

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

ŽILVINAS SURVILA
(Biochemijos studijų programa)

Magistro baigiamasis darbas

**CIRKULIUOJANČIŲ PROSTATOS VĖŽIO IMUNINIŲ VEIKSNIŲ
PROGNOSTINIS VAIDMUO**

Darbo vadovė prof. dr. Vita Pašukonienė

Studentas _____
(parašas)

(parašas)

Konsultantė Margarita Žvirblė

(parašas)

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1 Membraniniai PD-L1 ir PD-1 baltymai	7
1.1.1 Membraninių PD-L1 ir PD-1 struktūra ir funkcijos	7
1.1.2 PD-L1 ir PD-1 kaip priešvėžinės terapijos taikinyš.....	10
1.2 PD-1 ir PD-L1 tirpios formos	11
1.2.1 Tirpių PD-L1 ir PD-1 susidarymas	11
1.2.2 sPD-L1 ir sPD-1 funkcijos.....	13
1.2.3 Tirpūs sPD-L1 ir sPD-1 skirtinguose vėžio tipuose	13
1.2.4 sPD-1 ir sPD-L1 predikcinės savybės.....	15
1.3 Imuninės ląstelės ir jų vaidmuo	17
1.3.1 CD4+ ir CD8+ T limfocitai	18
1.3.2 NK ląstelės	20
1.3.3 Treg ląstelės	21
1.3.4 Mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės	22
1.4 Išvados iš literatūros apžvalgos	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	25
2.1 Bioetikos leidimas.....	25
2.2 Pacientų grupės atrinkimas tyrimui	25
2.3 Kontrolinės grupės rinkimo kriterijai.....	26
2.4 Kraujo plazmos išskyrimas	27
2.5 Ląstelių fenotipavimas	27
2.6 Kraujo plazmos sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijos nustatymas	28
2.7 Statistinė analizė	28
3. REZULTATAI.....	30
3.1 Kontrolinės grupės charakteristikos.....	30
3.2 sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijų padidėjimas prostatos vėžio pacientams	30
3.3 sPD-L1 ir sPD-1 ryšys su prostatos vėžio atsinaujinimu ir agresyvumu.....	32
3.4 sPD-L1 sąsaja su naviku	36
3.5 sPD-1 ir sPD-L1 sąsajos su imuninėmis ląstelėmis.....	38
3.6 Imuninių ląstelių tarpusavio ryšys sPD(L)-1 grupėse.....	40
4. REZULTATŲ APTARIMAS	43
4.1 sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos prostatos vėžyje	43
4.2 sPD-L1 ir sPD-1 kaip predikcinės molekulės.....	45
4.3 sPD-L1 ir sPD-1 sąsajos su imuninių ląstelių populiacijomis	47
4.4 Imuninių profilių skirtumai tarp sPD-(L)1 grupių.....	49
4.5 Apibendrinimas.....	51
5. IŠVADOS	52
SANTRAUKA	53
SANTRAUKA ANGLŲ KALBA	54
LITERATŪROS SĄRAŠAS	55
PRIEDAI.....	62

SANTRUMPOS

- ADAM – dizintegrino ir metaloproteinazių šeima
- Akt – serino/treonino baltymų kinazė
- APC – alofikocianinas
- AUC – plotas po kreive (angl. *area under curve*)
- CCL – CC chemokinių ligandas (angl. *CC chemokine ligand*)
- CD – ląstelių paviršiaus žymuo (angl. *cluster of differentiation*)
- CTLA-4 – su citotoksiais T limfocitais susijęs antigenas 4 (angl. *cytotoxic T Lymphocyte-Associated antigen 4*)
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
- ELISA – fermentinis imunosorbentinis tyrimas (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ERK – ekstraląstelinė receptorinė kinazė (angl. *extracellular Receptor Kinase*)
- FITC – fluoresceino izotiocianatas
- FoxP3 – Fox domeno baltymas 3 (angl. *forkhead box P3*)
- G-MDSC – granulocitinės mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės
- HIF – Hipoksiją sukeliantis veiksnys (angl. *hypoxia-inducible factor*)
- HLA – žmogaus leukocitų antigenas (angl. *human leukocyte antigen*)
- IFN- γ – interferonas gama
- Ig – imunoglobulinas
- IL – interleukinas
- ITIM – imunoreceptoriaus tirozino pagrindu veikiantis inhibicijos motyvas (angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM*)
- ITSM – imunoreceptoriaus tirozino pagrindu veikiantis perjungimo motyvas (angl. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM*)
- M-MDSC – monocitinės mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės
- MMP – matrikso proatezės metaloproteinazė
- mTOR – žinduolių rapamicino taikynys (angl. *mammalian Target Of Rapamycin*)
- NET – neutrofilų ekstraląstelinės gaudyklės (angl. *neutrophil extracellular trap*)
- NK – natūralieji kileriai
- ORR – objektyvaus atsako dažnis (angl. *objective response rate*)
- PD-1 – užprogramuotos ląstelės mirties baltymas 1 (angl. *programmed cell death protein 1*)

PD-L1 – užprogramuotos mirties ligandas 1 (angl. *programmed death-ligand 1*)

PE – fikoeritrinas

PI3K – fosfoinositido-3 kinazė (angl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PSA – prostatos specifinis antigenas

ROC – sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. *receiver operating characteristic*)

SHP – Src homologijos regiono 2 domeno fosfatazė (angl. *src homology region 2 domain-containing phosphatase*)

sPD-1 – tirpus užprogramuotos ląstelės mirties baltymas 1

sPD-L1 – tirpus užprogramuotos mirties ligandas 1

STAT3 – signalų perdavėjas ir transkripcijos aktyvatorius 3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TCR – T ląstelių receptorius (angl. *T-cell receptor*)

TGF- β – Transformuojantis augimo veiksnys beta (angl. *transforming growth factor beta*)

Th – T helperiai

TIM-3 – T-ląstelių imunoglobuliną ir mucino domenų turintis-3 (angl. *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*)

Treg – T reguliacinės ląstelės

ĮVADAS

Tarp daugybės faktorių ir reguliacinių signalinių kelių, susijusių su vėžio imunologija, PD-1 ir PD-L1 reguliacinė ašis yra vienas iš kertinių elementų reguliuojančių imuninį atsaką. Ši ašis sudaryta iš PD-1 receptoriaus (angl. *programmed cell death protein 1*) ir jo ligando PD-L1 (angl. *programmed death ligand 1*), kurie sukuria pusiausvyrą tarp imuninės sistemos aktyvacijos ir tolerancijos. PD-1 receptoriaus ir PD-L1 ligando sąveika imunologinei tolerancijai sukurti yra būdingas įvairių piktybinių navikų požymis, turintis didelę įtaką ligos progresijai ir imuninės sistemos kontrolės taškų blokatorių (angl. *immune checkpoint inhibitors*), kaip gydymo strategijos, pritaikymui (Han et al., 2020). Membraninė PD-L1 ligando ekspresija naviko ląstelėse leidžia joms prisijungti prie PD-1 receptoriaus esančio ant T ląstelių. Ko pasekoje yra sukliamas T ląstelių išsekimas, nuslopinamas priešnavikinis imunitetas, skatinamas naviko augimas, progresavimas ir metastazės (Han et al., 2020). Visos šios funkcijos apibrėžia membraninių PD-1 receptorių ir PD-L1 ligandų baltymų, kaip terapinio taikinio, reikšmę onkologijoje (Doroshov et al., 2021).

Imuninės sistemos kontrolinių taškų slopikliai, nukreipti į PD-1 / PD-L1 ašį, sukėlė proveržį vėžio gydyme, kurio metu yra aktyvinamas priešnavikinis imuninis atsakas. Tačiau gydymo efektyvumas ne visada užtikrinamas ir siejamas su įvairiais faktoriais, darančiais įtaką terapijos veiksmingumui. Vienas iš tokių veiksnių yra PD-L1 raiška navikinėse ląstelėse. Membraninė PD-L1 raiška yra susijusi su imuninės kontrolės taškų terapijos efektyvumu ir gali apibūdinti atsako į terapiją tikimybę (Yang et al., 2021). Šie PD-L1 ir PD-1 membraniniai baltymai gali būti randami alternatyvių formų pavidalu. Pavyzdžiui, laisvai cirkuliuojančios tirpios PD-1 ir PD-L1 (angl. *soluble PD-(L)1*) molekulės. Tirpios PD-1 ir PD-L1 formos taip pat sulaukė dėmesio kaip galimi biožymenys, leidžiantys prognozuoti imunoterapijos rezultatus ir suteikiantys įžvalgų apie gydymo pasirinkimo strategijas (Zhu and Lang, 2017).

Naujausi tyrimai rodo, kad tirpios PD-1 (sPD-1) ir PD-L1 (sPD-L1) formos yra perspektyvios vėžio agresyvumo vertinimo kandidatės. sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos kraujyje yra siejamos su ligos progresavimu, atsaku į gydymą ir bendru išgyvenamumu sergant įvairiais piktybiniais navikais (Bailly et al., 2021). Šie tirpūs membraninio receptoriaus ir ligando atitikmenys, atsirandantys proteolitinio skaidymo arba alternatyvaus splaisingo metu, pasižymi išskirtinėmis funkcinėmis savybėmis ir turi didžiulį, kaip neinvazinių biožymenų potencialą, tačiau dėl skirtingų navikų heterogeniškumo, cirkuliuojančių sPD-L1 ir sPD-1 lygiai išmatuoti kraujo plazmoje arba serume, gali labai skirtis priklausomai nuo naviko tipo, ligos stadijos, lyties ar paskirto gydymo (Bailly et al., 2021). Todėl svarbu nustatyti šių tirpių baltymų patikimumą ligos eigos prognozei ir gydymo efektyvumo įvertinimui

kiekvienam vėžio tipui. Vienas iš vėžio tipų, kuriam sPD-L1 ir sPD-1 reikšmė mažai aprašyta yra prostatos vėžys. Prostatos vėžys yra vienas iš labiausiai paplitusių vėžinių susirgimų tarp vyrų visame pasaulyje ir pagal mirčių skaičių, onkologinių susirgimų tarpe, užima antrą vietą (Sung et al., 2021).

sPD-L1 ir sPD-1 cirkuliavimas sisteminėje kraujotakoje gali atspindėti dinamišką naviko mikroaplinkos ir šeimininko imuniteto sąveiką, suteikdamas vertingų įžvalgų apie unikalų imunologinį vėžio profilį. Skirtingi imunologiniai fenotipai gali lemti skirtingus vėžio vystymosi mechanizmus ir galimas terapines strategijas. Taigi, šiame darbe siekiama išsiaiškinti sPD-1 ir sPD-L1 baltymų prognostinę reikšmę ir sąsajas su kitais imuninėmis sistemos parametrais – T ląstelėmis, NK ląstelėmis, mieloidinės kilmės supresorinėmis ląstelėmis, neutrofilais ir monocitais prostatos vėžiu sergančių pacientų kraujo plazmoje.

Darbo tikslas:

Įvertinti cirkuliuojančių imuninių veiksnių (sPD-1, sPD-L1 ir imuninių parametru) prognostinę reikšmę prostatos vėžiu sergantiems pacientams.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti, sPD-1 ir sPD-L1 baltymų koncentracijų pokyčius prostatos vėžiu sergančių asmenų kraujo plazmoje prieš operaciją ir po operacijos lyginant su sveikų vyrų sPD-1 ir sPD-L1 kiekiais.
2. Įvertinti sPD-L1 ir sPD-1 molekulių prognostinę reikšmę ligos atsinaujinimui ir naviko agresyvumui prostatos vėžyje.
3. Nustatyti ryšį tarp sPD-1 ir imuninių parametru prostatos vėžiu sergančių asmenų kraujyje.
4. Išanalizuoti sPD-L1 ir imuninių parametru ryšius tarp palankios ir nepalankios prognozės pacientų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Membraniniai PD-L1 ir PD-1 baltymai

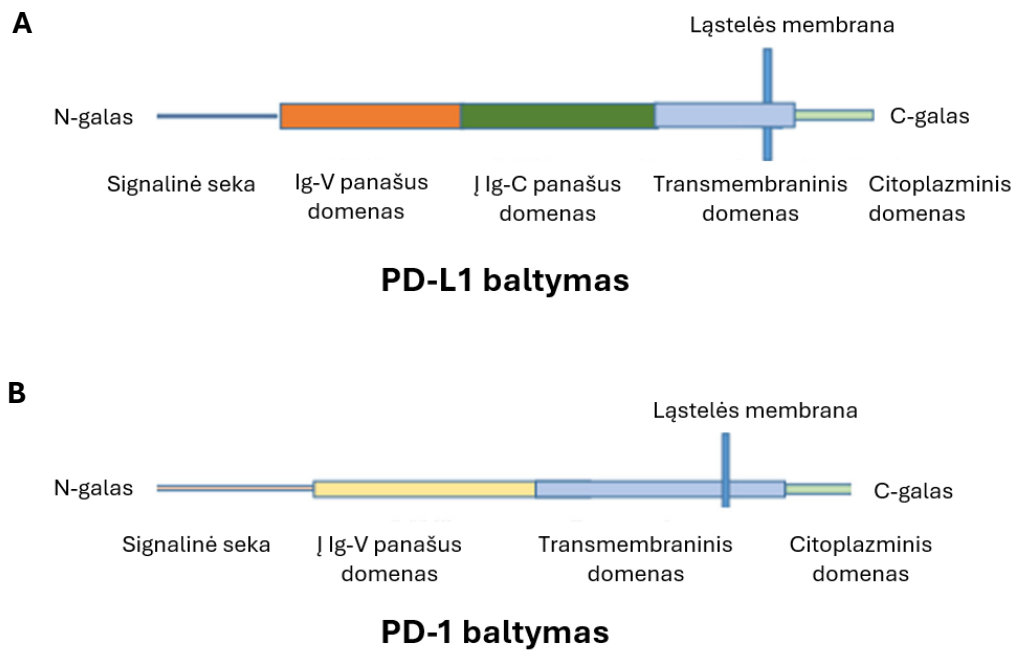
PD-1 (angl. *Programmed cell death protein 1*) ir PD-L1 (angl. *Programmed death ligand 1*) yra molekulės, atliekančios svarbų vaidmenį reguliuojant imuninės sistemos atsaką. Jos svarbios palaikant imuninės sistemos pusiausvyrą, užkertant kelią pernelyg dideliame imuninės sistemos suaktyvėjime ir išvengiant sveikų audinių pažeidimo (Akinleye and Rasool, 2019). Tačiau vėžio ląstelės gali pasinaudoti PD-1/PD-L1 keliu, kad išvengtų imuninės priežiūros. Molekulinių mechanizmų tinklas, apimantis PD-L1 ir PD-1, yra glaudžiai susijęs su daugybe kitų kelių reguliuojančių ląstelių išgyvenimą ir proliferaciją. Dėl to PD-L1 ekspresijos aktyvavimas naviko ląstelėse dažnai kyla dėl šių pakitusių molekulinių mechanizmų (Han et al., 2020). Vėžinės ląstelės, kurios vykdo PD-L1 ligando ekspresiją, gali susijungti su PD-1 receptoriais ant T ląstelių, taip slopindamos jų aktyvumą ir leisdamos vėžinėms ląstelėms išvengti nuo T ląstelių priklausomo imuninės sistemos sunaikinimo (Planes-Laine et al., 2019). Šis mechanizmas yra pagrindinis vėžio imunoterapijos objektas, kai vaistai, vadinami kontrolės taškų inhibitoriais (angl. *Immune checkpoint inhibitors*), naudojami PD-1 ir PD-L1 sąveikai blokuoti, kad imuninė sistema galėtų atakuoti vėžio ląsteles (Akinleye and Rasool, 2019).

1.1.1 Membraninių PD-L1 ir PD-1 struktūra ir funkcijos

PD-L1 (dar žymimas B7-H1 arba CD274 (ląstelių paviršiaus žymuo, CD)) yra 1 tipo transmembraninis baltymas priklausantis B7 kostimuliatorinių molekulių šeimai, kurio ekspresiją vykdo įvairių tipų ląstelės, įskaitant ir navikines ląsteles (Liu et al., 2022). PD-L1 ekspresuojamas įvairiuose ląstelių tipuose, pradedant nuo placentos ląstelių, kraujagyslių endotelio, kasos salelių ląstelių ir raumenų ląstelių iki hepatocitų, epitelio ląstelių ir mezenchiminių kamieninių ląstelių. PD-L1 raiška taip pat vykdoma įvairiose imuninėse ląstelėse, įskaitant B ląsteles, T ląsteles, dendritines ląsteles, makrofagus ir putliąsias ląsteles (Patel and Kurzrock, 2015).

PD-L1 turi į imunoglobuliną (Ig) panašų susilankstymą, sudarytą iš dviejų β klosčių, sujungtų disulfidiniu tilteliu. PD-L1 turi du ekstraląstelinius į Ig panašius domenus: IgV ir IgC. IgV yra atsakingas už prisijungimą prie PD-1 receptoriaus. PD-L1 kristalų struktūrose sudaro homodimerus, tačiau neaišku, ar jie tai daro fiziologinėmis sąlygomis. PD-L1 IgC domeno vaidmuo nežinomas, tačiau manoma, kad jis veikia kaip struktūra atitraukianti PD-L1 surišimo vietą nuo membranos (Zak et al., 2017). Be Ig domenų PD-L1 turi transmembraninį ir citoplazminį regioną (1.1A pav.) (Xiong et al., 2021). Citoplazminiame regione aptinkami trys konservatyvūs aminorūgščių motyvai. Šie motyvai atsakingi už

signalų perdavimą ir PD-L1 stabilumą (Hudson et al., 2020). Pavyzdžiui, aminorūgščių RMLDVEKC motyvo pagalba gali būti slopinami nuo interferonų priklausomi apoptozės keliai. RMLDVEKC motyvas slopina STAT3 (signalų perdavėjas ir transkripcijos aktyvatorius 3) fosforilinimą, o STAT3 gali dalyvauti nuo kaspazių priklausomos apoptozės iniciavime, tačiau nuslopinus fosforilinimą apoptozė yra stabdoma (Escors et al., 2018).



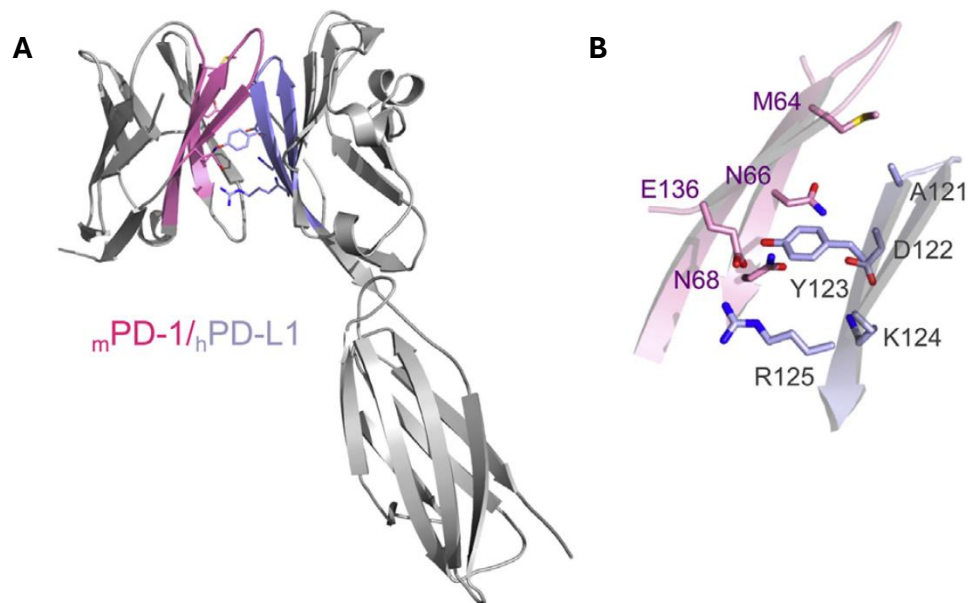
1.1 pav. PD-L1 ir PD-1 struktūra. (A) PD-L1 domenų išsidėstymas. (B) PD-1 domenų išsidėstymas (pagal Akinleye and Rasool, 2019).

PD-1, taip pat, 1 tipo transmembraninis baltymas priklausantis tai pačiai šeimai kaip ir PD-L1 ligandas (Patsoukis et al., 2020; Zak et al., 2017). PD-1 receptoriaus ekspresiją vykdo daugelis imuninių ląstelių: CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelės, CD4⁺FoxP3⁺ (Fox domeno baltymas 3 (angl. *forkhead box P3*)) T reguliacinės ląstelės (Treg), B ląstelės, natūralios ląstelės žudikės (NK ląstelės), dendritinės ląstelės, mieloidinės kilmės ląstelės (Kim and Ha, 2021).

PD-1 receptorių, kaip ir jo ligandas PD-L1, sudarytas iš 1 Ig panašaus domeno, tačiau priešingai nei PD-L1 turi tik vieną tokio tipo domeną – IgV (1.1B pav.) (Zak et al., 2017). IgV domenas gali būti padalintas į priekinę dalį (sudarytą iš CC'FG vijų) ir galinę dalį (sudarytą iš AA'BDE vijų). Būtent priekinė IgV dalis yra atsakinga už sąveiką su PD-1 ligandais. Be IgV domeno PD-1 receptorių sudarytas iš stiebo motyvo, kuris skiria IgV domeną nuo plazminės membranos, transmembraninio regiono ir citoplazminio regiono, kuriame yra ITIM (imunoreceptoriaus tirozino pagrindu veikiantis

inhibicijos motyvas) ir ITSM (imunoreceptoriaus tirozino pagrindu veikiantis perjungimo motyvas) motyvai svarbūs signalo perdavimui po sąveikos su ligandu (Patsoukis et al., 2020).

PD-1 ir PD-L1 kompleksas sudaro homodimerą santykiu 1:1, o kiekviena PD-1 molekulė ortogonalia orientacija jungiasi prie vienos PD-L1 molekulės. Komplexo susidaryme dalyvauja abiejų baltymų IgV domenai ir kompleksas stabilizuojamas PD-1 CC' kilpos (1.2A pav.) (Zak et al., 2017). PD-1 ir PD-L1 komplekso susidaryme vyrauja hidrofobinės sąveikos, kurios sudaromos specifinių aminorūgščių (1.2B pav.). Tačiau kompleksą papildomai stabilizuoja keletas vandenilio jungčių ir elektrosstatinės sąveikos. PD-1 ir PD-L1 surišimo būdas yra panašus į kitų CD28/CTLA-4 (su citotoksiniiais T limfocitais susijęs antigenas 4) šeimos narių, receptorių ir ligandų sąveikas (Chen ir Flies, 2013). Todėl PD-L1 gali sudaryti sąveiką ir su su CD80 receptoriais (Liu et al., 2022).



1.2 pav. PD-1 ir PD-L1 struktūrinė sąveika. (A) PD-1 ir PD-L1 išsidėstymas erdvėje sąveikos metu. Sąveikoje dalyvaujančios klostės paryškintos. (B) Sąveikoje dalyvaujančios aminorūgštys, kurios sukuria hidrofobinę sąveiką (pagal Zak et al., 2017). mPD-1 – pelės PD-1 baltymas, hPD-L1 – žmogaus PD-L1 baltymas.

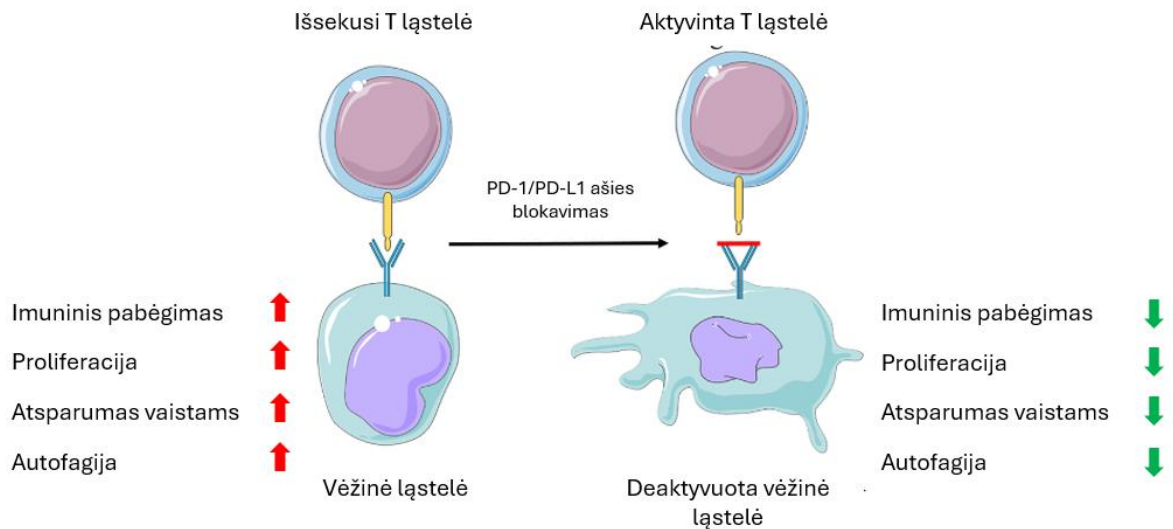
Įvykus PD-1 receptoriaus sąveikai su ligandu, ITSM motyvas pritraukia SHP1 ir SHP2 (Src homologijos regiono 2 domeno fosfatazė 1 ir 2), fosfatazes ko pasekoje yra aktyvinamos ubikvitin ligazės, kurios slopina TCR (T ląstelių receptoriaus) raišką (Escors et al., 2018). Papildomai, PD-1 receptorius gali paveikti ekstraląstelių receptorių kinazių (ERK1 ir ERK2) signalinius kelius nepriklausomai nuo SHP fosfatazių ir taip stabdyti ląstelės ciklą (Chen and Flies, 2013).

Membraninis PD-L1 tiesiogiai skatina vėžinių ląstelių išgyvenamumą ir naviko progresavimą per kitų signalinių kelių modifikavimą. PD-L1 susietas su mTOR-AKT (žinduolių rapamicino taikinio

(mTOR), serino/treonino baltymų kinazės (AKT)), DNR pažaidų, apoptoziniais, interferonų ir branduolio transporto signaliniais keliais (Escors et al., 2018). PD-L1 gali skatinti navikinių ląstelių proliferaciją aktyvuodamas PI3K (fosfoinositido-3 kinazės)/Akt/mTOR kelius. Taip pat PD-L1 gali moduluoti β -katenino kiekius stabdydamas jo degradaciją per PI3K-Akt signalinį kelią (Yu et al., 2020).

1.1.2 PD-L1 ir PD-1 kaip priešvėžinės terapijos taikiny

PD-1 ir PD-L1 imuninės kontrolės taškų inhibitoriai yra kliniškai veiksmingi prieš daugelį įvairių solidinių ir hematologinių piktybinių navikų. PD-L1 prisijungimas prie jo receptoriaus slopina T ląstelių migraciją, proliferaciją ir citotoksinių mediatorių sekreciją bei riboja navikinių ląstelių žudymą. PD-1 ir PD-L1 inhibitoriai sutrikdo PD-L1/PD-1 ašį, taip panaikindami T ląstelių slopinimą ir sustiprindami endogeninį priešvėžinį imunitetą, kad pacientams, sergantiems įvairiais vėžiniais susirgimais, pasireikštų ilgalaikis priešvėžinis atsakas (Akinleye and Rasool, 2019). Be efektorinių imuninteto ląstelių slopinimo PD-L1 ligando ir PD-1 receptoriaus sąveika skatina vėžinių ląstelių proliferaciją, atsparumą vaistams ir autofagiją. Visi šie procesai PD-L1 arba PD-1 blokavimo metu yra taip pat slopinami (1.3 pav.) (Liu et al., 2022). PD-1 ir PD-L1 blokatoriai naudojami krūties, plaučių, inkstų, kasos, galvos ir kaklo, prostatos vėžio ir melanomos atvejų gydymui (Marei et al., 2023).



1.3 pav. PD-1 ir PD-L1 imuninės ašies blokavimo efektas, kuris pasireiškia vėžinių ląstelių proliferacijos, atsparumo vaistams, navikinius procesus skatinančios autofagijos ir imunotolerancijos sumažėjimu.

Tačiau PD-1 ir PD-L1 blokatorių efektyvumas siejamas su įvairiais veiksniais. Membraninė PD-L1 raiška, mikrosatelitų nestabilumas (angl. *microsatellite instability*), naviko mutacijų kiekis (angl.

tumor mutation burden), naviką infiltruojantys limfocitai, HLA genotipas, leukocitų kiekis, kraujyje esančių citokinų kiekiai ir kt. gali daryti įtaką imunoblokatorių terapijos efektyvumui (Yang et al., 2021). Šiuo metu vėžio gydymui yra patvirtinti trys PD-1 blokuojantys monokloniniai antikūnai (nivolumabas, pembrolizumabas, cemiplimabas) ir trys PD-L1 blokuojantys monokloniniai antikūnai (atezolizumabas, avelumabas, durvalumabas) (Marei et al., 2023).

1.2 PD-1 ir PD-L1 tirpios formos

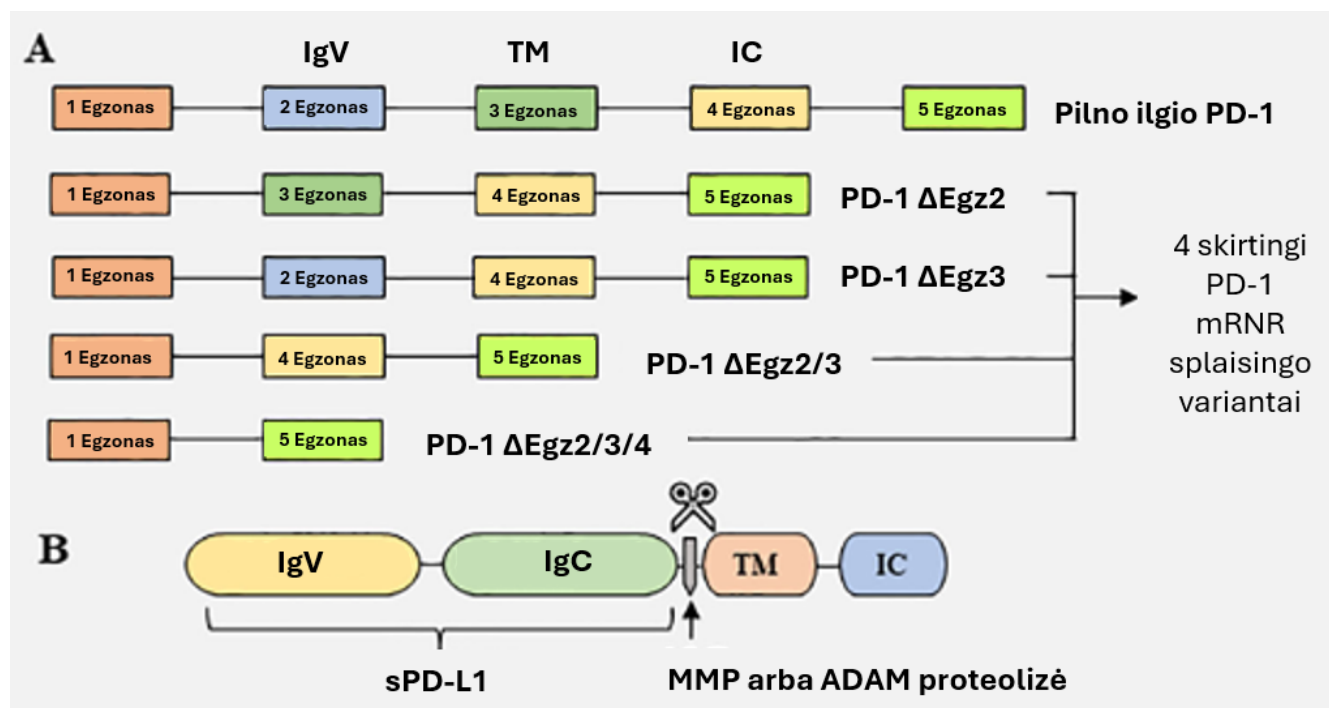
PD-L1 ir PD-1 molekulės gali būti aptinkamos įvairiomis kitomis formomis. Pavyzdžiui, PD-L1 gali būti aptinkamas egzosomaliniu (PD-L1 egzsituojantis egzosome), tirpiu (laisvai cirkuliuojančios molekulės) pavidalu. Taip pat išskiriamos branduolio PD-L1 molekulės bei citoplazminės PD-L1 molekulės (Ying et al., 2021). Kita vertus PD-1 receptorių aptiktas tirpia ir egzosome forma (Khan et al., 2020; Qiu et al., 2021). Visoms šioms PD-1 ir PD-L1 formoms yra būdingos unikalios savybės. Dėl kurių skiriasi jų vaidmuo imuninių funkcijų moduliacijoje (Khan et al., 2020; Qiu et al., 2021; Ying et al., 2021).

1.2.1 Tirpių PD-L1 ir PD-1 susidarymas

Vienas iš būdų, kaip gali susidaryti tirpios PD-L1 formos yra membraninio ligando proteolitinis skaidymas, kuris yra atliekamas matrikso metalo proteazių arba membraninių proteazių. Matrikso proteazės metaloproteinazės 13 (MMP-13) ir 9 (MMP-9) dalyvauja membraninių PD-L1 ir PD-L2 proteolitiniam skaidyme. Membraninis PD-L1 yra skeliamas tarp į IgC panašaus domeno ir transmembraninio domeno ir atskeliamas sPD-L1 (1.4B pav) (Niu et al., 2022). Pastebėta, kad membraninių PD-L1 proteolitinio skaidymo efektas turi reikšmės ir imuniteto kontrolėje. Membraninio PD-L1 skaidymas stabdo CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelių apoptozę, kai ląstelių kultūros veikiamos šiomis MMP šeimos proteazėmis (Dezutter-Dambuyant et al., 2015).

Kita proteazių šeima dalyvaujanti sPD-L1 susidaryme yra dizintegrino ir metaloproteinazių šeima (ADAM). ADAM šeimos proteazių veikla buvo apibūdinta krūties vėžio, prostatos ir plaučių vėžio ląstelių kultūrose (Romero et al., 2020). Taip pat melanomos ląstelių kultūros, kurios buvo teigiamos pagal membraninę PD-L1 ekspresiją, nevykdė ADAM proteazių raiškos, o PD-L1 neigiamos ląstelės vykdė ADAM-10 ir ADAM-17 raišką (Orme et al., 2020). Šios proteazės turi įtakos ir ląsteliniam imunitetui. ADAM-10 ir ADAM-17 proteazių generuojamas sPD-L1 sukelia aktyvuotų CD8⁺ T ląstelių apoptozę, kuri yra sustabdoma prie didesnių PD-1 arba PD-L1 blokatorių koncentracijos (Orme et al., 2020). MMP veikla susieta su teigiamu efektu T ląstelėms, kuris kyla iš membraninio PD-L1 skaidymo,

o ADAM šeimų proteazių veikla siejama su CD8⁺ T ląstelių apoptozės skatinimu. Visi šie rezultatai rodo, kad sPD-L1 susidaryme gali dalyvauti skirtingos proteazių šeimos priklausomai nuo vėžio tipo ir turėti skirtingą efektą, kuris gali priklausyti nuo membraninio PD-L1 sumažėjimo ir sPD-L1 padidėjimo aplinkoje. Pavyzdžiui, pastebėta, kad kai kurių metaloproteinazių (įskaitant MMP-13) ekspresija gali būti padidėjusi galvos ir kaklo plokščialąstelinės karcinomos ląstelių kultūrose ir, kad ji yra dar labiau suaktyvinama ląstelių kultūras paveikus priešvėžiniu preparatu paklitakseliu (Hira-Miyazawa et al., 2017). Tačiau krūties vėžio ląstelės pasižymi labai maža MMP-9 ir MMP-13 ekspresija (Romero et al., 2020), o ADAM-10 ir ADAM-17 proteazės yra aktyvios inkstų vėžio ląstelių kultūrose (Orme et al., 2020).



1.4 pav. Galimi tirpių PD-1 ir PD-L1 susidarymo būdai. (A) PD-1 iRNR splaisingo variantai, kurie transliuojami į sPD-1. (B) PD-L1 baltymo proteolizės vieta. IgV – į IgV panašus domenas, IgC – į IgC panašus doemnas, TM – transmembraninis domenas, IC – viduląstelinis domenas, egz – egzonas. (pagal Niu et al., 2022).

Tirpaus PD-L1 iRNR gali susidaryti ir alternatyvaus splaisingo metu iš membraninio PD-L1 iRNR (Romero et al., 2020). Splaisingas gali būti vykdomas keliais skirtingais būdais, tačiau dauguma variantų susidaro dėl įvykstančių pokyčių 4 arba 5 egzone, kurie įveda „stop“ kodoną prieš transmembraninį regioną. Šios sPD-L1 izoformos taip pat turi neigiamą efektą T ląstelėms (Hassounah et al., 2019). Kitas iš sPD-L1 variantų gali susidaryti dėl introninio LINE-2A (L2A) endogeninio retroelemento egzaptacijos gene, koduojančiame PD-L1, dėl kurio praleidžiamas transmembraninis domenas ir reguliacinė seka 3'UTR regione. CD274-L2A koduojamas sPD-L1 pasižymi priešingu kitoms

izoformoms efektu. Ši izoforma neturi CD8+T ląstelių slopinamojo aktyvumo ir vietoj to jis gali blokuoti membraninio PD-L1 slopinamąjį aktyvumą (Ng et al., 2019).

Kaip ir sPD-L1, sPD-1 gali susidaryti alternatyvaus splaisingo metu. PD-1 gene yra 5 egzoni, kurie koduoja skirtingus PD-1 baltymo regionus ir gali būti iškerpami ir sudaromi skirtingi transkriptai. Po alternatyvaus splaisingo susidarę transkriptai gali neturėti 2 egzono (IgV domenas), 3 egzono (transmembraninis domenas), 2 ir 3 egzonų arba būti iškerpami visi egzoni nuo 2 iki 4 (viduląstelinis domenas) (1.4A pav.) (Keir et al., 2008). Tačiau yra tyrimų, kurie rodo, kad sPD-1 gali susidaryti ne vien alternatyvaus splaisingo metu. Pavyzdžiui, sepsio atveju pastebėta koreliacija tarp sPD-L1 ir PD-L1 iRNR, tačiau koreliacijos tarp sPD-1 ir PD-1 iRNR nerasta (Derigs et al., 2022).

1.2.2 sPD-L1 ir sPD-1 funkcijos

sPD-1 molekulės pasižymi biologiniu aktyvumu ir gali sutrikdyti sąveiką tarp membraninio PD-1 receptoriaus ir PD-L1 ligando. Šis efektas pastebimas lėtinių infekcijų metu, autoimuninėse ligose ir priešnavikinio imuniteto atveju (Khan et al., 2020). Priešnavikinis sPD-1 efektas apima citotoksinių T ląstelių aktyvaciją ir infiltraciją, padidėjusią navikinių ląstelių lizę, slopinamą naviko progresiją, citokinų sekreciją, kurie pastumia imuninį atsaką link Th1 ir Th17 ląstelių atsako (Khan et al., 2020). sPD-1 efektyvumas parodytas *in vivo*. DNR vakcina koduojanti sPD-1 ir naudojama kaip adjuvantas padidino T-ląstelių proliferaciją ir sumažino T-ląstelių apoptozę bei padidino dendritinių ląstelių brendimą (Song et al., 2011). Imunologinis sPD-1 aktyvumas parodytas ir kitame tyrime su pelėmis, kurioms buvo skirtas rekombinantinis baltymas koduojantis sPD-1 peptidą (Qiu et al., 2009).

sPD-L1 molekulės taip pat yra fiziškai aktyvios. Tiek navikinės, tiek imuninių ląstelių kilmės sPD-L1 gali sukelti T ląstelių apoptozę (Frigola et al., 2012). Taip pat sPD-L1 sumažina CD3+ T ląstelių interleukino 2 (IL-2) ir interferono gama (IFN- γ) citokinų sekreciją (Hassounah et al., 2019). IFN- γ sekreciją slopinantis efektas pastebėtas ir kitame tyrime (Liang et al., 2017).

1.2.3 Tirpūs sPD-L1 ir sPD-1 skirtinguose vėžio tipuose

Tirpios PD-1 ir PD-L1 formos susilaukė ypatingo dėmesio dėl jų, kaip biožymenų reikšmės, vėžio progresavimui ir agresyvumui nusakyti, kadangi jų kraujo koncentracijos yra padidėjusios įvairių piktybinių ligų atveju (Bailly et al., 2021). Prieš gydymą nustatytos koncentracijos gali suteikti vertingos pradinės informacijos apie paciento imuninę būklę ir naviko mikroaplinką, kurios leidžia įžvelgti naviko sukeltus pokyčius sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijose. Dėl šios priežasties svarbu apibūdinti koncentracijas

randamas prieš ir po gydymo, kadangi šių baltymų koncentracijos kraujyje gali priklausyti nuo skirto gydymo (Bailly et al., 2021).

sPD-L1 koncentracija įvairiuose vėžio tipuose labai skiriasi. Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio atveju koncentracija yra santykinai mažesnė: vieno tyrimo duomenimis, koncentracijų mediana yra 68 pg/ml, o kitame tyrime nustatyta mediana – 44 pg/ml (Ancin et al., 2022; Murakami et al., 2020). Kita vertus nesmulkialąstelinio plaučių vėžio atveju gali būti randamos ir daug didesnės koncentracijos (Sasaki et al., 2023). Inkstų vėžys pasižymi nežymiai didesne sPD-L1 koncentracijų mediana – 90 pg/ml (Davidsson et al., 2022). Priešingai, krūties vėžys pasižymi ypač padidėjusiu sPD-L1 kiekiu kraujo plazmoje: priešoperacinio ir metastazinio vėžio atvejų medianinė koncentracija siekia 7690 pg/ml, o ankstyvojo krūties vėžio atveju medianinė koncentracija šiek tiek mažesnė – 4890 pg/ml (Han et al., 2021). Kasos vėžys patenka į tarpinį intervalą pagal aptiktas sPD-L1 koncentracijas kraujo plazmoje, jo medianinė koncentracija yra 1700 pg/ml (Park et al., 2019). Šie sPD-L1 koncentracijos medianų skirtumai pabrėžia įvairių vėžio tipų imuninio atsako heterogeniškumą ir gali būti susiję su skirtingais imuninės sistemos išvengimo ir skirtingu atsaku į įvairius gydymo metodus.

Lyginant su sveikų individų grupėmis, vėžiu sergantys asmenys kraujo plazmoje turi padidėjusias sPD-L1 koncentracijas. Prieš gydymą kiaušidžių vėžio pacientėms nustatytas didesnis sPD-L1 kiekis kraujo plazmoje lyginant su kontrole. sPD-L1 koncentracijų mediana pacienčių grupėje buvo 2,4 karto didesnė nei kontrolinėje grupėje (260 pg/mL ir 109 pg/mL) (Okła et al., 2020). Padidėjusios sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos nustatytos ir priešoperaciniuose nesmulkialąstelinio plaučių vėžio pacientų kraujo serumo mėginiuose lyginant su kontroline sveikų individų grupe. sPD-1 koncentracijos vidurkis 44 pg/mL ir 19 pg/mL, o sPD-L1 26 pg/mL ir 10 pg/mL pacientų ir kontrolinėje grupėje atitinkamai. Taip pat pastebėtas sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų mažėjimas po operacijos (Ancin et al., 2022). Padidėjusios sPD-L1 koncentracijos aptiktos ir skrandžio vėžiu sergančių pacientų kraujo plazmoje. sPD-L1 koncentracijos buvo daug didesnės (71,69 pg/mL mediana) nei sveikoje kontrolinėje grupėje (35,34 pg/mL mediana) (Kawakami et al., 2023). Hodžkino limfoma ir T-ląstelių limfomą sergantiems pacientams taip pat buvo nustatytos padidėjusios sPD-L1 koncentracijos kraujyje (Feng et al., 2023). Nors daugumos tyrimų rezultatai rodo padidėjusias sPD-L1 koncentracijas kraujo plazmoje ar serume, viename tyrime nustatyta, kad sveikų moterų ir moterų, kurioms diagnozuotas krūties vėžys, sPD-L1 kiekis nesiskiria (Yazdanpanah et al., 2021).

Nemažai tyrimų atkreipia dėmesį ir į gydymo metu esančias sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijas. Pavyzdžiui, plaučių vėžio pacientų grupė, į kurią buvo įtraukti įvairų gydymą gaunantys pacientai (chemoterapiją, monokloninių antikūnų gydymą, radioterapiją ir kitus gydymo metodus) pasižymėjo

didesnėmis kraujo plazmos sPD-L1 koncentracijomis nei kontrolinė grupė (Han et al., 2024). sPD-L1 kiekis buvo padidėjęs chemoterapinį arba chemoradiacinį gydymą patyrusiems galvos ir kaklo plokščialąsteline karcinoma sergantiems pacientams, palyginti su sveika kontroline grupe (Molga-Magusiak et al., 2023). Pastebėta, kad po gydymo sPD-L1 kiekiai gali grįžti į sveikų asmenų kraujyje randamos sPD-L1 kiekius. Tyrime su Hodžkino limfoma pacientų grupėje, kuriems pasireiškė visiška remisija, po 2 chemoterapijos kursų sPD-L1 kiekis sumažėjo iki sveikos kontrolinės grupės lygio, tačiau tiems pacientams, kuriems nepasireiškė remisija, sPD-L1 lygis po chemoterapijos reikšmingai nesiskyrė nuo prieš chemoterapiją buvusio lygio ir buvo didesnis nei sveikos kontrolinės grupės (Feng et al., 2023).

Pastebėta, kad pacientams, kuriems taikomas įvairus gydymas, tirpių sPD-1 ir sPD-L1 baltymų kiekiai taip pat labai skiriasi. Visų pirma, prostatos vėžiu sergančių pacientų, kuriems buvo taikoma androgenų deprivacijos terapija, chemoterapija arba radioterapija, sPD-L1 kiekis buvo ypač sumažėjęs ir siekė 60 pg/mL (Katongole et al., 2022). Kitame tyrime, kuriame buvo įtraukti pacientai, sergantys išplitusiu kasos vėžiu ir kuriems buvo taikoma chemoterapija, taip pat nustatyta mažos sPD-L1 koncentracijos, kurios mediana siekė vos 12 pg/mL (Kruger et al., 2017). Panašios koncentracijos nustatytos ir chemoterapija gydytų stemplės plokščialąstelinio vėžiu sergančių, asmenų kraujyje. Jų sPD-L1 vidutinė koncentracija buvo 90 pg/ml (Fu et al., 2021). Nors kai kuriais atvejais gydymo metu koncentracijos yra nedidelės, pastebimi ir didesni sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų kiekiai gydymo metu. Tyrime, kuriame dalyvavo kasos adenokarcinoma sergantys pacientai bei kuriems buvo taikoma chemoterapija buvo nustatytas daug didesnis tirpus PD-L1 kiekis, kurio mediana buvo 440 pg/mL (Bian et al., 2019). Didelės koncentracijos aptinkamos ir po chirurginio naviko pašalinimo. Pavyzdžiui, storosios žarnos vėžiu sergančių pacientų kraujyje nustatytų sPD-L1 mediana siekė 300 pg/mL (Shao et al., 2022). Chirurginiu būdu pašalinti galvos ir kaklo srities navikai taip pat pasižymėjo labai padidėjusiu sPD-L1 kiekiu kraujyje, kurių vidurkis siekė 640 pg/mL (Molga-Magusiak et al., 2023). Nustatytos koncentracijos gydymo metu gali padėti numatyti paciento atsaką gydymą. Be to, sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos svyravimai gydymo metu gali atspindėti imuninės sistemos suaktyvėjimo ar atsparumo mechanizmų pokyčius.

1.2.4 sPD-1 ir sPD-L1 predikcinės savybės

Naujausi tyrimai vis geriau apibūdina kokią reikšmę vėžio prognozei ir diagnostikai turi sPD-1 ir sPD-L1 formos ir su kokiais klinikiniais parametrais šie baltymai gali būti siejami. sPD-L1 koncentracijos pacientų kraujyje dažnai yra asocijuojamos su įvairiais naviko vertinimo kriterijais. Pavyzdžiui, didesnės sPD-L1 koncentracijos nustatytos tiems asmenims, kurie turi piktybinius, o ne

gerybinius navikus (Davidsson et al., 2022; Molga-Magusiak et al., 2023). Inkstų ir storosios žarnos vėžio pacientams nustatytos sPD-L1 koncentracijos susietos su naviko patologine stadija (Davidsson et al., 2022; Shao et al., 2022), o storosios žarnos navikai, kurie buvo išplitę į limfmazgius turėjo didesnę sPD-L1 koncentraciją (Shao et al., 2022). Prostatos vėžio atveju didesnės sPD-L1 koncentracijos rastos navikuose, kurie pasižymėjo aukštesniu Gleason kriterijumi (Katongole et al., 2022), o kiaušidžių vėžio sPD-L1 koncentracijos koreliuoja su vėžio stadija ir kiaušidžių vėžiui būdingas rizikos kriterijais (Okła et al., 2020)

sPD-L1 koncentracijos pacientų kraujyje siejamos ir su bendru pacientų išgyvenamumu. Aukštesnės sPD-L1 koncentracijos pacientų grupės priskirtos prie blogesnės išgyvenamumo tikimybės galvos ir kaklo srities, inkstų vėžio, plokščialąstelinio stemplės, kasos vėžio atveju (Davidsson et al., 2022; Fu et al., 2021; Molga-Magusiak et al., 2023; Mucileanu et al., 2021). Taip pat kaklo ir galvos vėžio pacientai, kuriems nustatytos aukštos sPD-L1 koncentracijos pasižymėjo mažesne išgyvenamumo be ligos progresavimo tikimybe (Molga-Magusiak et al., 2023). Toks pats rezultatas gautas ir įtraukiant kepenų, plaučių kasos vėžio atvejus, NK/T-ląstelių limfomas ir keletą kitų vėžio tipų į bendrą analizę (Huang et al., 2021).

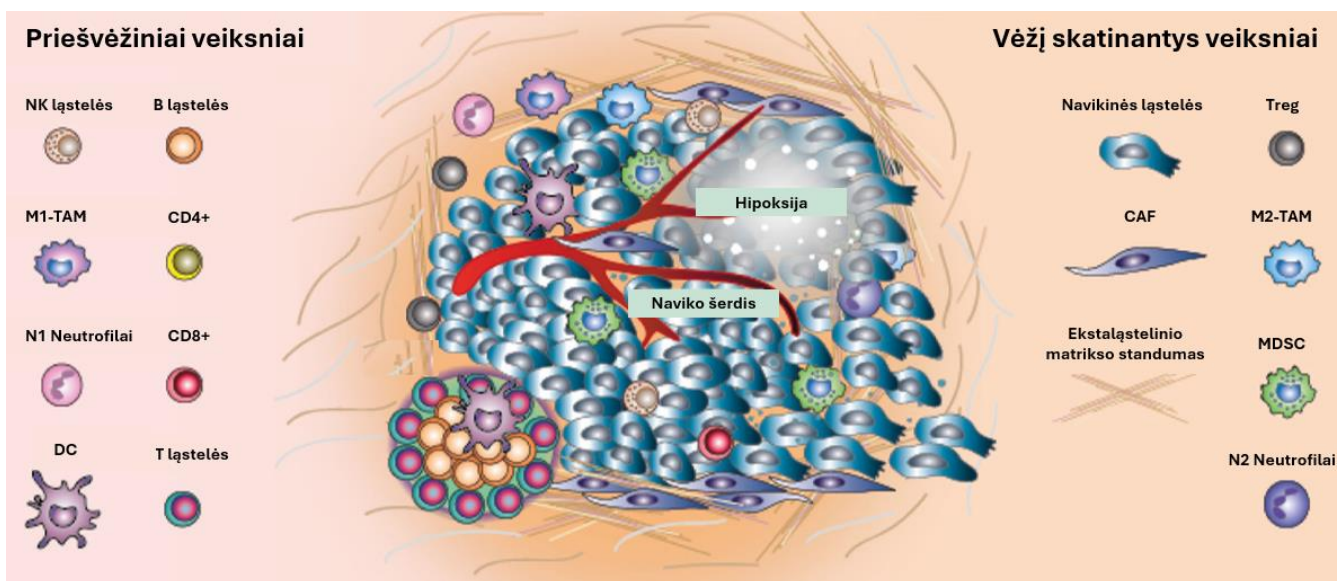
sPD-1 ir sPD-L1 molekulės susilaukė daug dėmesio dėl jų poveikio imunoterapijos efektyvumui. sPD-1 ir sPD-L1 tapo potencialiais prognostiniais rodikliais imunoterapijos srityje. Padidėjęs sPD-L1 lygis dažnai koreliuoja su padidėjusia tikimybe, kad bus teigiamas atsakas į gydymą anti-PD-1 ir anti-PD-L1 monokloniniais antikūnais (Bailly et al., 2021). Pavyzdžiui, melanomos pacientams mažos sPD-1, bet ne sPD-L1, koncentracijos prieš gydymą susietos su didesniu objektyviu atsaku (angl. *objective response rate* (ORR)) į anti-PD-1 monokloninių antikūnų terapiją (Incorvaia et al., 2023). Taip pat didelis sPD-L1 kiekis kraujyje koreliavo su prastesniais išgyvenamumo rodikliais, sergantiems nesmulkiaūstelinio plaučių vėžiu ir gydomiems PD-1 blokatoriais (Genova et al., 2023; Murakami et al., 2020). Priešingai, mažos sPD-L1 koncentracijos buvo geresnio bendro išgyvenamumo ir ORR rodiklis tarp metastazavusių inkstų vėžiu sergančių pacientų, gydomų anti-PD-1 blokatoriumi (Wakita et al., 2023). Skrandžio vėžiu sergančių pacientų padidėjusi sPD-1 ir sPD-L1 koncentracija taip pat buvo susieta su pacientų, gaunančių gydymą anti-PD-1 blokatoriumi, išgyvenamumu. Didesnis sPD-1 ir sPD-L1 kiekis kraujo plazmoje buvo susijęs su trumpesniu bendru išgyvenamumu, tačiau tik didesnis sPD-L1 kiekis buvo reikšmingai susijęs su trumpesniu išgyvenamumu be ligos progresavimo (Kawakami et al., 2023). sPD-1 ir sPD-L1 sąsaja su imunoterapijos efektyvumui pastebėta ir daugelyje kitų vėžio tipų. Melanoma, plaučių vėžiu, urotelio ir inkstų ląstelių karcinoma sergančių pacientų, kuriems buvo taikoma anti-PD-1 arba anti-PD-L1 imunoterapija, 1 ir 2 metų bendro išgyvenamumo rodikliai buvo

geresni, kai sPD-L1 koncentracija jų kraujyje buvo mažesnė, palyginti su pacientais, kurių sPD-L1 koncentracija kraujyje buvo didesnė (Scirocchi et al., 2022).

1.3 Imuninės ląstelės ir jų vaidmuo

PD-1 receptoriaus ir PD-L1 ligando sąveikia yra išnaudojama ląstelinio imuniteto kontrolei. Ląstelinis imunitetas, koordinuodamas įvairias imunines ląsteles, vaidina svarbų vaidmenį kovoje su vėžiu. T limfocitai, įskaitant citotoksines CD8⁺ T ląsteles ir pagalbines CD4⁺ T ląsteles, kartu su natūraliomis žudikėmis (NK) ląstelėmis nukreipia ir naikina vėžines ląsteles įvairiais mechanizmais, tokiais kaip tiesioginis citotoksiškumas ir citokinai. CD4⁺ T ląstelės organizuoja imuninį atsaką teikdamos pagalbą kitoms imuninėms ląstelėms, įskaitant CD8⁺ T ląsteles, B ląsteles ir makrofagus. CD4⁺ T ląstelės padeda suaktyvinti CD8⁺ T ląsteles, leidžiančias joms veiksmingai atpažinti ir sunaikinti vėžines ląsteles, o T reguliacinės ląstelės slopina pernelyg didelį imuninį atsaką, kad išvengtų autoimuninių reakcijų, tačiau ši savybė gali būti išnaudojama ir sukuriant imunotoleranciją navikui (Gonzalez et al., 2018). Granulocitai prisideda prie priešnavikinio imuniteto per tokius procesus kaip fagocitozė ir citotoksinių granulinių išsiskyrimas, o mieloidinės kilmės slopinančios ląstelės (MDSC) gali susilpninti imuninį atsaką, skatindamos naviko augimą. Visų šių imuninių ląstelių sąveika sudaro bendrą imunologinę aplinką, kuri gali būti palanki piktybinių ląstelių išsivystymui ir dauginimuisi arba piktybinės ląstelės gali būti sunaikinamos (1.5 pav.). Tai daro didelę įtaką vėžio atsiradimui, vystymuisi ir gydymo efektyvumui (Gonzalez et al., 2018). Taip pat periferinės imuninės sistemos funkcionavimas, kuris gali būti slopinamas PD-1 receptoriaus, PD-L1 ligando ir jų tirpių formų, yra svarbus efektyviai imuninės kontrolės taškų blokatorių terapijai (Hiam-Galvez et al., 2021).

T ląstelės yra glaudžiai susijusios su priešvėžiniu imunitetu ir jo reguliacija. Naviko atsiradimas ir vystymasis siejamas su sisteminiu Treg ląstelių kiekio padidėjimu ir CD8⁺, CD4⁺ T ląstelių kiekio sumažėjimu (Hiam-Galvez et al., 2021). Patys navikai skatina Th2 tipo atsaką, slopina Th1 ląstelių tipo atsaką ir skatina Treg ląstelių populiacijos susidarymą. Taip pat navikinės ląstelės didina kostimuliatorinių molekulių (PD-L1, CTLA-4, B7-H3, BTLA, CD160) raišką, dėl kurių yra nuslopinama T ląstelių citokinų sekrecija ir proliferacija (Bhatia and Kumar, 2014).



1.5 pav. Imunitinės ląstelės esančios naviko mikroaplinkoje, kurios skatina arba stabdo ligos progresiją. CAF – su vėžiu asocijuoti fibroblastus, TAM – su naviku asocijuoti makrofagai, MDSC – mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės, DC – dendritinės ląstelės, Treg – T reguliacinės ląstelės (pagal Galli et al., 2020).

Vėžinės ląstelės vengia nuo limfocitų priklausomo imuniteto įvairiais būdais, kurie gali būti siejami su pokyčiais pačiame navike. Pavyzdžiui, navikas gali sukelti pokyčius MHC-I molekulių ekspresijoje. Tai leidžia navikui išvengti nuo T ir NK (natūralieji kileriai) ląstelių priklausomo imuninio atsako, o pakitę MHC-I raiškos lygiai turi įtakos ligos prognozėje (Bhatia and Kumar, 2014). T ląstelių efektyvumas gali pasireikšti ir priklausomai nuo to, ar navikas yra imunologiškai aktyvus, ar labiau imunologiškai neaktyvus (angl. *cold tumor*). Naviko imunologinis aktyvumas gali priklausyti nuo mutacijų kiekio. Mažas mutacijų kiekis nesukelia stipresnių imunologinių procesų, kadangi aplinkoje nėra antigenų, kuriuos galėtų atpažinti T ląstelės (Attias and Piccirillo, 2024).

1.3.1 CD4+ ir CD8+ T limfocitai

CD4+ ir CD8+ T ląstelės gali dalyvauti navikinių ląstelių eliminavime. Th1 tipo CD4+ ląstelės vykdo įvairių citokinų sekreciją, pavyzdžiui, IL-2 ir IFN- γ , kurie aktyvina CD8+ ląsteles ir jos sunaikina piktybines ląsteles (Galli et al., 2020). Todėl navikai gali trikdyti CD8+ T ląstelių infiltraciją į naviko aplinką keliais būdais. Vienas iš tokių būdų yra kolageno sekrecija sukuriant fizinį barjerą pasitelkus su vėžiu asocijuotus fibroblastus (angl. *cancer associated fibroblast*, CAF). Naviko pasiekiamumas toliau apsunkinamas M2 tipo makrofagų, kurie skatinami CAF padidina ekstraląstelinio matriksio tankį (Attias and Piccirillo, 2024). Kita vertus Th2 ir Th17 tipo ląstelės yra siejamos su navikui palankios aplinkos formavimu (Galli et al., 2020). Taip pat CD8+ ir CD4+ ląstelių santykis gali apibūdinti ar navikas yra

imunologiškai aktyvus. Imunologiškai neaktyviems navikams būdingas žemas CD8⁺/CD4⁺ T ląstelių santykis (Attias and Piccirillo, 2024).

sPD-1 ir sPD-L1 formos, kaip ir jų membraninės formos, yra siejamos su T ląstelių efektorinėmis funkcijomis. Pavyzdžiui, PD-1 padidina reikiamą kiekį reikalingų signalų T ląstelių aktyvacijai. Jeigu aktyvacijos signalų nepakanka yra slopinama T ląstelių aktyvacija. sPD-1 taip pat slopina IL-2 lygius ir didina IL-10 kiekius. Tačiau sPD-1 poveikis pastebėtas tik tada, kada aplinkoje buvo dendritinių ląstelių, todėl sPD-1 gali veikti per dendritines ląsteles, kuriuos stimuliuojamos šio tirpaus baltymo įgauna imunosupresinį fenotipą ir skatina IL-10 sekreciją (Kuipers et al., 2006). Tyrime su kelių skirtingų vėžio tipų pacientais ir sveikais individualais pastebėta, kad sPD-L1 koncentracijos padidėjimas pacientų kraujyje gali būti siejamas su PD-1 ekspresiją vykdančių CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelių padidėjusia apoptoze, lyginant su kontrole. Taip pat sPD-L1 skatino FoxP3 ekspresiją CD4⁺ T ląstelėse (Liang et al., 2023). Panašus rezultatas gautas ir tyrime su krūties vėžio pacientėmis ir krūties vėžio ląstelių kultūromis. Klinikiniuose mėginiuose pastebėta neigiama koreliacija tarp CD8⁺ T ląstelių kiekių ir membraninės PD-L1 raiškos ant navikinių ląstelių bei koreliacija tarp naviką infiltruojančių limfocitų tankio ir sPD-L1 koncentracijos kraujyje. Taip pat eksperimentuose su ląstelių kultūromis nustatyta, kad sPD-L1 slopina T ląstelių proliferaciją ir skatina apoptozę ir gali atstatyti anti-PD-L1 monokloninio antikūno sutrikdytą PD-L1 ir PD-1 sąveiką (Han et al., 2021). Neigiamas CD8⁺ T ląstelių ir sPD-L1 koncentracijų ryšys aprašytas ir nesmulkiąstelinio plaučių vėžio atveju (Mazzaschi et al., 2020). sPD-L1 efektas T ląstelėms pastebimas ne tik tarp naviko ir T ląstelių. Tyrimas su sepsio pacientais, kurie taip pat turi padidėjusiais sPD-L1 koncentracijas kraujyje, nustatė panašią ir vėžio atveju nustatytą koreliaciją tarp sPD-L1 ir CD8⁺ T ląstelių, tik šiuo atveju buvo tiriama CD8 koreceptorius iRNR. Papildomai pastebėtas neigiamas ryšys tarp CD4, TCR β baltymų iRNR ir sPD-L1 koncentracijų (Derigs et al., 2022).

CD8⁺ T ląstelių suaktyvinimas turi ir netiesioginį efektą kitiems ląstelių tipams. Pavyzdžiui, anti-PD-1 blokatorių terapija suaktyvina CD8⁺ T ląsteles ir skatina jų proliferaciją. Dėl to CD8⁺ T ląstelės pradeda konkuruoti dėl IL-2 su NK ląstelėmis, todėl NK ląstelėms prieinamų stimuliuojančių citokinų kiekis tampa ribotas, o tai gali lemti uždelstą NK ląstelių atsaką, kurio metu nėra sukuriamas išsekimas dėl per didelės pradinės stimuliacijos aktyvatoriumi (Bai and Cui, 2022). Taip pat pastebėtas ryšys tarp CD⁺ T ląstelių, dendritinių ląstelių ir sPD-1, sPD-L1 molekulių. CD8⁺ T ląstelės pasižymėjo didesne CD107a ir citokinų ekspresija kai jos buvo inkubuojamos su dendritinėmis ląstelėmis, antigenų ir kai aplinkoje buvo sPD-1, sPD-L1 baltymų. CD107a ekspresijos pokyčio nebuvo be sPD-1 ir sPD-L1 molekulių. CD4⁺ T ląstelės taip pat buvo aktyvuojamos tokiomis pat sąlygomis (Pen et al., 2014).

Limfocitai, kurie pasižymi aktyvacijos žymens CD69 ekspresija, taip pat gali būti siejami su naviko parametrais ir ligos progresavimu. CD3+CD69+ limfocitų kiekiai yra padidėję priešoperaciniame prostatos vėžio pacientų kraujyje lyginant su gerybine prostatos hiperplazija bei šių ląstelių kiekiai gali būti asocijuojami su didesniai Gleason kriterijau įvertėiais (Zhang et al., 2020). CD69+ gama-delta ($\gamma\delta$) limfocitai cirkuliuojantys metastazavusio storosios žarnos vėžio pacientų kraujyje susieti su mažesniais metastazių pažeidimais, ilgesniu bendru išgyvenamumu ir nuslėptu vėžio metastazavimu į kepenis (Bruni et al., 2022). Kitame *in vivo* tyrime, kuriame pritaikytas storosios žarnos vėžio pelės modelis, nustatyta, kad storosios žarnos vėžiui specifinės CD8+CD69+ ląstelės gali sukelti vėžinių ląstelių apoptozę, slopinti storosios žarnos vėžio augimą ir prailginti pelių išgyvenamumą (Lan et al., 2016). Kita vertus yra tyrimų, kurie rodo, kad storosios žarnos vėžiu sergantiems pacientams CD69+ T ląstelės gali būti siejamos su didesne ligos atsinaujinimo tikimybe (Taylor et al., 2018).

1.3.2 NK ląstelės

NK ląstelės yra limfocitai, taip pat vaidinantys svarbų vaidmenį priešvėžiniame imuniniame atsake. NK ląstelės, kaip ir CD8+ T ląstelės, geba sunaikinti piktybines ląsteles. NK ląstelių citotoksiškumas navikinėms ląstelėms pasireiškia per išskiriamas citotoksines granules. Tačiau, be piktybinių ląstelių eliminavimo, NK ląstelės gali į aplinką išskirti ir įvairius citokinus, kurie skatina priešnavikinį imunitetą (Galli et al., 2020). Dėl to, vystantis navikui NK ląstelių veikla yra sutrikdoma. Priešnavikinės veiklos sutrikdymas gali pasireikšti per inicijuojamus kokybinius ir kiekybinius receptorių pokyčius ant NK ląstelių (Bhatia and Kumar, 2014). Receptorių pokyčiai sukeliama per MDSC, Treg ląstelių ir su naviku asocijuotu makrofagų, kurie imunosupresinių citokinų pagalba trikdo NK ląstelių receptorių ekspresiją ir pačių ląstelių aktyvaciją (Bai and Cui, 2022).

NK ląstelių, kaip ir T ląstelių, veikla gali būti reguliuojama PD-1 receptoriaus ir PD-L1 ligando. Pačios NK ląstelės vykdo abiejų šių molekulių ekspresiją. PD-1 raiška NK ląstelėse buvo aptikta daugybine mieloma, inkstų karcinoma, Kaposi sarkoma, kiaušidžių karcinoma, Hodžkino limfoma sergančių pacientų audiniuose (Quatrini et al., 2020). Kita vertus PD-L1 raiška ant NK ląstelių yra labiau ribota. NK ląstelės, kurios vykdo PD-L1 ligando raišką aptinkamos agresyvios NK ląstelių leukemijos atveju, tačiau *in vitro* ir *in vivo* tyrimai pelėse rodo, kad PD-L1 raiška gali būti suaktyvinama ir ne supiktybėjusiose ląstelėse (Quatrini et al., 2020). NK ląstelės taip pat gali būti paveiktos cirkuliuojančio sPD-1. Kai aplinkoje yra sPD-1 ir NK ląstelių, padaugėja mirštančių naviko ląstelių kiekis, pastebimi efektyvesni degranuliacijos ir IFN- γ sekrecijos procesai, lyginant su aplinka, kurioje nėra sPD-1 (Mariotti et al., 2023). NK ląstelių populiacija gali dalyvauti ir sPD-1 sekrecijoje ir yra vienas iš sPD-1

ir sPD-L1 molekulių šaltinių periferiniame kraujyje. NK ląstelės stimuliuojamos IL-12, IL-15, IL-18 citokinais, į aplinką išsiskiria sPD-1, o nestimuluotos interferonais ląstelės į aplinką geba išskirti sPD-L1 ir sPD-L2 baltymus (Mariotti et al., 2023).

Anti-PD-L1 ir anti-PD-1 monokloninių antikūnų terapijos metu pastebimas ryšys tarp terapijos efektyvumo ir NK ląstelių. Šių molekulių blokavimas gali sustabdyti PD-1 receptoriaus sukeltą slopinimo efektą, dėl kurio yra atkuriamos PD-1+ NK funkcijos – citotoksiškumas ir citokinų gamyba, IFN- γ ir CD107a ekspresijos ir degranuliacijos procesai, apoptozės slopinimas. Panašus efektas pastebimas PD-L1+ NK ląsteles paveikus anti-PD-L1 blokatoriumi. Taigi šie terapiniai antikūnai sustiprina NK ląstelių nuo antikūnų priklausomą citotoksinį efektą (Bai and Cui, 2022). Taip pat nesmulkią ląstelinio plaučių tipo pacientams nustatytas aukštas sPD-L1 lygis ir žemas NK ląstelių kiekis buvo susietas su trumpesniu išgyvenamumu be ligos progresijos ir bendru išgyvenamumu (Mazzaschi et al., 2020).

1.3.3 Treg ląstelės

Treg (T reguliacinės) ląstelės yra T ląstelių subtipas, kuris gali būti atpažįstamas pagal CD25 ir FoxP3 ekspresiją ant ląstelės paviršiaus, tačiau yra aptinkamos ir CD8+ Treg ląstelės, kurios vykdo FoxP3 ekspresiją (Togashi et al., 2019). Didžioji dalis cirkuliuojančių Treg ląstelių yra kildinamos iš pavienių teigiamų CD4+ T ląstelių, kurios įgyja Foxp3 raišką, kai užkrūčio liaukoje pateikiamas savasis antigenas, tačiau pačioje naviko mikroaplinkoje vėžinės ląstelės išskiria FoxP3 indukuojančius veiksnius, tokius kaip TGF- β , kuris stabilizuoja Treg ląstelių slopinimo funkciją, gali sukelti efektorinių T ląstelių virsmą į Treg ir padeda palaikyti Treg ląstelių homeostazę (Attias and Piccirillo, 2024). Navikai ne tik indukuoja efektorinių T ląstelių virsmą į Treg ląstelės, papildomai, šios ląstelės yra skatinamos migruoti į naviko aplinką. Treg ląstelių pritraukimas į navikinę aplinką yra vykdomas CCL22, CCL28 (CC chemokinių ligandai) citokinų ir HIF- α (hipoksiją sukeliantis veiksnys alfa), o migravusių ląstelių proliferacija skatinama naviko mikroaplinkos, kurioje gausu IL-10, TGF- β , adenozino ir mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių (Bhatia and Kumar, 2014).

Treg ląstelės gali slopinti imuninį atsaką keliais būdais. Treg ląstelės konkuruoja su kitoms T ląstelėms reikalingu citokinu IL-2 ir jį sunaudoja, blokuoja antigeną pateikiančių ląstelių funkciją per CTLA-4, todėl kitos T ląstelės negali būti aktyvuotos, išskiria imunitetą slopinančius citokinus, tokius kaip IL-10, IL-35 ir TGF- β , keičia ATP į adenoziną, kuris slopina T ląstelių aktyvaciją (Ohue and Nishikawa, 2019). Visos šios Treg funkcijos sukuria naviko vystymuisi palankią aplinką ir daugumos vėžio tipų atveju didelis Treg ląstelių kiekis arba didelis Treg ląstelių santykis su CD4+ T ląstelėmis

lemia prastą ligos prognozę (Togashi et al., 2019). Taip pat Treg (CD4+CD25+Foxp3+) ląstelių kiekis yra padidėjęs kastracijai prostatos atspariu vėžiu sergantiems individams lyginant su sveika kontrole ir gerybine prostatos hiperplazija. Padidėjęs reguliacinių T-ląstelių kiekis pacientų periferiniame kraujyje rodo, kad šios ląstelės gali dalyvauti prostatos vėžio patogenezėje ir progresavime (Seputra et al., 2021).

Treg ląstelės vykdo PD-1 ekspresiją, tačiau jos kiekis priklauso nuo naviko mikroaplinkos ir sutampa su įprastiniu CD4+ ląstelių PD-1 ekspresijos kiekiu. Dėl to PD-1 slopinimas gali sustiprinti Treg imunosupresinę funkciją. Pastebėta, kad anti-PD-1 monokloniniai antikūnai *in vitro* sustiprina Treg ląstelių imunosupresines funkcijas, tačiau tyrime su pelėmis parodyta, kad įvykus sąveikai tarp PD-1 receptoriaus ir PD-L1 ligando esančio and CD8+ T ląstelės stebimi priešingi imunosupresiniams veiksniams reiškiniai (Togashi et al., 2019). Kita vertus PD-L1 ligandas yra svarbus ir Treg ląstelių indukcijai. Susitikusios PD-L1 liganda naivios T ląstelės yra indukuojamos į FoxP3+ Treg ląsteles. PD-L1 ne tik naujai indukuoja FoxP3 raišką naiviose ląstelėse, bet ir padeda išlaikyti jo ekspresiją jau esančiose Treg ląstelėse. Šios indukuotos Treg ląstelės slopina CD4+ T ląstelių efektorines funkcijas (Francisco et al., 2009).

1.3.4 Mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės

MDSC (mieloidinės kilmės supresorinės ląstelės) yra ląstelių populiacija, kuriai būdingas gebėjimas slopinti T-ląstelių ir NK ląstelių funkciją. MDSC susidaro iš progenitorinių mieloidinių ląstelių (angl. *myeloid progenitor cells*), kurios nesidiferencijuoja į subrendusias dendritines ląsteles, granulocitus ar makrofagus. MDSC yra fenotipiškai heterogeniškos ir gali būti skirstomos į granulocitines (G-MDSC) ir monocitines (M-MDSC), kurios pasižymi skirtingomis savybėmis. G-MDSC ląstelės gali būti atpažįstamos pagal CD33+, CD11b+, CD14- ekspresiją, o M-MDSC atpažįstamos pagal CD14+ ekspresiją. Vėžio pacientams nustatyti abiejų šių tipų ląstelių kiekiai prieš gydymą ir gydymo metu yra siejami su bendru išgyvenamumu ir išgyvenamumu be ligos progresavimo (Diaz-Montero et al., 2014). Taip pat daugumos vėžio tipų atveju stebimas stiprus hematopoezės sutrikdymas, kurio metu yra skatinama nesubrendusių neutrofilų ir monocitų ekspansija. Dėl to padaugėja imunosupresorių MDSC ląstelių (Hiam-Galvez et al., 2021).

MDSC padeda navikams išvengti imuninės sistemos įvairiais mechanizmais. Pavyzdžiui, MDSC gali vykdyti arginazės (ARG1) ir azoto oksido sintazės (iNOS2) fermentų sintezę, kurie skaido L-argininą (T ląstelių funkcijai svarbi aminorūgštis) arba sekretuoja azoto oksidą ir superoksidą, kurie gali sukelti T ląstelių mirtį ir pakenkti jų funkcijai (Bhatia and Kumar, 2014). Monocitinės MDSC ląstelės skatina epitelio virsmą į mezenchimą, kuris didina naviko invazyvumą, tačiau granulocitinės

MDSC ląstelės stabdo šį procesą (Galli et al., 2020). Taip pat monocitinės MDSC slopina T ląstelių proliferaciją ir dalyvauja vėžio progresavime. Dėl to M-MDSC yra siejamos su kai kurių vėžio tipų prasta ligos baigtimi (Chen et al., 2023). Pastebėta, kad MDSC ląstelės gali sutrikdyti T ląstelių adheziją pasitelkusios ADAM-17 proteazės, dėl kurio yra sumažinama CD62 ligando ekspresija (Lindau et al., 2013). Tos pačios ADAM-17 proteazės gali dalyvauti ir sPD-L1 baltymo susidaryme (Orme et al., 2020). MDSC populiacija yra glaudžiai susijusi ir su Treg ląstelėmis, abi ląstelių populiacijos gali daryti įtaką išskirdamos tirpius mediatorius. Pavyzdžiui, MDSC gali skatinti Treg proliferaciją per IL-10 ir TGF- β . TGF- β gali sumažinti PD-L1 raišką ant M-MDSC ląstelių, o Treg ląstelių išskiriamas IL-10 gali skatinti PD-L1 raišką MDSC populiacijoje. Šios ląstelių populiacijos pasižymi dideliu tarpląstelinės sąveikos potencialu, kurį gali lemti įvairios molekulės, įskaitant CTLA-4/CD80, PD-L1/PD-1, TIM-3 (T-ląstelių imunoglobuliną ir mucino domenų turintis-3) ir kitas paviršiaus molekules (Haist et al., 2021).

Nesmulkiažasteliniais plaučių vėžiu sergantys pacientai, kurie turėjo didesnius CD33+CD14+ ląstelių lygius pasižymėjo geresniu atsaku į anti-PD-1 blokatorių terapiją. Taip pat melanomos atveju didelė CD33 ekspresija monocituose susieta su ilgesniu išgyvenamumu ir anti-PD-1 blokatorių terapijos efektyvumu, o monocitai, pasižymintys CD33+ ekspresija turėjo neigiamą sąsają su Treg (CD4+CD25+FoxP3+) ląstelių populiacija (Olingy et al., 2022). Kiaušidžių vėžio atveju, kraujyje cirkuliuojančiose M-MDSC ląstelės pasižymi didesniu membraninės PD-L1 raiškos kiekiu lyginant su sveikų individų ląstelėmis bei pastebėta, kad kraujyje esančios sPD-L1 koncentracijos teigiamai koreliuoja M-MDSC, kurios vykdo PD-L1 ekspresiją (Okła et al., 2020). Prostatos vėžio atveju, pacientų periferiniame kraujyje cirkuliuojančių M-MDSC dažnis buvo daug didesnis nei sveikų donorų kraujyje. M-MDSC išskirtos iš pacientų kraujo reikšmingai slopino CD4+ T ląstelių proliferaciją ir galėjo slopinti CD8+ T ląstelių proliferaciją, nors ir ne taip stipriai (Idorn et al., 2014). Be to, M-MDSC teigiamai koreliavo su cirkuliuojančių Treg ląstelių dažniu prostatos vėžiu sergančių pacientų periferiniame kraujyje, bet ne sveikų individų kraujyje. Taip pat M-MDSC lygiai koreliavo su prostatos vėžio prognostiniais įverčiais (Idorn et al., 2014).

1.4 Išvados iš literatūros apžvalgos

Padidėjusios sPD-1 ir sPD-L1 baltymų koncentracijos aptinkamos įvairių vėžio tipo atveju. Šie baltymai gali būti siejami su naviko, bendro išgyvenamumo, ligos progresijos parametrais ir imunoterapijos efektyvumu. Kita vertus, šių baltymų koncentracijos tarp skirtingų navikų labai skiriasi ir yra gali būti paveikiamos gydymo metu. Iki šiol sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos buvo nustatytos tik prostatos vėžio pacientams gaunantiems gydymą, tačiau koncentracijos prieš gydymą prostatos vėžio

atveju dar nebuvo tirtos. Taip pat sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos susietos su tam tikrais prostatos vėžio parametrais ligos metu, tačiau jų prognostinę reikšmę ir įtaką išgyvenamumui be ligos progresijos nebuvo apibūdinta.

Imuninės ląstelės (CD4+, CD8+, NK, Treg, MDSC) dalyvaujančios naviko mikroaplinkos procesuose yra glaudžiai susijusios tiek su membraniniais PD-L1/PD-1 ašies komponentais, tiek su tirpiomis formomis ir gali būti įvairių ligos parametrų rodiklis, tačiau nėra duomenų ar šių ląstelių populiacijos gali būti siejamos su sPD-1 ir sPD-L1 baltymais cirkuliuojančias prostatos vėžio pacientų periferiniame kraujyje. Taigi, siekiant geriau suprasti prostatos vėžio progresavimą, reikalingas sPD-1/sPD-L1 molekulių ir jų ryšio su imuninių ląstelių populiacijomis apibūdinimas.

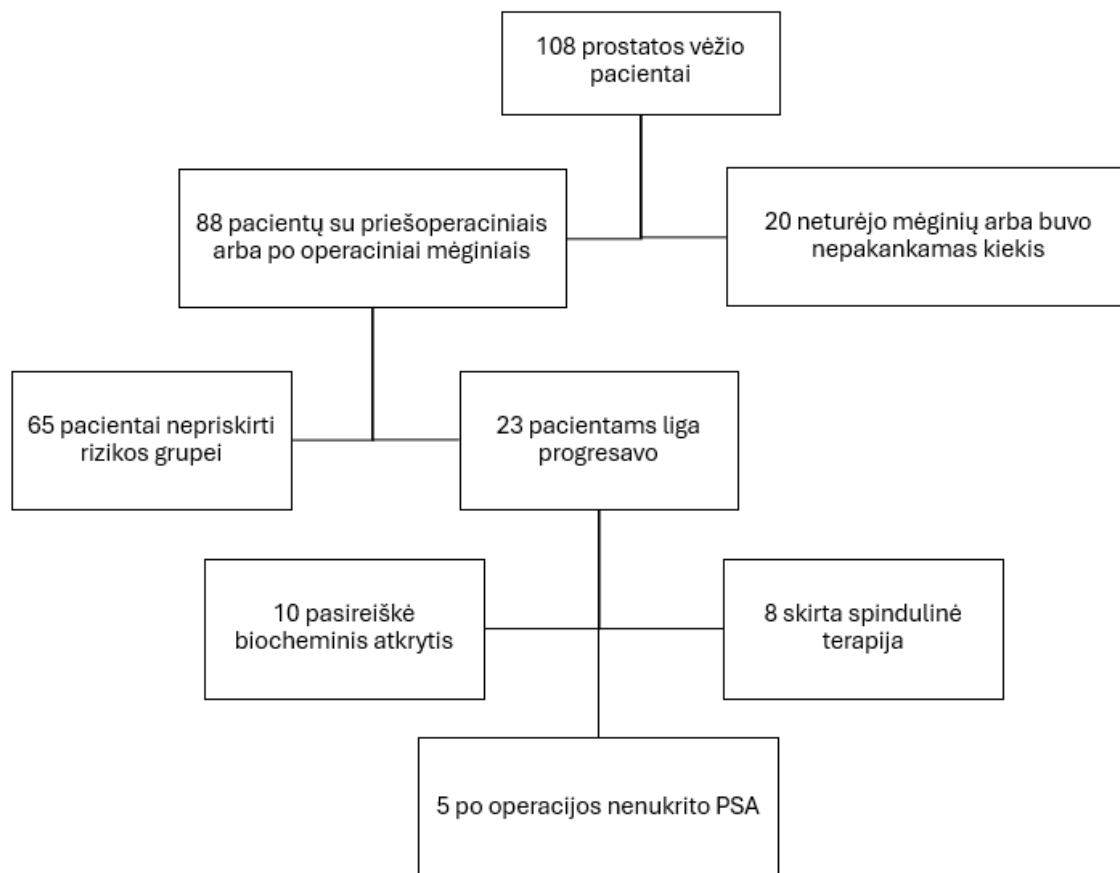
2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Bioetikos leidimas

Prostatos vėžio mėginiai pacientų ir kontrolinės grupės mėginiai gauti gavus informuotą asmens sutikimą ir naudoti pagal Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų komiteto leidimą 158200-17-928-422.

2.2 Pacientų grupės atrinkimas tyrimui

Pacientų atranka tyrimui, priešoperaciniai ir pooperaciniai prostatos vėžio pacientų kraujo mėginiai ir su ligos eiga susijusi informacija gauti iš 2017–2021 metais Nacionalinio vėžio instituto vykdyto tyrimo. Priešoperaciniai mėginiai paimti 0–1 dienos prieš radikalią prostatektomiją, o pooperaciniai kraujo mėginiai paimti nuo 82 iki 107 dienų po operacijos.



2.1 pav. Prostatos vėžio pacientų klasifikacija ir priskyrimas prie nerizikos ir ligos progresavimo grupės.

Iš 108 pacientų imties buvo atrinkti asmenys, patyrę biocheminį atkrytį, su taikytu profilaktiniu spindulinės terapijos gydymu, bei tikslinės normos nepasiekusių PSA pooperaciniu rodikliu ir pacientai be recidyvo ir turėję pakankamą kraujo plazmos mėginių kiekį priešoperaciniame ir pooperaciniame laiko taškuose (2.1 pav). Biocheminiu atkryčiu buvo laikomas prostatos specifinio antigeno (PSA) koncentracijos pakilimas virš 0,2 ng/ml. Atrinktų pacientų charakteristikos pateiktos 2.1 lentelėje. Tirtos pacientų grupės amžiaus mediana buvo 63 metai, o priešoperacinis PSA svyravo nuo 2,15 ng/mL iki 67,7 ng/mL (mediana 6.2 ng/mL).

2.1 lentelė. Įtrauktų prostatos vėžio pacientų klinikinės charakteristikos.

Pacientų skaičius (%)	88 (100 %)
pT stadija	
pT2	64 (72,2 %)
pT3	24 (27,3 %)
Gleason klasė	
Klasė 1 [3+3]	24 (27,3 %)
Klasė 2 [3+4]	53 (60,2 %)
Klasė 3 [4+3]	10 (11,4 %)
Klasė 4 [4+4]	1 (1,1 %)

Pacientų Gleasono kriterijus nustatytas patologo iš biopsijos metu paimtų audinių mėginių. Pacientai pagal Gleason kriterijų padalinti į Gleason klases pagal Tarptautinės urologinės patologijos draugijos (angl. *International Society of Urological Pathology*) klasifikavimo sistemą: 3+3 Gleason kriterijus priskirtas 1 klasei, 3+4 – 2 klasei, 4+3 – 3 klasei, o 4+4 – 4 klasei.

2.3 Kontrolinės grupės rinkimo kriterijai.

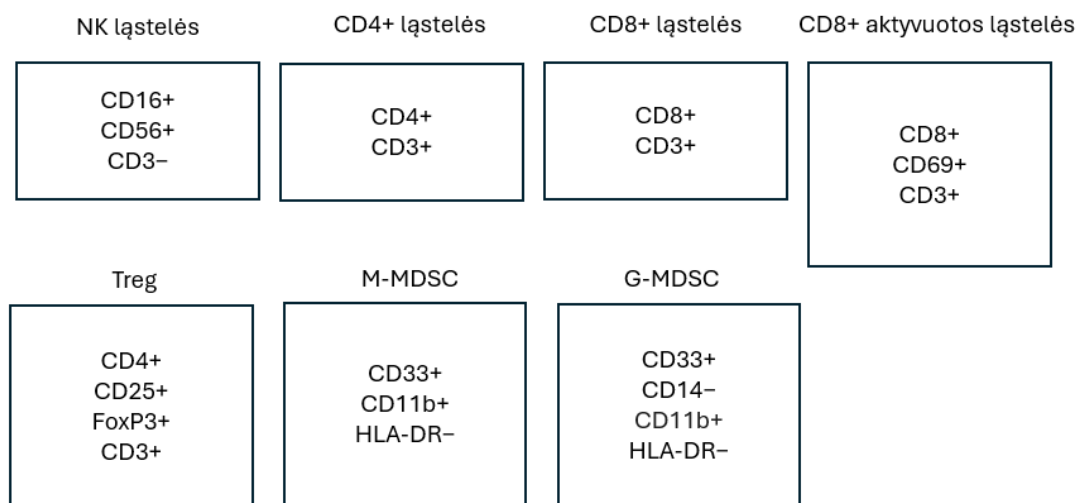
Kontrolinės grupės pacientų kraujo plazma buvo renkama biomedicininų tyrimų laboratorijoje Rezus.lt, remiantis PSA (prostatos specifinio antigeno) verte. Tinkami tyrimui asmenys buvo atrenkami pagal nustatytą PSA koncentraciją (<3 ng/mL), amžių (vyresni nei 58 metų vyrai), nesergantys onkologinėmis ligomis, neturintys reumatoidinio artrito, opinio kolito, Krono ligos, vilkligės, glomerulonefrito, diabeto arba podagros ir nevartojantys vaistų nuo alerginių ligų, prednizolo, ciklosporino.

2.4 Kraujo plazmos išskyrimas

Kraujas surinktas į BD Vacutainer® mėgintuvėlius su EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) antikoagulantu (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV). Į keturis atitinkamus mėgintuvėlius buvo įpilta 100 μl kraujo, o ląstelės buvo apdorotos pagal gamintojo instrukcijas. Mėgintuvėliai sukti ant purtyklės ir po surinkimo atlikta tėkmės citometrija.

2.5 Ląstelių fenotipavimas

Imuninių ląstelių fenotipavimas atliktas 2017–2021 metų vykdomo tyrimo metu. Imuninėms ląstelėms nudažyti antikūnais buvo naudojami keli mėgintuvėliai su skirtingu antikūnų mišiniu. NK ląstelių (CD56+CD16+CD3–) populiacijai nustatyti naudotas mėgintuvėlis dažytas su anti-CD16-APC (alofikocianino žymuo), anti-CD56-PE (fikoeritrino žymuo), anti-CD3-FITC (fluoresceino izotiocianato žymuo) („BioLegend“, San Diegas, CA, JAV). CD4+ ir Treg (CD4+CD25+FoxP3+) ląstelių populiacijoms nustatyti kraujo mėginiai dažyti su anti-CD3-APC, anti-CD25-PE, anti-CD4-FITC, anti-FoxP3-BV421TM („BioLegend“, San Diegas, CA, JAV). CD8+ ir aktyvuotų CD8+CD69+ T ląstelių populiacijos dažytos kitame mėgintuvėlyje su anti-CD3-BV510TM (brilantinio violetinio žymuo), anti-CD69-APC, anti-CD8a-FITC (BioLegend, San Diegas, CA, JAV) antikūnais. Granulocitinių ir monocitinių MDSC ląstelių populiacijos dažytos su anti-CD33-APC, anti-CD14-FITC, anti-HLA-DR-PE, anti-CD11b-BV421TM (BioLegend, San Diegas, CA, JAV) antikūnais. M-MDSC populiacija apibrėžta kaip CD33+CD11b+HLA-DR–, G-MDSC kaip CD33+CD14–CD11b+HLA-DR– (2.2 pav.).



2.2 pav. Ankstesnio tyrimo metu nustatytų ląstelių populiacijų apibrėžimas. NK – natūralieji kileriai, Treg – T reguliacinės ląstelės, G-MDSC – granulocitinės mieloidinės kilmės surpresorinės ląstelės, M-MDSC monocitinės – mieloidinės kilmės surpresorinės ląstelės.

Į atitinkamą mėgintuvėlį buvo įpilta 20 µl kiekvieno antikūno. Kraujas buvo inkubuojamas su antikūnais 15 minučių tamsoje, po to atlikta raudonųjų kraujo kūnelių lizė su BD FACS tirpalu (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV) santykiu 1:10, 15 minučių tamsoje. Tada ląstelės buvo du kartus plautos centrifuguojant su 1 mL BD-Cell-Wash tirpalu (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV) 7 min., 250 g sąlygomis ir fiksuotos BD-Cell-Fix tirpale (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV). Visi apdoroti mėginiai buvo analizuojami naudojant BD LSR II tekės citometru (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV). Mėginių analizei rinkta po 20 000 įvykių, o pogrupių analizei naudota BD FACSDiva™ programinė įranga (BD Biosciences, San Chosė, CA, JAV). M-MDSC ir G-MDSC ląstelių populiacijos išreikštos kaip procentas nuo monocitinių ir granulocitinių ląstelių populiacijų, kurios nuo limfocitų atskiros pagal priekinę ir šoninę šviesos sklaidą.

2.6 Kraujo plazmos sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijos nustatymas

Tirpių PD-L1 ir PD-1 koncentracijos nustatytos ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodu su plokštelėmis dengtomis žmogaus anti-PD-L1 arba žmogaus anti-PD-1 antikūnais (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen). Iki matavimų kraujo plazmos mėginiai buvo laikomi –80 °C ir palaipsniui atšildyti. Tirpalų skiedimai, inkubavimas ir plovimai atlikti pagal gamintojo rekomendacijas. Trumpai, kiekvienam šulinėliui naudota po 50 µl kraujo plazmos, kurie tarp plovimų buvo papildyti biotino, streptavidino-krienu peroksidazės ir tetrametil-benzidino tirpalais. Šulinėlių sugertis pamatuota ties 450 nm bangos ilgiu mikroplokštelių skaitytuvu BioTek ELX800 (BioTek). Matavimai atlikti 2 pakartojimais.

2.7 Statistinė analizė

Šapiro Vilko (angl. *Shapiro-Wilk*) testas naudotas patikrinti duomenų normalumą. Statistinis skirtumas tarp sPD-(L)1 koncentracijų porų įvertintas su Mano ir Vitnio U (angl. *Mann-Whitney U*) testu. Kelios grupės vienu metu lygintos su Kruskas ir Valis (angl. *Kruskal-Wallis*) ir post-hoc Dun (angl. *Dunn*) kriterijumi su Bonferoni (angl. *Bonferroni*) korekcija. Koreliacijos tarp grupių nustatytos su Spirmano (angl. *Spearman*) koreliacijos koeficientu. Koreliacijos koeficientas nuo 0 iki 0,20 buvo laikomas labai silpna koreliacija, nuo 0,20 iki 0,40 – silpna, nuo 0,40 iki 0,60 – vidutinio stiprumo, nuo 0,60 iki 0,80 – stipria ir nuo 0,80 iki 1 – labai stipria koreliacija.

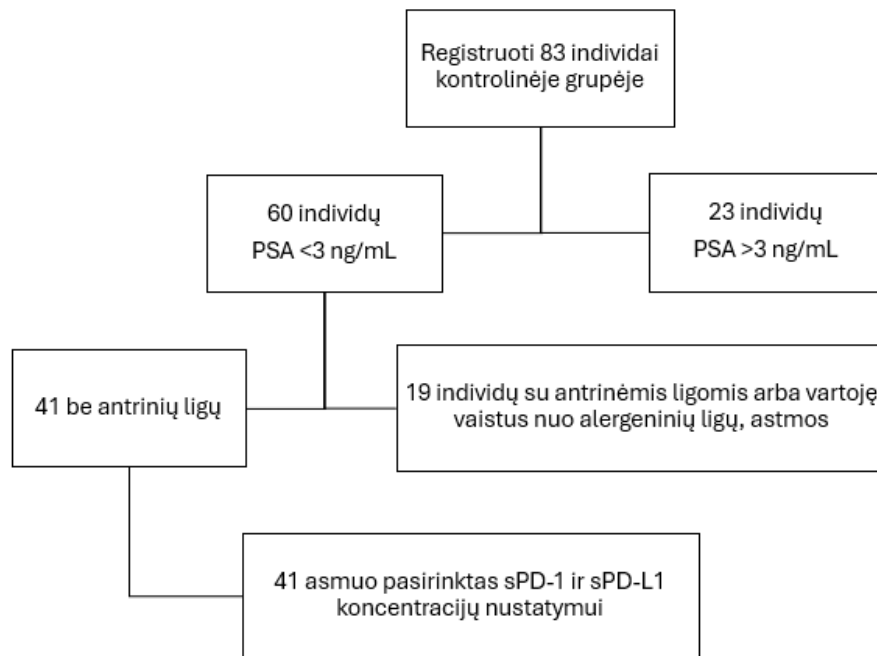
Išgyvenamumo be ligos progresijos tikimybėms apskaičiuoti naudotas Kaplan-Meier metodas, o logaritminio rango (Log-rank) testas – palyginti skirtumo reikšmingumą tarp grupių. Rizikos santykiam

įvertinti panaudota *Cox* proporcingų rizikos veiksnių (angl. *Cox proportional hazards*) analizė. Į multivariacinį modelį įtraukti kintamieji, kurių univariacinėje analizėje $p < 0,1$. Pacientai padalinti į mažos ir didelės koncentracijos grupes pagal ROC (sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. *receiver operating characteristic*)) kreives gautas logistinės regresijos metu su sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijomis ir atsižvelgiant pooperacinę ligos progresavimo statusą. ROC kreivės reikšmingumas įvertintas pasitelkus permutacijų testą (permutacijų skaičius – 1000). Analizė atlikta su „Python“ versija 3.11.4 („Python Software Foundation“) ir *pandas* (2.0.3), *numpy* (1.25.3), *matplotlib* (3.7.2), *networkx* (3.2.1), *pingouin* (0.5.3), *scikit-posthocs* (0.8.0), *scipy* (1.11.1), *lifelines* (0.27.8), *scikit-learn* (1.2.2) paketais.

3. REZULTATAI

3.1 Kontrolinės grupės charakteristikos

Šio darbo metu iš viso buvo viso surinti 83 asmenų kontrolinės grupės kraujo plazmos mėginiai. Iš šių 83 asmenų, 23 individai viršijo 3 ng/mL PSA koncentraciją kraujyje ribą. Iš likusių 60 individų, 19 sirgo antrinėmis ligomis arba vartojo vaistus nuo alerginių ligų (3.1 pav.).



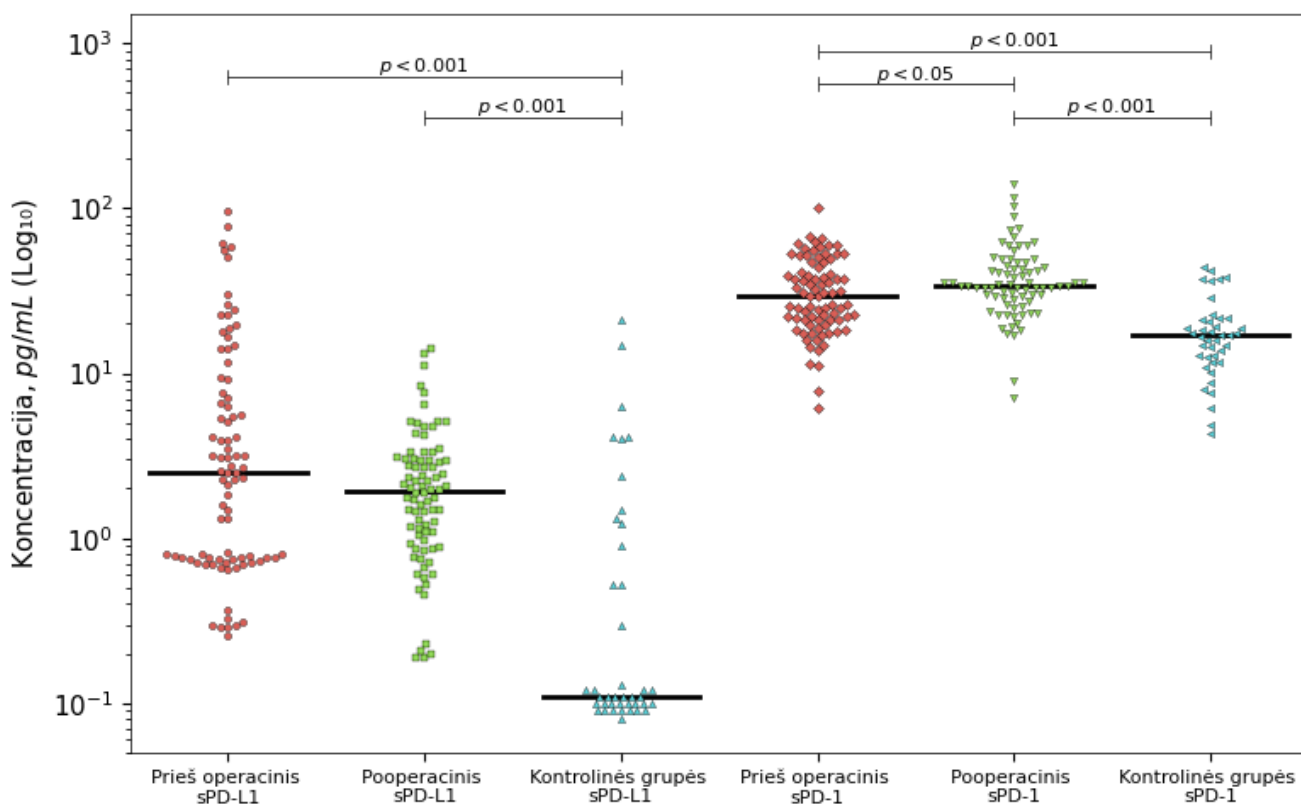
3.1 pav. Kontrolinės grupės pasirinkimas SPD-1 ir SPD-L1 kraujo plazmos koncentracijos nustatymui.

41 asmuo atitiko reikalavimus ir buvo pasirinkti kontrolinės grupės SPD-1 ir SPD-L1 koncentracijų kraujyje nustatymui. Atrinktų kontrolinės grupės asmenų amžiaus intervalas buvo nuo 58 iki 72 metų (mediana 66 metai), o PSA koncentracijos kontrolinėje grupėje neviršijo 3 ng/mL (PSA mediana 1,1 ng/mL).

3.2 SPD-L1 ir SPD-1 koncentracijų padidėjimas prostatos vėžio pacientams

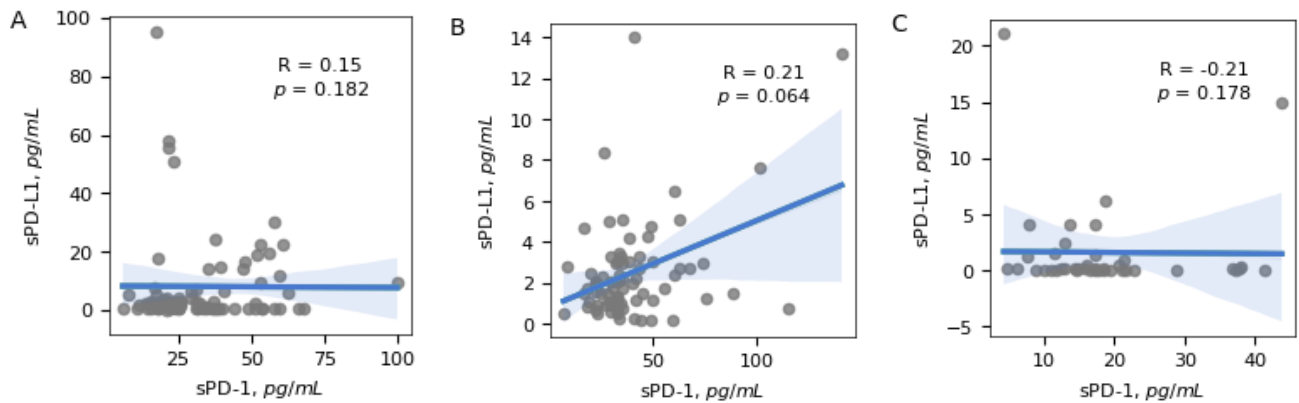
Iš viso darbo metu nustatyta 85 priešoperacinės SPD-L1 prostatos vėžio pacientų koncentracijos, 81 pooperacinės SPD-L1 koncentracijos, 81 priešoperacinės SPD-1 koncentracijos ir 77 pacientų pooperacinės SPD-L1 koncentracijos. Kontrolinėje grupėje nustatyta 41 individų SPD-1 ir SPD-L1 kraujo plazmos koncentracijos. Nustatytas priešoperacinis prostatos vėžio pacientų SPD-L1 koncentracijų intervalas buvo nuo 0,26 pg/mL iki 95,38 pg/mL (mediana 2,51 pg/mL), o SPD-1 baltymai pacientų

kraujo plazmoje svyravo nuo 6,18 pg/mL iki 99,93 pg/mL (mediana 29,44 pg/mL). Kontrolinės grupė pasižymėjo mažesnėmis sPD-L1 ir sPD-1 baltymų koncentracijomis lyginant su prostatos vėžio pacientų grupe. sPD-L1 koncentracijos kontrolinėje grupėje svyravo nuo 0,08 pg/mL iki 21,04 pg/mL (mediana 0,11 pg/mL), o nustatytas sPD-1 baltymų koncentracijų intervalas buvo nuo 4,33 pg/mL iki 43,79 pg/mL (mediana 17,18 pg/mL). sPD-L1 ir sPD-1 baltymų koncentracijų skirtumas tarp kontrolinės ir pacientų buvo statistiškai reikšmingas (*Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,001$) (3.2 pav.).



3.2 pav. Priešoperacinių ir pooperacinių prostatos vėžio ir sveikų žmonių kraujo plazmos sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijų pasiskirstymas. Atkarpos žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių, juoda linija pažymėta grupės koncentracijų mediana.

Panašus rezultatas gautas ir tarp pooperacinių pacientų koncentracijų ir kontrolinės grupės. Pooperacines prostatos vėžio sergančių asmenų sPD-1 koncentracijos buvo padidėjusios lyginant su kontroline sveikų asmenų grupe ir svyravo intervale nuo 7,12 pg/mL iki 141,24 pg/mL (mediana 33,89 pg/mL). Nustatytų pooperacinių sPD-L1 koncentracijų mediana buvo 2,58 pg/mL ir ji buvo mažesnė už priešoperacinių reikšmių sPD-L1 koncentracijų medianą. sPD-L1 koncentracijų intervalas sumažėjo nuo 0,19 pg/mL iki 13,99 pg/mL, tačiau skirtumas buvo nereikšmingas. Kita vertus skirtumas tarp pacientų ir kontrolinės grupės sPD-L1 koncentracijų buvo išlaikytas ir po operacijos (*Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,001$) (3.2 pav.).

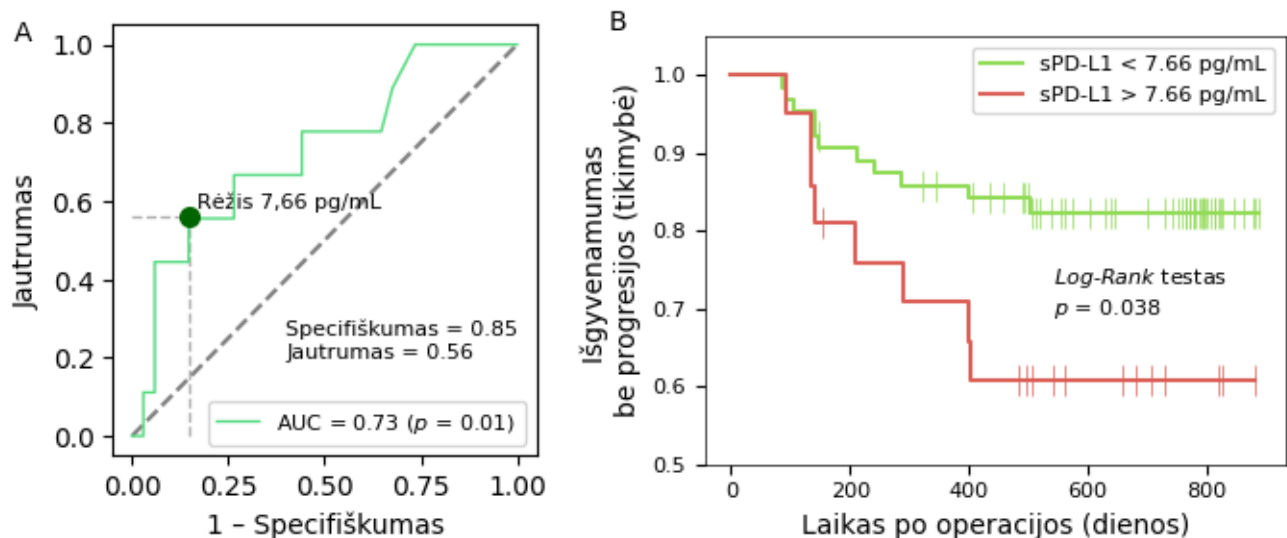


3.3 pav sPD-1 ir sPD-L1 tarpusavio koreliacijos. (A) Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių reikšmių koreliacija. (B) Prostatos vėžio pacientų pooperacinės koreliacija. (C) Kontrolinės grupės sPD-1 ir sPD-L1 koreliacija.

Koreliacijos analizė neatskleidė stiprios ir reikšmingos koreliacijos tarp sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų priešoperacinėje prostatos vėžio pacientų imtyje (Spirmano koreliacijos koeficientas, $R = 0,15$, $p = 0,18$), pooperacinėje imtyje ($R = 0,21$, $p = 0,06$) ir kontrolinėje imtyje ($R = -0,21$, $p = 0,18$) (3.3 pav.). Tačiau visose grupėse buvo išlaikytas reikšmingas skirtumas tarp sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų kiekio (*Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,001$) ir nustatytos sPD-1 koncentracijos visose grupėse buvo didesnės nei sPD-L1 koncentracijos (3.2 pav.).

3.3 sPD-L1 ir sPD-1 ryšys su prostatos vėžio atsinaujinimu ir agresyvumu

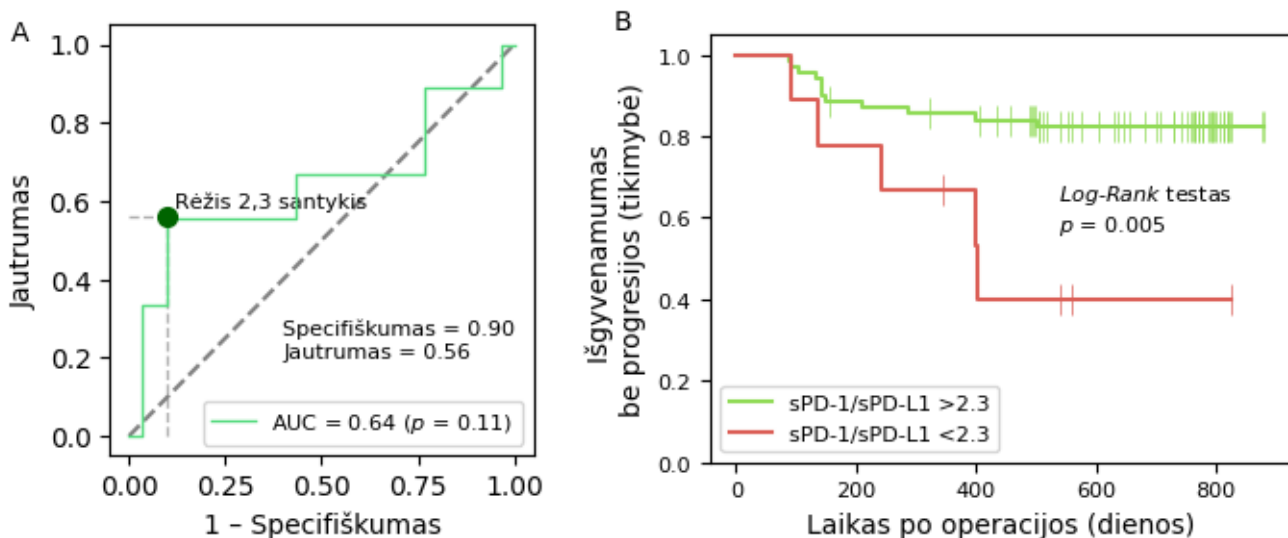
Kraujyje cirkuliuojantys sPD-L1 ir sPD-1 kitų vėžio tipų atveju gali būti prognostinis žymuo pacientų ligos eigai nusakyti. Pacientai į didelės ir mažos koncentracijos grupes padalinti pasitelkus logistinę regresiją, ROC (sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė) kreives ir pacientų ligos progresavimo statusą. Pagal ROC kreivę nustatytas priešoperacinių sPD-L1 koncentracijų rėžis 7,66 pg/mL (specifiškumas 85 %, jautrumas, 56 % ir AUC (plotas po kreive) = 0,73) (3.4A pav.). Prostatos vėžio pacientai, kurių kraujyje nustatytos didesnės nei 7,66 pg/mL sPD-L1 baltymo koncentracijos prieš chirurginę operaciją, buvo labiau linkę patirti ligos atsinaujinimą po operacijos (Log-rank testas, $p < 0,05$). Vienerių metų išgyvenamumas be ligos progresijos mažesnės nei 7,66 pg/mL sPD-L1 koncentracijos grupėje buvo 86 %, o didelės koncentracijos grupėje (>7,66 pg/mL) – 71 %. Skirtumas tarp šių grupių išgyvenamumo tikimybės be biocheminio atkryčio dar labiau padidėjo praėjus 2 metams po operacijos (82 % <7,66 pg/mL grupėje ir 61 % >7,66 pg/mL grupėje) (3.4B pav.).



3.4 pav. Priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos kaip biožymuo apibūdinantis prostatos vėžio pacientų išgyvenamumą be ligos atsinaujinimo. (A) Priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos kraujuje kaip klasifikatoriaus išgyvenamumui be ligos progresavimui patikimumas ir (B) prostatos vėžio pacientų išgyvenamumas be ligos progresavimo pagal kraujuje nustatytą priešoperacinių sPD-L1 koncentracijų grupes. AUC – plotas po kreive.

Priešoperacinės sPD-1 koncentracijos pasižymėjo daug silpnesne klasifikatoriaus galia. Pagal ROC kreivę nustatytas priešoperacinių sPD-1 rėžis 18,2 pg/mL (specifiškumas 82 %, jautrumas 100 % ir AUC = 0,47) (1 priedas, 1A pav.). Nepastebėta ryškaus skirtumo tarp išgyvenimo be ligos progresavimo tarp didesnės nei 18,2 pg/mL ir mažiau nei 18,2 pg/mL sPD-1 koncentracijos kraujuje grupių. Skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas lyginant su mažesnės koncentracijos sPD-1 grupe (Log-rank testas, $p > 0,05$). Tarp šių sPD-1 grupių vienerių metų išgyvenamumo be ligos progresavimo tikimybių skirtumas buvo minimalus. Vienerių metų išgyvenamumas be ligos progresijos <18,22 pg/mL sPD-1 grupėje siekė 87 %, o >18,22 pg/mL grupėje 82 %. Dviejų metų išgyvenamumas be ligos progresavimo mažos koncentracijos sPD-1 grupėje siekė 79 % ir 77 % didelės koncentracijos grupėje (1 priedas, 1B pav.).

Pooperacinės kraujo plazmos sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijos neparodė statistiškai reikšmingo rezultato tarp logistinės regresijos metodu išskirtų didelės ir mažos koncentracijos grupių, nei pasižymėjo stipria klasifikatoriaus galia. Pooperacinės pacientų grupės padalintos pagal šių baltymų koncentracijas stipriai nesiskyrė pagal išgyvenamumo be ligos progresijos tikimybę. Šie skirtumai tarp grupių išgyvenamumo pagal po operacijos nustatytus koncentracijų rėžius buvo statistiškai nereikšmingi (1 priedas, 2 ir 3 pav.).



3.5 pav. Priešoperacinio sPD-1 ir sPD-L1 santykio reikšmė išgyvenamumui be ligos progresavimo apibūdinimui. (A) Priešoperacinio sPD-1/sPD-L1 santykio ROC kreivė biocheminio atkryčio klasifikavimui. (B) Prostatos vėžio pacientų, padalintų pagal sPD-1/sPD-L1 santykį prieš operaciją, išgyvenamumo Kaplan-Meier kreivė. AUC – plotas po kreive.

PD-1 ir sPD-L1 gali atlikti priešingas vienas kito atžvilgiu funkcijas ir priklausomai nuo šių molekulių kiekių gali susidaryti aktyvi arba imunosupresinė aplinka. Dėl to svarbu įvertinti, kokią įtaką išgyvenamumui daro sPD-1 ir sPD-L1 santykis. Pagal ROC kreivę nustatytas priešoperacinių sPD-1/sPD-L1 santykio rėžis buvo 2,3 (specifiškumas 90 %, jautrumas 56 % ir AUC = 0,64) (3.5A pav.). Pacientų grupė su mažesniu santykiu tarp sPD-1/sPD-L1 priskirta prie grupės su didesne išgyvenamumo be ligos progresijos tikimybe. Vienerių metų išgyvenamumas be ligos progresavimo <2,3 sPD-1/sPD-L1 santykio grupėje buvo 75 %, o >2,3 santykio grupėje 84 %. Išgyvenamumo tikimybės be ligos progresavimo dar labiau išsiskyrė tarp grupių praėjus 2 metams po operacijos. Praėjus 2 metams po operacijos <2,3 sPD-1/sPD-L1 santykio grupė pasižymėjo 45 % tikimybe išgyventi nepatyrus ligos progresavimo, o >2,3 santykio grupė – 81 % tikimybe (3.5B pav.).

Tam, kad įvertinti prostatos vėžio pacientų riziką patirti ligos atsinaujinimą, kuri galėtų būti siejama su sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijomis, buvo pritaikytas *Cox* regresijos modelis, į kurį buvo įtraukti prostatos vėžio agresyvumui įvertinti naudojami prognostiniai faktoriai (patologinė stadija (pT), Gleason klasės, PSA koncentracijos) bei pacientų amžius. Kaip ir buvo tikėtasi, Gleason klasės, patologinė stadija ir PSA koncentracijos numatė nepalankią prognozę šioje pacientų grupėje. Univaracinėje analizėje priešoperacinis sPD-L1 susietas su ligos progresavimo rizika, tačiau priešoperacinės sPD-1 koncentracijos pacientų kraujyje neapibūdino ligos progresavimo rizikos (3.1 lentelė). Taip pat pacientų amžius neturėjo įtakos prostatos vėžio progresavimo rizikai.

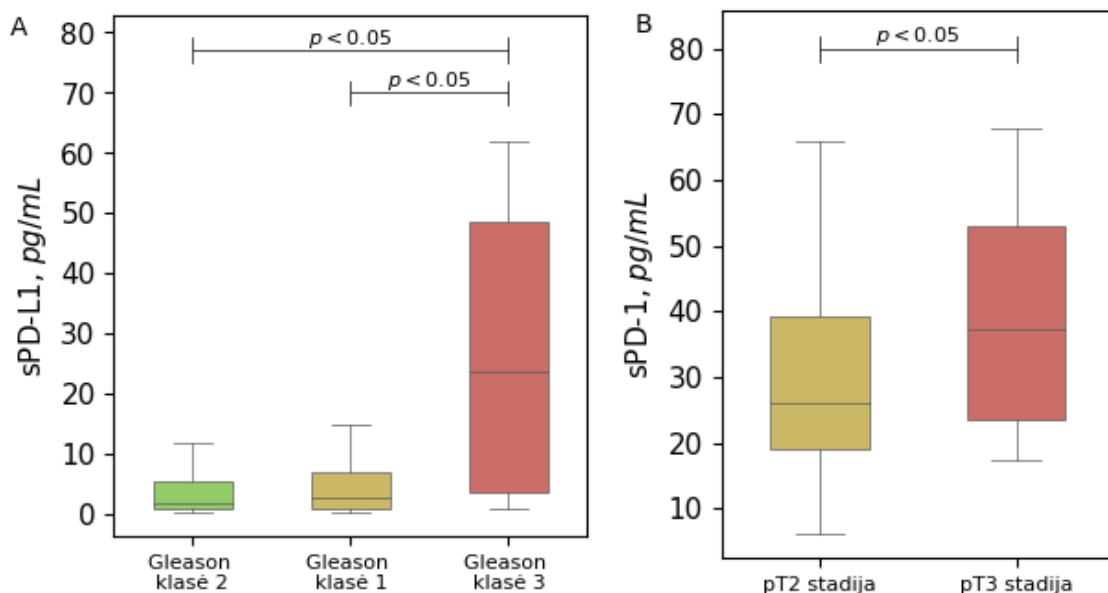
3.1 lentelė. Cox regresijos rezultatai. Ref. – referentinis kintamasis.
HR – rizikos santykis (angl. *hazard ratio*), PI – pasikliautinis intervalas.

Parametras	Univariacinė analizė			Multivariacinė analizė		
	HR	95% PI	P reikšmė	HR	95% PI	P reikšmė
Amžius, metai	1,02	0,96–1,1	0,97		–	
Gleason klasės grupė						
Gleason klasė 1	Ref.			Ref.		
Gleason klasė 2	5,9	0,77–44,72	0,087	79	55–2915	0,047
Gleason klasė 3	22,49	2,8–180,5	0,003	182	124–5900	0,015
PSA, ng/mL	1,03	1,01–1,06	0,013	1,09	1,01–1,16	0,031
pT stadija						
pT2	Ref.			Ref.		
pT3	10,15	3,98–25,89	$p < 0,001$	5,98	1,91–18,70	0,002
sPD-1 grupė						
<18.22 pg/ml	Ref.				–	
>18.22 pg/mL	1,5	0,43–5,2	0,52		–	
sPD-L1 grupė						
<7.66 pg/mL	Ref.			Ref.		
>7.66 pg/mL	3,5	1,40–8,73	0,007	1,2	0,31–3,98	0,88

Multivariacinėje Cox regresijoje priešoperacinės sPD-L1 prarado reikšmingumą kaip nepriklausomas predikcinis faktorius išgyvenamumo be ligos progresijos rizikai nustatyti. Kita vertus PSA koncentracijos, patloginė stadija, ir Gleasono 2 ir 3 klasės išliko kaip nepriklausomi predikciniai faktoriai (3.1 lentelė).

Gleason histologinis prostatos naviko ląstelių diferenciacijos rodiklis nustatomas prostatos biopsijos metu ir yra stiprus prognostinis kriterijus. Pacientai priskirti 3-iai Gleason klasei turėjo didesnes sPD-L1 koncentracijas nei 1 ir 2 klasės pacientais. Pirmos Gleason klasės pacientų grupėje priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos vidurkis siekė 3,7 pg/mL, antroje klasėje – 8,3 pg/mL, o pacientų trečioje Gleason klasėje sPD-L1 koncentracijos pakilo iki 25,9 pg/mL. Skirtumas tarp pirmos, antros ir trečios Gleason klasės buvo statistiškai reikšmingas (*Dunn* testas, $p < 0,05$) (3.6A pav.). 4 klasės Gleason pacientų grupė į palyginimą nebuvo įtraukta, nes nebuvo pakankamas pacientų skaičius patikimam statistiniam palyginimui.

Kita vertus ryškaus skirtumo tarp priešoperacinių sPD-1 koncentracijų ir pacientų grupių su skirtingais Gleason rodikliais nepastebėta. Visose Gleason klasėse vidurkis svyravo intervale nuo 31 pg/mL iki 33 pg/mL ir reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo. Pooperacinės sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos taip pat neturėjo sąryšio su Gleason klasėse (*Kruskal-Wallis* kriterijus, $p < 0,05$) (2 priedas, 1 pav.).



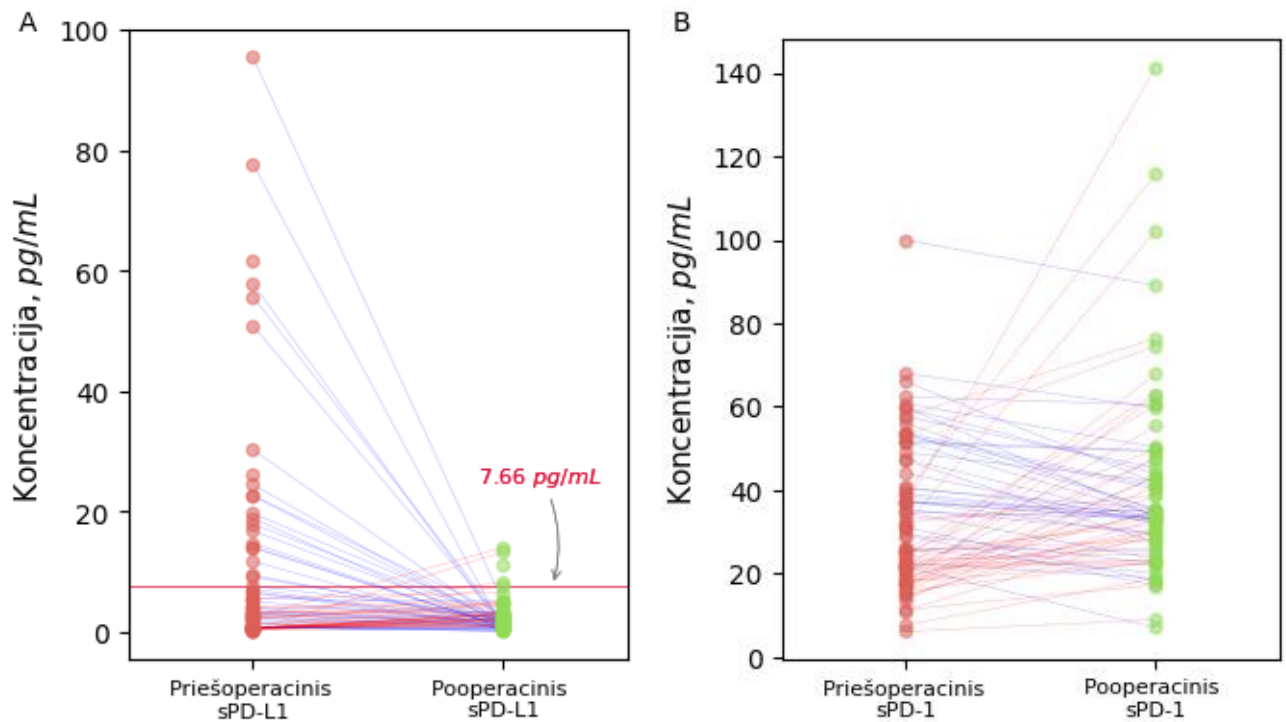
3.6 pav. Priešoperacinių prostatos vėžio pacientų sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijų sąsaja su klinikiniais rodikliais. (A) Priešoperacinių sPD-L1 kraujo plazmos koncentracijų pasiskirstymas pagal Gleason klases ir (B) pacientų priešoperacinių sPD-1 koncentracijų pasiskirstymas pagal patologinę stadiją. Atkarpomis pažymėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių.

Priešoperacinės sPD-1 koncentracijos buvo reikšmingai didesnės pacientams, kuriems buvo nustatyta pT3 stadija, lyginant su pacientais, kurie buvo priskirti pT2 stadijai. sPD-1 koncentracijų mediana pT2 stadijoje – 25,1 pg/mL, o pT3 stadijos mediana – 37,1 pg/mL (*Mann-Whitney U* kriterijus $p < 0,05$) (3.6B pav). Tarp sPD-L1 koncentracijų pasiskirstymą pagal stadijas ir abiejų baltymų pooperacinių koncentracijų pasiskirstymą pagal stadijas reikšmingo skirtumo nebuvo (*Mann-Whitney U* kriterijus $p > 0,05$) (2 priedas, 2 pav.).

3.4 sPD-L1 sąsaja su naviku

Priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos pasižymėjo didesne mediana nei pooperacinės sPD-L1 koncentracijos, tačiau šis skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas. Dėl to buvo įvertinta kaip sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijos pakito pašalinus naviką ir koks sPD-L1 pokytis buvo mažos ir didelės koncentracijos grupėse. sPD-L1 koncentracijos pokytis visų prostatos vėžio pacientų kraujo plazmoje nebuvo dėsningas, 56 % pacientų sPD-L1 koncentracija po operacijos sumažėjo, o 44 % pacientų ši koncentracija padidėjo. Kita vertus visos sPD-L1 koncentracijos nustatytos prieš operaciją, pasižymėjo daug didesniu išsibarstymu, kuris pašalinus naviką sumažėjo. sPD-L1 koncentracijų standartinis nuokrypis priešoperacinėje grupėje buvo 17,7 pg/mL, pooperacinėje grupėje 2,6 pg/mL.

Pacientų grupėje, kurie buvo priskirti didelės koncentracijos grupei (sPD-L1 >7,66 pg/mL) pooperacinės koncentracijos sumažėjo (3.7A pav). Didelės sPD-L1 koncentracijos pacientų grupėje priešoperacinių koncentracijų mediana buvo 22,6 pg/mL, kuri po operacijos sumažėjo iki 1,2 pg/mL. Šis pokytis buvo statistiškai reikšmingas (*Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,001$). Priešingas efektas pastebėtas <7,66 pg/mL sPD-L1 pacientų grupėje. Šioje grupėje priešoperacinės koncentracijos po operacijos neženkliai padidėjo nuo 0,82 pg/mL medianos iki 2,11 pg/mL medianos (*Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,05$).

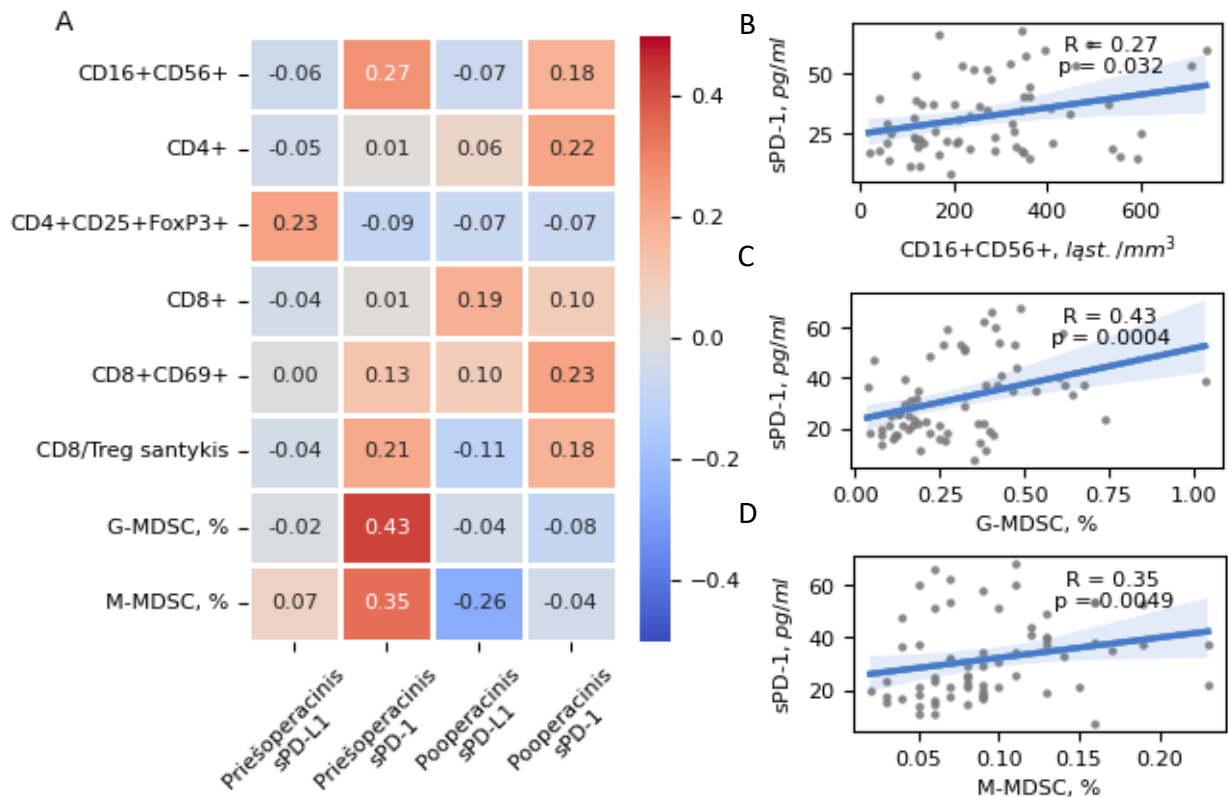


3.7 pav. Prostatos naviko pašalinimo įtaka kraujo plazmos sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijoms. (A) sPD-L1 koncentracijų didėjimas arba sumažėjimas po naviko pašalinimo. (B) sPD-1 koncentracijų pokytis prieš ir po operacijos. Mėlynos linijos žymi mažėjantį, o raudonos linijos didėjantį pokytį.

Bendras sPD-1 koncentracijų pokytis prieš ir po operacijos taip pat nebuvo dėsningas. Nors priešoperacinių sPD-1 koncentracijų mediana iš 29,4 pg/ml pakilo iki 33,9 pg/ml po operacijos (statistiškai reikšmingas rezultatas *Mann-Whitney-U*, kriterijus, $p < 0,05$), tik 55 % pacientų sPD-1 koncentracija kraujo plazmoje pakilo, likusiems 45 % sPD-1 koncentracija sumažėjo. Priešingai nei sPD-L1 atveju nebuvo pastebėta ryškaus sklaidos pokyčio tarp priešoperacinės ir pooperacinės grupės (priešoperacinis sPD-1 standartinis nuokrypis – 17,1 pg/mL, o pooperacinis – 22,3 pg/mL) (3.7B pav).

3.5 sPD-1 ir sPD-L1 sąsajos su imuninėmis ląstelėmis

Prostatos vėžio pacientų imuninių ląstelių iš periferinio kraujo fenotipavimas pasitelkiant tėkmės citometriją ir Spirmano koreliacijos analizė atskleidė keletą silpnų sąsajų su imuninių ląstelių populiacijomis. Ryškesnės koreliacijos nustatytos tarp imuninių ląstelių ir sPD-1 koncentracijų. Statistiškai reikšminga silpna teigiama koreliacija nustatyta tarp NK ląstelių ir priešoperacinio sPD-1 kiekio ($R = 0,27$, $p < 0,05$), vidutinio stiprumo koreliacija tarp M-MDSC procentinės dalies ir priešoperacinių sPD-1 koncentracijų ($R = 0,43$, $p < 0,001$) ir silpna koreliacija tarp G-MDSC procentinės dalies ir priešoperacinių sPD-1 koncentracijų ($R = 0,35$, $p < 0,001$). Pooperacinė M-MDSC ir sPD-1 koncentracijų koreliacija išnyko, tačiau silpnai teigiamą priešoperacinę koreliaciją tarp G-MDSC ir sPD-1 pakeitė silpnai neigiama koreliacija ($R = -0,26$, $p < 0,05$) (3.8A-C pav).

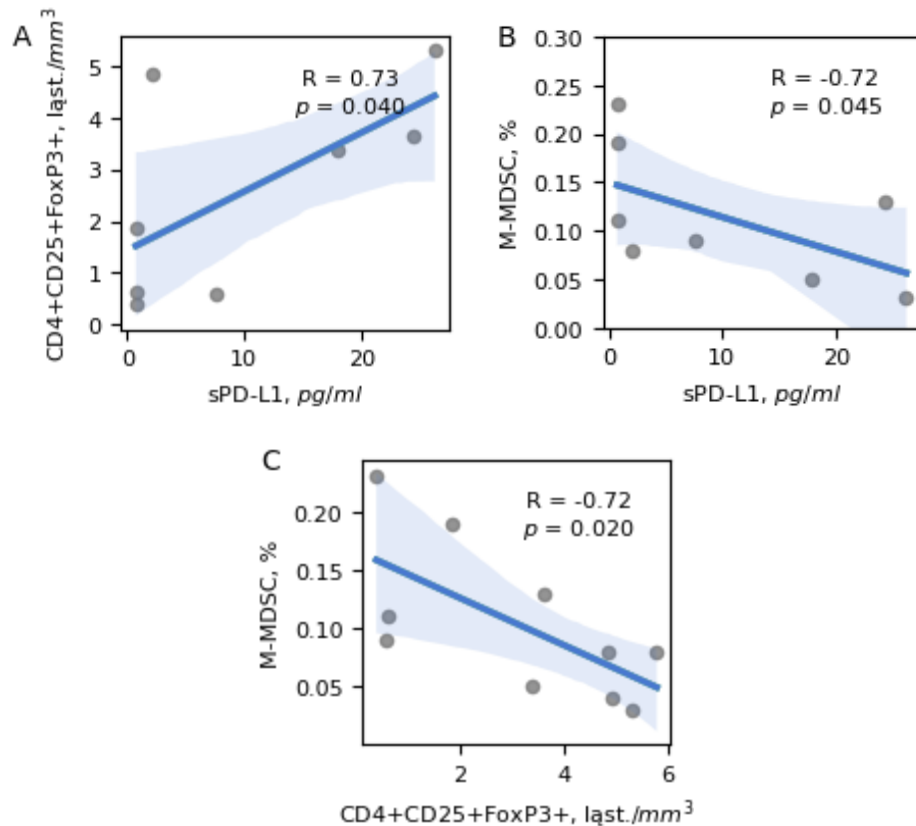


3.8 pav. Prostatos vėžio pacientų sPD-1 ir sPD-L1 kraujo plazmos koncentracijų koreliacijos su imuniniais parametrais. (A) sPD-1 ir sPD-L1 plazmos koncentracijų prieš ir po operacijos Spirmano koreliacijos su imuniniais parametrais. (B) Priešoperacinių sPD-1 kraujo plazmos koncentracijų ir NK ląstelių (CD16+CD56+) koreliacija. (C) Priešoperacinių G-MDSC ląstelių ir sPD-1 koreliacija. (D) Priešoperacinių M-MDSC ląstelių koreliacija su sPD-1 kiekiais.

Priešoperacinės ir pooperacinių sPD-L1 koncentracijos silpniau koreliavo su imunologinių ląstelių kiekiais, nei sPD-1 baltymai. Pastebėta silpna neigiama koreliacija tarp G-MDSC procentinės dalies ir pooperacinio sPD-L1 ($R = -0,26$, $p < 0,05$). Nustatyta ir daugiau silpnų koreliacijų tarp sPD-L1

ir imuninių ląstelių. Pavyzdžiui, silpnas teigiamas ryšys tarp priešoperacinių imunosupresinių CD4+CD25+FoxP3+ Treg ląstelių ir sPD-L1 ($R = 0,23$, $p = 0,06$). Tačiau ši koreliacija nebuvo statistiškai reikšminga (3.8A pav.)

Daug stipresnės sPD-L1 koncentracijų koreliacijos su imunosupresinėmis ląstelėmis nustatytos pacientams, kurie po operacijos patyrė biocheminį atkrytį. Biocheminio atkryčio grupėje priešoperacinis sPD-L1 stipriai koreliavo su CD4+CD25+FoxP3+ T ląstelėmis ($R = 0,73$, $p < 0,05$) (3.9A pav). Taip pat pastebėta stipri neigiama koreliacija tarp sPD-L1 ir M-MDSC procentinio kiekio ($R = -0,72$, $p < 0,05$) (3.9B pav.), o CD4+CD25+FoxP3+ T ir M-MDSC ląstelių procentinis kiekis tarpusavyje koreliavo neigiamai (3.9C pav.). Pacientų grupėje, kurie nepatyrė biocheminio atkryčio, šios koreliacijos buvo statistiškai nereikšmingos ir daug mažesnės (3 priedas, 1 pav.).



3.9 pav. Priešoperacinių imunosupresinių ląstelių ir priešoperacinių sPD-L1 koncentracijų koreliacijos periferiniame prostatos vėžio pacientų kraujyje, kurie po operacijos patyrė biocheminį atkrytį. (A) sPD-L1 koreliacija su CD4+CD25+FoxP3+ ląstelėmis. (B) sPD-L1 koreliacija su M-MDSC procentine dalimi. (C) Procentinio kiekio M-MDSC ląstelių ir CD4+CD25+FoxP3+ T ląstelių tarpusavyje ryšys biocheminį atkrytį patyrusių prostatos vėžio pacientų grupėje.

Prostatos vėžio pacientų grupėse, kuriems vėliau pasireiškė arba visiškai nepasireiškė biocheminis atkrytis, priešoperacinių koreliacijų tarp sPD-1 koncentracijų ir imuninių ląstelių kiekių nebuvo pastebėta.

Toliau buvo įvertinta ar imuninių ląstelių kiekiai ir imuniniai parametrai nesiskyrė tarp pacientų, kurių kraujyje nustatyti skirtingi sPD-1 ir sPD-1 koncentracijų lygiai. Tarp <7,66 pg/mL ir >7,66 pg/mL sPD-L1 koncentracijų grupių, kuriuose pastebėtas išgyvenamumo be ligos progresijos tikimybės skirtumas prieš operaciją ir po operacijos, nerasta jokių imuninių ląstelių kiekių ir parametų skirtumo (3 priedas, 1 lent.).

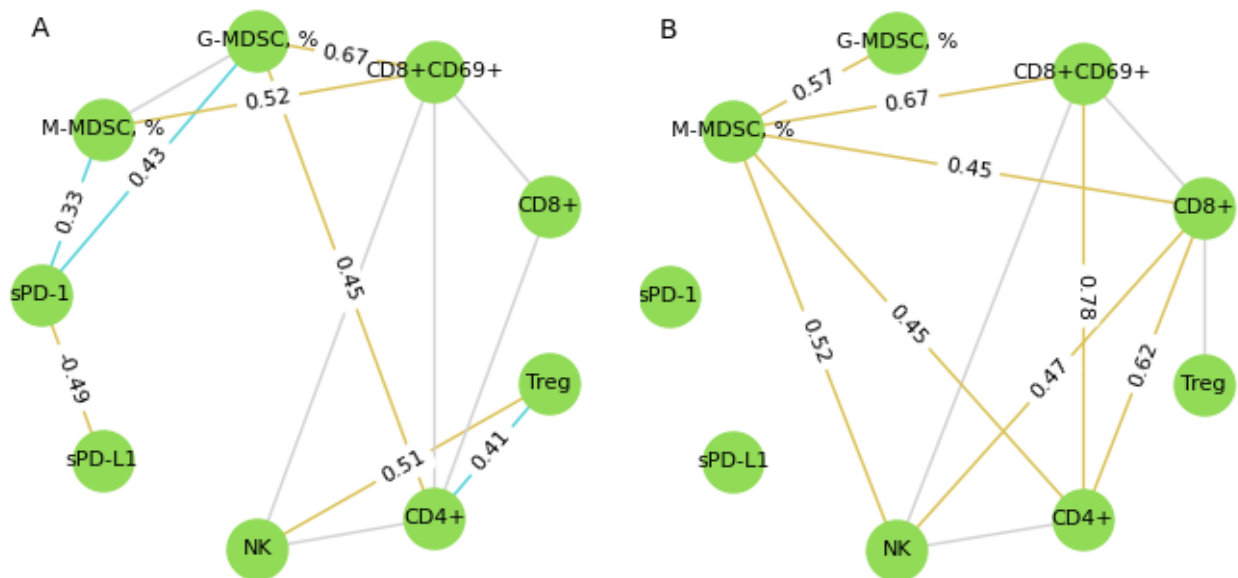
3.2 lentelė. Priešoperacinių prostatos vėžio pacientų imuninių parametų palyginimas tarp didelės ir mažos kraujo plazmos sPD-1 koncentracijų pacientų grupių. Q – kvartilis. * – *Mann-Whitney U* kriterijus.

Parametras	sPD-1 <29,44 pg/mL	sPD-1 >29,44 pg/mL	P reikšmė*
	Mediana (Q1–Q3)	Mediana (Q1–Q3)	
CD16+CD56+, ląst./mm ³	168 (84–330)	269 (162–368)	0,03
CD4+, ląst./mm ³	520 (379–976)	580 (486–780)	0,99
CD4+CD25+FoxP3+, ląst./mm ³	2,9 (1,5–4,6)	1,8 (1,1–3,2)	0,10
CD8+, ląst./mm ³	588 (327–927)	526 (400–786)	0,84
CD8+CD69+, ląst./mm ³	190 (83–397)	218 (159–301)	0,56
CD8+CD69+/Treg, santykis	8 (5–15)	11 (8–22)	0,05
G-MDSC, %	0,19 (0,12–0,34)	0,33 (0,22–0,47)	0,001
M-MDSC, %	0,08 (0,05–0,09)	0,11 (0,07–0,13)	0,01

Imuninių parametų palyginimui pacientai padalinti į 2 grupes pagal sPD-1 koncentracijų medianą (<29,44 pg/mL ir >29,44 pg/mL). Logistinės regresijos metu gauta kartinė vertė (18,2 pg/mL) nebuvo naudota, nes šioje pacientų imtyje sPD-1 koncentracijos nėra patikimas išgyvenamumo be ligos progresavimo klasifikatorius. Prostatos vėžio pacientų grupė, kurių kraujyje buvo rastos >29,44 pg/mL priešoperacinės sPD-1 koncentracijos, pasižymėjo didesniu NK ląstelių ir M-MDSC, G-MDSC ląstelių procentu (*Mann-Whitney U* kriterijus $p < 0,05$). Tarp kitų ląstelių populiacijų ar ląstelių santykių reikšmingo skirtumo nepastebėta (3.2 lentelė). Atlikus identišką analizę su pooperacinėmis sPD-1 koncentracijomis ir ląstelių kiekiais, skirtumų tarp sPD-1 medianų grupių nebuvo (3 priedas, 1 ir 2 lent.).

3.6 Imuninių ląstelių tarpusavio ryšys sPD(L)-1 grupėse

sPD-L1 gali būti išskiriamas naviko bei kai kurių imuninių ląstelių, o sPD-1 įvairių imuninių ląstelių atliekančių tiek teigiamas, tiek neigiamas funkcijas naviko progresavimo atžvilgiu. Dėl to yra tikimybė, kad bendras sPD-1 ir sPD-L1 kiekis gali apibūdinti bendrą naviko ir imuninių ląstelių sąveiką bei apibūdinti ar vyrauja imunosupresinė, ar imunologiškai aktyvi aplinka.

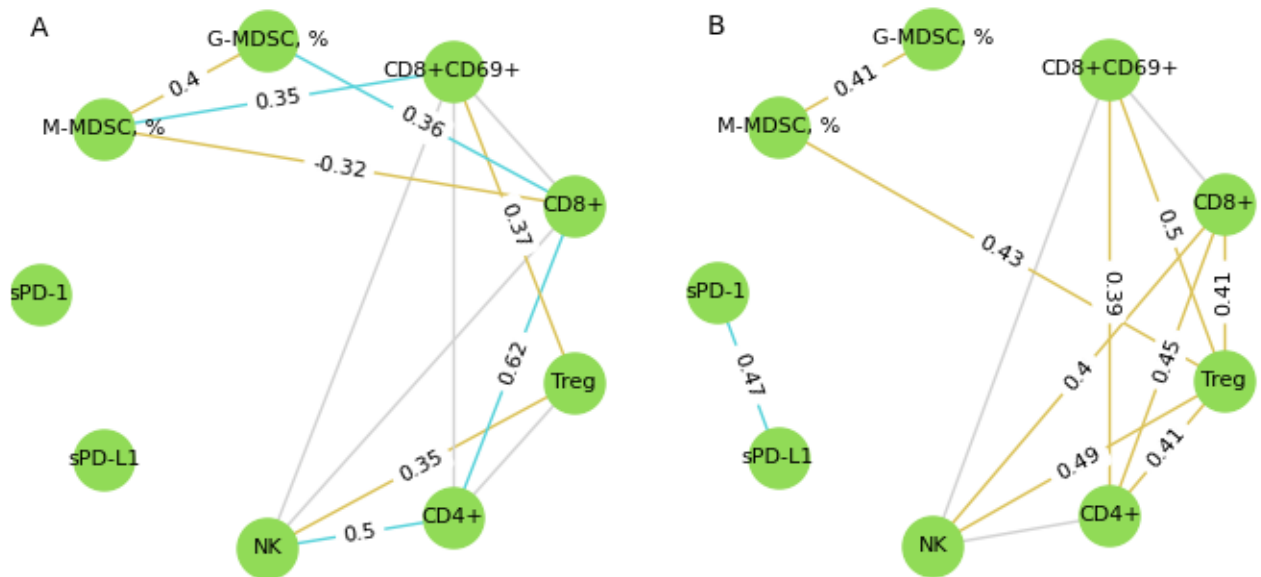


3.10 pav. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių (A) ir pooperacinių (B) imuninių ląstelių Spirmano koreliacijų palyginimas tarp $<7,66$ pg/mL ir $>7,66$ pg/mL koncentracijų sPD-L1 grupių. Grafike pavaizduotos tik koreliacijos su $p < 0,05$. Geltona linija – koreliacija yra tik $>7,66$ pg/mL sPD-L1 grupėje. Mėlyna – koreliacija yra tik $<7,66$ pg/mL sPD-L1 grupėje. Sutampančios reikšmingos koreliacijos pavaizduotos pilka linija.

Šiai hipotezei patikrinti prostatos vėžio pacientai padalinti į didelės ir mažos sPD-L1 (7,66 pg/mL režis) bei sPD-1 (29,44 pg/mL režis) baltymų koncentracijų grupes, kuriose patikrintos Spirmano koreliacijos tarp nustatytų imuninių ląstelių kiekių. Grupėse buvo lyginamos tik silpnos ir stipresnės koreliacijos. Priešoperacinėse sPD-L1 grupėse pastebėti tam tikri koreliacijų skirtumai. Tik mažesnės sPD-L1 koncentracijos grupė pasižymėjo sPD-1 koreliacijomis su MDSC ląstelių procentinėmis dalimis ir tik sPD-L1 $>7,66$ pg/mL grupėje buvo vidutinio stiprumo koreliacija tarp G-MDSC ir CD4+ limfocitų bei M-MDSC ir aktyvuotų CD8+CD69+ ląstelių. Taip pat tik didesnės koncentracijos grupėje pastebėtos vidutinio stiprumo koreliacijos tarp imunosupresinių CD4+CD25+FoxP3+ limfocitų ir NK ląstelių (3.10A pav.).

Pašalinus prostatos naviką, $<7,66$ pg/mL sPD-L1 grupėje imuninių ląstelių tarpusavio koreliacijos išliko panašios, tačiau dingo sPD-1 ir MDSC ląstelių ryšys, CD4+ ląstelės prarado teigiamą koreliaciją su CD8+ ląstelėmis ir CD4+CD25+FoxP3+ ląstelių koreliacija su CD4+ ląstelėmis pasikeitė į koreliaciją su CD8+ ląstelėmis. Ryškesnis pokytis po operacijos pastebėtas $>7,66$ pg/mL grupėje. Granulocitinių MDSC ląstelių ryšys su anksčiau pastebėtomis ląstelių populiacijomis dingo, tačiau šias sąsajas pakeitė naujos koreliacijos su M-MDSC ląstelėmis. Didesnės sPD-L1 koncentracijos grupėje M-MDSC pasižymėjo vidutinio stiprumo koreliacija su priešvėžiniu aktyvumu pasižyminčiomis NK ląstelėmis, CD4+ ir CD8+ T ląstelėmis. Šioje grupėje NK ląstelės taip pat koreliavo su CD8+ T

ląstelėmis. Visos šios koreliacijos nebuvo rastos po operacinėje prostatos vėžio grupėje, kurių kraujyje sPD-L1 koncentracija buvo mažesnė (3.10B pav.).



3.11 pav. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių (A) ir pooperacinių (B) imuninių ląstelių tarpusavio Spirmano koreliacijų palyginimas tarp <29,44 pg/mL ir >29,44 pg/mL koncentracijų sPD-1 grupių. Grafike pavaizduotos koreliacijos su $p < 0,05$. Geltona linija – koreliacija yra tik >29,44 pg/mL sPD-1 grupėje. Mėlyna – koreliacija yra tik <29,44 pg/mL sPD-1 grupėje. Sutampančios reikšmingos koreliacijos pavaizduotos pilka linija.

Tarp prostatos vėžio pacientų grupių padalintų pagal sPD-1 koncentracijų medianą taip pat pastebėti tam tikri skirtumai. CD8+ T limfocitai turėjo sąsajų su G-MDSC ir monocitais tik <29,44 pg/mL sPD-1 grupėje. Taip pat tik šioje grupėje CD8+ T ląstelės koreliavo su CD4+ ląstelėmis, o CD4+ su NK ląstelėmis (3.11A pav.).

Pooperaciniuose pacientų kraujo ląstelių kiekiuose, paskirstytuose pagal sPD-1 koncentracijų medianą, pastebimi ryškesni pokyčiai lyginant su pokyčiais pastebėtais sPD-L1 grupėse. Daugiau nei 29,44 pg/mL sPD-1 grupėje po operacijos atsiranda ryšys tarp M-MDSC procentinės dalies ir CD4+CD25+FoxP3+ limfocitų. Taip pat padaugėja reikšmingų koreliacijų tarp NK, CD4+, CD4+CD25+FoxP3+, CD8+ ląstelių populiacijų. Tuo tarpu mažesnės koncentracijos grupėje po operacijos išnyksta didelė dalis koreliacijų bei atsiranda naujas ryšys tarp sPD-1 ir sPD-L1 kraujo plazmos koncentracijų. Tačiau tiek priešoperacinėse koreliacijose, tiek pooperacinėse koreliacijose M-MDSC ir G-MDSC koreliavo tarpusavyje tik didesnės sPD-1 koncentracijos pacientų grupėje (3.11B pav.).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos prostatos vėžyje

Šiame darbe nustatytos prostatos vėžio pacientų kraujo plazmos sPD-1 ir sPD-L1 baltymų koncentracijos buvo padidėjusios lyginant su kontroline sveikų asmenų grupe. sPD-1 ir sPD-L1 lygiai yra padidėję ir daugelyje kitų vėžio tipų lyginant sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijas kraujyje tarp vėžio pacientų ir sveikų individų. Pavyzdžiui, krūties, plaučių vėžio, limfomų ir skrandžio vėžio atveju taip pat buvo nustatytos padidėjusios sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos kraujyje lyginant su kontroline grupe (Ancin et al., 2022; Feng et al., 2023; Kawakami et al., 2023; Okla et al., 2020). Tačiau, palyginti su kitais vėžio tipais, prostatos vėžiu atveju nustatyti sPD-1 ir sPD-L1 lygiai buvo mažesni nei daugelio kitų vėžio atvejų. Pavyzdžiui, skrandžio vėžio ir plaučių vėžio pacientų sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos buvo keletą kartų mažesnės (Ancin et al., 2022; Kawakami et al., 2023). Skiriant skirtingus gydymo metodus aptiktos dar didesnės koncentracijos tiek prostatos vėžio atveju (Katongole et al., 2022), tiek kituose vėžio tipuose (Bian et al., 2019; Fu et al., 2021; Shao et al., 2022). Kai kurių vėžio tipų atveju santykinai didesnės sPD-L1 koncentracijos gali būti mažesnės arba didesnės, o tai gali rodyti alternatyvius imuninės sistemos vengimo mechanizmus arba mažiau imunosupresinę mikroaplinką.

Prostatos vėžys paprastai yra imunologiškai mažai aktyvus, o tai yra susiję su mažu naviko mutacijų dažniu ir nedidele T ląstelių infiltracija naviko mikroaplinkoje (Kgatle et al., 2021). Dėl šios priežasties prostatos vėžio atveju gali būti aptinkamos mažesnės sPD-1 ir sPD-L1 molekulių koncentracijos, kadangi be imunines funkcijas atliekančių ląstelių, šių molekulių imunomoduliacinė funkcija negalėtų pasireikšti. Katongole et al atliktame tyrime, kuriame dalyvavo prostatos vėžiu sergantys Afrikos vyrai, nustatytos didesnės prostatos vėžio sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos, tačiau į tyrimą buvo įtraukti metastazavusiu kastracijai atspariu prostatos vėžiu sergantys pacientai, 45 % pacientų nustatytas Gleason kriterijus 8 ir daugiau. Taip pat agresyvesnės vėžio formos siejamos su didesne membranine PD-L1 raiška (Haffner et al., 2018). Be to, pastebėta, kad juodaodžiai vyrai yra dažniau linkę susirgti prostatos vėžiu ir jis yra agresyvesnis (Lillard Jr et al., 2022). Abu šie faktoriai gali būti susiję su didesnėmis sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijoms, kadangi didesnės šių molekulių koncentracijos kraujyje yra siejamos su prastesne ligos prognoze ir agresyvesniu naviku, o šiame darbe dauguma tirtų pacientų turėjo mažiau agresyvia prostatos vėžio forma su Gleason kriterijumi nuo 6 iki 7.

Nors bendroje imtyje nepastebėtas vienareikšmis sPD-L1 pokytis po naviko pašalinimo, dėsningesnis sPD-L1 pokytis buvo nustatytas priešoperaciniuose aukštos ir žemos sPD-L1 koncentracijų grupėse, kurios taip pat išsiskyrė pagal išgyvenamumo be ligos progresijos tikimybę. Didesnės

koncentracijos grupėje po operacijos sPD-L1 koncentracijos sumažėjo iki artimesnės visų pacientų grupės sPD-L1 medianos. Kita vertus, mažos koncentracijos sPD-L1 grupėje priešoperacinės koncentracijos neženkliai padidėjo. Toks koncentracijų pokytis tarp grupių galėjo atsirasti dėl skirtingų dominuojančių sPD-L1 šaltinių. Aukštos koncentracijos grupėje priešoperacinės koncentracijos galėjo būti padidėjusios dėl navikinių ląstelių išskiriamų sPD-L1. Todėl pašalinus naviką, buvo pašalintas ir sPD-L1 šaltinis. Tačiau maži sPD-L1 kiekiais kraujyje gali būti siejami su imuninių ląstelių vykdoma sPD-L1 sekrecija.

Skirtumai, esantys tarp skirtingų navikų sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų, gali rodyti kiekvienam navikui unikalius imunologinius profilius, kurie gali skatinti arba slopinti naviko progresavimą ir atsaką į tam tikrą terapiją. Kaip ir prie membraninių PD-1/PD-L1 ašies komponentų, prie stebimų sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų gali prisidėti tie patys veiksniai, kadangi tirpių formų susidarymas yra glaudžiai susijęs su jų membraninėmis formomis. Tai gali apimti genetinius pakitimus, epigenetines modifikacijas ir uždegiminių citokinų buvimą naviko mikroaplinkoje (Cha et al., 2019). Pavyzdžiui, onkogeniniai signalizacijos keliai gali moduluoti membraninių PD-L1 ekspresiją transkripcijos ir post-transkripciniuose procesuose, dar labiau sustiprindami imuninės sistemos slopinimą ir imuninės sistemos toleranciją navikui (Cha et al., 2019). Kraujyje laisvai cirkuliuojančių sPD-1 ir sPD-L1 įtaka pastebėta ir gerai apibūdinta anti-PD-1/PD-L1 terapijos efektyvumui įvairiuose vėžio tipuose, tačiau imunoblokatorių terapija nepasižymi dideliu efektyvumu prostatos vėžio atveju (Khan et al., 2020), išskyrus atvejus, kada prostatos navikas pasižymi dideliu mutacijų kiekiu (Kgatle et al., 2021; Khan et al., 2020). Pastebėta, kad ir kitų vėžio tipo atveju, DNR nesutapimų taisymo sistemos (angl. *mismatch repair*, MMR) ir mikrosatelitų nestabilumas yra susiję su atsaku į anti-PD-1/PD-L1 terapiją. Dėl netinkamo MMR sistemos veikimo atsiranda didelis mutacijų kiekis ir padidėja su mutacijomis susijusių neoantigenų kiekis, kuriuos atpažįsta imuninės ląstelės (Mucileanu et al., 2021). sPD-1 taip pat siejamas su suaktyvėjusiais uždegiminiais procesais (Zhou et al., 2019) bei bendra imuninės sistemos aktyvacija (Khan et al., 2020). Kraujyje esančių sPD-1 koncentracijos gali būti susijusios su naviko mutacijų kiekiu, tačiau reikalingi tolimesni sPD-1, sPD-L1 ir naviko genetinio nestabilumo ryšio tyrimai, kurie tai galėtų patvirtinti arba paneigti.

Tarp priešoperacinių, pooperacinių ir kontrolinės grupės sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų kraujo plazmoje nebuvo pastebėta jokių koreliacijų. Kitas tyrimas atliktas su trigubai neigiamu krūties vėžiu nustatė stiprią koreliaciją tarp sPD-1 ir sPD-L1 (Li et al., 2019), tačiau kasos vėžio pacientų sPD-1 ir sPD-L1 baltymų koncentracijos rodė nedidelę koreliaciją (Kruger et al., 2017). Tai gali reikšti, kad skirtingi biologiniai veiksniai, turintys įtakos jų gamybai ar išsiskyrimui, gali priklausyti nuo konkretaus

vėžio tipo ir kad šių molekulių raišką ar sekreciją reguliuojantys keliai gali veikti nepriklausomai, be abipusės kompensacijos. Tačiau ryšio nebuvimas tarp sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų gali būti vertingas kaip vėžio diagnozės, prognozės ar gydymo atsako biožymenų atžvilgiu. Jų individualūs lygiai gali suteikti papildomos informacijos apie imuninę būklę arba naviko mikroaplinką. Kadangi abi šie baltymai gali būti lengvai nustatomi iš kraujo plazmos, abiejų tirpių faktorių nustatymas gali veikti kaip 2 atskiri biožymenys, paaiškinantys ir papildantys vienas kitą. Taip pat koreliacijos tarp sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijų pasireiškimas tik tam tikrais atvejais gali reikšti, kad egzistuoja mechanizmai, kurie tiesiogiai arba netiesiogiai gali veikti šių abiejų molekulių koncentracijas. Pavyzdžiui, tyrime su metastazavusiu inkstų vėžiu sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos kraujyje koreliavo tik pacientų grupėje, kuriems buvo skirtas gydymas bevacizumabu, bet ne sunitinibu (Montemagno et al., 2020). Tai gali turėti įtakos ir terapinėms strategijoms, nukreiptoms į PD-1 ir PD-L1 imuninės kontrolės taškų molekules.

4.2 sPD-L1 ir sPD-1 kaip predikcinės molekulės

Prostatos vėžio pacientai, suskirstyti pagal aukštą (>7,66 pg/mL) ir mažą (>7,66 pg/mL) sPD-L1 koncentraciją, parodė reikšmingą išgyvenamumo skirtumą tarp šių grupių. Pacientams, kurių sPD-L1 koncentracija kraujo plazmoje yra didelė, išgyvenamumas yra ženkliai mažesnis, palyginti su tais, kurių kraujo plazmoje sPD-L1 koncentracija yra maža. Aukštas sPD-L1 lygis periferiniame kraujyje gali būti prastesnės prognozės rodiklis, padedantis identifikuoti pacientus, kuriems gresia didesnė biocheminio atkryčio rizika. Šie rezultatai sutampa su dauguma kitų tyrimų, atliktų su kitais vėžio tipais, kuriuose didesnė sPD-L1 koncentracija taip pat buvo susieta su prasta ligos prognoze. Didelės sPD-L1 koncentracijos galvos ir kaklo vėžio pacientuose siejamos su mažesniu išgyvenamumu be ligos progresavimo (Molga-Magusiak et al., 2023). Inkstų, stemplės, kasos, plaučių, kepenų vėžiuose taip pat pastebėtas mažesnis išgyvenamumas arba didesnė ligos atsinaujinimo tikimybė didelės sPD-L1 koncentracijos grupėje (Davidsson et al., 2022; Fu et al., 2021; Huang et al., 2021; Mucileanu et al., 2021).

Šiame darbe nustatytas sPD-L1 režis pasižymėjo nedideliu 56 % jautrumu, tačiau šis režis yra nustatytas ne agresyvaus prostatos vėžio kontekste, todėl tikėtina, kad pacientų klasifikavimas į prastos ir geros ligos prognozės grupes, kai imtyje yra ir agresyvių formų navikai, pasižymi didesniu jautrumu. Be to, gautas reikšmingas išgyvenamumo skirtumas tarp mažiau agresyvaus prostatos vėžio pacientų, kurie stratifikuoti pagal didelę ir mažą sPD-L1 koncentraciją, išryškina klinikinę sPD-L1, kaip prognostinio biožymens, svarbą ir galimą naudą prostatos vėžio kontekste. Prostatos vėžio atveju membraninė PD-L1 raiška taip pat susieta su didesne biocheminio atkryčio tikimybe ir prastesniu

išgyvenamumu (Gevensleben et al., 2016). Todėl tikėtina, kad membraninė PD-L1 raiška ir sPD-L1 gali rodyti panašius prognostinius rezultatus ir būti alternatyvūs biožymenys.

Nustatytas ryšys tarp aukšto sPD-L1 lygio ir prastesnio išgyvenamumo be ligos progresijos gali padėti kurti ir optimizuoti gydymo strategijas, nukreiptas į PD-1/PD-L1 ašį. Pavyzdžiui, pacientams, kurių sPD-L1 koncentracija didelė, gali būti naudingos intervencijos, skirtos PD-1/PD-L1 sąveikai moduluoti, pvz., imuninės kontrolės taško inhibitoriai, monoterapija arba šių terapijų skyrimas kartu su kitais gydymo būdais. Tyrimai, siekiantys išsiaiškinti sPD-1/sPD-L1 ryšį su imunoterapijos efektyvumu, rodo, kad didesni sPD-L1 kiekiai siejami su blogesniu imunoterapiniu atsaku (Scirocchi et al., 2022). Imuninių kontrolės taškų inhibitorių monoterapija pasižymi minimaliu priešvėžiniu aktyvumu prostatos vėžiu sergantiems pacientams dėl įvairių šiam naviko tipui būdingų veiksnių, įskaitant imunologiškai neaktyvią naviko mikroaplinką su prastai diferencijuotomis ir mažai naviką infiltruojančiomis T ląstelėmis (Kgatle et al., 2021), tačiau sPD-L1 koncentracijos periferiniame kraujyje gali būti kaip potencialus stratifikacijos faktorius ir gali palengvinti sprendimus, dėl kurių būtų skiriami labiau individualizuoti gydymo metodai ir pasiekti geresni rezultatai su imunoblokatorių gydymo strategijomis. Pastebėta, kad sPD-1 lygiai gali atspindėti atspindi imuninio atsako stiprumą, kuriam būdinga T ląstelių proliferacija ir aktyvacija (Li et al., 2016). Todėl toks sPD-1 koncentracijos pokytis gali būti ryškesnis esant tam tikriems vėžio tipams, turintiems didelę mutacijų naštą arba stiprią uždegiminę aplinką. Ir atvirkščiai, vėžio tipų atveju, kai sPD-1 lygis yra mažesnis gali vyrauti mažiau aktyvi imuninė aplinka.

Atlikus *Cox* regresijos analizę, gauti rezultatai parodė, kad sPD-L1 ir sPD-1 nėra nepriklausomi biožymenys įvertinti išgyvenamumą be ligos progresavimo. PSA koncentracijos, Gleason klasės ir patologinė stadija tiek univariacinėje, tiek multivariacinėje analizėje buvo statistiškai reikšmingi ligos atsinaujinimo rizikos rodikliai. Šie rezultatai sutampa su šių rodiklių naudojimu kaip patikimi klinikiniai kriterijai. sPD-L1 koncentracijos buvo reikšmingos tik univariacinėje analizėje, bet prarado savo reikšmingumą multivariacinėje analizėje, kai buvo atsižvelgta į kitų kintamųjų įtaką. Tai rodo, kad nors sPD-L1 gali turėti tam tikrą prognozavimo galią, jo prognostinė reikšmė yra susijusi su kitais prostatos vėžio prognozei naudojamais kriterijais. Kituose vėžio tipuose sPD-L1 savarankiška prognostinė reikšmė varijuoja. Pavyzdžiui, kasos vėžio pacientams sPD-L1 koncentracijos nebuvo reikšmingas rizikos veiksnys univariacinėje ir multivariacinėje analizėje (Kruger et al., 2017). Kita vertus skrandžio vėžio pacientams sPD-L1 buvo nepriklausomas rizikos vertinimo faktorius ir multivariacinėje analizėje (Shigemori et al., 2019). Tačiau šiame darbe taikyta *Cox* regresija parodė, kad sPD-L1 kaip predikcinis biožymuo prostatos vėžio pacientų išgyvenamumui be ligos progresijos įvertinti yra susijęs su kitais klinikoje plačiai naudojamais kriterijais: Gleasono klasėmis, patologine stadija ir PSA koncentracijomis.

Todėl sPD-L1 prostatos vėžio kontekste nesuteikia papildomos informacijos apie ligos atsinaujinimo tikimybę, bet atkartoja kitų klinikinių žymenų rezultatus. Didesnės sPD-L1 koncentracijos nustatytos pacientams, kurie buvo priskirti 3 Gleason klasei, tačiau nepastebėta sPD-L1 koreliacijos su PSA koncentracijomis, PSA koncentracijų skirtumų tarp didesnės ir mažesnės sPD-L1 koncentracijos grupių, ar koreliacijos ir koncentracijos skirtumų tarp pataloginių stadijų (2 priedas, 2 ir 3 pav.). Todėl tikėtina, kad sPD-L1 yra tiesiogiai susijęs su Gleason kriterijumi. sPD-L1 ir Gleason ryšys pastebėtas ir kitame tyrime su prostatos vėžiu (Katongole et al., 2022). Jeigu sPD-L1 koncentracijos yra tiesiogiai susijusios su naviko diferenciacija, sPD-L1 koncentracijos vis tiek išlaiko savo kaip biožymens vertę. sPD-L1 galėtų būti lengviau nustatomas biožymuo nei Gleason kriterijus, kadangi sPD-L1 koncentracijos įvertinimui užtenka kraujo mėginio ir nėra reikalinga biopsija, o sPD-L1 matavimas kraujyje galėtų būti suderintas su klinikinėje praktikoje naudojamu PSA koncentracijų nustatymu.

Kita vertus, pacientai priskirti mažos arba didelės koncentracijos sPD-1 grupei nebuvo reikšmingai susieti su rizika nė vienoje analizėje. Šie rezultatai rodo, kad jo prognostinė galia ligos atsinaujinimo rizikai vertinti nėra patikima mažiau agresyvaus prostatos vėžio kontekste. Nors sPD-1 neparodė jokios prognostinės vertės, rezultatai rodo, kad šio baltymo koncentracijos vis tiek yra padidėjusios prostatos vėžio atveju (prieš ir net po operacijos) lyginant su kontrole. Taip pat nustatytas reikšmingas sPD-1 koncentracijų skirtumas tarp pT2 ir pT3 prostatos vėžio stadijų. Kitų vėžio tipų pacientams sPD-1 koncentracijos gali rodyti atsaką į imunoterapiją ir parodyta, kad sPD-1 yra imunologiškai aktyvus (Khan et al., 2020). Dėl šios priežasties sPD-1 vis dėlto gali turėti tam tikrą diagnostinę ar prognostinę paskirtį prostatos vėžio prognozėje, tačiau mažai tikėtina, kad sPD-1 gali apibūdinti išgyvenamumo be ligos progresavimo tikimybę.

4.3 sPD-L1 ir sPD-1 sąsajos su imuninių ląstelių populiacijomis

Tarp tirtų imuninių ląstelių populiacijų stiprių koreliacijų su kraujyje cirkuliuojančias sPD-1 ar sPD-L1 baltymas nebuvo pastebėta, tačiau nustatytos silpnos sPD-1 ir granulocitinių, monocitinių MDSC ląstelių koreliacijos. Ląstelių populiacijos, kurios pasižymėjo nedidelėmis koreliacijomis su sPD-1 taip pat buvo reikšmingai padidėjusios didesnės sPD-1 koncentracijos prostatos vėžio pacientų grupėje. MDSC ląstelės gali vykdyti membraninę PD-L1 raišką ir raiška gali būti padidinta, kad būtų atliekamos imunosupresinės funkcijos (Wang and Sun, 2022). Tokiu atveju imunosupresinis MDSC ląstelių efektas galėtų būti kompensuojamas sPD-1 baltymo veikla. M-MDSC ląstelių kiekiai taip pat yra padidėję prostatos vėžio atveju (Idorn et al., 2014). Sąveika tarp M-MDSC ir sPD-1 gali būti viena iš padidėjusios sPD-1 koncentracijos prostatos vėžiu sergančiuose pacientuose priežasčių. NK ląstelės taip

pat gali būti vienas iš sPD-1 baltymų šaltinių (Mariotti et al., 2023). Šiame darbe tirtų prostatos vėžio pacientų kraujyje sPD-1 silpnai koreliavo su NK ląstelėmis ir pastebėti didesni NK ląstelių kiekiai pacientų grupėje, kuri pasižymėjo ir didesniu sPD-1 kiekiu. Šis rezultatas rodo, kad prostatos vėžio atveju dalis sPD-1 cirkuliuojančio kraujuje gali būti kilęs iš NK ląstelių. Nors šio darbo metu nepavyko rasti sPD-1 įtakos išgyvenamumui be ligos progresijos, didėjančios sPD-1 koncentracijos pacientų kraujyje po imunoterapijos skyrimo siejamos su geresniu išgyvenamumu (Khan et al., 2020). NK ląstelės pasižymi priešnavikine veikla, o MDSC ląstelių imunosupresinių funkcijų trikdytas turėtų sukelti nepalankią naviko vystymuisi aplinką, todėl tikėtina, kad padidėjusios sPD-1 koncentracijos vėžio pacientų kraujyje ir jų efektas išgyvenamumui yra susiję ir su šiomis ląstelių populiacijomis.

Bendroje prostatos vėžio pacientų imtyje korelacijų tarp sPD-L1 koncentracijų kraujyje ir imuninių ląstelių populiacijų bei kiekių ląstelių skirtumų tarp aukštos ir žemos sPD-L1 koncentracijų grupių nebuvo pastebėta nei prieš operaciją, nei po operacijos. Tai sutampa su anksčiau pastebėta sPD-L1 dinamika prieš ir po operacijos, kuri rodo, kad padidėję sPD-L1 koncentracijų kiekiai prostatos vėžio pacientų kraujyje yra sukelti naviko. Kita vertus biocheminių atkrytį patyrę pacientai pasižymėjo stipria koreliacija tarp sPD-L1 koncentracijų ir Treg (CD4+CD25+FoxP3+) ląstelių bei M-MDSC ląstelių procentiniu kiekiu. Tiek Treg, tiek M-MDSC ląstelės veikia yra siejama su palankios navikui mikroaplinkos sukūrimu ir imuninio atsako sutrikdymu (Bhatia and Kumar, 2014), o padidėjusios Treg ląstelių koncentracijos susietos su kastracijai atspariu prostatos vėžiu (Seputra et al., 2021). Šiame darbe taip pat nustatytas sPD-L1 ryšys su prostatos vėžio agresyvumo rodikliu – Gleason kriterijumi. Šie rezultatai rodo, kad padidėjęs sPD-L1 kiekis gali būti glaudžiai susijęs su šių reguliacinių T ląstelių naviko aplinkoje buvimu. Tačiau ne visi biocheminių atkrytį patyrę pacientai pasižymėjo dideliu sPD-L1 ir CD4+CD25+FoxP3+ ląstelių kiekiu, todėl prostatos navikai gali turėti keletą vystymosi ir progresavimo būdų. Didelės sPD-L1 koncentracijos, kartu su reguliacinėmis T ląstelėmis pacientų kraujyje gali rodyti tam tikrą naviko patogenezės mechanizmą. M-MDSC ląstelės taip pat pasižymi koreliacija su sPD-L1 biocheminio atkryčio grupėje, tačiau priešingai nei Treg ląstelių atveju, ši koreliacija yra neigiama. Tiek sPD-L1, tiek M-MDSC gali būti siejami su imunosupresiniais reiškiniais, todėl yra tikimybė, kad navikui palanki aplinka gali būti formuojama dviem būdais: pasitelkiant veiksnius, kuriuose dalyvauja M-MDSC populiacija arba CD4+CD25+FoxP3+ T ląstelių populiacija kartu su sPD-L1 baltymais. MDSC ir Treg ląstelės pasižymi glaudžiu tarpusavio ryšiu, kuris yra reguliuojamas tirpių mediatorių ir ląstelių paviršiaus receptorių tarpusavio sąveika (Haist et al., 2021). Įdomu tai, kad biocheminio atkryčio grupėje M-MDSC procentinė dalis stipriai neigiamai koreliavo su CD4+CD25+FoxP3+ ląstelėmis. Šis rezultatas rodo, kad Treg ir MDSC ląstelės gali veikti suderintai,

palaikydami pusiausvyrą tarp atitinkamų populiacijų ir galimai skatinti ligos atsinaujinimą, sPD-L1 koncentracijos periferiniame kraujyje gali būti biožymuo, kuris rodo vykstančius imunosupresinius mechanizmus, tačiau visos koreliacijos tarp imuninių ląstelių ir sPD-L1 koncentracijų aptiktos prieš operaciją, po operacijos ženkliai sumažėjo ir tapo statistiškai nereikšmingos. Šie rezultatai atitinka anksčiau gautus rezultatus su pooperaciniu sPD-L1, kuris nebuvo patikimas kriterijus išgyvenamumui be ligos progresijos įvertinti ir, kad tik prieš operaciją nustatytos sPD-L1 koncentracijos yra patikimas prognostinis kriterijus.

4.4 Imuninių profilių skirtumai tarp sPD-(L)1 grupių

Tarp prostatos vėžio pacientų sPD-L1 grupių pastebėti tam tikri pokyčiai tarp imuninių ląstelių sąveikų skirtingose populiacijose. Priešoperaciniame aukštos sPD-L1 koncentracijos grupėje vyravo sąsajos tarp efektorinių ir imunosupresinių ląstelių bei vien imunosupresinių ląstelių tarpe. G-MDSC ląstelės turėjo sąsajų su CD4+ ląstelėmis ir, su T reguliacinių ląstelių populiacija. MDSC ląstelės yra glaudžiai susijusios su Treg ląstelių populiacija ir atlieka svarbų vaidmenį slopinant veiksmingą priešvėžinį imuninį atsaką, poliarizuojant ir pritraukiant kitas imunosupresines ląstelių populiacijas ir taip reguliuojant imunosupresinę naviko aplinką. MDSC ląstelės skatina CD4+ ląstelių indukciją į Treg ląsteles ir kitus subtipus, išskiria slopinančius imunomodulatorius, trikdo aktyvių T ląstelių veiklą (Haist et al., 2021). MDSC ląstelių reikšmė pastebima ir prostatos vėžio atveju. MDSC ląstelės (granulocitinės ir monocitinės) siejamos su PSA kiekiais, vėžio stadijomis ir prastesniu išgyvenamumu (Koinis et al., 2021) bei imunoblokatorių terapijos efektyvumu kituose vėžio tipuose (Haist et al., 2021). Todėl sPD-L1 ir MDSC ryšys gali būti svarbus apibūdinant vyraujančią imuninę aplinką, vėžio agresyvumą ir padėti taikant individualizuotą gydymą.

Anksčiau nustatytas ryšys tarp sPD-1 ir MDSC ląstelių pasireiškė tik <7,66 pg/mL sPD-L1 pacientų grupėje, kurioje pacientai turėjo didesnę išgyvenamumo tikimybę be ligos prognozės. Ankstesniuose tyrimuose pastebėta, kad MDSC ląstelės gali paveikti T ląstelių adhezijos ligandą per proteolitinį skaidymą ir taip reguliuoti jų aktyvumą (Lindau et al., 2013). Tos pačios proteazės vaidmuo apibūdinantis ir sPD-L1 susidaryme (Orme et al., 2020). Tikėtina, kad sPD-1, kaip ir sPD-L1, gali susidaryti 2 būdais: alternatyvaus splaisingo, kuris yra gerai apibūdinamas (Keir et al., 2008) ir proteolitinio skaidymo keliu. MDSC ląstelės vėžio kontekste dažniausiai apibūdinamos kaip imunosupresinė aplinką kuriančios ląstelės, tačiau MDSC vaidmuo pastebėtas ir uždegiminių procesų skatinime (Sanchez-Pino et al., 2021). Ryšys tarp sPD-1 ir MDSC ląstelių tik geros prognozės prostatos vėžio pacientų grupėje rodo, kad šios ląstelės gali dalyvauti membraninio PD-1 proteolitiniame skaidyme. Dėl kurio

imunosupresiniai signalai perteikiami per PD-1/PD-L1 ašį paranda efektyvumą ir aktyvinami priešnavikiniai procesai.

Taip pat tik didelės sPD-L1 koncentracijos pacientų grupė pasižymėjo vidutinio stiprumo koreliacija tarp CD8+CD69+ aktyvuotų T ląstelių ir M-MDSC ląstelių ir NK ląstelių koreliacija su CD4+CD25+FoxP3+ T limfocitais. Tyrimai su šiomis ląstelių populiacijomis rodo, kad iš periferinio kraujo išskirti CD4+CD25+Foxp3+ limfocitai gali slopinti NK ląstelių citotoksiškumą (Geng et al., 2019) ir galėtų būti siejami su prastesne prognoze. Po operacijos pacientų grupėse padalintose pagal priešoperacinę sPD-L1 koncentraciją, taip pat išlaikytos teigiamos koreliacijos tarp imunosupresinių (M-MDSC) ir priešnavikinę veiklą priskiriamų imuninių ląstelių (NK ląstelių, CD4+, CD8+, CD8+CD69+ T ląstelių). Visi šie rezultatai rodo, kad didelės priešoperacinės koncentracijos sPD-L1 pacientų grupėje vyrauja imunosupresinė aplinka, kuri bendrai galėtų būti siejama su sPD-L1 koncentracija kaip neigiamos prognozės indikatoriumi.

Tarp prostatos vėžio pacientų sPD-1 grupių (<29,44 pg/mL ir >29 pg/mL) ryškių ir dėsningų sąsajų tarp kraujo plazmos sPD-1 koncentracijų ir imuninių ląstelių populiacijų rasta ženkliai mažiau. Teigiamą koreliaciją tarp M-MDSC ir M-MDSC procentų prieš ir po operacijos pastebėta tik didesnės sPD-1 koncentracijos grupėje. Taip pat pastebėtas dėsningas skirtumas tarp sPD-1 pacientų grupių CD8+ limfocitų koreliacijų. >29,44 pg/mL sPD-1 grupėje CD8+ ląstelės rodo atvirkštinį ryšį su M-MDSC, o sPD-1 <29,44 pg/mL grupėje tiesioginis ryšys tarp CD8+ ir G-MDSC. MDSC yra susijusios su imunosupresinėmis funkcijomis ir pastebėta, kad šios ląstelės geba mažinti CD8+ T ląstelių kiekį ir didinti Treg kiekį, per PD-L1 ligandus (Sanchez-Pino et al., 2021). Kita vertus, CD8+ T ląstelės yra imuninių ląstelių tipas atsakingas už vėžinių ląstelių atpažinimą ir naikinimą (Bhatia and Kumar, 2014). Nustatyta neigiama koreliacija tarp M-MDSC ir CD8+ T ląstelių rodo, kad didėjant imunosupresinių M-MDSC populiacijai, CD8+ T ląstelių populiacija galėjo mažėti. Dėl to gali susilpnėti imuninis atsakas į vėžines ląsteles. Taip pat G-MDSC ląstelių populiacijos teigiamai koreliavo su CD8+ ląstelių populiacija. Jos taip pat atlieka imunosupresines funkcijas, nors ir skirtingais mechanizmais, palyginti su M-MDSC (Diaz-Montero et al., 2014). Skirtingų tipų MDSC ląstelės gali prisidėti prie CD8+ ląstelių funkcijų slopinimo. Priklausomai nuo veikiančių mechanizmų, periferiniame kraujyje gali padidėti sPD-1 koncentracijos, kurios galėtų parodyti pagrindinį imunosupresijos mechanizmą.

Priešoperacinėje ir pooperacinėje didelės sPD-1 koncentracijos grupėje pastebėtos vidutinio stiprumo koreliacijos tarp NK ląstelių, Treg ląstelių bei pooperacinėje aukštos koncentracijos grupėje atsirado daugiau koreliacijų tarp priešnavikinę veiklą vykdančių ląstelių (NK ląstelės turėjo sąsają su CD8+ populiacija, CD8+ su CD4+) bei atsirado ryšys tarp šių ląstelių ir CD4+CD25+FoxP3+. Šis

rezultatas gali reikšti, kad tarp šių ląstelių populiacijų vyksta grįžtamasis ryšys, kuris palaiko homeostazę tarp populiacijų. Kita vertus, maži NK ląstelių ir dideli Treg ląstelių populiacijų kiekiai siejama su vėžio atsiradimu ir progresavimu (Pedroza-Pacheco et al., 2013).

4.5 Apibendrinimas

Apibendrinant galima teigti, kad yra įtikinamų sąsajų tarp sPD-L1 kiekio prostatos vėžio pacientų periferiniame kraujyje ir nepalankių prostatos vėžio prognostinių rodiklių. Padidėjęs sPD-L1 kiekis turi reikšmingas sąsajas su aukštesne Gleason klase ir prastesniu išgyvenamumu be ligos progresavimo, o tai rodo, kad jis gali būti panaudotas kaip potencialus prognostinis biožymuo prostatos vėžio kontekste. Be to, padidėjęs sPD-L1 kiekis gali būti siejamas su imunosupresine naviko aplinka, kuriai būdinga padidėjusi reguliacinių T ląstelių, bet ne MDSC ląstelių populiacija. Šios ląstelės kartu su kitais veiksniais sukuria imunosupresinį tinklą, kuris slopina priešnavikinį imuninį atsaką ir skatina naviko progresavimą. Šie rezultatai leidžia teigti, kad sPD-L1 yra svarbus imunosupresinės aplinkos navikuose rodiklis. Į klinikinę praktiką įtraukus sPD-L1 vertinimą, būtų galima pagerinti pacientų stratifikaciją. Pavyzdžiui, stebint sPD-L1 kiekį būtų galima nustatyti pacientus, kuriems tam tikri gydymo metodai efektyvesni, o sPD-L1 ryšys su imunosupresiniais veiksniais, gali suteikti vertingų įžvalgų kuriant naujas imunoterapines strategijas. Tačiau reikalingi tolimesni tyrimai apibūdinantys efektyvesnes kertines vertes pacientų stratifikacijai ir išsamesni tyrimai, kurie praplėstų supratimą apie sPD-L1 baltymų ir Treg bei MDSC ląstelių ryšį.

Kita vertus sPD-1 koncentracija tiesiogiai nėra susijusi su išgyvenamumu be ligos progresijos, tačiau sPD-1 koncentracijos padidėja esant prostatos vėžiui ir aukštesnėse prostatos vėžio patologinėse stadijose, taip pat šių molekulių kiekiai yra susiję su padidėjusiu NK ir MDSC kiekiu. Vienos sPD-1 koncentracijos nėra pakankamos klinikinėms pasekmėms prognozuoti, tačiau jos galėtų būti platesnio imuninių žymenų rinkinio, skirto išsamiam pacientų profiliavimui, dalis. Pavyzdžiui, šiame darbe taip pat pastebėtas ryšys tarp išgyvenamumo be ligos progresijos ir PD-1/PD-L1 santykio. Šie rezultatai neleidžia tiksliai apibrėžti sPD-1 cirkuliuojančio prostatos vėžio pacientų kraujyje reikšmės, tačiau sPD-1 baltymai greičiausiai vaidina tam tikrą vaidmenį vėžio progresavime arba imuniniame reguliavime.

5. IŠVADOS

1. Priešoperacinės sPD-L1 ir sPD-1 baltymų koncentracijos kraujo plazmoje yra reikšmingai padidėjusios prostatos vėžiu sergantiems pacientams lyginant su kontroline grupe. Pooperacinės sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos išlieka reikšmingai padidėjusios pacientų grupėje lyginant su kontroline grupe.
- 2A. Didesnės priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos prostatos vėžiu sergančių pacientų kraujyje siejamos su mažesne išgyvenamumo tikimybe be ligos progresavimo ir didesne ligos atsinaujinimo rizika bei aukštesne klase pagal Gleason klasifikaciją.
- 2B. sPD-1 koncentracijos prostatos vėžio pacientų kraujyje neturi prognostinės reikšmės ligos progresijai įvertinti, tačiau pT3 patologine stadija pasižymi reikšmingai padidėjusiomis priešoperacinės sPD-1 koncentracijomis lyginant su pT2 stadija.
3. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinės sPD-1 koncentracijos kraujyje siejamos su cirkuliuojančiu NK ląstelių kiekiu, kaip su galimu sPD-1 šaltiniu prostatos vėžyje.
4. Biocheminį atkrytį patyrusių prostatos vėžio pacientų sPD-L1 koncentracijos kraujyje siejamos su imunines reakcijas slopinančių ląstelių CD4+CD25+FoxP3+ Treg ir/ar M-MDSC sąveika. Palankios prognozės prostatos vėžio pacientų grupėje sPD-L1 koncentracijos nėra susijusios su M-MDSC ir CD4+CD25+FoxP3+ T ląstelių populiacijomis.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Žilvinas Survila

Magistro baigiamasis darbas

**CIRKULIUOJANČIŲ PROSTATOS VĖŽIO IMUNINIŲ VEIKSNIŲ PROGNOSTINIS
VAIDMUO**

SANTRAUKA

Prostatos vėžys yra vienas iš labiausiai paplitusių piktybinių navikų visame pasaulyje. sPD-1 ir sPD-L1 molekulių reikšmė prostatos vėžio atveju yra mažai apibūdinta, tačiau šios molekulės gali suteikti naujų įžvalgų apie prostatos vėžio progresavimą ir prognozę.

Šio darbo tikslas – įvertinti cirkuliuojančių sPD-1, sPD-L1 ir imuninių parametru prognostinę reikšmę prostatos vėžiu sergantiems pacientams. Darbo uždaviniai: nustatyti sPD-1 ir sPD-L1 baltymų koncentracijų pokyčius prostatos vėžiu sergančių asmenų kraujo plazmoje prieš operaciją ir po operacijos, įvertinti sPD-L1 ir sPD-1 molekulių prognostinę reikšmę ligos atsinaujinimui ir naviko agresyvumui, nustatyti ryšį tarp sPD-1 ir imuninių parametru ir išanalizuoti sPD-L1 ir imuninių parametru ryšius tarp palankios ir nepalankios prognozės pacientų.

sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos nustatytos ELISA metodu, o pacientų imunologiniams profilams įvertinti imuninėms buvo pasitelkta tėkmės citometrija. Gautos sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijos buvo integruotos su citometrijos analizės rezultatais ir pacientų klinikiniais duomenimis.

Nustatytos sPD-L1 ir sPD-1 koncentracijos prostatos vėžiu sergančių pacientų kraujyje buvo didesnės, palyginti su sveikos kontrolinės grupės sPD-1 ir sPD-L1 koncentracijomis. Didelė sPD-L1 koncentracija kraujo plazmoje buvo susijusi su blogesniu išgyvenamumu be ligos progresavimo ir aukštesniais Gleasono įverčiais. Taip pat sPD-L1 koncentracijos pasižymėjo stipria koreliacija su Treg ir MDSC ląstelėmis biocheminio atkryčio grupėje. Be to, nors sPD-1 nebuvo susijęs su išgyvenamumu be ligos progresavimo, sPD-1 ryšys su patologine pacientų stadija ir NK ląstelių skaičiumi rodo galimas sąsajas su imunosupresiniais mechanizmais naviko mikroaplinkoje. Šie rezultatai rodo, kad šios molekulės gali būti naudingos kaip diagnostiniai biožymenys ir kad sPD-L1 baltymai prostatos vėžio pacientų kraujyje gali būti ligos agresyvumo žymuo.

Žilvinas Survila
Master's thesis

PROGNOSTIC ROLE OF CIRCULATING IMMUNE FACTORS IN PROSTATE CANCER

SUMMARY

Prostate cancer is one of the most common malignancies worldwide. sPD-1 and sPD-L1 molecules are poorly characterised in prostate cancer, but these molecules may provide new insights into disease progression and prognosis.

The main aim of this study was to evaluate the prognostic value of circulating sPD-1, sPD-L1 and immune parameters in prostate cancer patients. The goals of the study were to determine the changes in sPD-1 and sPD-L1 protein levels in plasma of prostate cancer patients before and after surgery, to evaluate the prognostic significance of sPD-L1 and sPD-L1 molecules on disease recurrence and tumour aggressiveness, to determine the relationship between sPD-1 and immune parameters, and to analyze the association between sPD-L1 and immune parameters in patients with favourable and unfavourable prognosis.

sPD-1 and sPD-L1 levels were determined by ELISA method, and flow cytometry was used to assess the patients' immunological profiles. The resulting sPD-1 and sPD-L1 concentrations were integrated with the results of the cytometry analysis and the patients' clinical data.

The levels of sPD-L1 and sPD-1 detected in the blood of prostate cancer patients were higher than those of healthy controls. High serum sPD-L1 concentrations were associated with poorer progression-free survival and higher Gleason scores. Also, sPD-L1 levels showed a strong correlation with Treg and MDSC cells in the biochemical recurrence group. Furthermore, although sPD-1 was not associated with progression-free survival, the association of sPD-1 with patients' pathological stage and NK cell count suggests a possible link with immunosuppressive mechanisms in the tumour microenvironment. These results suggest that these molecules may be useful as diagnostic biomarkers and that sPD-L1 proteins in the blood of prostate cancer patients may be a marker of disease aggressiveness.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Akinleye, A., Rasool, Z., 2019. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J. Hematol. Oncol.* 12, 92. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0779-5>
2. Ancin, B., Özercan, M.M., Yılmaz, Y.M., Uysal, S., Kumbasar, U., Sarıbaş, Z., Dikmen, E., Doğan, R., Demircin, M., 2022. The correlation of serum sPD-1 and sPD-L1 levels with clinical, pathological characteristics and lymph node metastasis in nonsmall cell lung cancer patients. *Turk. J. Med. Sci.* 52, 1050–1057. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5407>
3. Attias, M., Piccirillo, C.A., 2024. The impact of Foxp3+ regulatory T-cells on CD8+ T-cell dysfunction in tumour microenvironments and responses to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/bph.16313>
4. Bai, R., Cui, J., 2022. Burgeoning Exploration of the Role of Natural Killer Cells in Anti-PD-1/PD-L1 Therapy. *Front. Immunol.* 13.
5. Bailly, C., Thuru, X., Quesnel, B., 2021. Soluble Programmed Death Ligand-1 (sPD-L1): A Pool of Circulating Proteins Implicated in Health and Diseases. *Cancers* 13, 3034. <https://doi.org/10.3390/cancers13123034>
6. Bhatia, A., Kumar, Y., 2014. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 41–62. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.865519>
7. Bian, B., Fanale, D., Dusetti, N., Roque, J., Pastor, S., Chretien, A.-S., Incorvaia, L., Russo, A., Olive, D., Iovanna, J., 2019. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 8, e1561120. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1561120>
8. Bruni, E., Cimino, M.M., Donadon, M., Carriero, R., Terzoli, S., Piazza, R., Ravens, S., Prinz, I., Cazzetta, V., Marzano, P., Kunderfranco, P., Peano, C., Soldani, C., Franceschini, B., Colombo, F.S., Garlanda, C., Mantovani, A., Torzilli, G., Mikulak, J., Mavilio, D., 2022. Intrahepatic CD69+Vδ1 T cells re-circulate in the blood of patients with metastatic colorectal cancer and limit tumor progression. *J. Immunother. Cancer* 10, e004579. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004579>
9. Cha, J.-H., Chan, L.-C., Li, C.-W., Hsu, J.L., Hung, M.-C., 2019. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol. Cell* 76, 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>
10. Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
11. Chen, X., Li, Y., Xia, H., Chen, Y.H., 2023. Monocytes in Tumorigenesis and Tumor Immunotherapy. *Cells* 12, 1673. <https://doi.org/10.3390/cells12131673>
12. Davidsson, S., Huotilainen, S., Carlsson, J., Sundqvist, P., 2022. Soluble Levels of CD163, PD-L1, and IL-10 in Renal Cell Carcinoma Patients. *Diagn. Basel Switz.* 12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020336>
13. Derigs, M., Heers, H., Lingelbach, S., Hofmann, R., Hänze, J., 2022. Soluble PD-L1 in blood correlates positively with neutrophil and negatively with lymphocyte mRNA markers and implies adverse sepsis outcome. *Immunol. Res.* 70, 698–707. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09302-y>
14. Dezutter-Dambuyant, C., Durand, I., Alberti, L., Bendriss-Vermare, N., Valladeau-Guilemond, J., Duc, A., Magron, A., Morel, A.-P., Sisirak, V., Rodriguez, C., Cox, D., Olive, D., Caux, C., 2015. A novel regulation of PD-1 ligands on mesenchymal stromal cells through MMP-mediated proteolytic cleavage. *Oncoimmunology* 5, e1091146. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1091146>
15. Diaz-Montero, C.M., Finke, J., Montero, A.J., 2014. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer: Therapeutic, Predictive, and Prognostic Implications. *Semin. Oncol.* 41, 174–184. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.02.003>

16. Doroshov, D.B., Bhalla, S., Beasley, M.B., Sholl, L.M., Kerr, K.M., Gnjatic, S., Wistuba, I.I., Rimm, D.L., Tsao, M.S., Hirsch, F.R., 2021. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18, 345–362. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00473-5>
17. Escors, D., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., García-Granda, M.J., Vera, R., Kochan, G., 2018. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct. Target. Ther.* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0022-9>
18. Feng, X., Luo, X., Yang, Y., Fan, Y., Ye, Q., 2023. Expression of PD-1/PD-L1 in peripheral blood and tumor tissues of patients with classical Hodgkin’s lymphoma. *Medicine (Baltimore)* 102, e35757. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000035757>
19. Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., Sharpe, A.H., 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>
20. Frigola, X., Inman, B.A., Krco, C.J., Liu, X., Harrington, S.M., Bulur, P.A., Dietz, A.B., Dong, H., Kwon, E.D., 2012. Soluble B7-H1: Differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol. Lett.* 142, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.11.001>
21. Fu, R., Jing, C.-Q., Li, X.-R., Tan, Z.-F., Li, H.-J., 2021. Prognostic Significance of Serum PD-L1 Level in Patients with Locally Advanced or Metastatic Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Combination Cytotoxic Chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* 13, 4935–4946. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S312690>
22. Galli, F., Aguilera, J.V., Palermo, B., Markovic, S.N., Nisticò, P., Signore, A., 2020. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 39, 89. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01586-y>
23. Geng, X., Li, M., Cui, B., Lu, C., Liu, X., Zhang, P., Liu, B., Ma, C., Shen, Y., Lu, Z., 2019. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells suppress NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity in peripheral blood. *Medicine (Baltimore)* 98, e15722. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015722>
24. Genova, C., Tasso, R., Rosa, A., Rossi, G., Reverberi, D., Fontana, V., Marconi, S., Croce, M., Dal Bello, M.G., Dellepiane, C., Tagliamento, M., Ciferri, M.C., Zullo, L., Fedeli, A., Alama, A., Cortese, K., Gentili, C., Cella, E., Anselmi, G., Mora, M., Barletta, G., Rijavec, E., Grossi, F., Pronzato, P., Coco, S., 2023. Prognostic Role of Soluble and Extracellular Vesicle-Associated PD-L1, B7-H3 and B7-H4 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cells* 12, 832. <https://doi.org/10.3390/cells12060832>
25. Gevensleben, H., Dietrich, D., Golletz, C., Steiner, S., Jung, M., Thiesler, T., Majores, M., Stein, J., Uhl, B., Müller, S., Ellinger, J., Stephan, C., Jung, K., Brossart, P., Kristiansen, G., 2016. The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 1969–1977. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2042>
26. Gonzalez, H., Hagerling, C., Werb, Z., 2018. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 32, 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
27. Haffner, M.C., Guner, G., Taheri, D., Netto, G.J., Palsgrove, D.N., Zheng, Q., Guedes, L.B., Kim, K., Tsai, H., Esopi, D.M., Lotan, T.L., Sharma, R., Meeker, A.K., Chinnaiyan, A.M., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., Luo, J., Mehra, R., Antonarakis, E.S., Drake, C.G., De Marzo, A.M., 2018. Comprehensive Evaluation of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Primary and Metastatic Prostate Cancer. *Am. J. Pathol.* 188, 1478–1485. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.02.014>
28. Haist, M., Stege, H., Grabbe, S., Bros, M., 2021. The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancers* 13, 210. <https://doi.org/10.3390/cancers13020210>
29. Han, B., Dong, L., Zhou, J., Yang, Y., Guo, J., Xuan, Q., Gao, K., Xu, Z., Lei, W., Wang, J., Zhang, Q., 2021. The clinical implication of soluble PD-L1 (sPD-L1) in patients with breast

- cancer and its biological function in regulating the function of T lymphocyte. *Cancer Immunol. Immunother.* 70, 2893–2909. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02898-4>
30. Han, S., Zhang, Y., Yuan, J., Wu, Y., Zhou, Yun, Zhou, Yan, Li, X., Zhou, S., 2024. sPD-L1 and sPD-L2 in plasma of patients with lung cancer and their clinical significance. *Cytokine* 176, 156532. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156532>
 31. Han, Y., Liu, D., Li, L., 2020. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 10, 727–742.
 32. Hassounah, N.B., Malladi, V.S., Huang, Y., Freeman, S.S., Beauchamp, E.M., Koyama, S., Souders, N., Martin, S., Dranoff, G., Wong, K.-K., Pedomallu, C.S., Hammerman, P.S., Akbay, E.A., 2019. Identification and characterization of an alternative cancer-derived PD-L1 splice variant. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 68, 407–420. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2284-z>
 33. Hiam-Galvez, K.J., Allen, B.M., Spitzer, M.H., 2021. Systemic immunity in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 21, 345–359. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>
 34. Huang, P., Hu, W., Zhu, Y., Wu, Y., Lin, H., 2021. The Prognostic Value of Circulating Soluble Programmed Death Ligand-1 in Cancers: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* 10, 626932. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626932>
 35. Hudson, K., Cross, N., Jordan-Mahy, N., Leyland, R., 2020. The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment. *Front. Immunol.* 11.
 36. Idorn, M., Køllgaard, T., Kongsted, P., Sengeløv, L., Thor Stratén, P., 2014. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 1177–1187. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1591-2>
 37. Incorvaia, L., Rinaldi, G., Badalamenti, G., Cucinella, A., Brando, C., Madonia, G., Fiorino, A., Pipitone, A., Perez, A., Li Pomi, F., Galvano, A., Gristina, V., Barraco, N., Bono, M., Bazan Russo, T.D., Toia, F., Cordova, A., Fanale, D., Russo, A., Bazan, V., 2023. Prognostic role of soluble PD-1 and BTN2A1 in overweight melanoma patients treated with nivolumab or pembrolizumab: finding the missing links in the symbiotic immune-metabolic interplay. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 15, 17588359231151845. <https://doi.org/10.1177/17588359231151845>
 38. Katongole, P., Sande, O.J., Reynolds, S.J., Joloba, M., Kajumbula, H., Kalungi, S., Ssebambulidde, K., Nakimuli, C., Atuheirwe, M., Orem, J., Niyonzima, N., 2022. Soluble Programmed Death-Ligand 1 (sPD-L1) is Elevated in Aggressive Prostate Cancer Disease Among African Men. *Oncol. Ther.* 10, 185–193. <https://doi.org/10.1007/s40487-022-00184-6>
 39. Kawakami, H., Sunakawa, Y., Inoue, E., Matoba, R., Noda, K., Sato, T., Suminaka, C., Yamaki, M., Sakamoto, Y., Kawabata, R., Ishiguro, A., Akamaru, Y., Kito, Y., Yabusaki, H., Matsuyama, J., Takahashi, M., Makiyama, A., Hayashi, H., Chamoto, K., Honjo, T., Nakagawa, K., Ichikawa, W., Fujii, M., 2023. Soluble programmed cell death ligand 1 predicts prognosis for gastric cancer patients treated with nivolumab: Blood-based biomarker analysis for the DELIVER trial. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 184, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.02.003>
 40. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
 41. Kgatle, M.M., Boshomane, T.M.G., Lawal, I.O., Mokoala, K.M.G., Mokgoro, N.P., Lourens, N., Kairemo, K., Zeevaart, J.R., Vorster, M., Sathekge, M.M., 2021. Immune Checkpoints, Inhibitors and Radionuclides in Prostate Cancer: Promising Combinatorial Therapy Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4109. <https://doi.org/10.3390/ijms22084109>
 42. Khan, M., Zhao, Z., Arooj, S., Fu, Y., Liao, G., 2020. Soluble PD-1: Predictive, Prognostic, and Therapeutic Value for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 11, 587460. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587460>

43. Kim, M.J., Ha, S.-J., 2021. Differential Role of PD-1 Expressed by Various Immune and Tumor Cells in the Tumor Immune Microenvironment: Expression, Function, Therapeutic Efficacy, and Resistance to Cancer Immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.767466>
44. Koinis, F., Xagara, A., Chantzara, E., Leontopoulou, V., Aidarinis, C., Kotsakis, A., 2021. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Prostate Cancer: Present Knowledge and Future Perspectives. *Cells* 11, 20. <https://doi.org/10.3390/cells11010020>
45. Kruger, S., Legenstein, M.-L., Rösgen, V., Haas, M., Modest, D.P., Westphalen, C.B., Ormanns, S., Kirchner, T., Heinemann, V., Holdenrieder, S., Boeck, S., 2017. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology* 6, e1310358. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1310358>
46. Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F.B.J., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 36, 2472–2482. <https://doi.org/10.1002/eji.200635978>
47. Lan, B., Zhang, J., Lu, D., Li, W., 2016. Generation of cancer-specific CD8+ CD69+ cells inhibits colon cancer growth. *Immunobiology* 221, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.08.010>
48. Li, Y., Cui, X., Yang, Y.-J., Chen, Q.-Q., Zhong, L., Zhang, T., Cai, R.-L., Miao, J.-Y., Yu, S.-C., Zhang, F., 2019. Serum sPD-1 and sPD-L1 as Biomarkers for Evaluating the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Clin. Breast Cancer* 19, 326–332.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.03.008>
49. LI, Y., XIAO, Y., SU, M., ZHANG, R., DING, J., HAO, X., MA, Y., 2016. Role of soluble programmed death-1 (sPD-1) and sPD-ligand 1 in patients with cystic echinococcosis. *Exp. Ther. Med.* 11, 251–256. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2876>
50. Liang, Z., Chen, W., Guo, Y., Ren, Y., Tian, Y., Cai, W., Bao, Y., Liu, Q., Ding, P., Li, Y., 2023. Soluble monomeric human programmed cell death-ligand 1 inhibits the functions of activated T cells. *Front. Immunol.* 14.
51. Liang, Z., Tian, Y., Cai, W., Weng, Z., Li, Yanyan, Zhang, H., Bao, Y., Li, Yi, 2017. High-affinity human PD-L1 variants attenuate the suppression of T cell activation. *Oncotarget* 8, 88360–88375. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21729>
52. Lillard Jr, J.W., Moses, K.A., Mahal, B.A., George, D.J., 2022. Racial disparities in Black men with prostate cancer: A literature review. *Cancer* 128, 3787–3795. <https://doi.org/10.1002/cncr.34433>
53. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., Adema, G.J., 2013. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138, 105. <https://doi.org/10.1111/imm.12036>
54. Liu, Z., Yu, X., Xu, L., Li, Y., Zeng, C., 2022. Current insight into the regulation of PD-L1 in cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* 11, 44. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00297-8>
55. Marei, H.E., Hasan, A., Pozzoli, G., Cenciarelli, C., 2023. Cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs): potential, mechanisms of resistance, and strategies for reinvigorating T cell responsiveness when resistance is acquired. *Cancer Cell Int.* 23, 64. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02902-0>
56. Mariotti, F.R., Ingegnere, T., Landolina, N., Vacca, P., Munari, E., Moretta, L., 2023. Analysis of the mechanisms regulating soluble PD-1 production and function in human NK cells. *Front. Immunol.* 14, 1229341. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1229341>
57. Mazzaschi, G., Minari, R., Zecca, A., Cavazzoni, A., Ferri, V., Mori, C., Squadrilli, A., Bordi, P., Buti, S., Bersanelli, M., Leonetti, A., Cosenza, A., Ferri, L., Rapacchi, E., Missale, G., Petronini, P.G., Quaini, F., Tiseo, M., 2020. Soluble PD-L1 and Circulating CD8+PD-1+ and NK Cells Enclose a Prognostic and Predictive Immune Effector Score in Immunotherapy Treated NSCLC patients. *Lung Cancer* 148, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.07.028>

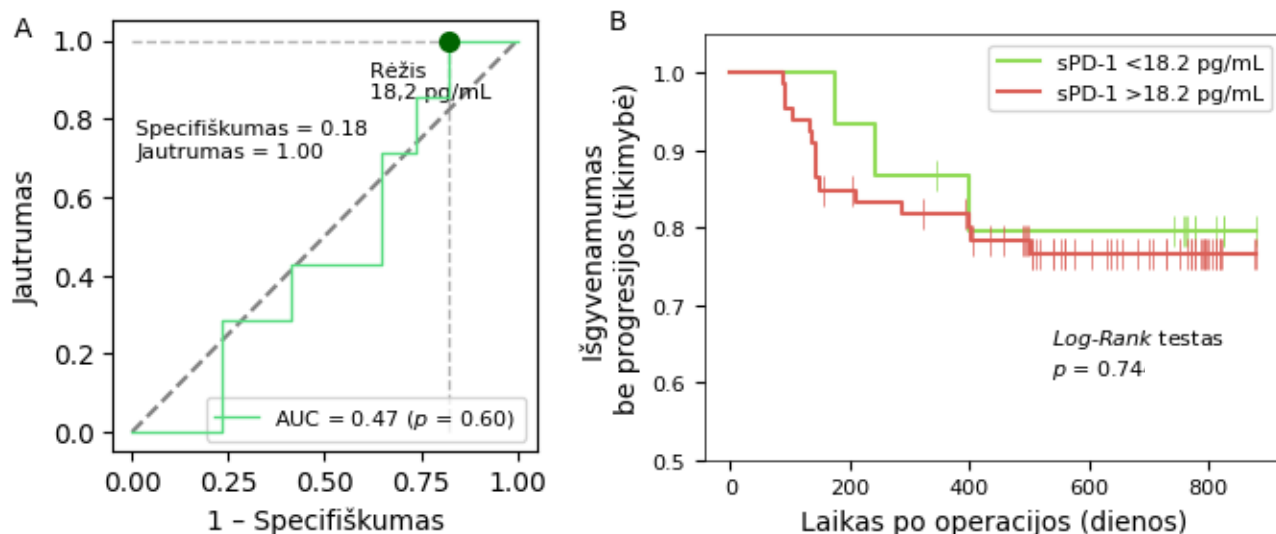
58. Molga-Magusiak, M., Rzepakowska, A., Żurek, M., Kotuła, I., Demkow, U., Niemczyk, K., 2023. Prognostic and predictive role of soluble programmed death ligand-1 in head and neck cancer. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2023.02.005>
59. Montemagno, C., Hagege, A., Borchiellini, D., Thamphyra, B., Rastoin, O., Ambrosetti, D., Iovanna, J., Rioux-Leclercq, N., Porta, C., Negrier, S., Ferrero, J.-M., Chamorey, E., Pagès, G., Dufies, M., 2020. Soluble forms of PD-L1 and PD-1 as prognostic and predictive markers of sunitinib efficacy in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *OncoImmunology* 9, 1846901. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1846901>
60. Mucileanu, A., Chira, R., Mircea, P.A., 2021. PD-1/PD-L1 expression in pancreatic cancer and its implication in novel therapies. *Med. Pharm. Rep.* 94, 402–410. <https://doi.org/10.15386/mpr-2116>
61. Murakami, S., Shibaki, R., Matsumoto, Y., Yoshida, T., Goto, Y., Kanda, S., Horinouchi, H., Fujiwara, Y., Yamamoto, N., Ohe, Y., 2020. Association between serum level soluble programmed cell death ligand 1 and prognosis in patients with non-small cell lung cancer treated with anti-PD-1 antibody. *Thorac. Cancer* 11, 3585–3595. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13721>
62. Ng, K.W., Attig, J., Young, G.R., Ottina, E., Papamichos, S.I., Kotsianidis, I., Kassiotis, G., n.d. Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. *eLife* 8, e50256. <https://doi.org/10.7554/eLife.50256>
63. Niu, M., Liu, Y., Yi, M., Jiao, D., Wu, K., 2022. Biological Characteristics and Clinical Significance of Soluble PD-1/PD-L1 and Exosomal PD-L1 in Cancer. *Front. Immunol.* 13, 827921. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827921>
64. Ohue, Y., Nishikawa, H., 2019. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* 110, 2080–2089. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>
65. Okła, K., Rajtak, A., Czerwonka, A., Bobiński, M., Wawruszak, A., Tarkowski, R., Bednarek, W., Szumiło, J., Kotarski, J., 2020. Accumulation of blood-circulating PD-L1-expressing M-MDSCs and monocytes/macrophages in pretreatment ovarian cancer patients is associated with soluble PD-L1. *J. Transl. Med.* 18, 220. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02389-7>
66. Olingy, C., Alimadadi, A., Araujo, D.J., Barry, D., Gutierrez, N.A., Werbin, M.H., Arriola, E., Patel, S.P., Ottensmeier, C.H., Dinh, H.Q., Hedrick, C.C., 2022. CD33 Expression on Peripheral Blood Monocytes Predicts Efficacy of Anti-PD-1 Immunotherapy Against Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Immunol.* 13.
67. Orme, J.J., Jazieh, K.A., Xie, T., Harrington, S., Liu, X., Ball, M., Madden, B., Charlesworth, M.C., Azam, T.U., Lucien, F., Wootla, B., Li, Y., Villasboas, J.C., Mansfield, A.S., Dronca, R.S., Dong, H., 2020. ADAM10 and ADAM17 cleave PD-L1 to mediate PD-(L)1 inhibitor resistance. *Oncoimmunology* 9, 1744980. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1744980>
68. Park, H., Bang, J.-H., Nam, A.-R., Eun Park, J., Hua Jin, M., Bang, Y.-J., Oh, D.-Y., 2019. Prognostic implications of soluble programmed death-ligand 1 and its dynamics during chemotherapy in unresectable pancreatic cancer. *Sci. Rep.* 9, 11131. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47330-1>
69. Patel, S.P., Kurzrock, R., 2015. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 14, 847–856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>
70. Patsoukis, N., Wang, Q., Strauss, L., Boussiotis, V.A., 2020. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* 6, eabd2712. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd2712>
71. Pedroza-Pacheco, I., Madrigal, A., Saudemont, A., 2013. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 222–229. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.2>

72. Pen, J.J., Keersmaecker, B.D., Heirman, C., Corthals, J., Liechtenstein, T., Escors, D., Thielemans, K., Breckpot, K., 2014. Interference with PD-L1/PD-1 co-stimulation during antigen presentation enhances the multifunctionality of antigen-specific T cells. *Gene Ther.* 21, 262–271. <https://doi.org/10.1038/gt.2013.80>
73. Planes-Laine, G., Rochigneux, P., Bertucci, F., Chrétien, A.-S., Viens, P., Sabatier, R., Gonçalves, A., 2019. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences are Emerging—A Literature Review. *Cancers* 11, 1033. <https://doi.org/10.3390/cancers11071033>
74. Qiu, H., Liu, S., Xie, C., Long, J., Feng, Z., 2009. Regulating Immunity and Inhibiting Tumor Growth by the Recombinant Peptide sPD-1-CH50. *Anticancer Res.* 29, 5089–5094.
75. Qiu, Y., Yang, Y., Yang, R., Liu, C., Hsu, J.-M., Jiang, Z., Sun, L., Wei, Y., Li, C.-W., Yu, D., Zhang, J., Hung, M.-C., 2021. Activated T cell-derived exosomal PD-1 attenuates PD-L1-induced immune dysfunction in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 40, 4992–5001. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01896-1>
76. Quatrini, L., Mariotti, F.R., Munari, E., Tumino, N., Vacca, P., Moretta, L., 2020. The Immune Checkpoint PD-1 in Natural Killer Cells: Expression, Function and Targeting in Tumour Immunotherapy. *Cancers* 12, 3285. <https://doi.org/10.3390/cancers12113285>
77. Romero, Y., Wise, R., Zolkiewska, A., 2020. Proteolytic Processing of PD-L1 by ADAM Proteases in Breast Cancer Cells. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 69, 43–55. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02437-2>
78. Sanchez-Pino, M.D., Dean, M.J., Ochoa, A.C., 2021. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): When good intentions go awry. *Cell. Immunol.* 362, 104302. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104302>
79. Sasaki, T., Nonomura, R., Tabata, T., Yoshimura, N., Hata, S., Shimada, H., Nakamura, Y., 2023. Study of the clinicopathological features of soluble PD-L1 in lung cancer patients. *J. Rural Med. JRM* 18, 42–49. <https://doi.org/10.2185/jrm.2022-040>
80. Scirocchi, F., Strigari, L., Di Filippo, A., Napoletano, C., Pace, A., Rahimi, H., Botticelli, A., Rughetti, A., Nuti, M., Zizzari, I.G., 2022. Soluble PD-L1 as a Prognostic Factor for Immunotherapy Treatment in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14496. <https://doi.org/10.3390/ijms232214496>
81. Seputra, K.P., Kalim, H., Susianti, H., Purnomo, B.B., Al Rasyid, H., Purnomo, A.F., 2021. Modulation of T-cell Regulators Associated with Advanced Stage of Prostate Cancer. *Acta Inform. Medica* 29, 182–186. <https://doi.org/10.5455/aim.2021.29.182-186>
82. Shao, W., Xu, Y., Lin, S., Gao, Junli, Gao, Junshun, Wang, H., 2022. The potential of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) as a diagnosis marker for colorectal cancer. *Front. Oncol.* 12, 988567. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.988567>
83. Shigemori, T., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Yamamoto, A., Yin, C., Narumi, A., Ichikawa, T., Ide, S., Shimura, T., Fujikawa, H., Yasuda, H., Hiro, J., Yoshiyama, S., Ohi, M., Araki, T., Kusunoki, M., 2019. Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression. *Ann. Surg. Oncol.* 26, 876–883. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-07112-x>
84. Song, M.-Y., Park, S.-H., Nam, H.J., Choi, D.-H., Sung, Y.-C., 2011. Enhancement of Vaccine-induced Primary and Memory CD8+ T-cell Responses by Soluble PD-1. *J. Immunother.* 34, 297–306. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318210ed0e>
85. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

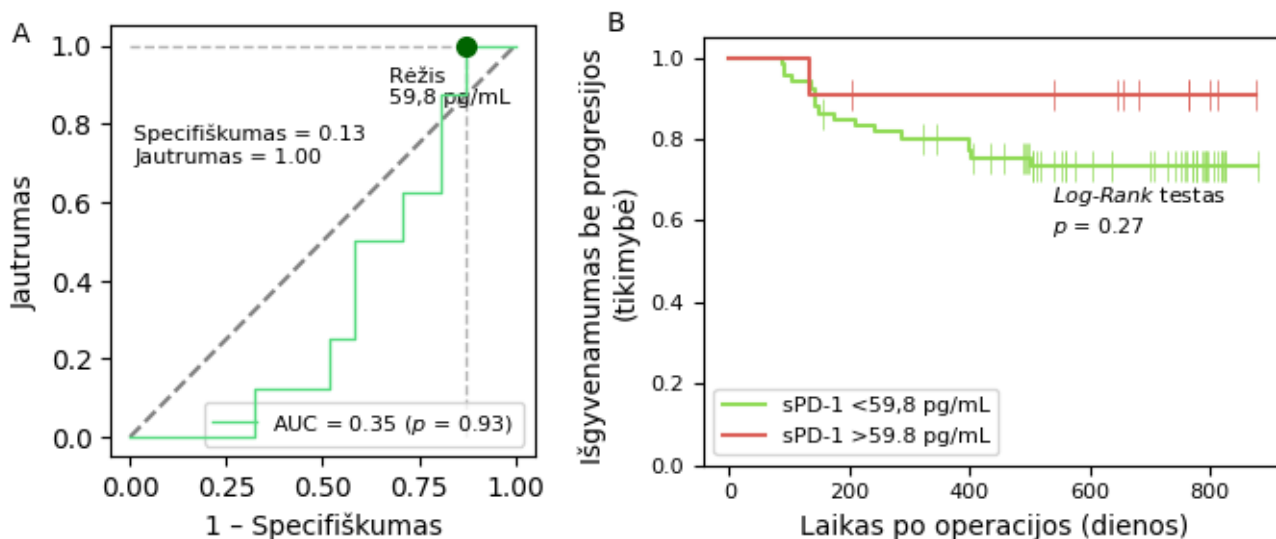
86. Taylor, E.S., McCall, J.L., Shen, S., Girardin, A., Munro, F.M., Black, M.A., Ward-Hartstonge, K.A., Kemp, R.A., 2018. Prognostic roles for IL -2-producing and CD 69 + T cell subsets in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 143, 2008–2016. <https://doi.org/10.1002/ijc.31598>
87. Togashi, Y., Shitara, K., Nishikawa, H., 2019. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 356–371. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0175-7>
88. Wakita, N., Hinata, N., Bando, Y., Hara, T., Terakawa, T., Furukawa, J., Nakano, Y., Fujisawa, M., 2023. Prognostic Value of Serum Soluble PD-L1 in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients Treated With Nivolumab. *Anticancer Res.* 43, 841–847. <https://doi.org/10.21873/anticancer.16226>
89. Wang, J.-C., Sun, L., 2022. PD-1/PD-L1, MDSC Pathways, and Checkpoint Inhibitor Therapy in Ph(-) Myeloproliferative Neoplasm: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5837. <https://doi.org/10.3390/ijms23105837>
90. Xiong, W., Gao, Y., Wei, W., Zhang, J., 2021. Extracellular and nuclear PD-L1 in modulating cancer immunotherapy. *Trends Cancer* 7, 837–846. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.03.003>
91. Yang, F., Wang, J.F., Wang, Y., Liu, B., Molina, J.R., 2021. Comparative Analysis of Predictive Biomarkers for PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cancers: Developments and Challenges. *Cancers* 14, 109. <https://doi.org/10.3390/cancers14010109>
92. Yazdanpanah, P., Alavianmehr, A., Ghaderi, A., Monabati, A., Montazer, M., Tahmasbi, K., Farjadian, S., 2021. PD-L1 expression in tumor lesions and soluble PD-L1 serum levels in patients with breast cancer: TNBC versus TPBC. *Breast Dis.* 40, 43–50. <https://doi.org/10.3233/BD-201049>
93. Ying, H., Zhang, X., Duan, Y., Lao, M., Xu, J., Yang, H., Liang, T., Bai, X., 2021. Non-cytoplasmic PD-L1: An atypical target for cancer. *Pharmacol. Res.* 170, 105741. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105741>
94. Yu, W., Hua, Y., Qiu, H., Hao, J., Zou, K., Li, Z., Hu, S., Guo, P., Chen, M., Sui, S., Xiong, Y., Li, F., Lu, J., Guo, W., Luo, G., Deng, W., 2020. PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and β -catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer. *Cell Death Dis.* 11, 506. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2701-z>
95. Zak, K.M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., Holak, T.A., 2017. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* 25, 1163–1174. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.011>
96. Zhang, Y., Zhang, Z., Zhang, L., Zhao, S., Zhao, J., Ye, Q., Gao, Y., Jiang, C., Cui, D., Xia, S., Han, B., Jing, Y., 2020. Clinical Implications of Peripheral CD3+CD69+ T-Cell And CD8+CD28+ T-Cell Proportions in Patients Prior to Radical Prostatectomy. *Urol. J.* 17, 257–261. <https://doi.org/10.22037/uj.v17i3.5103>
97. Zhou, L., Li, X., Huang, X., Chen, L., Gu, L., Huang, Y., 2019. Soluble programmed death-1 is a useful indicator for inflammatory and fibrosis severity in chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.* 26, 795. <https://doi.org/10.1111/jvh.13055>
98. Zhu, X., Lang, J., 2017. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget* 8, 97671–97682. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18311>

PRIEDAI

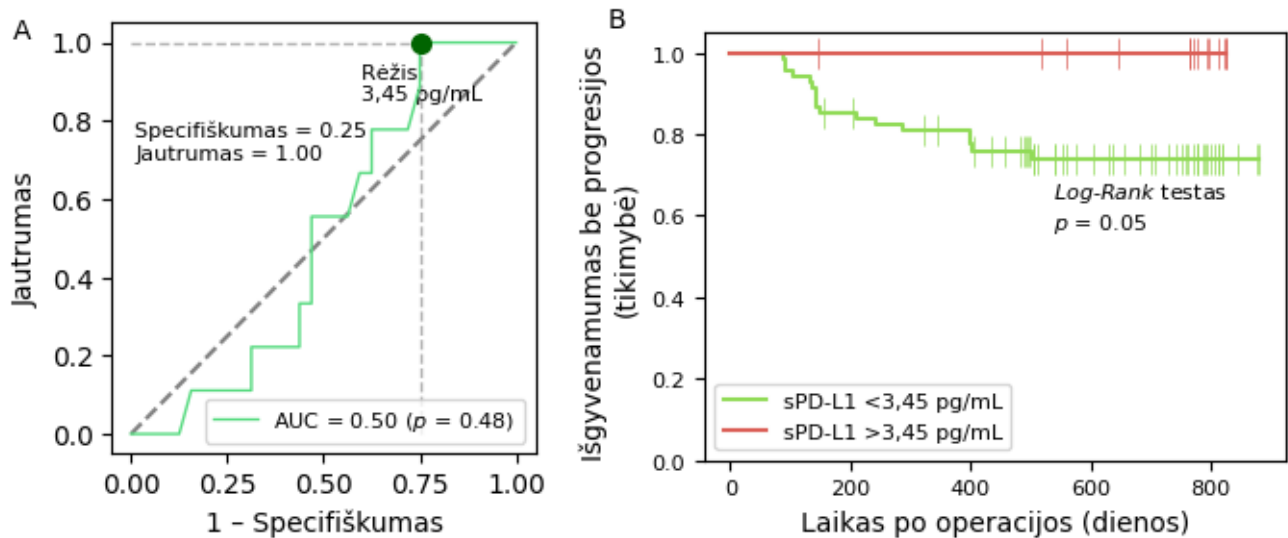
1 Priedas. sPD-L1, sPD-1 koncentracijų ir prostatos vėžio atsinaujinimo ryšys.



1 pav. Priešoperacinės sPD-1 koncentracijos kraujyje kaip klasifikatoriaus išgyvenamumui be ligos progresavimui patikimumas (A) ir prostatos vėžio pacientų išgyvenamumas be ligos progresavimo pagal kraujyje nustatytų sPD-1 koncentracijų grupes (B). AUC – plotas po kreive.

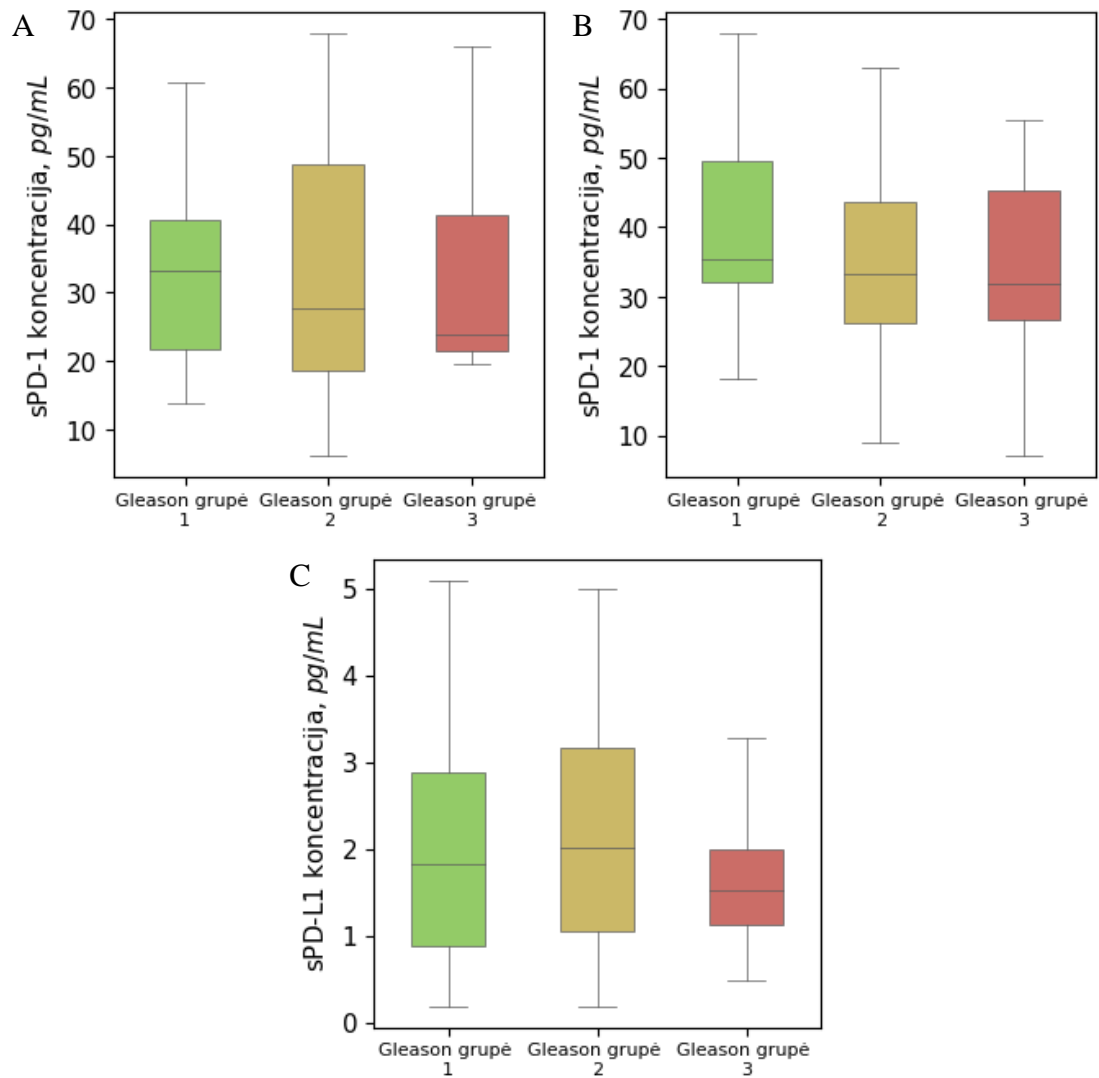


2 pav. Pooperacinės sPD-1 koncentracijos kraujyje kaip klasifikatoriaus išgyvenamumui be ligos progresavimui patikimumas (A) ir prostatos vėžio pacientų išgyvenamumas be ligos progresavimo pagal kraujyje nustatytų sPD-1 koncentracijų grupes (B). AUC – plotas po kreive.

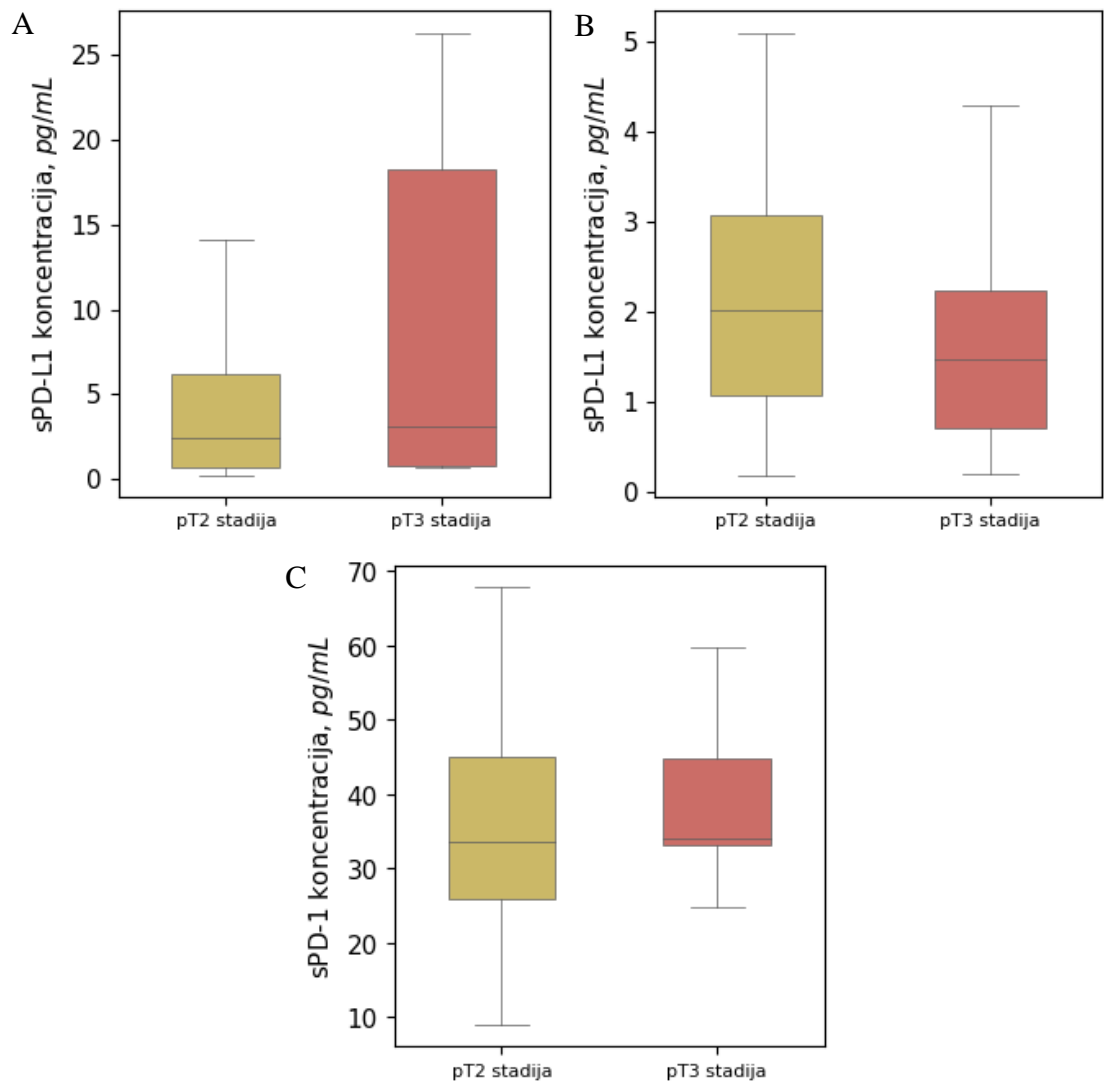


3 pav. Pooperacinės sPD-L1 koncentracijos kraujyje kaip klasifikatoriaus išgyvenamumui be ligos progresavimui patikimumas (A) ir prostatos vėžio pacientų išgyvenamumas be ligos progresavimo pagal kraujyje nustatytą sPD-1 koncentracijų grupes (B). AUC – plotas po kreive.

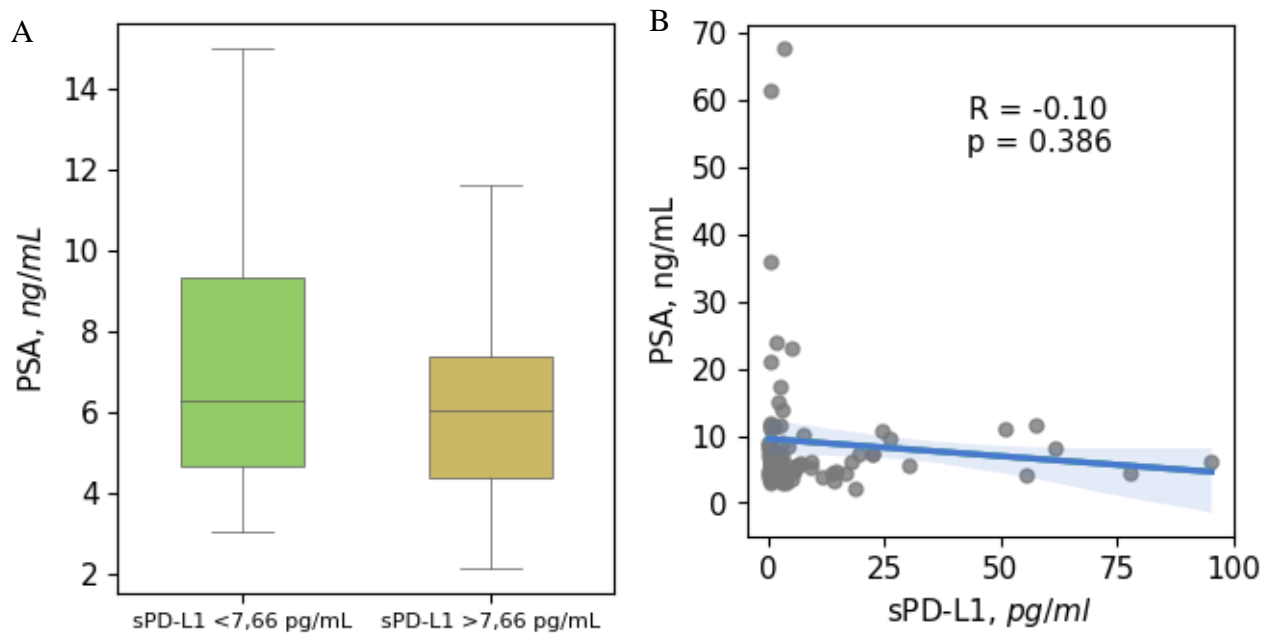
2 priedas. sPD-(L)1 sąsajos su prostatos vėžio pacientų klinikiniais rodikliais.



1 pav. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių ir pooperacinių sPD-(L)1 koncentracijų pasiskirstymas pagal Gleason naviko klasifikaciją. (A) Priešoperacinės sPD-1 koncentracijos. (B) Pooperacinės sPD-1 koncentracijos. (C) Pooperacinės sPD-L1 koncentracijos.

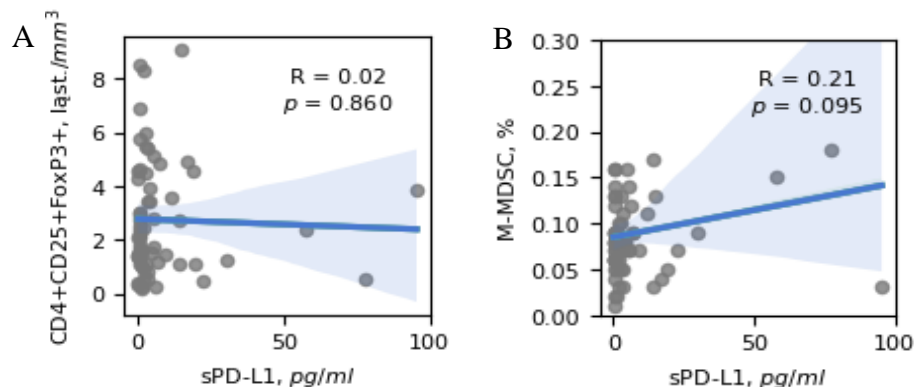


2 pav. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių ir pooperacinių sPD-(L)1 koncentracijų pasiskirstymas pagal patologinę stadiją. (A) Priešoperacinės sPD-L1 koncentracijos. (B) Pooperacinės sPD-L1 koncentracijos. (C) Pooperacinės sPD-1 koncentracijos.



3 pav. Prostatos vėžio pacientų priešoperacinių prostatos specifinio antigeno (PSA) ir sPD-L1 koncentracijų pasiskirstymas. (A) PSA koncentracijų pasiskirstymas žemos (<7,66 pg/mL) sPD-L1 koncentracijos ir aukštos (>7,66 pg/mL) sPD-L1 koncentracijos pacientų grupėse. (B) PSA ir sPD-L1 tarpusavio koreliacija.

3 Priedas. Prostatos vėžio pacientų imuninių parametrų ir sPD-1, sPD-L1 ryšys.



1 pav. Biocheminio atkryčio nepatyrusių prostatos vėžio pacientų Treg (CD4+CD25+FoxP3+), M-MDSC ir sPD-L1 Spirmano koreliacijos. Treg ir sPD-L1 koreliacija (A). M-MDSC ir sPD-L1 koreliacija (B).

1 lentelė. Priešoperacinių prostatos vėžio pacientų imuninių ląstelių kiekių palyginimas tarp didelės ir mažos sPD-L1 koncentracijos pacientų grupių. * – *Mann-Whitney U* kriterijus.

Parametras	sPD-L1 <7,66 pg/mL	sPD-1 >7,66 pg/mL	P reikšmė*
	Mediana (Q1–Q3)	Mediana (Q1–Q3)	
CD16+CD56+, ląst./mm ³	232 (120–355)	225 (123–334)	0,78
CD4+, ląst./mm ³	544 (441–853)	529 (403–915)	0,93
CD4+CD25+FoxP3+, ląst./mm ³	1,9 (1,1–3,9)	2,7 (1,4–4,6)	0,21
CD8+, ląst./mm ³	540 (380–821)	446 (222–929)	0,58
CD8+CD69+, ląst./mm ³	211 (141–346)	153 (70–393)	0,51
CD8+CD69+/Treg santykis	10 (6–18)	10 (6–19)	0,92
G-MDSC, %	0,23 (0,15–0,40)	0,29 (0,15–0,39)	0,66
M-MDSC, %	0,08 (0,06–0,11)	0,09 (0,05–0,16)	0,47

2 lentelė. Pooperacinių prostatos vėžio pacientų imuninių ląstelių kiekių palyginimas tarp didelės ir mažos sPD-L1 koncentracijos pacientų grupių. * – *Mann-Whitney U* kriterijus.

Parametras	sPD-L1 <7,66 pg/mL	sPD-L1 >7,66 pg/mL	P reikšmė*
	Mediana (Q1–Q3)	Mediana (Q1–Q3)	
CD16+CD56+, ląst./mm ³	365 (190–485)	243 (115–420)	0,1
CD4+, ląst./mm ³	555 (420–703)	603 (429–838)	0,59
CD4+CD25+FoxP3+, ląst./mm ³	2,4 (1,24–3,49)	2,6 (0,97–5,38)	0,76
CD8+, ląst./mm ³	664 (455–877)	442 (2556–922)	0,17
CD8+CD69+, ląst./mm ³	220 (156–289)	146 (60–309)	0,05
CD8+CD69+/Treg santykis	8 (4–14)	7 (3–18)	0,53
G-MDSC, %	0,33 (0,21–0,46)	0,34 (0,19–0,5)	0,95
M-MDSC, %	0,1 (0,08–0,13)	0,1 (0,08–0,13)	0,66

3 lentelė. Pooperacinių prostatos vėžio pacientų imuninių ląstelių kiekių palyginimas tarp didelės ir mažos sPD-1 koncentracijos pacientų grupių. * – *Mann-Whitney U* kriterijus.

Parametras	sPD-1 <33,89 pg/mL	sPD-1 >33,89 pg/mL	P reikšmė*
	Mediana (Q1–Q3)	Mediana (Q1–Q3)	
CD16+CD56+, ląst./mm ³	327 (138–419)	340 (188–485)	0,22
CD4+, ląst./mm ³	529 (367–636)	565 (461–716)	0,25
CD4+CD25+FoxP3+, ląst./mm ³	2,4 (1,2–3,4)	2,0 (1,2–4,1)	0,83
CD8+, ląst./mm ³	566 (414–820)	679 (399–983)	0,68
CD8+CD69+, ląst./mm ³	192 (115–255)	223 (147–334)	0,21
CD8+CD69+/Treg santykis	7 (4–13)	10 (4–17)	0,13
G-MDSC, %	0,39 (0,21–0,48)	0,31 (0,2–0,53)	0,75
M-MDSC, %	0,1 (0,08–0,14)	0,11 (0,08–0,13)	0,76