9, kU/L							
37-100	<37	2.588	1.191-5.623	0.016	0.564	0.227-1.399	0.217
100-1000	<37	1.164	0.402-3.375	0.779	0.486	0.166-1.427	0.189
>1000	<37	1.494	0.744-3.000	0.259	0.528	0.289-1.172	0.130

Table 13. Univariate Cox regression analysis for progression-free survival in different chemotherapy groups (mFOLFIRINOX or gemcitabine monotherapy): lymphocyte subsets at baseline (Visit 1), resectable group (N = 102). Only significant values included.

Parameter	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabine monotherapy (N = 46)		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
FC LYM count	0.605	0.387-0.945	0.027	0.761	0.502-1.154	0.199
CD3+CD8+	0.998	0.996-1.000	0.039	1.000	0.998-1.001	0.362
CD3-CD56+CD16-	0.995	0.991-1.000	0.032	0.996	0.992-1.001	0.106

Table 14. Univariate Cox regression analysis for overall survival in different chemotherapy groups (mFOLFIRINOX or gemcitabine monotherapy): demographic and clinical parameters, resectable group (N = 102).

Parameter	Reference value	mFOLFIRINOX (N = 56)			Gemcitabine monotherapy (N = 46)		
		HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
Age		1.002	0.969-1.036	0.898	1.044	0.994-1.096	0.088
Sex							
Male	Female	0.819	0.454-1.476	0.507	1.449	0.785-2.675	0.235
BMI category, kg/m ²							
18.5-24.9	<18.5	0.787	0.105-5.885	0.816	3.789	0.448-30.032	0.207
>25	<18.5	1.297	0.732-2.296	0.373	1.012	0.549-1.867	0.968
ECOG status							
1	0	0.010	0.001-0.116	<0.001	0.393	0.165-0.934	0.034
2	0	0.014	0.001-0.166	0.001	0.519	0.222-1.215	0.519
Tumor differentiation grade							
G2	G1	0.192	0.024-1.513	0.117	0.380	0.050-2.880	0.349
G3	G1	0.468	0.263-0.832	0.010	0.987	0.538-1.814	0.967
Distant metastases							
M1	M0	0.520	0.289-0.935	0.029	0.579	0.308-1.087	0.089
Ascites							
Present	Absent	0.447	0.158-1.266	0.130	0.635	0.266-1.519	0.308
CA19-9, kU/L							
37-100	<37	1.848	0.860-3.969	0.115	0.601	0.237-1.528	0.285
100-1000	<37	1.007	0.351-2.892	0.989	0.267	0.074-0.962	0.267
>1000	<37	0.773	0.373-1.605	0.490	0.645	0.317-1.312	0.645

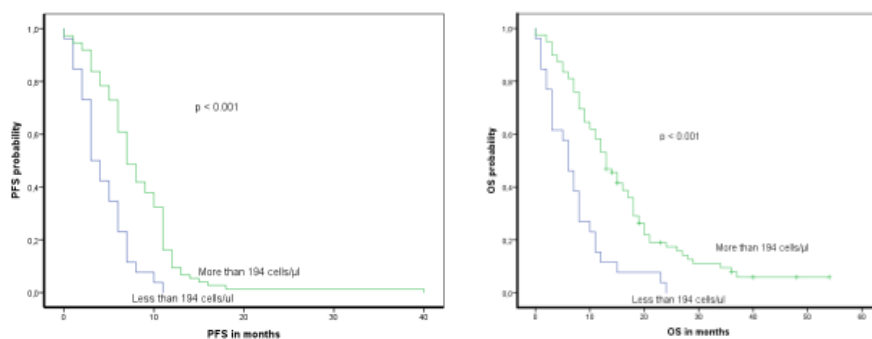


Figure 14. Kaplan–Maier analysis of patients with different CD8CD57-cells according to a cut-off of 194 cells/ μ L. (A) PFS results. (B) OS results of the unresectable group.

DISCUSSION

The main goal of our study was to detect the influence of various immune factors on survival. In terms of survival prognosis, the study sample is quite heterogeneous. The prognosis of pancreatic cancer is determined by the spread of the disease and the degree of differentiation. These characteristics of cancer itself are more important in various statistical analyses than the biomarkers secreted by the tumor or regulated by the immune system.

On the other hand, the entire study sample has to be first divided into two groups according to the disease stage and the treatment goal (cure or only control of the disease). We can only use the entire study sample to analyze changes in lymphocyte subpopulations, not survival.

The average age in our study population was 66 years, which is somewhat lower than the world data. It is considered that the development of pancreatic cancer depends on age; the most common cases are 70 years old. And nearly 90% after age 55 (1).

In our study, women were more often affected. However, men are generally more at risk of developing PDAC in Lithuania. The distribution between sexes varies worldwide: for example, in Armenia, the Czech Republic, and Hungary, men are more affected, and in North America, Western, and Northern Europe, women are more affected (1).

We divided the study patients into resectable and unresectable because we considered it our task to evaluate how the initial treatment affects lymphocyte subpopulations in the blood. Some patients with unresectable cancer underwent surgery, then a good response was noticed, but they

remained in the unresectable cohort in the analysis. Since treatment tactics and prognosis differ, it would be rational to divide all patients into three groups according to operability (resectable, borderline, unresectable). The pooling of borderline, locally advanced, and metastatic conditions may have influenced the results.

Standard treatment was applied to the study patients based on international recommendations, and conventional surgical methods were used. With adjuvant FOLFIRINOX or gemcitabine regimens, PFS in our study cohort was 10 and 8 months in the FOLFIRINOX and gemcitabine arms, respectively. However, these results were significantly better in the PRODIGE-24 trial at 21.6 months in FOLFIRINOX and 12.8 months in gemcitabine arms. Also, OS in our cohort was 14 months in the FOLFIRINOX group and 13 months in Gemcitabine, and in that multicenter randomized trial, the corresponding 54 and 45 months (19, 20). This dramatic discrepancy in survival results is explained by the different characteristics of the patients in these studies: Our group of patients treated with chemotherapy after surgery included primarily tumors of G2 and G3 differentiation (whereas in the study mentioned above, even 32% were G1) and we included many stage III patients. In comparison, in the cited research, there were only 0.4%. Therefore, our population of operated and chemotherapy-treated patients aligns more with the PRODIGE 29-UCGI 26 (NEOPAN) trial (21).

First-line treatment was a combination regimen of FOLFIRINOX or monotherapy with gemcitabine, although according to today's international guidelines, gemcitabine could still be combined with nab-paclitaxel. PFS results in our study were: 8.9 months in the mFOLFIRINOX arm and 7.1 months in gemcitabine. They are even better than in randomized clinical trials (6.4 months and 3.3 months, respectively). In our study, better OS data 15.1 months in the mFOLFIRINOX group and 12.7 months in the gemcitabine arm also differs from the aforementioned randomized trial (11.1 months. and 6.8 months) (22). In the latter, only patients with metastatic disease of the fourth stage were included, determining the differences in survival rates.

For the second and subsequent lines of treatment, combination regimens of oxaliplatin, liposomal irinotecan, and fluorouracil were prescribed based on international guidelines. During our research, treatment options in Lithuania expanded. Some patients with perfect functional status were treated with the mFOLFIRINOX regimen multiple times. After proving the benefit of liposomal irinotecan, some patients are treated with its combination with fluorouracil in the second or subsequent lines. Therefore,

the second and subsequent lines of treatment in our study patients were heterogeneous and may have slightly influenced the results of OS.

Eternal changes in the number of lymphocytes have been known for a long time. In 1992, researchers studied the younger than 44-year-old and older than 80 women blood noticed that in the elderly group, fewer active effector cells were detected in the peripheral blood (CD3+CD4+CD25+; CD3+CD4+CD25+CD127+; CD3+CD4+CD25+ and CD3+CD4+CD25highCD127+, and CD25 δ Foxp3+ phenotypes: CD3+CD4+ CD25 δ Foxp3+ and CD3+CD4+CD25 δ CD127 δ Foxp3+ increased with age (23). Tumors can promote T cell exhaustion and senescence, essential features that coexist in cancer patients (24). T-cell dysfunction occurs over time through various mechanisms. Cells become exhausted and senescent and no longer respond to usual T cell receptor effects. Senescent cells (SA-T) accumulate in cancer tissue, promoting chronic tissue inflammation and tumor growth progression (25). In our entire study population, CD4+CD25+CD127+/- were age-dependent, and in the early-stage patient group, total leukocyte, CD19+ B lymphocyte, CD4+CD25+CD127+/-, CD4+FOXP3 subpopulations were associated with age, which may be due to a perpetual change in CD4+ cell phenotype to more inflammatory or anti-inflammatory Treg (26). Alternatively, the effect of tumor cells on T regulatory lymphocytes: releasing chemokines that attract them from secondary lymphoid structures to the TME or promoting their proliferation and differentiation by converting immature dendritic cells into TGF- β producing ones. With age, B cells decline, and their subpopulations and antibody responses change (27)

In the advanced group, no correlation with age was observed, which may indicate that immune processes are more determined by other factors, such as cancer, abundantly expressed tumor tissue, and altered metabolism factors, but not eternal (28, 29).

Baseline total lymphocytes, B CD19+ cells, CD3+ lymphocyte subpopulations, CD3+CD4+ and CD3+CD4-CD8- depended on disease stage. The stage reflects the volume of the tumor and the number of cancer cells. The relationship between the stage and the number of lymphocytes was already described in 1991 when it was noticed that in gastric cancer, as the stage increases, the total number of lymphocytes, CD3+, CD4+, and CD8+ lymphocytes decreases (30). CD4+ cells are potent antitumor agents, capable of directly recognizing tumor cells and activating death-promoting ligands and indirectly through secreted cytokines (31). Thus, our results show that in pancreatic cancer, T helpers decrease as the tumor mass increases and therefore support cancer development.

B lymphocytes with the marker CD19+ in our study differed when analyzed every 2 or 3 months (reliably decreased), and in the advanced patients' group, it was related to the presence of distant metastases. In the general population, it depended on the stage (decreased in more advanced). When analyzing the group of operated patients, a negative correlation was found between circulating B (CD19+) lymphocytes at the first visit and the tumor-stroma ratio. Tumor-infiltrating B lymphocytes are essential in initiating and developing PDAC (32). B cells generally exhibit protumorigenic and even immunosuppressive effects, but in lymphoid structures, their function changes to tumor suppressor and immunostimulatory (33). Tumor-infiltrating B lymphocytes can improve OS in various solid tumors (e.g., breast, ovarian) (32). Cancer patients lack B cells, as demonstrated in studies of non-small cell lung cancer (34). An abundance of circulating CD19+ B cells in nasopharyngeal carcinoma was associated with better five-year survival, appearing as an independent prognostic factor for OS and PFS (35). In preclinical models of PDAC, tumor-infiltrating B cells still led to progression (32). In addition, B cells can also lead to fibrosis by secreting factors that stimulate collagen production in PDAC patients (36). Anticancer treatment reduces the number of circulating B cells: this has been demonstrated in the follow-up of esophageal (37) and lung cancer (38) patients treated with radiotherapy.

Thus, the role of B cells in cancer development is unquestionable, although there is not much data on chemotherapy and changes in circulating B cells. In our study, the decrease in peripheral blood during treatment may indicate a connection with the spread of cancer in the body. As the disease mass diminishes, the count of circulating B lymphocytes decreases, which is supported by establishing a link between the stage and distant metastases. Furthermore, when the tumor predominates over the stroma (with a higher tumor-stroma ratio), peripheral B-cell activity may be reduced as a reaction to cancer-released substances. An effect on survival could not be demonstrated, apparently due to the excessive influence of other factors.

In our study, the amount of NK CD3-CD56+CD16- in the general population decreased during treatment and had a relationship with the presence of metastases in the group analysis. More is known about the role of NK cells in solid tumors and PDAK specifically. NK cells are antitumor cytotoxic (39). Higher levels of NK cells in the peripheral blood of patients with resectable PDAC and TME are associated with better survival (40). Although the prognostic value can be assessed differently, an association with worse survival is observed in advanced diseases. (39, 41). The effect of

surgery on NK cells remains unclear (42). However, in murine models, resection and adjuvant chemotherapy with gemcitabine activated NK cells and protected against disease relapse (43). Gemcitabine is likely to have a beneficial effect on NK cells (44), and this effect is also observed in tumors of other localizations, such as the lung (45). The effect of FOLFIRINOX on this population has yet to be apparent. We detected their impact on the PFS in the advanced-metastatic disease group by evaluating all patients and studying FOLFIRINOX-treated patients separately.

Interestingly, NK CD3-CD56+CD16- levels in resectable disease were associated with BMI: fewer cells were detected at higher index. According to the literature, NK cells in children with obesity were activated and metabolically altered, and their function was impaired, unable to respond to stimuli (46). Furthermore, mechanisms such as NK cell subpopulations, distribution, phenotype, cytokine secretion, and cytotoxicity are already known to be associated with obesity, and how these factors complement each other in cancer development (47).

Cytotoxic T lymphocytes are crucial in the PDAC microenvironment, and their increase indicates a good prognosis. Our study observed an increase in the number after two months. In subsequent visits, no such increase was observed in the general population and the resectable group. This would indicate a particularly positive influence of the surgical treatment on the activity of these cells, especially since the effect of gemcitabine on CD3+CD8+ cell count is unclear (48). Oxaliplatin combination increased the number of cytotoxic T cells in gastric TME (49). Analyzing lymphocyte subpopulations in the advanced and metastatic disease group, CD3+CD8+ cell counts before treatment were highly significant in PFS and OS. Namely, CD3+CD8+CD57- were significant, while CD3+CD8+CD57+ were not. A low pretreatment CD3+CD8+CD57- cell count was associated with a worse prognosis in the entire study population and in various subgroups. The prognostic value of circulating CD3+CD8+CD57- cells did not depend on the presence of metastases and the aggressiveness of the disease (degree of differentiation). Due to the small number of patients, it is difficult to trace the effect of chemotherapy on the changes in these cells and the prognosis of patients. However, various treatment regimens change the prognosis of patients with a low initial CD3+CD8+CD57- value, and the role of this subpopulation can be predictive in the era of modern chemotherapy.

Tumor infiltration by cytotoxic CD3+CD8+ cells in cancer patients is considered a good prognostic factor, and several recent studies confirm this (48, 50, 51). Moreover, a meta-analysis performed in the field of PDAC revealed a positive CD3+ and a significant influence of CD8+ cells in the

center of the tumor (52). The prognostic value of these circulating CD3+CD8+ subpopulations is unclear, but interest has recently increased as new anticancer immunotherapy drugs enter the arena (53-56). Thus, CD8+ T cells are essential in forming anticancer immunity (56).

CD8+ cytotoxic T cells are the primary triggers of acquired immunity, and their cancer-specific immune responses are identified as the main targets of all immunotherapies. Many facets of CD8+ T-cell dysfunction include tolerance, anergy, exhaustion, and senescence. T cell senescence is characterized by decreased expression of CD28 and increased expression of CD57 antigens (57). Several sources report that the levels of CD8+CD28- and CD8+CD57+ T cell subpopulations increase in the peripheral blood and TME of solid and hematologic oncology (58). We failed to demonstrate an adverse effect of CD8+CD57+ T lymphocytes on the survival of PDAC patients. However, the prognostic value of CD8+CD57- T lymphocytes in the peripheral blood suggests that immature T lymphocytes are decisive for cancer control in advanced and metastatic PDAC patients. Thus, inhibition of T lymphocyte senescence to control cancer development may serve to develop new therapeutic strategies (57). CD3+CD8+ and CD8+CD57- levels were prognostically significant for gemcitabine monotherapy and FOLFIRINOX. Interestingly, patients with shallow baseline values of these cells survived longer when treated with gemcitabine. The effects of gemcitabine *in vitro* have been studied (53), but no precise data on immunostimulation *in vivo*. The immunostimulatory or immunosuppressive effects of mFOLFIRINOX are still unclear and widely studied, although this neoadjuvant regimen has shown the ability to increase TME infiltration by CD8+ cells. (59, 60). According to our data, we can guess that gemcitabine better stimulates the growth of CD8+CD57- and thereby improves patient survival.

Neither CD3+CD8+ in total nor 57+/- subpopulations individually affected the survival of patients in the surgical group, but CD3+CD8+CD57- cells significantly decreased after surgery.

Some studies have shown that T regulatory lymphocytes in peripheral blood and TME are increased in PDAC patients (61), worsening the prognosis (62). Cisplatin/gemcitabine-based chemotherapy can reduce CD4+CD25+FOXP3+ levels in non-small cell lung cancer patients (63). The FOLFIRINOX regimen reduces T regulatory (FoxP3+) cell density in PDAC patients (64). Our study confirms a decline in T regulatory cells throughout treatment in the general population, with a more significant decline in the first two months. The same downward trend was observed in operable and non-operable subgroups separately.

In the advanced group patients, the amount of T regulatory CD4+FOXP3+ at the first visit was significant, but only in the OS, general population, and the G3 tumor group. This significance suggests that the influence of these cells depends on factors such as poor differentiation and is not an independent prognostic factor.

In the resectable arm, regulatory lymphocytes CD4+CD25+CD127+/- and CD4+FoxP3 were related to the age of the patients. Their quantity was lower in the older ones, but the survival analysis did not show the influence.

When analyzing the patients undergoing surgical treatment, changes in CD8+ regulatory lymphocytes and their significance for survival were determined. CD8+ CD25+Foxp3+ was first described as a subpopulation of single CD8+ thymocytes, phenotypically and functionally similar to CD4+ regulatory lymphocytes. They are believed to suppress the immune system non-specifically or antigen-specifically (viral, allogeneic antigens) through cell contact. In 2007 they were identified in prostate cancer TME by confocal microscopy. In 2009 in a study with 40 colon cancer patients, increased levels of CD8+CD25+Foxp3+ in peripheral blood and cancer tissue compared to healthy subjects were found to be related to tumor stage, and isolation of T8reg cells from tissues *ex vivo* revealed their ability to suppress the proliferation of autologous CD4+CD25- T cells and Th1 production (65). The amount of peripheral CD8+CD25High+FOXP3+ T lymphocytes in the blood of HCC patients is also increased, and the expression of FOXP3 in CD8+CD25High+ T cells is higher than in CD8+CD25low+ and CD8+CD25negative T cells (66). Thus, it is currently considered that the phenotype of CD8+ Treg lymphocytes is characterized by a high expression of IL-2 receptor α -chain C25 and CD122 (IL-2, IL-15 receptor β -chains), adhesion molecule CD103, ectoenzymes CD39 and CD73, inhibitory receptors CD152, expression of CTLA-4, MHC-II-binding molecule LAG-3, and apoptosis-promoting molecule FasL. In addition, CD8+ T regulatory lymphocytes can also express soluble FoxP3, IFN- γ , IL-10, IL-34, and IL-35 molecules. The regulatory functions are performed with the help of several mechanisms: the direct transmission of the death-negative signals of the target cell via CTLA-4 or PD1 to the antigen-presenting cell is stimulated, the release of immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β . The suppressive effect on CD4+ and CD8+ effector T lymphocytes is helpful in graft versus host and autoimmune diseases. In cancer, suppressing this population could change the course of the disease (67).

There is no literature data on the significance of these cells in pancreatic cancer. Our analysis rejects the association of CD8+CD25+CD127+/- with disease progression in the resectable group but supports their significance as

an independent factor in OS. Furthermore, the fact that during the disease, they decrease in the chemotherapy groups (when FOLFIRINOX and gemcitabine are evaluated separately, the decrease is significant) also shows its predictive value. Such an effect of surgery on the number of CD8+CD28- was also observed in non-small cell lung cancer patients (68). The particularly significant influence of the number of CD8+CD25+CD127+/- in the FOLFIRINOX arm can be explained by the higher effectiveness of chemotherapy in patients with a less suppressed immune system.

Recently, the role of NK-like CD3+CD56+ cells in cancer development has also been described. Their increase was found in HCC patients after stereotactic radiotherapy, and a higher number led to a better prognosis (69). NK cell-like PD-L1 expression may even be considered a potential target for immunotherapy (68). Cells of this subpopulation increase in colorectal cancer patients after surgery (70). The percentage expression of NK-like CD16+ cells in samples collected before surgery has shown a shorter progression-free survival (71). In gastric cancer patients, low levels of this subpopulation are associated with poor survival (72). There are no data on the importance of CD3+CD56+ cells in PDAC. We found that their amount changes significantly during treatment: it increases after two months in the entire study population and the non-operated arm but not in the operated group. This could indicate an inhibitory influence of the tumor mass or a stimulatory effect of chemotherapy. No effect on survival could be detected in any of the study groups.

The absolute number of lymphocytes can be considered a prognostic factor in PDAC patients, but the data are diverse (73). With modern research capabilities, the aim is to more accurately describe which subpopulations determine the changes in the total number of lymphocytes and is most prognostically valuable. According to the data of our study, the total absolute number of lymphocytes changed significantly during treatment. In the advanced disease arm, PFS was influenced considerably, with lower baseline values leading to faster disease progression. Meanwhile, in the arm of early cancer, a correlation of absolute lymphocyte count before treatment with CA 19-9 was seen, and no influence on survival was found.

The pathological material of the resectable disease group patients was examined in terms of the tumor-stroma ratio, and a correlation was found only with circulating B lymphocytes and differences between the degrees of G2 and G3 differentiation. The tumor-stroma relationship is extremely widely studied in studies of various solid tumors. The examination methods vary, there is no standardized method yet, and the prognostic and predictive value has yet to be refined. In the surgical material of 95 patients with

PDAC, when assessing the ratio of tumor stroma in the invasive part of the tumor, there was no relationship with the size, stage, and influence on survival rates after dividing the patients into two groups. The association with peripheral blood lymphocyte subpopulations has not been investigated (74). TME and circulating components of the immune system and their interaction are also being studied in patients with other cancer localizations (54), but the studies are isolated, and the samples are small.

In HCC, the lower stromal content leads to better survival after liver resection or transplantation (75). The paradoxical effect of a small tumor-stromal ratio in PFS may be due to immunogenic or other stromal properties in early tumors. However, overall stromal predominance is considered an immunosuppressive and tumor-promoting factor (76). These circulating B cells do not directly affect survival, but their effect on TME may be significant (77).

Most recent studies have investigated tumor-infiltrating lymphocyte activity, were retrospective, limited to a smaller number of patients, or focused on one marker. We wanted to investigate whether the state of the immune system, as reflected by the activity of peripheral blood lymphocytes, influences the effectiveness of anticancer treatment and whether surgery or chemotherapy changes the state of the immune system in pancreatic cancer patients. Of course, although peripheral blood indicators can be quickly evaluated, they may not reflect the characteristics of the tumor environment.

We have shown that the cell count of some lymphocyte subtypes changes during treatment, but those changes are not significant in PFS and OS. The influence of some lymphocyte subtypes before any treatment on survival rates in groups of both early and advanced diseases treated with today's accepted surgical and systemic treatment methods has been determined. This is the only study to examine the relationship of two chemotherapy regimens to changes in the immune system and one of the few to address the role of the FOLFIRINOX regimen on the immune system.

The limitations of our study are the small and heterogeneous cohort, short intervals between blood samples, and lack of randomization, which immediately distorts the survival results. Randomization, according to age and functional status, would clarify the value of influence on survival. Longer intervals between visits could reveal the long-term effects of chemotherapy on the immune system. The small sample size may explain the negative results regarding the effect of immune cell changes on survival. Thus, in the future, a larger spectrum of immune cells should be included in the research. An attempt should also be made to link the studies of peripheral

blood subpopulations of patients with progressive disease groups to TME and to evaluate the influence of newer chemotherapy agents.

CONCLUSIONS

1. After two months of treatment (after pancreatic resection surgery and adjuvant chemotherapy), the peripheral blood significantly increases cytotoxic CD3+CD8+ cells and decreases T regulatory CD4+FoxP3+, CD8+CD25+, and CD4/CD8 ratio.
2. The tumor-stroma ratio of pancreatic tissue negatively correlates with the amount of circulating B CD19+ lymphocytes in the blood before radical surgery.
3. After two months of treatment with only systemic chemotherapy (advanced disease group), significantly decreased NK CD3-CD56+CD16+, CD3-CD56+CD16-, T regulatory CD4+FoxP3 and increased NK-like CD3+CD56+ cells.
4. The following prognostic indicators were determined:
 - a. in the resectable group, a lower initial value of T regulatory CD8+CD25+CD127+/- is associated with better overall survival;
 - b. a low tumor-stroma ratio leads to better survival without disease progression;
 - c. in the advanced disease (unresectable) group, a higher baseline CD8+CD57- cell value is associated with better progression-free and overall survival.

REFERENCES

1. Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(44), 9694. 3
2. Laura D. Wood, Marcia Irene Canto, Elizabeth M. Jaffee, Diane M. Simeone, Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment, *Gastroenterology*, Volume 163, Issue 2, 2022, Pages 386-402.e1, ISSN 0016-5085, doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056. 10
3. Bachmann, J., Michalski, C. W., Martignoni, M. E., Büchler, M. W., & Friess, H. (2006). Pancreatic resection for pancreatic cancer. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 8(5), 346–351. doi.org/10.1080/13651820600803981 19
4. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, et al.; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a

- randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Sep 8;304(10):1073-81. doi: 10.1001/jama.2010.1275
5. Hackert, Thilo MD; Sachsenmaier, Milena; et al.;. Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Annals of Surgery* 264(3):p 457-463, September 2016. | DOI: 10.1097/SLA.0000000000001850 28
 6. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1817-25. doi: 10.1056/NEJMoa1011923.
 7. Chen, J., Hua, Q., Wang, H., Zhang, D., Zhao, L., Yu, D., Pi, G., Zhang, T., & Lin, Z. (2021). Meta-analysis and indirect treatment comparison of modified FOLFIRINOX and gemcitabine plus nab-paclitaxel as first-line chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *BMC cancer*, 21(1), 853. doi.org/10.1186/s12885-021-08605-x 47
 8. Wang-Gillam A, Li C-P, Bodoky G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2016; 387: 545–557 51
 9. Bao K, Li X, He X, Jian L. Pharmacoeconomic Evaluation of Erlotinib for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Clin Ther*. 2021 Jun;43(6):1107-1115. doi: 10.1016/j.clinthera.2021.04.012. Epub 2021 May 29.
 10. Zhang J, Wolfgang CL, Zheng L. Precision Immuno-Oncology: Prospects of Individualized Immunotherapy for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Jan 30;10(2):39. doi: 10.3390/cancers10020039.
 11. Safi F, Roscher R, Bittner R, Schenkluhn B, Dopfer HP, Beger HG. High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas*. 1987;2(4):398-403. doi: 10.1097/00006676-198707000-00006.
 12. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:247-60. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_15.
 13. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, et al.; Maintenance Olaparib for Germline *BRCA*-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Jul 25;381(4):317-327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387.
 14. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, Barua S, Wang H, Rao A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Spatial computation of intratumoral

- T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun.* 2017 Apr 27;8:15095. doi: 10.1038/ncomms15095.
15. Chang JH, Jiang Y, Pillarisetty VG. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: An updated review. *Medicine (Baltimore).* 2016 Dec;95(49):e5541. doi: 10.1097/MD.0000000000005541.
 16. Orhan A, Vogelsang RP, Andersen MB, Madsen MT, Hölmich ER, Raskov H, Gögenur I. The prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2020 Jun;132:71-84. doi: 10.1016/j.ejca.2020.03.013.
 17. Chun B, Pucilowska J, Chang S, et al.; Changes in T-cell subsets and clonal repertoire during chemoimmunotherapy with pembrolizumab and paclitaxel or capecitabine for metastatic triple-negative breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2022 Jan;10(1):e004033. doi: 10.1136/jitc-2021-004033.
 18. Bersanelli M, Gnetti L, Vaglio A, et al.; Correlations between tumor-infiltrating and circulating lymphocyte subpopulations in advanced renal cancer patients treated with nivolumab. *Acta Biomed.* 2019 Dec 23;90(4):468-474. doi: 10.23750/abm.v90i4.7057.
 19. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al.; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Dec 20;379(25):2395-2406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775.
 20. Conroy T, Castan F, Lopez A, et al.; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2022 Nov 1;8(11):1571-1578. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.3829.
 21. Ducreux, M. P., Desgrippes, R., Rinaldi, et al.; (2022). 1296MO PRODIGE 29-UCGI 26 (NEOPAN): A phase III randomised trial comparing chemotherapy with folfirinox or gemcitabine in locally advanced pancreatic carcinoma (LAPC). *Annals of Oncology*, 33, S1136. 45
 22. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011 May 12;364(19):1817-25. doi: 10.1056/NEJMoa1011923.
 23. Cruvinel Wde M, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Samazi KC, Kállas EG, Cendoroglo MS, Andrade LE. Abnormal phenotypic distribution of

- regulatory and effector T cells in octogenarian and nonagenarian women. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2015 Aug;61(4):329-35. doi: 10.1590/1806-9282.61.04.329.
24. Kaiser M, Semeraro MD, Herrmann M, Absenger G, Gerger A, Renner W. Immune Aging and Immunotherapy in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7016. Published 2021 Jun 29. doi:10.3390/ijms22137016 206.
 25. Minato N, Hattori M, Hamazaki Y. Physiology and pathology of T-cell aging. *Int Immunol*. 2020 Apr 12;32(4):223-231. doi: 10.1093/intimm/dxaa006.
 26. Elyahu Y, Hekselman I, Eizenberg-Magar I, et al.; Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes. *Sci Adv*. 2019 Aug 21;5(8):eaaw8330. doi: 10.1126/sciadv.aaw8330. PMID: 31457092; PMCID: PMC6703865. 208
 27. de Mol J, Kuiper J, Tsiantoulas D, Foks AC. The Dynamics of B Cell Aging in Health and Disease. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:733566. doi: 10.3389/fimmu.2021.733566.
 28. Qin C, Yang G, Yang J, Ren B, Wang H, Chen G, Zhao F, You L, Wang W, Zhao Y. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies. *Mol Cancer*. 2020 Mar 2;19(1):50. doi: 10.1186/s12943-020-01169-7.
 29. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, et al.; Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):559-63. doi: 10.1038/nature13490.
 30. Hong WS, Hong SI, Kim CM, Kang YK, Song JK, Lee MS, Lee JO, Kang TW. Differential depression of lymphocyte subsets according to stage in stomach cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1991 Apr;21(2):87-93. doi: 10.1093/oxfordjournals.jjco.a039451.
 31. Bernard D, Ventresca MS, Marshall LA, Eveleigh C, Wan Y, Bramson JL. Processing of tumor antigen differentially impacts the development of helper and effector CD4+ T-cell responses. *Mol Ther*. 2010 Jun;18(6):1224-32. doi: 10.1038/mt.2010.30.
 32. Roghanian A, Fraser C, Kleyman M and Chen J: B Cells Promote Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov* 6(3): 230- 232, 2016. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16- 0100 213
 33. Melzer MK, Arnold F, Stifter K, Zengerling F, Azoitei N, Seufferlein T, Bolenz C and Kleger A: An immunological glance on pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* 21(9): 3345, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093345 214
 34. Wang Y, Zhou N, Zhu R, Li X, Sun Z, Gao Y, Liu W, Meng C, Ge Y, Bai C, Li T and Liu H: Circulating activated immune cells as a

- potential blood biomarkers of non-small cell lung cancer occurrence and progression. *BMC Pulm Med* 21(1): 282, 2021. DOI: 10.1186/s12890-021-01636-x 215
35. Shen DS, Yan C, Liang Y, Chen KH and Zhu XD: Prognostic significance of circulating lymphocyte subsets before treatment in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Manag Res* 13: 8109-8120, 2021. DOI: 10.2147/CMAR.S334094 216
 36. Minici C, Rigamonti E, Lanzillotta M, et al.; B lymphocytes contribute to stromal reaction in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 9(1): 1794359, 2020. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1794359 217
 37. Lv Y, Song M, Tian X, Yv X, Liang N, Zhang J. Impact of radiotherapy on circulating lymphocyte subsets in patients with esophageal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Sep 4;99(36):e20993. doi: 10.1097/MD.0000000000020993.
 38. Chen Y, Jin Y, Hu X and Chen M: Effect of chemoradiotherapy on the proportion of circulating lymphocyte subsets in patients with limited-stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 70(10): 2867-2876, 2021. DOI: 10.1007/s00262-021-02902-x 218
 39. Wu SY, Fu T, Jiang YZ and Shao ZM: Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 19(1): 120, 2020. DOI: 10.1186/s12943-020-01238-x 219
 40. Lee leem M, Aoki T, Matsushita H, Karasaki T, Hosoi A, Odaira K, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Ohara O, Arita J, Hasegawa K, Kakimi K, Kokudo N. NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 8;495(2):2058-2065. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.083.
 41. Lee HS, Leem G, Kang H, Jo JH, Chung MJ, Jang SJ, Yoon DH, Park JY, Park SW, Song SY, Bang S. Peripheral natural killer cell activity is associated with poor clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Feb;36(2):516-522. doi: 10.1111/jgh.15265.
 42. Iannone F, Porzia A, Peruzzi G, et al.; Effect of surgery on pancreatic tumor-dependent lymphocyte asset: modulation of natural killer cell frequency and cytotoxic function. *Pancreas* 44(3): 386-393, 2015. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000288
 43. Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, Brooks J, et al.; Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural Killer Cells.

44. Van Audenaerde JRM, Roeyen G, Darcy PK, Kershaw MH, Peeters M and Smits ELJ: Natural killer cells and their therapeutic role in pancreatic cancer: A systematic review. *Pharmacol Ther* 189: 31-44, 2018. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.003
45. Zhang X, Wang D, Li Z, Jiao D, Jin L, Cong J, Zheng X, Xu L. Low-Dose Gemcitabine Treatment Enhances Immunogenicity and Natural Killer Cell-Driven Tumor Immunity in Lung Cancer. *Front Immunol.* 2020 Feb 25;11:331. doi: 10.3389/fimmu.2020.00331.
46. Tobin LM, Mavinkurve M, Carolan E, Kinlen D, O'Brien EC, Little MA, Finlay DK, Cody D, Hogan AE, O'Shea D. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight.* 2017 Dec 21;2(24):e94939. doi: 10.1172/jci.insight.94939.
47. Bähr I, Spielmann J, Quandt D, Kielstein H. Obesity-Associated Alterations of Natural Killer Cells and Immunosurveillance of Cancer. *Front Immunol.* 2020 Mar 13;11:245. doi: 10.3389/fimmu.2020.00245.
48. Lohneis P, Sinn M, Bischoff S, Jühling A, Pelzer U, Wislocka L, Bahra M, Sinn BV, Denkert C, Oettle H, Bläker H, Riess H, Jöhrens K and Striefler JK: Cytotoxic tumour-infiltrating T lymphocytes influence outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 83: 290-301, 2017. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.06.016 32
49. Wei Q, Xu Q, Yuan X, Li JJ, Chen L, Luo C, Zhu X and Ying JE: Immunological impact of chemotherapy on the tumor microenvironment in gastric cancer. *J Surg Oncol* 123(8): 1708- 1715, 2021. DOI: 10.1002/jso.26449
50. L. Sams, S. Kruger, V. Heinemann, D. Bararia, S. Haebe, S. Alig, M. Haas, et al., Alterations in regulatory T cells and immune checkpoint molecules in pancreatic cancer patients receiving FOLFIRINOX or gemcitabine plus nab-paclitaxel, *Clin Transl Oncol.* 23 (11) (2021) 2394–2401, doi.org/10.1007/s12094-021-02620-x
51. A. Gabrielson, Y. Wu, H. Wang, J. Jiang, B. Kallakury, Z. Gatalica, et al., Intratumoral CD3 and CD8 T-Cell Densities Associated with Relapse Free Survival in HCC, *Cancer Immunol Res.* 4 (5) (2016) 419–430, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0110>.
52. Wang C, Wang HN, Wang L. Biomarkers for predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Cancer.* 2022 Jan 1;13(2):481-495. doi: 10.7150/jca.65012.
53. Yang F, Xu GL, Huang JT, Yin Y, Xiang W, Zhong BY, Li WC, Shen J, Zhang S, Yang J, Sun HP, Wang WS, Zhu XL. Transarterial

- Chemoembolization Combined With Immune Checkpoint Inhibitors and Tyrosine Kinase Inhibitors for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Efficacy and Systemic Immune Response. *Front Immunol.* 2022 Feb 18;13:847601. doi: 10.3389/fimmu.2022.847601.
54. Verma R, Hanby AM, Horgan K, Verghese ET, Volpato M, Carter CR, Hughes TA. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Aug;183(1):49-59. doi: 10.1007/s10549-020-05757-5. Epub 2020 Jun 23.
 55. S. Tolaney, D.R. Ziehr, H. Guo, et al., Phase II and Biomarker Study of Cabozantinib in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Patients, *Oncologist* 22 (2017) 25–32, doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0229.
 56. H. Raskov, A. Orhan, J.P. Christensen, I. Gøgenur, Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy, *Br. J. Cancer* 124 (2021) 359–367, doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4.
 57. Huff WX, Kwon JH, Henriquez M, Fetcko K, Dey M. The Evolving Role of CD8⁺CD28⁻ Immunosenescent T Cells in Cancer Immunology. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 8;20(11):2810. doi: 10.3390/ijms20112810.
 58. V. Tedeschi, G. Paldino, M. Kunkl, M. Paroli, R. Sorrentino, L. Tuosto, M.T. Fiorillo, CD8+ T Cell Senescence: Lights and Shadows in Viral Infections, Autoimmune Disorders and Cancer, *Int J Mol Sci* 23 (6) (2022) 3374, doi.org/10.3390/ijms23063374.
 59. T. Michelakos, L. Cai, V. Villani, F. Sabbatino, F. Kontos, C. Fernandez-del Castillo, et al., Tumor microenvironment immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma patients treated with neoadjuvant therapy, *Natl. Cancer Inst.* 113 (2) (2021) djaa073, doi.org/10.1093/jnci/djaa07.
 60. J. Allen, C. Cernik, S. Bajwa, R. Al-Rajabi, A. Saeed, et al., Association of Neutrophil, Platelet, and Lymphocyte Ratios with the Prognosis in Unresectable and Metastatic Pancreatic Cancer, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 3283, doi.org/10.3390/jcm9103283
 61. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS and Linehan DC: Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169(5): 2756-2761, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.169.5.2756
 62. Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, Ni B, Lu B and Wang H: An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is

- correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 9(3): e91551, 2014. PMID: 24637664. DOI: 10.1371/journal.pone.0091551
63. Chen C, Chen Z, Chen D, Zhang B, Wang Z, Le H. Suppressive effects of gemcitabine plus cisplatin chemotherapy on regulatory T cells in nonsmall-cell lung cancer. *J Int Med Res.* 2015 Apr;43(2):180-7. doi: 10.1177/0300060514561504.
 64. T. Michelakos, L. Cai, V. Villani, F. Sabbatino, F. Kontos, C. Fernandez-del Castillo, et al., Tumor microenvironment immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma patients treated with neoadjuvant therapy, *Natl. Cancer Inst.* 113 (2) (2021) djaa073, doi.org/10.1093/jnci/djaa07.
 65. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Ménégaux F, Rosenzweig M, Lemoine F, Klatzmann D, Taieb J. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut.* 2009 Apr;58(4):520-9. doi: 10.1136/gut.2008.158824.
 66. Zahran AM, Nafady-Hego H, Mansor SG, Abbas WA, Abdel-Malek MO, Mekky MA, Hetta HF. Increased frequency and FOXP3 expression of human CD8+CD25^{High} T lymphocytes and its relation to CD4 regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Immunol.* 2019 Jul;80(7):510-516. doi: 10.1016/j.humimm.2019.03.014.
 67. Chen C, Chen D, Zhang Y, Chen Z, Zhu W, Zhang B, Wang Z, Le H. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol.* 2014 Feb;18(2):255-61. doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.004
 68. Tao L, Wang S, Kang G, Jiang S, Yin W, Zong L, Li J and Wang X: PD-1 blockade improves the anti-tumor potency of exhausted CD3+CD56+ NKT-like cells in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 10(1): 2002068, 2021. DOI: 10.1080/2162402X.2021.2002068 239
 69. Li TT, Sun J, Wang Q, Li WG, He WP, Yang RC, Duan XZ. The effects of stereotactic body radiotherapy on peripheral natural killer and CD3+CD56+ NKT-like cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2021 Jun;20(3):240-250. doi: 10.1016/j.hbpd.2020.12.015.
 70. Krijgsman D, De Vries NL, Andersen MN, Skovbo A, Tollenaar RAEM, Bastiaannet E, Kuppen PJK, Hokland M. The effects of tumor resection and adjuvant therapy on the peripheral blood immune cell

- profile in patients with colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Oct;69(10):2009-2020. doi: 10.1007/s00262-020-02590-z.
71. Krijgsman D, de Vries NL, Skovbo A, Andersen MN, Swets M, Bastiaannet E, Vahrmeijer AL, van de Velde CJH, Heemskerk MHM, Hokland M, Kuppen PJK. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Jun;68(6):1011-1024. doi: 10.1007/s00262-019-02343-7.
 72. Peng LS, Mao FY, Zhao YL, Wang TT, Chen N, Zhang JY, Cheng P, Li WH, Lv YP, Teng YS, Guo G, Luo P, Chen W, Zou QM, Zhuang Y. Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55222-55230. doi: 10.18632/oncotarget.10484.
 73. J. Allen, C. Cernik, S. Bajwa, R. Al-Rajabi, A. Saeed, et al., Association of Neutrophil, Platelet, and Lymphocyte Ratios with the Prognosis in Unresectable and Metastatic Pancreatic Cancer, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 3283, doi.org/10.3390/jcm9103283
 74. Leppänen J, Lindholm V, Isohookana et al.; Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas.* 2019 Jan;48(1):43-48. doi: 10.1097/MPA.0000000000001195. PMID: 30451798; PMCID: PMC6296849. 240
 75. Lv Z, Cai X, Weng X, Xiao H, Du C, Cheng J, Zhou L, Xie H, Sun K, Wu J, Zheng S. Tumor-stroma ratio is a prognostic factor for survival in hepatocellular carcinoma patients after liver resection or transplantation. *Surgery.* 2015 Jul;158(1):142-50. doi: 10.1016/j.surg.2015.02.013.
 76. Liu X, Xu J, Zhang B, Liu J, Liang C, Meng Q, Hua J, Yu X, Shi S. The reciprocal regulation between host tissue and immune cells in pancreatic ductal adenocarcinoma: new insights and therapeutic implications. *Mol Cancer.* 2019 Dec 13;18(1):184. doi: 10.1186/s12943-019-1117-9.
 77. Delvecchio FR, Goulart MR, Fincham REA, Bombadieri M, Kocher HM. B cells in pancreatic cancer stroma. *World J Gastroenterol.* 2022 Mar 21;28(11):1088-1101. doi: 10.3748/wjg.v28.i11.1088.

PADĖKA

Noriu padėkoti disertacijos vadovui prof. Audriui Šileikiui ir konsultantui prof. D. Characiejui už visokeriopą palaikymą, pastabas ir patarimus.

Ypatingą padėką norėčiau išreikšti VU Klinikinės medicinos instituto, Hematologijos ir onkologijos klinikos vadovui prof. dr. L.Griškevičiui, už profesionalią pagalbą, konstruktyvią kritiką ir rekomendacijas.

Taip pat norėčiau padėkoti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Pilvo ir onkochirurgijos centro kolektyvui ir vadovui akad. Prof. K.Strupui bei Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro kolegoms onkologams chemoterapeutams, kurie padėjo įtraukti pacientus į klinikinį tyrimą, tapusį disertacijos pagrindu. Dėkoju visiems pacientams, kurie sutiko dalyvauti. Laboratorinės medicinos centro, Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijos darbuotojams ir vadovei doc. R.Matuzevičienei dėkoju už laboratorinių tyrimų atlikimą, interpretavimą. Ačiū dr. T.Žvirbliui už reikšmingą pagalbą, atliekant surinktų duomenų statistinę analizę. Taip pat norėčiau padėkoti recenzentams doc. B.Brasiūnienei, dr. V.Pašukonienei, prof. G. Simučiai už itin vertingas pastabas.

Galiausiai už palaikymą ir paramą norėčiau padėkoti dukrai Ievai, tetai Stanislavai ir tėčiui Kęstučiui.

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 20 egz.