

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

EPITELINIO KIAUŠIDŽIŲ VĖŽIO PREDIKCINIŲ IMUNINIŲ ŽYMENŲ PAIEŠKA

Magistrantė GRETA ŠALČIŪNIENĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas
dr. Vita Pašukonienė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2017m., Vilnius

TURINYS

| | |
|--|-----------|
| SANTRUMPOS | 4 |
| ĮVADAS | 6 |
| DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI..... | 8 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA | 9 |
| 1.1. Kiaušidžių struktūra ir funkcijos | 9 |
| 1.2. Epitelinis kiaušidžių vėžys ir jo gydymas | 10 |
| 1.2.1. Epitelinis kiaušidžių vėžys | 10 |
| 1.2.2. Epitelinio kiaušidžių vėžio gydymas | 12 |
| 1.3. Atsparumo chemoterapijai problema ir priežastys..... | 13 |
| 1.4. Imuninė sistema ir vėžys | 15 |
| 1.4.1. Naviko mikroaplinka | 15 |
| 1.4.2. T limfocitų svarba kiaušidžių vėžio vystymuisi | 15 |
| 1.4.3. Citokinų reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi..... | 17 |
| 1.5. Personalizuota vėžio medicina | 20 |
| 2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI | 22 |
| 2.1. Pacienčių atrankos kriterijai | 22 |
| 2.2. Ex vivo tyrimo schema..... | 22 |
| 2.3. Tėkmės citometrija..... | 23 |
| 2.4. Citokinų gardelė | 25 |
| 2.5. Žmogaus uždegiminių chemokinių tyrimas | 26 |
| 2.6. IFN- γ koncentracijos nustatymas tėkmės citometriniu metodu | 27 |
| 2.7. Genų raiškos tyrimas tikrojo laiko PGR metodu | 28 |
| 2.7.1. RNR išskyrimas..... | 28 |
| 2.7.2. RNR kokybės ir kiekybės tyrimas | 29 |
| 2.7.3. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė panaudojant RNR matricą | 29 |
| 2.7.4. Kiekybinė tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija..... | 30 |
| 2.8. Statistinė duomenų analizė..... | 31 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 33 |
| 3.1. Pacienčių charakteristikos | 33 |
| 3.2. Periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijų tyrimas tėkmės citometriniu metodu | 35 |
| 3.3. Citokinų tyrimas | 38 |
| 3.4. Genų raiškos vertinimas | 43 |
| 3.5. Imuninių parametų koreliacijos vertinimas | 44 |
| 4. IŠVADOS..... | 48 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| SANTRAUKA | 49 |
| SUMMARY | 51 |
| PADĒKA..... | 53 |
| LITERATŪROS SĀRAŠAS | 54 |
| PRIEDAI..... | 59 |

SANTRUMPOS

- APC** – alofikocianinas
- CCL2/MCP-1** – monocitų chemotaksinis baltymas 1
- CCL3/MIP-1 α** – makrofagų uždegiminis baltymas 1 alfa
- CCL4/MIP-1 β** – makrofagų uždegiminis baltymas 1 beta
- CCL5/RANTES** – chemokino ligandas 5
- CCL11/Eotaksinas 1** – eozinofilų chemotaksinis baltymas
- CCL17/TARC** – chemokino ligandas 17
- CCL20/MIP-3 α** – makrofagų uždegiminis baltymas 3
- CD40 L** – CD40 ligandas
- CT** – ciklo slenkstis
- CXCL1/GRO α** – augimą reguliuojantis onkogenas alfa
- CXCL5/ENA-78** – epitelio ląstelių kilmės neutrofilus aktyvinantis peptidas
- CXCL9/MIG** – interferono gama indukuotas monokinas
- CXCL10/IP-10** – interferono gama indukuotas baltymas 10
- CXCL11/I-TAC** – interferono indukuotas T ląstelių α chemotaksinis baltymas
- DNR** – deoksiribonukleorūgštis
- dNTP** – deoksinukleotidtrifosfatai
- EKV** – epitelinis kiaušidžių vėžys
- FIGO** – tarptautinė ginekologų ir akušerių federacija
- FITC** – fluoresceino izotiocianatas
- GAPDH** – gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazė
- G-CSF** – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius
- GOG** – ginekologinės onkologijos grupė
- HE4** – žmogaus epididymio 4 baltymas
- IL** – interleukinas
- IFN- γ** – interferonas gama
- iRNR** – informacinė ribonukleorūgštis
- kDNR** – kopijinė deoksiribonukleorūgštis
- NIL** – naviką infiltruojantys limfocitai
- NITL** – naviką infiltruojantys T limfocitai
- NK** – natūralioji žudikė
- NVI** – Nacionalinis vėžio institutas
- PAI-1** – plazminogeno aktyvatoriaus slopiklis 1

PE – fikoeritinas

PerCP – peridinino chlorofilo baltymas

PŠS – priekinė šviesos sklaida

RNR – ribonukleorūgštis

rS – Spirmeno koreliacijos koeficientas

SA-PE – streptavidinas konjuguotas su fluoroforu fikoeritriu

ŠŠS – šoninė šviesos sklaida

TGF-β – transformuojantis augimo faktorius beta

TL-PGR – tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija

TMB – tetrametilbenzidas

Treg – T reguliaciniai limfocitai

VKL – vėžinės kamieninės ląstelės

ĮVADAS

Kiaušidžių vėžys yra viena pagrindinių moterų mirties nuo ginekologinių onkologinių susirgimų priežastis išsivysčiusiose šalyse. Labiausiai paplitęs kiaušidžių vėžio tipas yra epitelinis kiaušidžių vėžys (EKV), kuris sudaro maždaug 85-90 % visų susirgimo atvejų. Ankstyvos kiaušidžių vėžio formos neturi specifinių klinikinių simptomų bei efektyvių patikros metodų, todėl ši liga dažniausiai yra diagnozuojama jau vėlyvose – III, IV stadijose. Vėlyvas šios ligos diagnozavimas lemia didelį pacienčių mirštamumą [1, 2, 3].

Moterims, sergančioms išplitusiu EKV, gydyti yra taikoma citoredukcinė operacija ir chemoterapija platinos bei taksanų deriniu. Nors karboplatinos ir paklitakselio derinys yra laikomas universaliu EKV gydymo standartu, tačiau gydymo metu chemoterapiniai vaistai dažnai tampa neefektyvūs dėl išsivysčiusio vėžinių ląstelių atsparumo jiems. Chemoterapijai atsparaus fenotipo atsiradimas lemia didelius pacienčių mirštamumo rodiklius. Pasaulyje kol kas nėra patvirtintų EKV predikcinių biožymenų, kuriais remiantis pacientės būtų galima suskirstyti į chemoterapijai jautrias bei atsparias ir jau ligos pradžioje skirti efektyvų gydymą [4, 5].

Kiaušidžių vėžys yra heterogeninė liga, tarp pacienčių besiskirianti histologiniu, molekulinio profiliu, naviko mikroaplinką sudarančių ląstelių tipu. Todėl kuriant vis naujas vėžio gydymo strategijas, daug dėmesio skiriama ne tik vėžinėms ląstelėms, bet ir naviko mikroaplinkai. Manoma, ji turi įtakos ne tik naviko augimui ir progresavimui, bet ir lemia atsaką į gydymą [6, 7].

Vienos svarbiausių naviko mikroaplinką sudarančių ląstelių yra įvairios imuninės ląstelės, nuo kurių profilio, kiekio, infiltravimo pobūdžio priklauso naviko jautrumas (ar atsparumas) imuninės sistemos poveikiui [6, 7]. Citotoksinių limfocitų infiltracija yra siejama su geresniu pacienčių išgyvenamumu, o su blogesne ligos prognoze siejami T reguliaciniai limfocitai, kurie pasižymi imunosupresinėmis savybėmis [8, 9]. Naujausi duomenys rodo, kad EKV progresavimas yra susijęs su padidėjusia uždegiminių citokinų sinteze ir sekrecija. Citokinai gali ne tik slopinti, bet ir skatinti naviko augimą ir plitimą bei prisidėti prie atsparumo chemoterapiniams vaistams įgijimo [10, 11]. Šio tiriamojo darbo tikslas buvo nustatyti galimus imuninių parametrų skirtumus tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių bei įvertinti potencialią šių parametrų predikcinę reikšmę. Numatytam tikslui pasiekti buvo tiriama: pacienčių periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijos tėkmės citometriniu metodu; citokinų koncentracija kraujo serume ir naviko lizate pasitelkiant gardelių technologiją bei tėkmės citometrinių metodą; su imunine sistema susijusių genų raiška navike tikrojo laiko PGR metodu. Tyrimo metu taip pat buvo vertinamos sąsajos tarp imuninių parametrų bei tikrinamas jų ryšys su atsparumu gydymui. Magistrinis darbas, atliktas Nacionalinio vėžio

instituto Imunologijos laboratorijoje, yra vienas iš mokslinio tyrimo projekto „Vėžio kamieninių ląstelių rezistentiškumo mechanizmai: nauji žymenys gydymui ir prognozei“ fragmentų.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tiriamąo darbo tikslas – nustatyti predikcinius imuninius atsparumo chemoterapijai žymenis žmogaus epitelinio kiaušidžių naviko mikroaplinkoje ir periferiniame kraujyje bei nustatyti jų tarpusavio sąsajas.

Darbo uždaviniai:

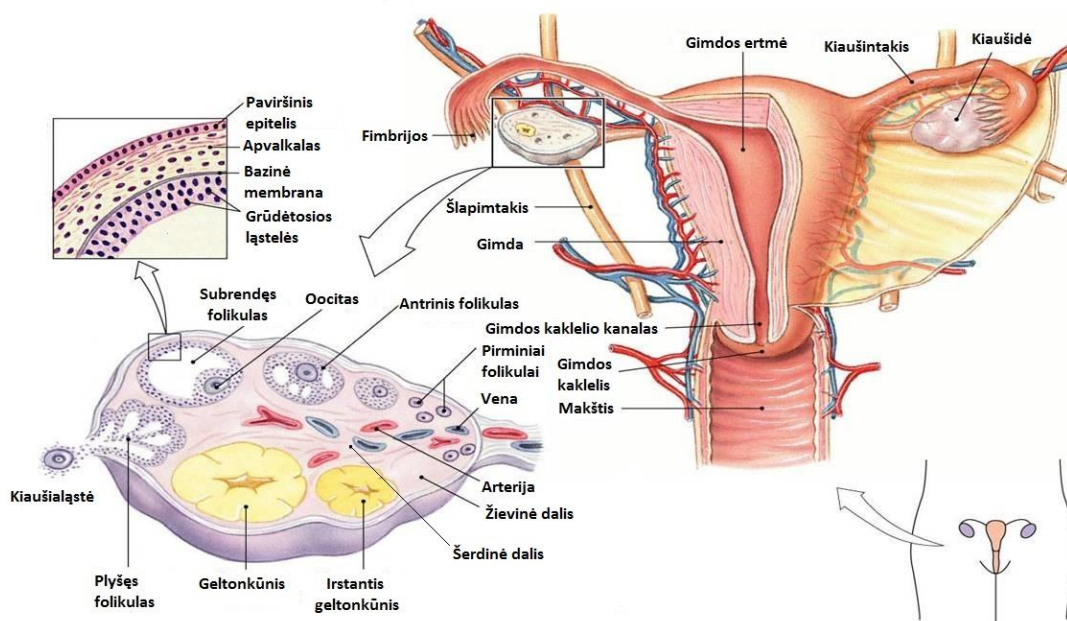
1. Įvertinti pacienčių periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijas.
2. Nustatyti citokinų koncentraciją naviko mikroaplinkoje ir kraujo serume.
3. Įvertinti su imunine sistema susijusių genų raišką naviko audinyje.
4. Nustatyti sąsajas tarp imuninių žymenų raiškos, kraujo limfocitų populiacijų, citokinų koncentracijos naviko mikroaplinkoje ir kraujo serume bei patikrinti šių žymenų ryšį su atsparumu gydymui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kiaušidžių struktūra ir funkcijos

Kiaušidė yra porinė moters lytinė liauka, išsidėsčiusi mažajame dubenyje. Suaugusios moters kiaušidė yra ovalo formos, maždaug 2,5-5,0 cm ilgio, 1,5-3,0 cm pločio, 0,6-1,5 cm storio ir 10-15 g svorio organas. Po menopauzės prasideda kiaušidės involiucija, todėl senyvame amžiuje ji sveria tik apie 6-8 g. Kiaušidė turi du paviršius – šoninį, kuris yra prigludęs prie mažojo dubens šoninės sienos, ir vidinį, atsuktą į kitus dubens organus. Vienas jos galas yra nukreiptas į gimdą, o kitas į kiaušintakį. Iš išorės kiaušidę dengianti pilvaplėvė yra kubinio epitelio sluoksnis, o toliau einantis plokščiasis epitelis sudaro pasaitus ir raiščius, kurie fiksuoja ją tarp dubens sienų ir gimdos [12, 13, 14].

Kiaušidę sudaro žievinė ir šerdinė dalys (1 pav.) Šerdinėje dalyje gausu paurus jungiamojo audinio, lygiųjų raumenų, elastinių skaidulų, pericitų, chromafininių ląstelių, čia išsidėsčiusios kraujagyslės, limfagyslės, nervai. Žievės paviršių dengia balta jungiamojo audinio kapsulė – balzganasis kiaušidės dangalas. Žievinėje dalyje auga ir bręsta folikulai, kurių viduje yra kiaušinėlis. Naujagimės kiaušidėse yra 1-2 mln. pirminių folikulų. Iki lytinės brandos vyksta kiaušidžių pertvarka, folikulų atranka, todėl jų lieka apie 300-500 tūkst., iš kurių tik 420-500 subręsta lytinio aktyvumo laikotapiu. Kiekvieną mėnesį menstruacinio ciklo metu auga daug folikulų, tačiau subręsta ir iš kiaušidės išsilaisvina tik vienas kiaušinėlis. Jis keliauja kiaušintakiu į gimdą, kur gali būti apvaisinamas spermatozoido. Neapvaisintas kiaušinėlis yra pašalinamas atsiskiriant gimdos gleivinei menstruacinio ciklo metu [12, 13, 14].



1 pav. Kiaušidžių struktūra (adaptuota pagal [15])

Kiaušidėse ne tik formuojasi ir subręsta kiaušinėlis, bet taip pat gaminami moteriški lytiniai hormonai estrogenai ir progesteronai bei nedidelis kiekis androgenų – vyriškų lytinių hormonų. Estrogenai skatina antrinių moteriškųjų lytinių požymių vystymąsi bei yra susiję su ovuliacijos reguliavimu, apvaisinimu, blastocistos implantacija, nėštumo eigos kontrole, gimdymu ir pieno liaukų formavimusi. Progesteronas veikia gimdos gleivinę, palaiko nėštumą, skatina pieno liaukų vystymąsi ir laktaciją [13, 16].

1.2. Epitelinis kiaušidžių vėžys ir jo gydymas

1.2.1. Epitelinis kiaušidžių vėžys

Kiaušidžių vėžys yra plačiai paplitęs onkologinis susirgimas, kuris užima septintą vietą pasaulyje pagal moterų sergamumą ir mirštamumą nuo vėžio. Tyrimų duomenimis, 2012 metais buvo diagnozuota 238719 naujų kiaušidžių vėžio atvejų (3,6% visų moterų susirgimų), o 151917 (4,3% moterų mirčių nuo vėžio) moterų mirė nuo šios ligos [17]. Remiantis vėžio registro duomenimis, 2012 metais Lietuvoje buvo diagnozuoti 377 nauji šios ligos atvejai. Pagal moterų sergamumą onkologinėmis ligomis Lietuvoje, kiaušidžių vėžys užima šestą vietą, o pagal mirčių skaičių – ketvirtą vietą. Tikimybė susirgti kiaušidžių vėžiu didėja su amžiumi. Daugiausiai serga vyresnės nei 50 m. amžiaus moterys [18].

Epitelinis kiaušidžių vėžys (EKV) yra labiausiai paplitęs kiaušidžių vėžio tipas, sudarantis maždaug 85-90 % visų susirgimo atvejų. Jis vystosi iš pakitusių epitelio ląstelių, dengiančių išorinį kiaušidžių paviršių [1]. EKV yra heterogeninė liga, skirstoma į I ir II tipo karcinomas. I tipo navikai paprastai yra neagresyvūs, neišplitę į aplinkinius audinius, genetiškai stabilūs – nesusiję su *TP53* geno mutacija. Šiai grupei priklauso mažo piktybiškumo serozinės, endometrioidinės, mucininės, šviesių ląstelių ir pereinamojo epitelio (Brenner) karcinomos [2, 4]. 5 metų išgyvenamumas siekia 55 % [19]. II tipo navikai yra labai agresyvūs, greitai progresuojantys, genetiškai nestabilūs – 80 % atvejų susiję su *TP53* mutacija. Šiai grupei priklauso didelio piktybiškumo serozinės, endometrioidinės, nediferencijuotos karcinomos bei mišrūs mezoderminiai navikai, dar vadinami karcinosarkomomis [2, 4]. 5 metų išgyvenamumas siekia tik 30 % [19].

Priežastys, lemiančios kiaušidžių vėžio atsiradimą ir vystymąsi, iki šiol nėra aiškios. Manoma, kad tikimybę susirgti šia liga didina ankstyva mėnesinių pradžia ir vėlyva menopauzė, taip pat persirgtos kiaušidžių uždegiminės ligos, buvusios kiaušidžių cistos, pakaitinė hormonų terapija. Negimdžiusių ar nevaisingų ir gydytų vaistais nuo nevaisingumo moterų rizika susirgti kiaušidžių vėžiu yra didesnė [3, 4]. Dauguma EKV atvejų yra sporadiniai, tačiau naujesni

tyrimai rodo, kad iki 5-10 % šio vėžio atvejų gali būti sąlygoti paveldimų *BRCA1/2* genų mutacijų. *BRCA* genai, dar vadinami naviko slopinimo genais, koduoja baltymus, atsakingus už pažeistos deoksiribonukleorūgšties (DNR) reparaciją. Moterys, turinčios *BRCA1* geno mutacijas, turi iki 40-65 %, o *BRCA2* geno mutacijas iki 20% didesnę tikimybę susirgti kiaušidžių vėžiu. Šių genų mutacijos didina riziką susirgti ne tik kiaušidžių, bet ir krūties, prostatos, kasos vėžiu [20, 21].

Ankstyvos kiaušidžių vėžio formos neturi specifinių klinikinių simptomų, todėl ši liga dažniausiai yra diagnozuojama jau vėlyvose – III, IV stadijose. Tai yra klastinga liga, todėl visuomenėje dar vadinama „tyliuoju žudiku“ [3, 20]. Paprastai pacientės kreipiasi į gydymo įstaigą tik tuomet, kai atsiranda ascitas, pilvo skausmai, šlapinimo ir tuštinimosi sutrikimai, pykinimas, kūno svorio mažėjimas, kraujavimas iš lytinių organų. Patikros metu atliekama ginekologinė dubens apžiūra, transvaginalinė echoskopija, o įtarus kiaušidžių vėžį matuojama kiaušidžių vėžio žymens CA 125 (*angl.* carbohydrate antigen 125) koncentracija kraujo serume [3, 20]. CA 125 yra didelės molekulinės masės glikoproteinas, kurio koncentracija kraujyje padidėja apie 90 % esant pažengusiam EKV. Šio žymens koncentracija kraujyje padidėja serozinių, bet ne mucininių navikų atvejais. Tyrimai parodė, kad CA 125 yra nepakankamai specifiškas ir jautrus žymuo ankstyvai kiaušidžių vėžio diagnostikai. Jo koncentracija gali padidėti nepiktybinių kiaušidžių ligų atvejais, taip pat sergant plaučių, krūties, kepenų, kiaušintakių, gaubtinės žarnos vėžiu. Todėl CA 125 klinikinėje praktikoje dažniausiai naudojamas stebėti jau diagnozuotos kiaušidžių vėžio ligos eigą ir recidyvą [3, 22, 23]. 2009 metais buvo patvirtintas naujas kiaušidžių vėžio žymuo – žmogaus epididymio 4 baltymas (HE4), kuris pasižymi didesniu jautrumu ir specifiskumu nei CA 125. Tačiau tyrimai rodo, kad HE4 koncentracija pacienčių kraujo serume padidėja ne tik kiaušidžių, bet ir gimdos gleivinės (endometriumo) vėžio atveju. HE4 yra proteazės slopiklis, sintetinamas tiek normaliuose organizmo audiniuose (reprodukcinuose, krūties, seilių liaukų, kvėpavimo, inkstų, storąjo žarnyno), tiek kiaušidžių vėžio epitelyje. Paprastai klinikoje tiriamas HE4 kartu su CA 125. Šių žymenų kombinacija padeda atskirti gerybinius mažąjo dubens darinius nuo vėžinio proceso moterims prieš ir po menopauzės bei įvertinti EKV riziką. Todėl, manoma, HE4 ir CA 125 žymenų nustatymas kartu gali padėti geriau aptikti anktyvąsias kiaušidžių vėžio stadijas [24]. Lietuvoje, kaip ir visame pasaulyje, trūksta patikimų, jautrių ir organui specifinių ankstyvos stadijos kiaušidžių vėžio diagnostikos ir patikros metodų, todėl naujų biožymenų atradimas galėtų sumažinti sergamumą ir mirštamumą nuo šios ligos.

1.2.2. Epitelinio kiaušidžių vėžio gydymas

EKV gydymo strategija paremta kokybiška citoredukcine operacija ir adjuvantine chemoterapija [4, 5, 25]. Citoredukcine operacija yra vadinama piktybinio naviko pašalinimo procedūra, kuri apima histerektomiją, salpingooforektomiją, omentektomiją bei didesnių nei 1 cm naviko metastazių pašalinimą pilvo ir dubens ertmėse bei retroperitoniniame tarpe. Operacijos metu histologiniam ir citologiniam ištyrimui paimama pilvaplėvės nuoplovų, biopsijos iš diafragmos ir taukinės, pašalinami ir tiriami padidėję dubens ir paraaortiniai limfmazgiai. Tokiu būdu nustatoma tiksli kiaušidžių vėžio stadija, kuri yra labai svarbi parenkant tinkamą gydymą bei prognozuojant ligos eigą [3, 4, 25].

Remiantis 2014 m. sudaryta tarptautine ginekologų ir akušerių federacijos (*angl. The International Federation of Gynecology and Obstetrics* – sutrump. FIGO) klasifikacija, skiriamos 4 EKV stadijos: I – navikas yra vienoje arba abiejose kiaušidėse; II – navikas išplitęs abiejose kiaušidėse ir apima mažojo dubens organus; III – navikas yra vienoje arba abiejose kiaušidėse, metastazės pilvaplėvėje už mažojo dubens ribų ir/ar metastazės retroperitoniniuose limfmazgiuose; IV – kiaušidžių vėžys išplitęs į tolimus organus: metastazės kepenyse, plaučiuose, tolimuosiuose limfmazgiuose [4, 5, 26].

Po operacijos pirmo pasirinkimo gydymo standartas išplitusiam EKV gydyti yra chemoterapija platinos (cisplatina ar karboplatina) ir taksanų (paklitakselis, docetakselis) deriniu [4, 5, 25]. Dauguma gydytojų chemoterapijai renkasi karboplatiną, nes ji sukelia mažiau nepageidaujamų reiškinių nei cisplatina. Karboplatina (1,1-ciklobutildikarboksilat) patekusi į ląstelę yra hidrolizuojama ir įgauna teigiamą krūvį, todėl gali sąveikauti su nukleofilinėmis molekulėmis, tokiomis kaip DNR, ribonukleorūgštimi (RNR) ar baltymais. Pagrindinis karboplatinės taikiny yra DNR, o suformuoti aduktai slopina replikaciją ir transkripciją bei lemia ląstelės žūtį [27]. Paklitakselis yra augalinės kilmės vaistas nuo vėžio veikiantis mikrovamzdelius. Jis skatina tubulino dimerus jungtis į mikrovamzdelius ir juos stabilizuoja, todėl yra pažeidžiama normali mikrovamzdelių tinklo reorganizacijos dinamika. Šie procesai sutrikdo dalijimo verpstės formavimąsi ir ląstelių mitozę bei lemia apoptozę [28].

Šiuo metu viena didžiausių epitelinio kiaušidžių vėžio gydymo inovacijų yra biologinė terapija bevacizumabu. Tai monokloninis antikūnas, kuris jungiasi prie kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus ir slopina angiogenezę. Tyrimai rodo, kad chemoterapijos derinimas su bevacizumabu prailgina pacienčių išgyvenamumą be ligos progresavimo [29]. 2015 metais Lietuvoje buvo svarstomas šio vaisto kompensavimo klausimas, tačiau Ligų, vaistinių preparatų ir medicinos pagalbos priemonių kompensavimo komisija nutarė, kad bevacizumabo klinikinė nauda abejotina, todėl kompensavimo prašymui nebuvo pritarta [30].

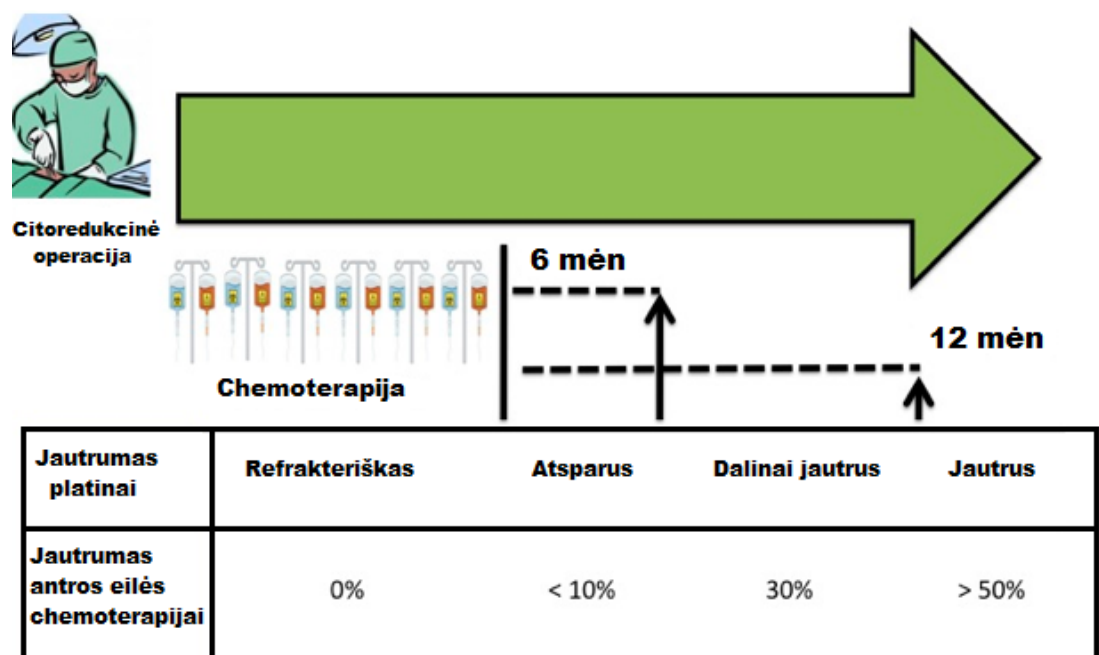
Nors karboplatinės ir paklitakselio derinys yra laikomas universaliu epitelinio kiaušidžių vėžio gydymo standartu, tačiau gydymo metu chemoterapiniai vaistai dažnai tampa neefektyvūs dėl išsivysčiusio vėžinių ląstelių atsparumo jiems. Platinai rezistentiškiems navikams taikoma paliatyvioji monoterapija skiriant paklitakselį/gemcitabiną/topotekaną/ifosfamidą, kai kuriais atvejais gydymą papildant bevacizumabu. Chemoterapijai atspariems navikams skiriamas gydymas prailgina pacienčių gyvenimo trukmę bei pagerina gyvenimo kokybę, tačiau paprastai ligos neišgydo, o tai lemia didelį sergančiųjų mirštamumą [4, 5, 27].

1.3. Atsparumo chemoterapijai problema ir priežastys

Viena svarbiausių išplitusio EKV gydymo problemų yra navikinių ląstelių atsparumas chemoterapijai, kuris lemia didelį pacienčių mirštamumą. Sergančiųjų jautrumas pirmos eilės chemoterapijai yra didelis ir siekia ~80 %, tik apie 10-15 % pacienčių nustatomas pirminis atsparumas chemoterapijai [31, 32]. Dažniausiai nustatomas atsparumas platinos preparatams. Ginekologinės onkologijos grupė (GOG) EKV jautrumą pirmos eilės platinos chemoterapijai suskirstė į kelias grupes, atsižvelgiant į laiko intervalą nuo gydymo pabaigos iki atkryčio (2 pav.): 1) Jei pacientas nereaguoja į platinos terapiją ir liga progresuoja gydymo metu ar per 4 sav. nuo jos pabaigos – platinai refrakteriškas kiaušidžių vėžys. Tai pirminis atsparumas platinos preparatams, siejamas su prasta prognoze bei trumpu išgyvenamumu; 2) Jei liga atsinaujino per 6 mėn nuo adjuvantinio gydymo pabaigos – platinai atsparus kiaušidžių vėžys. Išlieka labai nedidelė tikimybė, kad pacientas bus jautrus antros eilės platinos terapijai, todėl siejama su bloga prognoze; 3) Jei ligos recidyvas įvyko praėjus 6-12 mėn nuo gydymo platinos preparatais pabaigos – dalinai platinai jautrus kiaušidžių vėžys; 4) Jei liga atsinaujino po 12 mėn nuo adjuvantinio gydymo pabaigos – platinai jautrus kiaušidžių vėžys. Šiuo atveju tikimybė, kad pacientas bus jautrus antros eilės chemoterapijai yra >50 %. Nors pacienčių, sergančių išplitusiu EKV, jautrumas pirmos eilės chemoterapijai yra didelis, tačiau daugeliui sergančiųjų atkrytis įvyksta per 2 metus. Tolesnis gydymas platinos preparatais dažnai tampa neefektyvus dėl antrinio vėžinių ląstelių atsparumo chemoterapijai. Rezistentiškomis epitelinio kiaušidžių vėžio formoms kol kas efektyvaus gydymo nėra, todėl tai lemia didelį pacientų mirštamumą [4, 31, 32].

Šiuo metu yra pripažįstama, kad EKV atsparumą chemoterapijai lemia ne vienas, o daug skirtingų molekulinėlių mechanizmų. Naujausi tyrimai atskleidžia, kad žmogaus navikai turi nedidelį kiekį kamieninių ląstelių savybėmis pasižyminčių vėžinių ląstelių, kurios vadinamos vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis (VKL) ar vėžį skatinančiomis ląstelėmis. Jos gali neribotai

proliferuoti, atsinaujinti bei diferencijuotis į labiau specializuotas vėžines ląsteles. VKL geba išlikti ir regeneruoti navikinį audinį net po gydymo chemoterapija bei radioterapija, jei išlieka nedidelis šių ląstelių skaičius. Įprastinės terapijos citotoksiškai veikia pagrindines naviko ląsteles, o VKL išlieka atsparios ir vėliau suformuoja taikytai terapijai rezistentiškus navikinių ląstelių klonus [33-35]. Dabar žinoma keletas VKL atsparumo chemoterapijai mechanizmų: 1) vaistai pašalinami iš ląstelės taikinio per specialius membraninius baltymus – daugiavaisčio atsparumo transporterius, kurie pagal savo veikimo mechanizmą dar vadinami ABC transporteriais (*angl. ATP-Binding Cassette* t.y. nuo ATP priklausomos išmetimo pompos); 2) chemoterapiniai vaistai detoksikuojami sudarant konjugatus su glutationu, dėl to jie netenka savo aktyvumo ir yra pašalinami iš ląstelės; 3) VKL išvengia apoptozės dėl padidėjusios *Bmi-1* geno raiškos ir/arba nuslopintos geno *p53* veiklos; 4) vėžio progresavimo metu vėžinės epitelio ląstelės gali dediferencijuotis į gerokai atsparesnes, labiau invaziškas mezenchiminių ląstelių tipo ląsteles [35].



2 pav. Pacienčių gydymo atsakas į platinos terapiją remiantis GOG (adaptuota pagal [31])

Kiaušidžių vėžio ląstelės atsparumą chemoterapijai be dviejų anksčiau aprašytų mechanizmų – vaistų pašalinimo per ABC transporterius ir detoksikacijos, gali įgyti ir kitais būdais. Manoma, kad atsparumą paklitakseliui gali lemti pakitusi vaisto taikinio – β tubulino struktūra. Sumažėjęs vėžinių ląstelių jautrumas gydymui platinos preparatais yra siejamas su aktyvesne DNR reparacija. Be to, atsparumas chemoterapijai gali būti susijęs su padidėjusia tolerancija vaistų sukeltai pažeidai, o tai lemia mažesnę jautrumą apoptozei [36].

Klinikoje geriausiai onkologinių pacientų gydymo taktikai parinkti, gydymo efektyvumui įvertinti ir stebėti yra naudojami predikciniai biožymenys. Žymuo yra predikcinis, jeigu gydymo atsakas tarp tų žymenį turinčių ir neturinčių pacientų yra skirtingas. „Vėžio žymeniu gali būti bet kokia medžiaga, kurią gamina piktybinė ląstelė ar kaip atsaką į neoplaziją – gerybinė ląstelė, ir kurią galima išmatuoti organizmo skysčiuose ir audiniuose“ [37]. Klinikoje nėra patvirtintų kiaušidžių vėžio predikcinių žymenų, tačiau jų atradimas ir taikymas galėtų padėti atskirti chemoterapijai jautrias ir atsparias pacientes bei jau ligos pradžioje skirti efektyvų ir individualų gydymą.

1.4. Imuninė sistema ir vėžys

1.4.1. Naviko mikroaplinka

Pastaraisiais metais, kuriant vis naujas vėžio gydymo strategijas, daug dėmesio skiriama net tik vėžinėms ląstelėms, bet ir naviko stromai, kuri sudaro mikroaplinką. Stromą sudarančios ląstelės: imuninės sistemos ir uždegiminės ląstelės, fibroblastai, adipocitai, endotelio ir mezotelio ląstelės, mezenchiminės ląstelės, mezenchiminės kamieninės ląstelės darniai sąveikauja su vėžinėmis ląstelėmis, taip pat ir viena su kita. Manoma, kad mikroaplinka yra vienas pagrindinių veiksnių, darančių įtaką naviko augimui ir progresavimui bei lemiančių atsaką į gydymą. Stromos ląstelės gali būti atsakingos už chemoterapijai atsparaus fenotipo atsiradimą, nes pastarųjų išskiriami citokinai gali slopinti vėžinių ląstelių apoptozę. Nors naviko mikroaplinką sudarančios ląstelės nėra piktybinės, jos yra labai svarbios naviko išlikimui, todėl yra potencialus priešvėžinių vaistų taikiny [6, 7]. Vienos svarbiausių naviko stromos ląstelių yra imuninės ląstelės. Daugėja įrodymų, kad imuninė naviko mikroaplinka yra galimas prognostinis arba predikcinis veiksnys, taip pat taikiny vienam iš pažangiausių gydymų – imunoterapijai [6, 7, 38].

1.4.2. T limfocitų svarba kiaušidžių vėžio vystymuisi

Imuninė sistema yra svarbi kiaušidžių vėžio patogenezei, ligos progresavimui ir bendram išgyvenamumui. Vėžinės ląstelės skiriasi nuo normalių organizmo ląstelių, todėl gali būti atpažintos imuninės sistemos ir sunaikintos. Tačiau dažnai pakitusios ląstelės randa būdą „pasislėpti“ nuo imuninės sistemos ir išvengti imuninio atsako. Organizmo apsaugai nuo navikų didelę reikšmę turi ląstelinis imunitetas. Imuninį atsaką į vėžio vystymąsi atspindi naviką infiltruojančių limfocitų (NIL) skaičius [38]. Tiriant pacientes, sergančias III ir IV stadijos EKV,

nustatyta, kad didesnis naviką infiltruojančių T limfocitų (NITL) (CD3+) skaičius koreliuoja su geresne klinicine išėjimu ir didesniu išgyvenamumu. Pacientams, kurioms buvo taikyta chirurgija ir chemoterapija platinos junginiais, penkių metų išgyvenamumas siekia 73.9 % esant NITL ir 11.9 % nesant NITL [8, 39].

Vėlesni duomenys rodo, kad EKV sergančių pacienčių ligos prognozė priklauso nuo NIL dominuojančios subpopuliacijos. Sato ir kolegos nustatė, kad išgyvenamumas geresnis tų pacienčių, kurioms yra nustatomas didesnis infiltruojančių CD8+ limfocitų skaičius [40, 41]. Naujausi tyrimai atskleidė, kad aktyvinti CD8+ slopina fibroblastų nulemtą atsparumą platinos chemoterapijai išskirdami interferomą gama (IFN- γ). Tai rodo, kad ši limfocitų subpopuliacija gali turėti ne tik prognostinę, bet ir predikcinę vertę [42]. Duomenys apie naviką infiltruojančius CD4+ limfocitus yra kontroversiški. Vieni autoriai teigia, kad jie neturi įtakos EKV sergančių pacientų išgyvenamumui, tačiau didesnis CD8+/CD4+ santykis turi teigiamą prognostinę vertę. Kiti autoriai teigia, kad didesnis infiltruojančių CD4+ T limfocitų skaičius lemia geresnę pacienčių išgyvenamumą [40, 41]. Žinoma, kad CD4+ yra heterogeninė populiacija, sudaryta iš T pagalbininkų (Th1, Th2, Th17) bei T reguliacinių limfocitų (Treg), kurie veikia priešingai [8]. Todėl duomenų kontroversiškumas gali būti susijęs su tikslesniu CD4+ populiacijos identifikavimu.

Didesnis naviką infiltruojančių ir periferiniame kraujyje esančių Treg skaičius yra siejamas su blogesne klinicine prognoze kiaušidžių, krūties, skrandžio vėžio atvejais. Treg yra nedidelė T ląstelių subpopuliacija, kurių pagrindinė funkcija yra imuninio atsako slopinimas. Jie palaiko imuninę toleranciją nuosaviems antigenams blokuodami aktyvintų T ląstelių funkciją. Sergant vėžiu Treg slopina priešnavikinį imuninį atsaką ir taip skatina naviko progresavimą [9, 43, 44]. Treg slopina imuninį atsaką keliais būdais: a) tiesiogiai žudydami citotoksinius T limfocitus naudojant perforinus/granzinus ar per Fas/Fas ligandą; b) slopindami citotoksinių limfocitų išskiriamų citokinių, ypač IL-2, gamybą; c) tiesiogiai išskirdami imunomoduliuojančius citokinus, ypač TGF- β ir IL-10; d) sutrikdydami T efektorių funkcijas slopinant jų metabolinį aktyvumą; e) slopindami dendritinių ląstelių gebėjimą aktyvinti efektorinius T limfocitus [9, 45].

Šiuo metu jau yra žinomos kelios Treg subpopuliacijos: CD4+ Treg ir CD8+ Treg. Geriausiai ištirti yra CD4+ Treg. Pastarieji yra skirstomi į indukuotus Treg su variabilia CD25 raiška ir natūraliai atsiradusius CD4+CD25+FOXP3+ limfocitus [8, 43, 44, 46]. Tyrimai rodo, kad didesnis naviką infiltruojančių CD4+CD25+FOXP3+ limfocitų skaičius bei padidėjusi *FOXP3* geno raiška susiję su blogesne ligos prognoze ir išgyvenamumu. Be to, didesnis CD8+/CD4+CD25+FOXP3+, CD8+/CD4+CD25+FOXP3- santykis turi teigiamą prognostinę vertę [40, 43, 44, 47]. Didesnis CD4+ Treg nustatomas išplitusiu EKV sergančių pacienčių

periferiniame kraujyje ir teigiamai koreliuoja su ligos stadija [48]. CD8+ Treg yra neseniai atrasta Treg subpopuliacija. Naujausi tyrimai rodo, kad pacientams, sergančioms pirminiu kiaušidžių vėžiu, nustatomas didesnis naviką infiltruojančių ir periferiniame kraujyje esančių CD8+FOXP3+ limfocitų skaičius. Didesnis naviką infiltruojančių CD8+FOXP3+ limfocitų skaičius nustatytas pacientams, sergančioms pažengusiu (III – IV stadijos) kiaušidžių vėžiu nei ankstyvose ligos stadijose (I – II). *In vitro* tyrimai rodo, kad CD8+ Treg taip pat pasižymi imunosupresinėmis savybėmis, nes slopina CD4+ naiviųjų limfocitų proliferaciją (per TGF- β 1 ir IFN- γ), taip stabdydami priešvėžinį imuninį atsaką ir skatindami naviko progresavimą [46]. Remiantis gautais tyrimų rezultatais galima tikėtis, kad Treg funkcijos slopinimas gali būti vienas iš būdų padidinti priešvėžinį imuninį atsaką.

1.4.3. Citokinų reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi

Citokinai – tirpios tarpląstelinės sąveikos molekulės, kurios reguliuoja hemopoezės, uždegimo, imuninių, taip pat ir vėžinių ląstelių, proliferaciją, diferenciaciją, brendimą, migraciją, funkcinį aktyvumą bei apoptozę. Juos gamina ir išskiria aktyvintos imuninės sistemos ląstelės (makrofagai, B ir T limfocitai, putliosios ląstelės), naviko stromos ląstelės (fibroblastai, endotelio ląstelės). Be to, kai kuriuos citokinus gali sintetinti pačios navikinės ląstelės. Citokinai yra heterogeninės molekulės, kurios gali būti skirstomos į interleukinus, interferonus, chemokinus, navikų nekrozės faktorius, augimo ir kolonijas stimuliuojančius faktorius [10, 49]. Naviko mikroaplinkoje esantys citokinai gali ne tik slopinti, bet ir skatinti vėžinių ląstelių dalijimąsi bei ligos vystymąsi [10, 49]. Tyrimai rodo, kad EKV progresavimas yra susijęs su padidėjusia uždegiminių citokinų sinteze ir sekrecija. Pastarieji skatina vėžinių ląstelių proliferaciją, naviko angiogenezę, metastazavimą į kitus organus [10]. Daugėja įrodymų, kad naviko mikroaplinkos ląstelių išskiriami citokinai gali parakriniškai veikti vėžines ląsteles bei aktyvinti signalinius kelius, kuriais šios ląstelės gali prisidėti prie atsparumo chemoterapiniams vaistams įgijimo. Todėl citokinai gali būti ne tik puikus prognostinis, bet ir predikcinis vėžio žymuo. Kiaušidžių navikai yra gerai aprūpinti krauju, todėl citokinų kiekio pokyčiai gali būti nustatomi pacienčių periferiniame kraujyje [11]. Citokinų reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi pateikiama lentelėje Nr. 1.

1 lentelė. Citokinių reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi. ↑ - skatina/didina, ↓ - slopina/mažina.

| Citokinas | Citokino funkcija | Kilmė | Reikšmė |
|---|---|---|---|
| CCL2/MCP-1 | Monocitų/makrofagų migracijos ir infiltracijos reguliacija. | Monocitai/makrofagai, epitelio, endotelio, lygiųjų raumenų ląstelės, fibroblastai . | ↑ jautrumas chemoterapijai, išgyvenamumas be ligos progresavimo, ↓ invazija [50]; ↑ naviko augimas, progresavimas, vėžio ląstelių invazija, adhezija, angiogenezė [51]; ↑ atsparumas chemoterapijai [52]. |
| CCL5/RANTES | ↑ T limfocitų, makrofagų, eozinofilų, bazofilų migracija į uždegimo židinį; NK ląstelių aktyvinimas. | T limfocitai, NITL, kiaušidžių VKL, monocitai/makrofagai, trombocitai, fibroblastai, epitelio ląstelės. | ↑ VKL migracija, invazija, metastazavimas; teigiamai koreliuoja su ligos stadija [53]. |
| CXCL10/IP-10 | ↑ monocitų/makrofagų, aktyvintų T limfocitų, NK ląstelių migracija į uždegimo vietą; T limfocitų adhezija prie endotelio paviršiaus. | Pirminės EKV ląstelės, monocitai/makrofagai, neutrofilai, dendritinės, endotelio ląstelės, fibroblastai. | ↓ progresavimas, angiogenezė, ↑ NITL; teigiama koreliuoja su išgyvenamumu [54]. |
| CCL11/ Eotaksinas 1 | ↑ eozinofilų, bazofilų, Th2 limfocitų chemotaksis, dalyvavimas alerginėse reakcijose. | Epitelio, EKV ląstelės, lygiųjų raumenų, dendritinės ląstelės, fibroblastai. | ↑ EKV ląstelių proliferacija ir migracija; neigiamai koreliuoja su išgyvenamumu be ligos progresavimo [55]. |
| CCL3/MIP-1α ir CCL4/MIP-1β | ↑ monocitų/makrofagų, dendritinių ląstelių, T limfocitų migracija į uždegimo židinį (CCL3, CCL4); ↑ uždegiminių citokinių sekrecija, putliųjų ląstelių degranuliacija; NK ląstelių aktyvinimas (CCL3); | Monocitai/makrofagai, T ir B limfocitai. | Koncentracija sergančiųjų kraujo serume nustatoma ↓ nei sveikų asmenų [56]. |
| CXCL9/MIG | ↑ aktyvintų T limfocitų, NK ląstelių migracija į infekcijos ir uždegimo vietą. | EKV ląstelės, monocitai/makrofagai, T limfocitai, NK ir dendritinės ląstelės, eozinofilai, endotelio ląstelės, fibroblastai . | ↓ angiogenezė ir kiaušidžių vėžio progresavimas; ↑ NITL; teigiamai koreliuoja su išgyvenamumu [54]. |
| CCL17/TARC | ————— | ————— | Reikšmė kiaušidžių vėžiui nenustatyta. |
| CCL20/MIP-3α | ————— | ————— | Reikšmė kiaušidžių vėžiui nenustatyta. |

| Citokinas | Citokino funkcija | Kilmė | Reikšmė |
|-------------------------------------|--|--|--|
| CXCL5/ENA-78 | ↑ neutrofilų migracija į uždegimo vietą bei jų aktyvinimas. | Monocitai/makrofagai, eozinofilai, endotelio, epitelio, lygiųjų raumenų ląstelės. | ↑ angiogenezė, naviko augimas, metastazavimas [54]. |
| CXCL1/GROα | ↑ neutrofilų migracija į uždegimo vietą. | Monocitai/makrofagai, neutrofilai, epitelio ląstelės, fibroblastai. | ↑ naviko augimas ir progresavimas [57]. |
| CXCL11/I-TAC | ↑ aktyvintų T limfocitų, NK ląstelių chemotaksis. | EKV ląstelės, NK ląstelės, limfocitai. | ↓ angiogenezė [54]. |
| IL-8/CXCL8 | ↑ neutrofilų, bazofilų, T limfocitų migracija į uždegimo vietą; neutrofilų aktyvinimas. | EKV ląstelės, T limfocitai, monocitai/makrofagai, neutrofilai, endotelio, epitelio ląstelės, fibroblastai. | ↑ naviko augimas ir progresavimas; teigiamai koreliuoja su trumpesniu išgyvenamumu [58]. ↑ atsparumas chemoterapijai [59]. |
| IFN-γ | ↑ imuninis atsakas į virusus, navikus; makrofagų aktyvinimas; ↑ MHC I ir II klasės molekulių raiška; ↑ imunoglobulinų sekrecija. | T limfocitai, NIL, NK ląstelės. | ↓ EKV ląstelių proliferacija ir ↑ jų apoptozė; Gydant IFN- γ + cisplatina ↑ pacienčių išgyvenamumas be ligos progresavimo [60]. ↓ atsparumas platinos chemoterapijai [42]. |
| IL-1α | ↑ CD4+ T limfocitų, B limocitų proliferacija; ↑ IL-2 gamyba; ↑ NK ląstelių sąveika su vėžinėmis ląstelėmis. | Monocitai/ makrofagai, epitelio ląstelės, dendritinės ląstelės, fibroblastai. | ↑ priešvėžinis imuninis atsakas [49, 61]. |
| G-CSF | ↑ granulocitų gamyba kaulų čiulpuose. | Monocitai/makrofagai, fibroblastai, endotelio, kaulų čiulpų stromos ląstelės. | Gydant G-CSF + platinos ir paklitaselio chemoterapija ↑ pacienčių išgyvenamumas [62]. |
| PAI-1/Serpinas E1 | ↓ fibrinolizės procesas; dalyvavimas žaizdų gijime; ląstelių proliferacijos, migracijos, adhezijos reguliacija. | Endotelio ląstelės. | ↑ naviko augimas ir progresavimas; ↑ raiška teigiamai koreliuoja su trumpesniu išgyvenamumu [63]. |
| CD40 L | ↑ Makrofagų, endotelio, dendritinių ląstelių aktyvinimas. ↑ T, B limfocitų aktyvinimas ir diferenciacija, imunoglobulinų sintezė. | T, B limfocitai, makrofagai, NK ląstelės, trombocitai, bazofilai, putliosios ląstelės. | ↑ priešvėžinis imuninis atsakas [64]. |

1.5. Personalizuota vėžio medicina

Personalizuota medicina yra sparčiai besivystanti sveikatos priežiūros sritis, kuri leidžia kiekvienam pacientui atskirai parinkti optimalų gydymo metodą atsižvelgiant į jo individualius bruožus. Ši medicinos kryptis pagrįsta individualaus paciento klinicine, genetinė ir aplinkos informacija. Tokia į kiekvieną pacientą orientuota medicina yra labai svarbi onkologijoje, kuri siekia ne tik laiku nustatyti ligą, bet ir parinkti efektyvų ir kuo mažiau toksišką gydymą, numatyti ligos eigą bei gydymo prognozę. Todėl personalizuotos vėžio medicinos vystymuisi labai svarbi naujų diagnostinių, prognostinių bei predikcinių biožymenų paieška [65].

Vėžys yra heterogeninė liga, tarp pacientų besiskirianti histologiniu, molekulinio profiliu, naviko mikroaplinką sudarančiu ląstelių tipu, todėl dažnai tos pačios ligos eiga, atsakas į gydymą yra skirtingas. Tyrimai parodė, kad 20-25 % krūties vėžiu sergančių pacienčių turi padidėjusią *HER2* geno, reguliuojančio ląstelių proliferaciją, raišką. Tokioms pacientėms standartinė chemoterapija yra derinama su trastuzumabu – IgG1 monokloniniu antikūnu nukreiptu prieš *HER2*. Taikant šį gydymo metodą sumažėjo pacienčių mirštamumas bei atkryčio dažnis. Kiti tyrimai atskleidė, kad 66 % piktybine melanoma sergančių pacientų turi *BRAF V600E* onkogeno mutaciją, kuri siejama ne tik su bloga išgyvenimo prognoze, bet ir lemia sumažėjusį atsaką į chemoterapiją. Todėl šiems pacientams yra skiriamas gydymas vemurafenibu – B-Raf fermento inhibitoriumi. Tokios personalizuotos terapijos taikymas lyginant su standartiniu gydymu sumažino pacientų mirštamumą 63 % bei 74 % sumažino ligos progresavimą lyginat su negydomais IIIC/IV stadijos pacientais [65]. Įvairių tyrimų rezultatai rodo, kad navikai skiriasi molekulinio lygiu, todėl predikcinių biožymenų nustatymas yra labai svarbus jau ligos pradžioje siekiant parinkti tinkamą gydymo taktiką bei sumažinti pacientų mirštamumą.

Klinikoje nėra patvirtintų kiaušidžio vėžio predikcinių žymenų, kurie galėtų padėti suskirstyti pacientes į chemoterapijai jautrias ir atsparias. Jų atradimas leistų jau ligos pradžioje skirti individualų bei efektyvų gydymą ir sumažinti pacienčių mirštamumą. Klinikiniai tyrimai atskleidė, kad skiriant bevacizumabą kartu su chemoterapija (paklitakseliu, topotekanu ar pegiliuotu liposominiu doksorubicinu) pacientėms, sergančioms platinai atspariu EKV, statistiškai reikšmingai pagerėja jų išgyvenamumas be ligos progresavimo lyginant su pacientėmis, kurioms buvo skiriama vien tik chemoterapija [30]. Be to, platinai atsparių ir jautrių pacienčių atskyrimas galėtų padėti apsaugoti moteris nuo nereikalingo toksiško vaistų poveikio ir neveiksmingo gydymo.

Epitelinio kiaušidžių vėžio predikcinių biožymenų paieška atveria erdvę fundamentiniams tyrimams, kuriais galima atrasti naujas atsparumo chemoterapiniams vaistams rūšis bei geriau suprasti įgimtą imunitetą.

Pacienčių išskirstymas į chemoterapijai jautrias ir atsparias yra svarbus geresnio kiaušidžių vėžio gydymo paieškai ir naujiems klinikiniam tyrimams. Visoms pacientėms, sergančioms EKV, jau daugiau nei 20 m. taikoma ta pati gydymo strategija: citoredukcinė operacija ir chemoterapija platinos bei taksanų deriniu. Žinant, kad kiaušidžių vėžys yra heterogeninė liga, besiskirianti tarp pacienčių histologiniu, molekulinu, imuniniu profiliu, galima tikėtis, kad tos pačios rūšies gydymas nebus veiksmingas visoms pacientėms. Be to, atsparumo chemoterapijai mechanizmai taip pat yra skirtingi. Todėl šiuo metu daug dėmesio skiriama imuninei naviko mikroaplinkai, kuri yra svarbi vėžio vystymuisi. Imuninių predikcinių biožymenų atradimas, leidžiantis atskirti chemoterapijai jautrias ir atsparias pacientes, atveria kelią naujam pažangiam gydymui – imunoterapijai.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Pacienčių atrankos kriterijai

Tyrimui buvo atrinktos 33-76 m. I, III, IV stadijos EKV sergančios pacientės, kurioms po operacijos buvo taikyta chemoterapija platinos ir taksanų deriniu. Visos tirtos pacientės davė informuotą sutikimą naudoti prieš operaciją paimtą periferinį kraują ir operacijos metu gautą navikinę medžiagą *ex vivo* tyrimams. Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas pritarė biomedicininis tyrimų vykdymui, bioetikos leidimo Nr. 158200-06-500-147 (išduotas 2012 06 12).

Tyrimo negalėjo dalyvauti pirminiu kiaušidžių vėžiu sergančios pacientės, kurios sirgo nestabiliomis, gyvybei pavojingomis širdies ir kraujagyslių, kvėpavimo, virškinimo, urogenitalinės, endokrininės sistemų, metabolinėmis ir hematologinėmis ligomis, kurios galėjo turėti įtakos ligonio prognostinio išgyvenamumo stebėjimui. Taip pat į tyrimą nebuvo įtrauktos pacientės, sergančios ūmiomis sunkiomis infekcinėmis ligomis, autoimuninėmis ligomis ir/ar per paskutinius penkerius metus sirgusios kitos lokalizacijos piktybiniu naviku (NVI klinikinės studijos protokolas III – 2012 -2).

2.2. *Ex vivo* tyrimo schema

Iš Nacionalinio vėžio instituto (NVI) Onkochirurgijos centro buvo gaunama patologų verifikuota pirminiu kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių navikų medžiaga bei jų periferinis kraujas (po 2 ml į mėgintuvėlius su K₂EDTA). Taip pat surenkama informacija apie pacientėms taikytą gydymą bei jo efektyvumą. Tyrimo dalyvavo 36 I, III, IV stadijos EKV sergančios pacientės, kurios atsižvelgiant į jautrumą pirmos eilės platinos chemoterapijai buvo suskirstytos į dvi grupes: 15 jautrių ir 21 atspari.

Ex vivo tyrimams buvo naudojami pacienčių periferinis kraujas ir kraujo serumas, naviko audinys bei jo lizatas. Naviko lizatas gaunamas mechaniškai smulkinant ~30 mg navikinės medžiagos užpylus 400 μl lizės buferio. Po to mėginiai dedami į centrifugą (ALC Refrigerated centrifuge PK 120 R, Italija) ir centrifuguojami 15 min 15000 g, nusiurbiamas supernatantas, kuris ir yra naviko lizatas. Serumai buvo atskirti centrifuguojant pacienčių periferinį kraują 10 min 1000g.

Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti galimus imuninių parametrų skirtumus tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių bei įvertinti potencialią šių parametrų predikcinę reikšmę. Pacienčių periferinis kraujas buvo tiriamas siekiant įvertinti supresinių/citotoksinių

limfocitų populiacijas tėkmės citotometriniu metodu. Naviko fragmento lizatas bei kraujo serumas buvo naudojami pamatuoti uždegiminių citokinų koncentraciją bei galimus jų skirtumus tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių. Užšaldyti kiaušidžių naviko mėginiai buvo naudojami informacinės ribonukleorūgšties (iRNR) išskyrimui, siekiant tikrojo laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu (TL-PGR) įvertinti pasirinktų, su imunine sistema susijusių, genų raiškos skirtumus tarp grupių.

2.3. Tėkmės citometrija

Principas. Tėkmės citometrija – tai dalelių analizės metodas, leidžiantis įvertinti jų fizikines savybes. Tėkmės citometras yra sudėtingas nedidelių dalelių tėkmėje analizatorius, sudarytas iš hidrodinaminės, optinės ir elektroninės sistemų. Į didelio skersmens nešančiojo skysčio srovės vidurį išvirkščiai dalelių suspensija yra nukreipiama į piltuvą, kuris siaurėjant išrikiuoja daleles skystoje suspensijoje viena paskui kitą ir be turbulencijos nukreipia į tyrimo tašką. Šis procesas yra vadinamas hidrodinaminio suspensijos srauto fokusavimo efektu. Tyrimo taške dalelių dydžiui nustatyti buvo pritaikyti priekinės šviesos sklaidos (PŠS), o informacijai apie vidinės struktūros sudėtingumą apibūdinti – šoninės šviesos sklaidos (ŠŠS) principai. Šviesos šaltiniu naudojami monochromatinės šviesos (dažniausiai mėlynos (488 nm), raudonos (633 nm), violetinės (405 nm) spalvų) lazeriai, kurių spindulį kerta vorele išrikiuotos dalelės. Jos pasižymi skirtingu dydžiu, išorinių ir vidinių struktūrų sudėtingumu, todėl išsklaido šviesos spindulius į skirtingas puses. Daugiau informacijos apie ląstelių vidaus ir išorės struktūras suteikia dažymas flouorochromais. Tai medžiagos, kurios susijungę su specifinėmis ląstelių struktūromis, sugeria mažesnio bangos ilgio monochromatinę šviesą, o patys išspinduliuoja didesnio bangos ilgio šviesą. Šviesos sklaidą ir fluorochromų emisiją užfiksuoja detektoriai. Pastarieji šviesos signalus verčia elektriniais signalais ir juos išsaugo kompiuteryje [66].

Mėginių paruošimas analizei. Tyrimui pasirošiami 6 mėgintuvėliai, kurių vienas skirtas nedažytai kontrolei, o likusieji kraujo ląstelių žymėjimui skirtingais monokloninių antikūnų, konjuguotų su fluoroforais, deriniais: CD25-FITC/FoxP3-PE/CD4-PerCP, CD57-FITC/FoxP3-PE/CD8-PerCP, perforinas-PE/CD8-PerCP, IgG1-FITC/IgG1-PE/CD4-PerCP, IgG1-FITC/IgG1-PE/CD8-PerCP (2 lentelė). CD4, CD8, CD25 ir CD57 yra ląstelių paviršiaus, o FoxP3 ir perforinas – vidudulasteliniai žymenys. IgG1-FITC ir IgG1-PE žymenys buvo naudojami kaip izotipinė kontrolė, siekiant nustatyti nespecifinį monokloninių antikūnų jungimąsi su įvairiomis ląstelėje esančiomis molekulėmis.

Pirmiausia kraujo ląstelės yra žymimos antikūnais prieš ląstelių paviršiaus žymenis. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 50 μl kraujo ir inkubuojama su 5 μl paviršiaus antikūnų 15-20

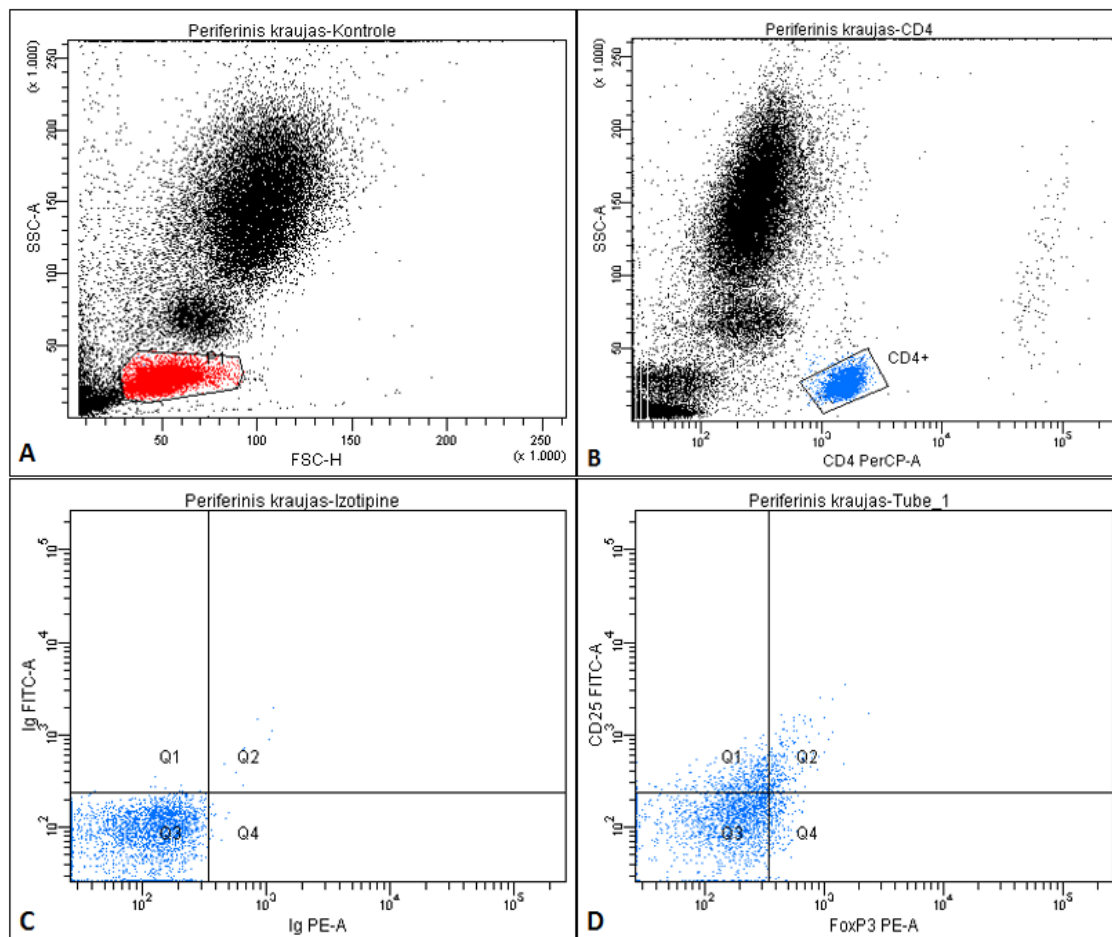
min kambario temperatūroje, tamsoje. Tada įpilama 1 ml eritrocitus lizuojančio tirpalo ir inkubuojama 10 min kambario temperatūroje, tamsoje. Po inkubacijos mėgintuvėliai centrifuguojami 7 min 250 g greičiu. Supernatantas atsargiai nupilamas, ląstelės nusausinamos ir švelniai supurtomos purtykle (Biosan Vortex V-1 plus, Latvija). Ant ląstelių užpilama 1 ml fosfatinio buferio ir vėl centrifuguojama 7 min tokiomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas atsargiai nupilamas, ląstelės nusausinamos ir supurtomos. Tuomet kraujo ląstelės yra žymimos antikūnais prieš viduląstelinius žymenis. Į mėgintuvėlius įpilama po 500 μl fiksavimo/permeabilizavimo buferinio tirpalo ir inkubuojama 30 min kambario temperatūroje, tamsoje. Po inkubacijos ląstelės praplaunamos 1 ml permeabilizacijos buferiu ir centrifuguojama 7 min įprastomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės inkubuojamos su 5 μl viduląstelinių antikūnų 30 min kambario temperatūroje, tamsoje. Po inkubacijos, ląstelės praplaunamos 1 ml permeabilizacijos buferiu ir centrifuguojama 7 min 250 g greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, ant ląstelių užpilama 300 μl buferinio plovimo tirpalo ir tiriama tėkmės citometru.

2 lentelė. Tyrime naudotų monokloninių antikūnų, kojuguotų su fluoroforais, deriniai.
FITC - fluoresceino izotiocianatas, PE - fikoeritrinas, PerCP - peridininio chlorofilo baltymas.

| Antikūnas | Fluoroforas | Izotipas | Gamintojas |
|-----------------|-------------|----------|-------------------------------|
| Anti-CD4 | PerCP | IgG2b | EXBIO, Čekija |
| Anti-CD8 | PerCP | IgG2a | Santa Cruz Biotechnology, JAV |
| Anti-CD25 | FITC | IgG1 | BD Biosciences, JAV |
| Anti-CD57 | FITC | IgG1 | BD Biosciences, JAV |
| Anti-FoxP3 | PE | IgG1 | Bioscience, JAV |
| Anti-Perforinas | PE | IgG2b | Santa Cruz Biotechnology, JAV |
| IgG1 | FITC | IgG1 | BD Bioscience, JAV |
| IgG1 | PE | IgG1 | BD Bioscience, JAV |

Duomenų analizė. Pacienčių periferinio kraujo ląstelės buvo analizuotos BD™ LSRII tėkmės citometru (BD Biosciences, JAV) ir BD FACSDiva kompiuterine programa. Pirmiausia kontrolinio mėginio taškinėje diagramoje skyrikliu (*angl. gate*) yra apibrėžiama limfocitų populiacija. Limfocitai nuo kitų periferinio kraujo leukocitų atskiriami pagal PŠS ir ŠŠS – jie yra maži pagal dydį ir žemo granuliuotumo. Atskirta limfocitų populiacija pažymima P1 (3 pav. A). Atidaromas naujas langas, kuriame ląstelės yra pasiskirsčiusios pagal ŠŠS ir CD4, taip pat kitas langas – ŠŠS ir CD8. Apibrėžiamos CD4+ ir CD8+ limfocitų populiacijos (3 pav. B), kurios yra svarbios vertinant kitų žymenų raišką. Tiriant skirtingų antikūnų deriniais pažymėtas limfocitų populiacijas (CD25-FITC/FoxP3-PE/CD4-PerCP, CD57-FITC/FoxP3-PE/CD8-PerCP, perforinas-PE/CD8-PerCP), atidaromas langas, kuriame vertinama dviejų fluorochromų fluorescencija (3 pav. D). Taškinėje diagramoje uždedamas dvimatis skyriklis (*angl. quadrant*

gate), kuris ją dalina į 4 regionus: Q1, Q2, Q3, Q4. Dvimatis skyriklis nekoreguojamas, jis uždedamas pagal izotipinę kontrolę (3 pav. C). Jei ląstelės dėstosi Q1 arba Q4 regione, jos turi tik vieną iš dviejų žymenų. Jei ląstelės dėstosi Q3 regione, jos neturi abiejų žymenų, o jei Q2 regione – ląstelės yra teigiamos pagal abu žymenis.



3 pav. Tėkmės citometro duomenų analizė FACSDiva kompiuterine programa. A - paveikslas vaizduoja periferinio kraujo ląstelių pasiskirstymą pagal PŠS ir ŠŠS, apibrėžta limfocitų populiacija (P1); B – vaizduoja ląstelių pasiskirstymą pagal ŠŠS ir CD4, apibrėžta CD4+ limfocitų populiacija; C - izotipinė kontrolė; D - ląstelių pasiskirstymas pagal du žymenis (CD25, FoxP3).

2.4. Citokinių gardelė

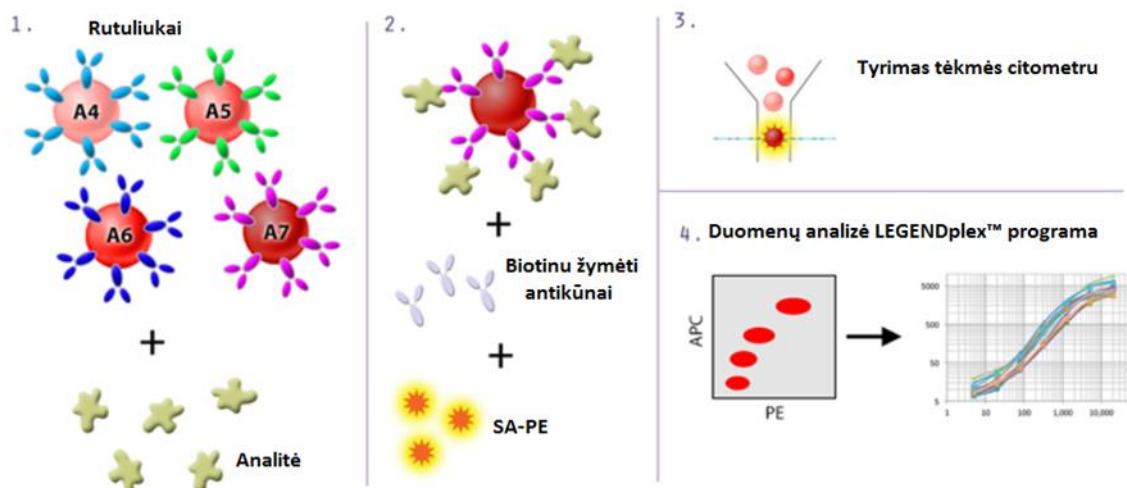
Principas. Tyrimas skirtas nustatyti 36 citokinių santykinį kiekį žmogaus biologiniuose mėginiuose taikant antigeno ir antikūno sąveiką (priedas Nr.1). Eksperimente naudojama nitroceliuliozinė membrana, kuri tam tikruose taškuose yra padengta citokinui specifiniais antikūnais. Reakcijai išryškinti naudojami biotinu žymėti antikūnai, prie kurių jungiasi streptavidinas, konjuguotas su fermentu krienų peroksidaze. Pastaroji katalizuoja chemoluminescencinę reakciją. Sugeneruota šviesa užregistruojama specialiu skaitytuvu. Šviesos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas santykiniam citokino kiekiui mėginyje.

Mėginių paruošimas analizei. Eksperimentui alikti buvo naudojamas R&D SYSTEMS Proteome Profiler rinkinys „Human Cytokine Array Kit, Panel A“ (katalogo Nr. ARY005B). Rinkinio apimtis – 4 mėginiai. Siekiant atrinkti svarbiausius citokinus tolesniems kiekybiniam tyrimams, iš abiejų (jautrios ir atsparios) pacienčių grupių buvo parinkta po 4 atsitiktines pacientės, kurių mėginiai lygiomis dalimis sudėti į vieną bandinį – kraujo serumas pagal tūrį, naviko lizatas pagal bendrą baltymų koncentraciją. Bendra baltymų koncentracija naviko lizate pamatuota spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, JAV). Procedūra buvo atliekama pagal gamintojo nurodytą protokolą. Tyrimui buvo naudojamos 4 nitroceliuliozinės membranos, kurių kiekviena panardinama į 2 ml inkubacijos buferio ir inkubuojama 1 val. ant horizontalios purtyklės (Stuart mini gyro-rocker SSM3, UK). Kol plokštelės inkubuojamos, pasiruošiami 4 mėgintuvėliai, į kiekvieną jų įpilama 1 ml serumo/lizato, 500 μl buferio ir 15 μl aptikimo antikūnų. Sumaišoma ir inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos nuo membranos nusiurbiamas buferis, užpilama mėginio ir aptikimo antikūnų mišinio, inkubuojama 2-8 °C temperatūroje per naktį, purtant. Po inkubacijos membranos tris kartus plaunamos 20 ml buferiniu plovimo tirpalu. Membranos nusausinamos, įdedamos į skaitytuvą (LI-COR C-DiGit Blot Scanner 3600, JAV) ir ant kiekvienos jų užpilama 2 ml krienu peroksidazės substrato mišinio. Chemoluminescencinės reakcijos metu išsiskyrusi šviesa užregistruojama skaitytuvu.

Duomenų analizė. Naudojant ImageJ programą įvertinamas pikselių tankis nuskaitytoje membranoje ir gauti duomenys apdorojami Microsoft Excel programa.

2.5. Žmogaus uždegiminių chemokinių tyrimas

Principas. Tyrimas skirtas įvertinti 13 uždegiminių chemokinių koncentraciją žmogaus biologiniuose mėginiuose taikant tėkmės citometrinį metodą. Tyrime naudojami rutuliukai, kurių paviršiuje yra prijungti analizei specifiniai antikūnai. Rutuliukai skiriasi savo dydžiu ir vidiniu fluorescencijos intensyvumu. Pagal dydį rutuliukai skirstomi į dvi grupes: mažesnę A ir didesnę B, kurių kiekviena gali būti atskirta pagal PŠS ir ŠŠS. Pagal vidinį fluorescencijos intensyvumą (alofikocianino (APC) kiekį) A grupė skirstoma į 6 populiacijas (IL-8, IP-10, CCL11, TARC, MCP-1, RANTES), o B grupė į 7 populiacijas (MIP-1 α , MIG, ENA-78, MIP-3 α , GRO α , I-TAC, MIP-1 β). Chemokino ir jam specifinio antikūno, esančio rutuliuko paviršiuje, reakcijai išryškinti naudojami antriniai antikūnai žymėti biotinu. Prie pastorojo jungiasi streptavidinas konjuguotas su fluoroforu fikoeritrinu (SA-PE). Lazeriu apšvietus fluoroforą, jis yra sužadinamas, o išsiskyrusi šviesa išmatuojama tėkmės citometro detektoriuose (4 pav.) [67].



4 pav. Žmogaus uždegiminių chemokinių tyrimo principas (adaptuota pagal [67])

Mėginių paruošimas analizei. Tyrimui atlikti buvo naudojamas BioLegend's LEGENDplex™ rinkinys „Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)“ (katalogo Nr. 740003). Uždegiminių chemokinių koncentracija buvo matuojama pacienčių kraujo serume bei naviko lizate. Eksperimentui buvo naudojamos 96 šulinėlių plokštelės. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 25 µl buferio, 25 µl mėginio, 25 µl rutuliukų mišinio, 25 µl aptikimo antikūnų. Plokštelė uždengiama aliuminio folija siekiant ją apsaugoti nuo tiesioginių saulės spindulių ir inkubuojama 2 val kambario temperatūroje ant horizontalios purtyklės (~600 aps/min). Po inkubacijos į kiekvieną šulinėlį įpilama 25 µl SA-PE, vėl uždedama aliuminio folija ir inkubuojama 30 min tomis pačiomis sąlygomis purtant. Po to plokštelė centrifuguojama 5 min 1000 g, supernatantas atsargiai pašalinamas pipete. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 200 µl buferinio plovimo tirpalo ir suspenduojama. Plokštelė centrifuguojama 5 min 1000 g, supernatantas atsargiai nusiurbiamas. Tada vėl į šulinėlį įpilama 200 µl buferinio plovimo tirpalo, suspenduojama ir tiriama BD LSRII tėkmės citometru.

Duomenų analizė. Duomenys buvo analizuojami BioLegend's LEGENDplex kompiuterine programa. Gauti rezultatai yra vertinami naudojant kalibracinę kreivę, kuri gaunama matuojant skirtingos koncentracijos standartinių tirpalų šviesos emisiją. Šiuo atveju procedūra yra tokia pati, tik vietoj mėginio yra dedami standartiniai tirpalai. Duomenys buvo apdorojami naudojant Microsoft Excel programą.

2.6. IFN- γ koncentracijos nustatymas tėkmės citometriniu metodu

Principas. IFN- γ koncentracijos žmogaus biologiniuose mėginiuose nustatymo principas yra analogiškas žmogaus uždegiminių chemokinių tyrimo principui, aprašytam 2.5. skyriuje.

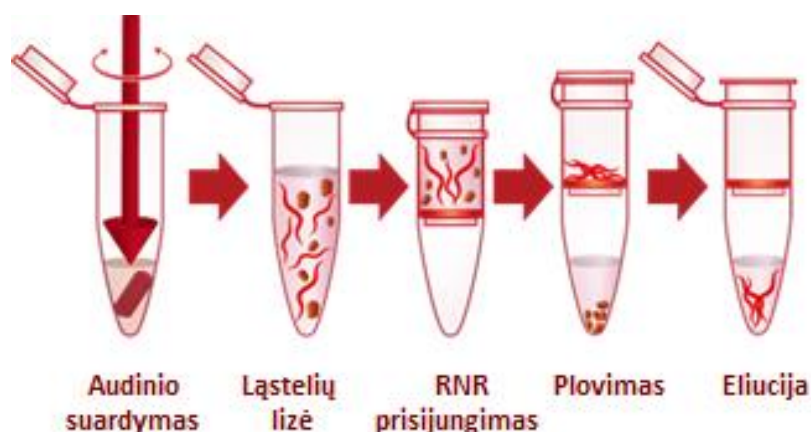
Mėginių paruošimas analizei. IFN- γ koncentracija EKV sergančių pacienčių kraujo serumo ir naviko lizato mėginiuose buvo tiriama naudojant „Human IFN- γ Flex Set“ (katalogo Nr. 558269) rinkinį. Eksperimento eiga buvo analogiška žmogaus uždegiminių chemokinių tyrimo eiga, aprašyta 2.5. skyriuje.

Duomenų analizė. Tėkmės citometro duomenys buvo analizuoti BD Cytometric Bead Array (CBA) FCAP Array Software v3.0 kompiuterine programa. Gauti rezultatai yra vertinami naudojant kalibracinę kreivę, kuri gaunama matuojant skirtingos koncentracijos standartinių IFN- γ tirpalų šviesos emisiją. Duomenys apdorojami naudojant Microsoft Excel programą.

2.7. Genų raiškos tyrimas tikrojo laiko PGR metodu

2.7.1. RNR išskyrimas

Principas. RNR buvo išskirta iš pirminio kiaušidžių naviko užšaldytų mėginių naudojant kolonėlinį išskyrimo metodą. RNR gryninimo metu naudojama speciali kolonėlė su įtaisyta silicio dioksido membrana. Šio metodo principas remiasi RNR gebėjimu prisitvirtinti prie silicio dioksido dalelių aukštos joninės jėgos tirpaluose, turinčiuose chaotropinių druskų. Chaotropinė druska, guanidino tiocianatas, suformuoja druskų tiltelius tarp neigiamai įkrautų nukleorūgščių fosfato grupių ir silicio dioksido silpnai disocijuotų hidroksigrupių. Procesu metu naudojamas monohidroksilis alkoholis (etanolis, izopropanolis) dehidratuoja nukleorūgštis ir padidina jų adsorbciją ant silicio dioksido dalelių. RNR nuo silicio dioksido membranos yra atplaunama žemos joninės jėgos tirpalais, pvz. vandeniu (5 pav.) [68].



5 pav. RNR išskyrimo schema (adaptuota pagal [68])

Darbo eiga. RNR gryninimui buvo naudotas Thermo Fisher Scientific rinkinys K0731, K0732 „GeneJET RNA Purification Kit“. RNR išskyrimo procedūra buvo atliekama pagal

gamintojo rekomendacijas. Pirmiausia skalpeliu atpjaunamas ~30 mg navikinio audinio gabalėlis, kuris patalpinamas į ependorfinį mėgintuvėlį. Audinys yra paveikiamas 500 μl lizavimo buferiu ir mechaniškai suardomas. Į mėgintuvėlį pridedama 600 μl proteinkinazės K tirpalo, sumaišoma ir inkubuojama 10 min kambario temperatūroje. Tada mėginys dedamas į centrifugą (Eppendorf centrifuge 5424, Vokietija) ir centrifuguojamas 10 min ≥ 12000 g, supernatantas nusiurbiamas ir perkeliamas į naują švarų mėgintuvėlį. Į jį pridedama 450 μl 96 % etanolio ir sumaišoma. 700 μl mėginio yra užnešama ant kolonėlės ir centrifuguojama 1 min ≥ 12000 g, gautas centrifugatas nupilamas. Procedūra kartojama, kol pro kolonėlę praleidžiamas visas mėginys. Po to mėginys plaunamas 700 μl plovimo buferiu I vieną kartą ir centrifuguojamas 1 min ≥ 12000 g. Centrifugatas nupilamas. Mėginys plaunamas du kartus plovimo buferiu II – pradžioj įpilama 600 μl, po to 250 μl. Centrifuguojama pirmą kartą 1 min, po to 2 min ≥ 12000 g. Kolonėlė yra perkeliama ant švaraus mėgintuvėlio ir ant jos užpilama 50 μl vandens. Centrifuguojama 1 min ≥ 12000 g. RNR švari vandeniu yra atplaunama nuo kolonėlės ir sukonzentruojama mėgintuvėlyje.

2.7.2. RNR kokybės ir kiekybės tyrimas

RNR kokybė ir koncentracija buvo nustatyti spektrofotometru NanoDrop. Visų mėginių absorbcija išmatuota esant 260 nm ir 280 nm bangų ilgiams. 260 nm ir 280 nm absorbcijos pikų santykis turėtų būti ~2,0, kuris rodo išgrynintos RNR švarumą bei priemaišų nebuvimą. Mažesnis santykis rodo, kad RNR preparate gali būti baltymų priemaišų, fenolio ar kitų teršalų, kurie sugeria šviesą netoli arba prie 280 nm. Atvirkštinės transkripcijos reakcijai naudoti tik geros kokybės ir švarūs RNR mėginiai.

2.7.3. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė panaudojant RNR matricą

kDNR buvo gauta atliekant atvirkštinę transkripciją iš išskirtos RNR naudojant komercinį Thermo Fisher rinkinį K1641 „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“. Tyrimo metu į švarų mėgintuvėlį įpilama 14 μl RNR tirpalo, kuriame yra 500 ng grynos RNR, taip pat pridedame 4 μl reakcijos (5X Reaction Mix) bei 2 μl fermentų (Maxima Enzyme Mix) mišinio. Galutinis reakcijos tūris buvo 20 μl. Į komercinį reakcijos mišinio sudėtį įeina buferis, deoksinukleotidtrifosatai (dNTP), atsitiktiniai pradmenys, o į fermentų mišinį – atvirkštinė transkriptazė bei RNazės slopiklis. Viską supilsčius mėgintuvėlis švelniai supurtomas. Termocikleris (SensoQuest labcyler, Vokietija) nustatomas 3 temperatūros

parametrams: 10 min 25°C (pradmenų prijungimas), 15 min 50°C (DNR sintezė), 5 min 85 °C (fermentų inaktyvinimas). Išskirta kDNR buvo saugoma -20°C ne ilgiau kaip savaitę.

2.7.4. Kiekybinė tikrojo laiko polimerazės grandininė reakcija

Principas. TL-PGR – metodas, kurio metu PGR reakcija ir pagausinto produkto kiekybinis įvertinimas vyksta vienu metu. Šis metodas yra labai jautrus, nes galima aptikti labai mažus nukleorūgščių (RNR, DNR) kiekius ir įvertinti nedidelius genų raiškos pokyčius. PGR ciklas susideda iš trijų etapų: DNR išvyniojimo, pradmenų prijungimo, DNR sintezės. Pagausinto produkto kiekybinis įvertinimas vyksta fiksuojant fluorescencijos signalų intensyvumą. Fluorescencija didėja kiekvieno PGR ciklo metu ir ji yra proporcinga susintetintų DNR kopijų skaičiui. Stiprėjant fluorescencijai pasiekama eksponentinė fazė, dar kitaip vadinama slenkstiniu TL-PGR ciklu (CT), kuris yra svarbus kiekybiniam tiriamos medžiagos įvertinimui. Šis dydis priklauso nuo pradinės DNR ar RNR kopijų skaičiaus, kurio mes nežinome. Todėl tyrimui galime naudoti vidinį standartą – referentinį geną, kurio raiškia daugelyje audinių yra vienoda.

Mėginių paruošimas analizei. Genų raiškos tyrimams atlikti buvo naudojamas Thermo Fisher rinkinys „Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), no ROX“ (katalogo Nr. K0251). Eksperimentui buvo naudojamos vienkartinės sterilios 48 šulinėlių plokštelės, kiekvienam mėginiui atliekamos dvi reakcijos. Be tiriamojo geno, amplifikuojamas ir vidinis standartas – *GAPDH* genas. Taršos kontrolei bent vienas šulinėlis eilutėje praleidžiamas be cDNR, bet su švairiu vandeniu. Įprastinė reakcijos mišinio sudėtis pateikiama lentelėje Nr. 3.

3 lentelė. TL-PGR reakcijos mišinio sudėtis

| Reagentas | Kiekis |
|--|---------|
| Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), no ROX | 5 µl |
| Tiesioginis pradmuo, 0,8 µM | 1,25 µl |
| Atvirkštinis pradmuo, 0,8 µM | 1,25 µl |
| Kopijinė DNR | 1 µl |
| Vanduo be nukleazių | 1,5 µl |

„Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), no ROX“ yra komercinis gamintojo mišinys, į kurio sudėtį įeina karšto starto DNR polimerazė, dNTP, SYBR Green I dažas ir buferis. Karšto starto DNR polimerazė yra chemiškai modifikuota DNR polimerazė, kuri yra aktyvi tik aukštoje temperatūroje ir neveikli kambario temperatūroje, tokiu būdu yra išvengiama

nespecifinio pradmenų ar jų dimerų prisijungimo. SYBR Green I yra fluorescencinis dažas, kuris nespecifiškai susijungia su dvigrande DNR. Tyrime naudoti pradmenys pateikiami lentelėje Nr. 4. Termocikleris (Eco Illumina, JAV) buvo užprogramuotas tokiems temperatūros parametrams: pirmas ciklas – 5 min 95 °C (aktyvinama karšto starto DNR polimerazė), 40 ciklų - 10 s 95°C (DNR denatūracija) ir 40 ciklų - 30 s 60 °C (pradmenų prijungimas, DNR sintezė). Programinė įranga automatiškai nustato ciklų sulaikymo slenkstį.

4 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys

| Genas | Priekinis pradmuo (5' – 3') | Atvirkštinis pradmuo (5' – 3') |
|---------------------|------------------------------|--------------------------------|
| GAPDH | AATCCCATCACCATCTTCCA | TGGACTCCACGACGTACTCA |
| CCL2/MCP-1 | CAGCCAGATGCAATCAATGCC | TGGAATCCTGAACCCACTTCT |
| CXCL11/I-TAC | ATGAGTGTGAAGGGCATGGC | TCACTGCTTTTACCCAGGG |
| CCL3/MIP-1 α | CAGAATTTTCATAGCTGACTACTTTGAG | GCTTCGCTTGGTTAGGAAGA |
| CCL4/MIP-1 β | CTTCCTCGCAACTTTGTGGT | CAGCACAGACTTGCTTGCTT |
| PAI-I | TGCTGGTGAATGCCCTCTACT | CGGTCATTCCCAGGTTCTCTA |
| CD40L | CTGCAAGGTGACACTGTTC | CACAGCATGATCGAAACATAC |
| IL-1 α | AGTAGCAACCAACGGGAAGG | TGGTTGGTCTTCATCTTGGG |
| G-CSF | CCTGGAGCTGAGAACTACCG | TCCCGGCTGAGTTATAGG |

Duomenų analizė. Duomenys apdoroti EcoStudy ir Microsoft Excel programomis. Genų raiška tiriamuosiuose mėginiuose buvo įvertinta skaičiuojant analizuojamo geno ciklo pokytį (ΔCT), kaip vidinį standartą pasirinkus *GAPDH* geną. Galiausiai apskaičiuojama ir įvertinama santykinė geno raiška (R).

$$\Delta CT = CT(ag) - CT(ref)$$

$$R = 2^{-\Delta CT}$$

ΔCT – analizuojamo geno ciklo pokytis

CT(ag) – analizuojamo geno ciklo slenkstis

CT(ref) – referentinio geno ciklo slenkstis

R – santykinė geno raiška

2.8. Statistinė duomenų analizė

Duomenų normalumui nustatyti buvo naudojamas Šapiro – Vilko testas (*angl. Shapiro Wilk test*). Tiriama duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, kai $p > 0,05$. Rezultatų, kurie tenkina normalumo sąlygą, vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas t-testas dviems

nepriklausomos imtims (*angl. Independent samples t-test*). Rezultatų, kurie netenkino normalumo sąlygos, medianų palyginimui buvo naudojamas neparametrinis Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijus dviems nepriklausomos imtims (*angl. Wilcoxon rank-sum test*). Duomenys patikimai skyrėsi, kai $p < 0,05$. Statistinė analizė atlikta naudojant Microsoft Excel ir RStudio programas.

Pacienčių išgyvenamumui įvertinti buvo braižomi Kaplano – Mejerio grafikai. Tiriamoms grupėms palyginti buvo naudojamas *Log rank* testas.

Siekiant nustatyti ryšio stiprumą tarp skirtingų imuninių parametrų buvo skaičiuojamas Spirmeno koreliacijos koeficientas (r_s) (*angl. Spearman's rank correlation coefficient*). Jis įgyja reikšmes nuo -1 iki 1, kur teigiama koreliacija rodo tiesioginę priklausomybę, o neigiama – atvirkštinę priklausomybę. Kuo r_s reikšmė arčiau 1 ar -1, tuo koreliacija yra stipresnė (lentelė Nr. 5). Koreliacijos reikšmingumui įvertinti skaičiuojama p reikšmė. Populiacijos kintamieji koreliuoja, kai $p < 0,05$. Spirmeno koreliacijos koeficientų matrica buvo nubraižyta naudojant internetę programą „Morpheus“ (internetu prieiga: <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

5 lentelė. Koreliacijos koeficiento vertinimas

| r_s reikšmė | Vertinimas |
|---------------|--------------------------------|
| 0,00-0,19 | Labai silpnas tarpusavio ryšys |
| 0,20-0,39 | Silpnas ryšys |
| 0,40-0,69 | Vidutinis ryšys |
| 0,70-0,89 | Stiprus ryšys |
| 0,90-1,00 | Labai stiprus tarpusavio ryšys |

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Pacienčių charakteristikos

Tyrimė dalyvavo 36 EKV sergančios pacientės, kurios 2013 – 2017 m. gydėsi NVI Onkoginekologijos skyriuje. Pacienčių amžius varijuoja nuo 33 m. iki 76 m. Tirtos populiacijos amžiaus vidurkis – $61,2 \pm 11,9$ m., mediana – $62,5 \pm 16,3$ m. (lentelė Nr. 6).

6 lentelė. Pacienčių charakteristikos. Pateikiamas amžiaus vidurkis \pm standartinis nuokrypis, mediana \pm kvartilų skirtumas.

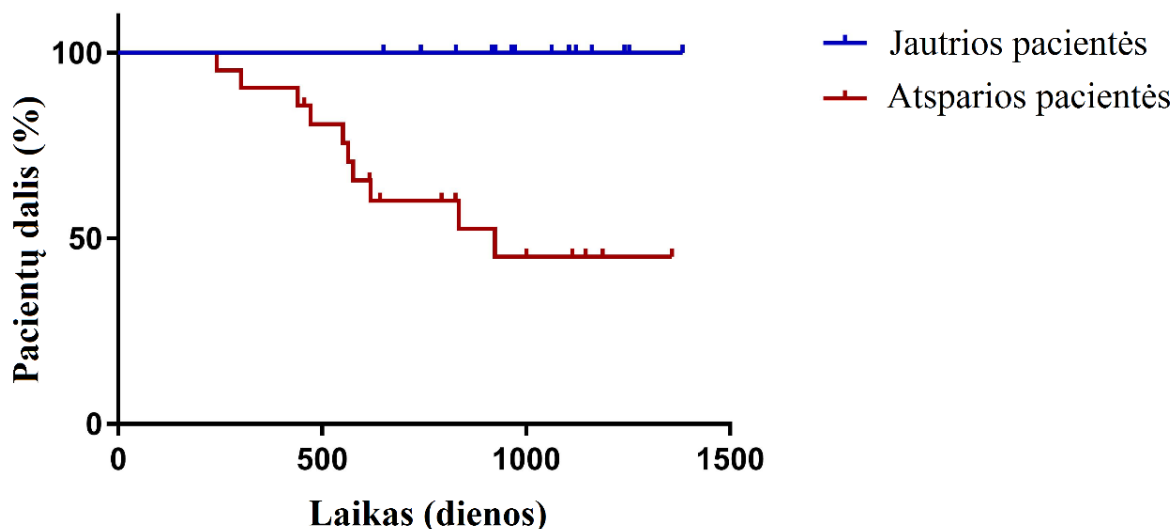
| | Visos pacientės | Jautrios pacientės | Atsparios pacientės |
|-----------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| Imtis | 36 | 15 | 21 |
| Amžius, metais | | | |
| vidurkis | $61,2 \pm 11,9$ | $55,0 \pm 14,4$ | $65,7 \pm 7,3$ |
| mediana | $62,5 \pm 16,3$ | $53,0 \pm 21,0$ | $64,0 \pm 9,0$ |
| intervalas | 33-76 | 33-69 | 53-76 |
| Stadija | | | |
| I | 3 | 2 | 1 |
| II | 0 | 0 | 0 |
| III | 29 | 13 | 16 |
| IV | 4 | 0 | 4 |

Remiantis FIGO kiaušidžių vėžio klasifikacija, į tyrimą buvo įtrauktos 3 I stadijos, 29 III stadijos ir 4 IV stadijos pacientės. Kaip minėta anksčiau, kiaušidžių vėžys neturi specifinių klinikinių simptomų bei efektyvių patikros metodų, todėl dažniausiai yra diagnozuojamas jau vėlyvose stadijose. Didžiausią dalį mūsų tiriamosios populiacijos sudarė pacientės, kurios serga išplitusiu EKV.

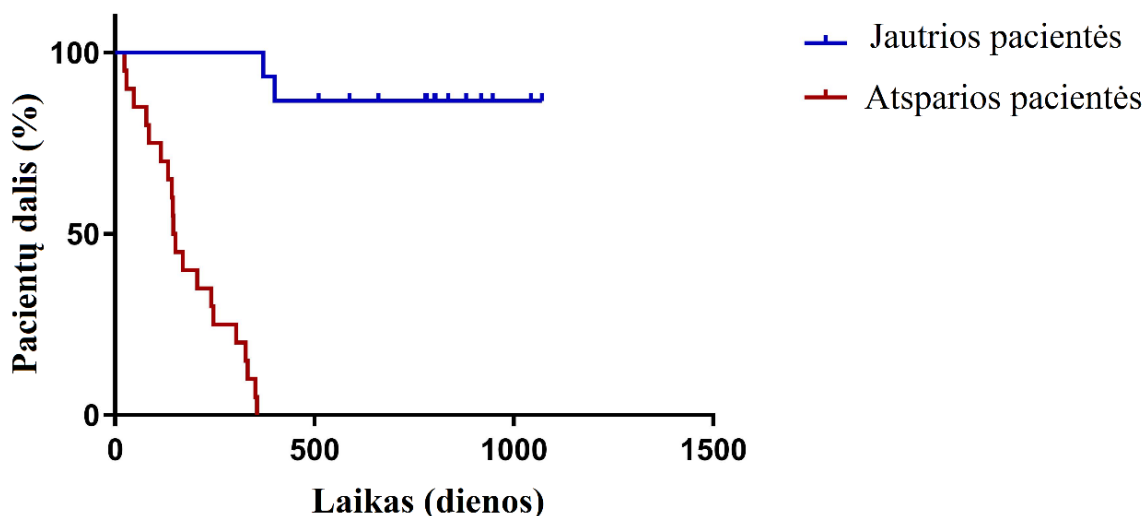
Visoms pacientėms gydyti buvo taikyta citoredukcinė operacija bei chemoterapija karboplatina arba karboplatinis ir paklitakselio deriniu. Atsižvelgiant į laiko intervalą nuo chemoterapinio gydymo pabaigos iki atkryčio, pacienčių jautrumas pirmos eilės platinos terapijai buvo suskirstytas į dvi grupes:

- jei liga atsinaujino per 6-12 mėn nuo adjuvantinio gydymo pabaigos – platinai atsparus kiaušidžių vėžys;
- jei liga atsinaujino po >12 mėn arba visai neatsinaujino nuo adjuvantinio gydymo pabaigos – platinai jautrus kiaušidžių vėžys.

Tyrimė dalyvavo 21 atspari ir 15 jautrių platinos terapijai pacienčių. Chemoterapijai jautrių pacienčių amžiaus vidurkis $55,0 \pm 14,4$ m., mediana $53,0 \pm 21,0$ m., atsparių pacienčių amžiaus vidurkis $65,7 \pm 7,3$ m., mediana $64,0 \pm 9,0$ m.



6 pav. *Kaplano - Mejerio bendro pacienčių išgyvenamumo grafikas.* Atžymos ant išgyvenamumo kreivės nurodo, kada baigtas paciento stebėjimas (cenzūruotas įvykis). Kreivės kritimas žemyn rodo paciento mirtį. Statistiškai patikimas skirtumas tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių ($p < 0,01$). Tiriamoms grupėms palyginti buvo naudojamas *Log rank* testas.



7 pav. *Kaplano - Mejerio pacienčių išgyvenamumo be ligos progresavimo grafikas.* Atžymos ant išgyvenamumo kreivės nurodo, kada baigtas paciento stebėjimas (cenzūruotas įvykis). Kreivės kritimas žemyn rodo paciento atkrytį. Statistiškai patikimas skirtumas tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių ($p < 0,01$). Tiriamoms grupėms palyginti buvo naudojamas *Log rank* testas.

EKV sergančių pacienčių gydymo efektyvumui įvertinti buvo skaičiuojami bendro išgyvenamumo ir išgyvenamumo be ligos progresavimo rodikliai. Bendras išgyvenamumas – tai laikotarpis nuo ligos diagnozavimo iki mirties arba pacienčių stebėjimo pabaigos. Išgyvenamumu be ligos progresavimo yra vadinamas laikotarpis nuo chemoterapinio gydymo pabaigos iki ligos atkryčio arba pacienčių stebėjimo pabaigos. Pacienčių išgyvenamumui

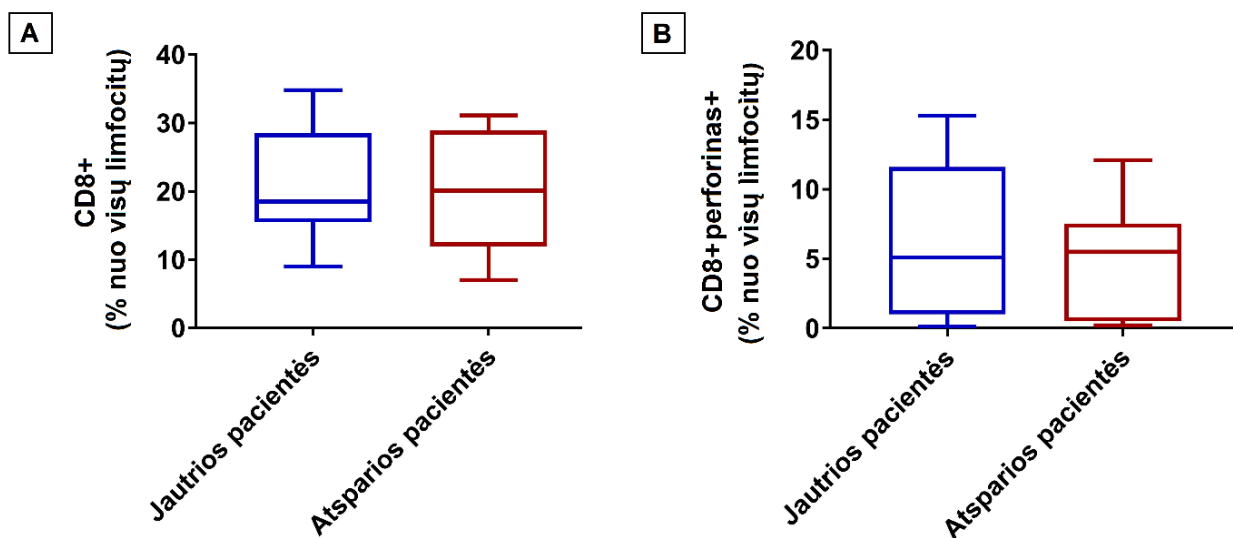
įvertinti ir palyginti tarp grupių buvo braižomi Kaplano – Mejerio grafikai. Paskutinė pacienčių stebėjimo data 2017 02 08. Jeigu tuo metu įvykis (paciento mirtis/ligos atkrytis) nebuvo įvykęs, atvejis buvo cenzūruotas. Bendras 1 m. chemoterapijai jautrių pacienčių išgyvenamumas buvo 100 %, o atsparių pacienčių – 90,5 % (6 pav.). Bendras 2 m. chemoterapijai jautrių pacienčių išgyvenamumas siekė 100 %, o atsparių pacienčių – 52,4 %. Stebėjimo metu mirė 10 pacienčių iš chemoterapijai atsparios grupės dėl ligos atsinaujinimo ir progresavimo. Platinos terapijai jautrių pacienčių 1 m. išgyvenamumas be ligos progresavimo buvo 100 %, visoms atsparioms pacientėms liga progresavo per 1 m (7 pav.).

3.2. Periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijų tyrimas tėkmės citometriniu metodu

Šiuo metu žinoma, kad organizmo apsaugai nuo navikų didelę reikšmę turi ląstelinis imunitetas [38]. Pirmiausia mes norėjome išsiaiškinti, koks yra sisteminis imuninis atsakas į kiaušidžių vėžį ir nustatyti galimus imuninių parametrų skirtumus tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių moterų. Pacienčių periferiniame kraujyje buvo tiriamos citotoksinių T limfocitų (CD8+ ir CD8+perforinas+) ir imunosupresinių reguliacinių T limfocitų (Treg) (CD4+CD25+FoxP3+ ir CD8+CD57+FoxP3+) populiacijos bei vertinamas jų santykis.

Citotoksiniai T limfocitai yra pagrindinės įgyto imuniteto ląstelės, kurios atpažįsta ir sunaikina navikines ląsteles. Naujausi tyrimai atskleidė, kad CD8+ T limfocitai slopina atsparumą platinos chemoterapijai išskirdami IFN- γ ir gali turėti predikcinę vertę [42]. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad chemoterapijai jautrių pacienčių CD8+ T limfocitų dalis nuo visų limfocitų svyruoja nuo 9,0 % iki 34,8 % (mediana 18,5 %) (8 pav. A). Chemoterapijai atsparių pacienčių CD8+ T limfocitų dalis nuo visų limfocitų varijuoja nuo 7,0 % iki 30,7 % (mediana 20,1%). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių nerasta ($p>0,05$).

Priešvėžiniam imuniniam atsakui yra svarbūs aktyvinti citotoksiniai T limfocitai t.y. CD8+ T limfocitų subpopuliacija, pasižyminti citotoksino perforino raiška (CD8+perforinas+). Pastarasis suformuoja ląstelės taikinio membranoje poras ir sukelia osmosinę ląstelės lizę [44]. Tyrimo rezultatai rodo, kad platinos terapijai jautrių pacienčių CD8+perforinas+ T limfocitų dalis nuo visų limfocitų svyruoja nuo 0,1 % iki 15,3 % (mediana 5,1 %) (8 pav. B). Chemoterapijai atsparių pacienčių CD8+perforinas+ T limfocitų dalis nuo visų limfocitų varijuoja nuo 0,2 % iki 12,1 % (mediana 5,5 %). Reikšmingų skirtumų tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupių nebuvo pastebėta ($p>0,05$).

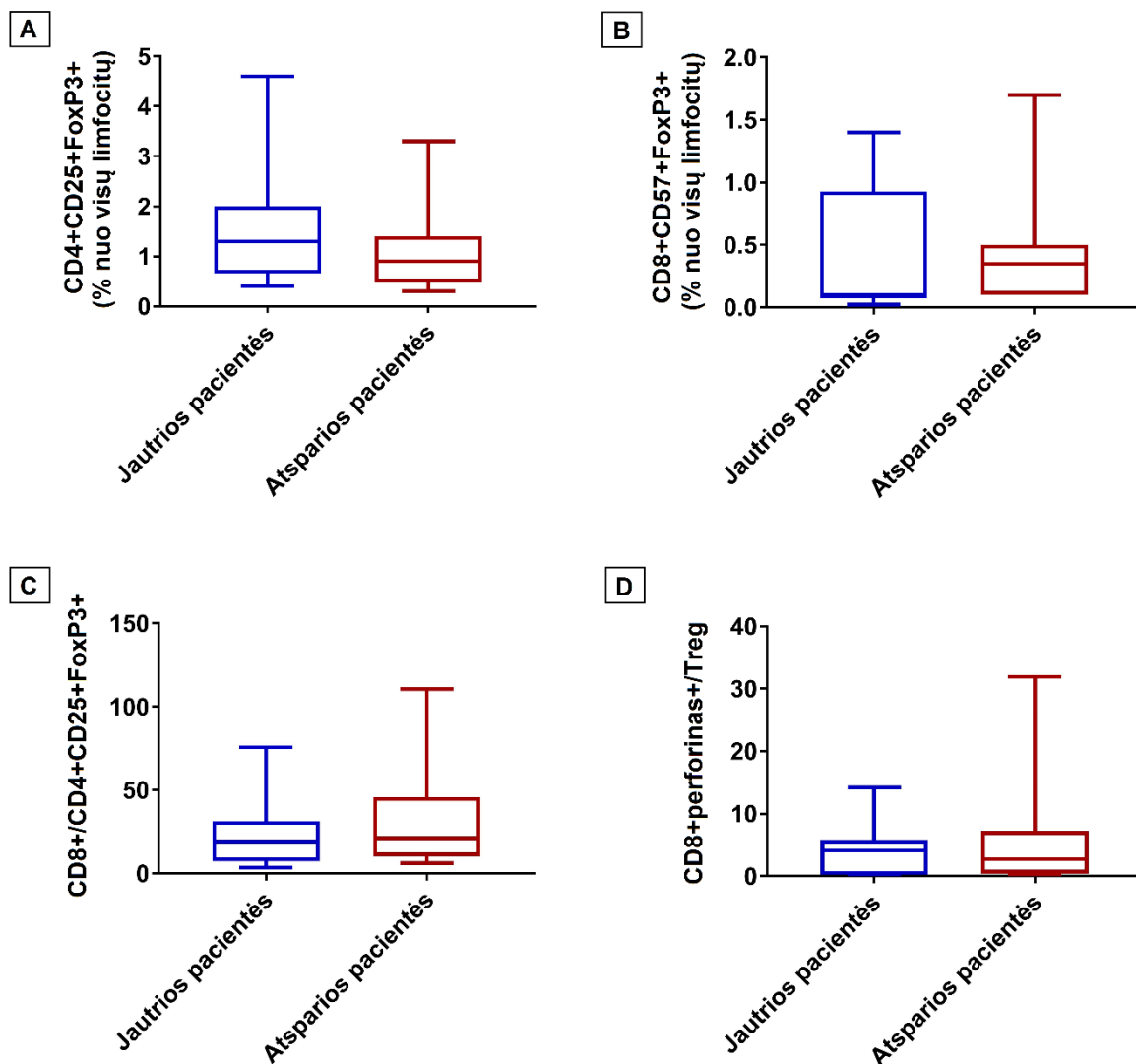


8 pav. Kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių periferinio kraujo citotoksinių limfocitų populiacijų vertinimas. A - pavaizduota CD8+ T limfocitų dalis (%) nuo visų limfocitų; B – pavaizduota CD8+perforinas+ T limfocitų dalis (%) nuo visų limfocitų. Stačiakampėje diagramoje horizontali vidurinė linija žymi medianą, o nuo stačiakampio šono nubrėžti „ūšai“ rodo didžiausią ir mažiausią stebėtą reikšmę. Medianų palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas neparametrinis Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijus.

Daugėja įrodymų, kad Treg dalyvauja vėžio patogenezeje. Nustatyta, kad sergant vėžiu Treg slopina priešnavikinį imuninį atsaką ir skatina naviko progresavimą [9, 43, 44]. Neseniai dvi skirtingos mokslininkų komandos parodė, kad didesnis CD4+ Treg ir CD8+ Treg skaičius pacienčių periferiniame kraujyje nustatomas sergant išplitusiu EKV (III – IV stadija) nei ankstyvose ligos stadijose (I – II) [46, 48]. Mes siekėme nustatyti, ar CD4+ Treg ir CD8+ Treg skaičius periferiniame kraujyje skiriasi tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių bei įvertinti šių parametru predikcinę vertę. Tyrimo rezultatai parodė, kad platinos terapijai jautrių pacienčių CD4+CD25+FoxP3+ limfocitų dalis nuo visų limfocitų varijuoja nuo 0,4 % iki 4,6 % (mediana 1,3 %), o atsparių pacienčių – nuo 0,3 % iki 3,3 % (mediana 0,8 %) (9 pav. A). Nustatyta, kad chemoterapijai jautrių pacienčių CD8+CD57+FoxP3+ limfocitų dalis nuo visų limfocitų varijuoja nuo 0,02 % iki 1,4 % (mediana 0,1 %) (9 pav. B). Chemoterapijai atsparių pacienčių CD8+CD57+FoxP3+ limfocitų dalis nuo visų limfocitų svyruoja nuo 0,1 % iki 1,7 % (mediana 0,3 %). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių nebuvo pastebėta (visais atvejais $p > 0,05$).

Manoma, kad EKV sergančių pacienčių ligos eiga ir prognozė gali priklausyti nuo to, kuri T limfocitų populiacija – citotoksinių ar supresinių – vyrauja. Remiantis literatūra, vyraujančiai populiacijai įvertinti yra skaičiuojamas CD8+ ir CD4+ Treg limfocitų santykis [43]. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad chemoterapijai jautrių pacienčių šis santykis varijuoja nuo 3,6 iki 75,7 (mediana 19,2), o atsparių pacienčių nuo 6,2 iki 110,5 (mediana 21,2) (9 pav. C). Tačiau šiuo metu žinoma, kad svarbiausi priešvėžiniam imuniniam atsakui yra aktyvinti citotoksiniai T

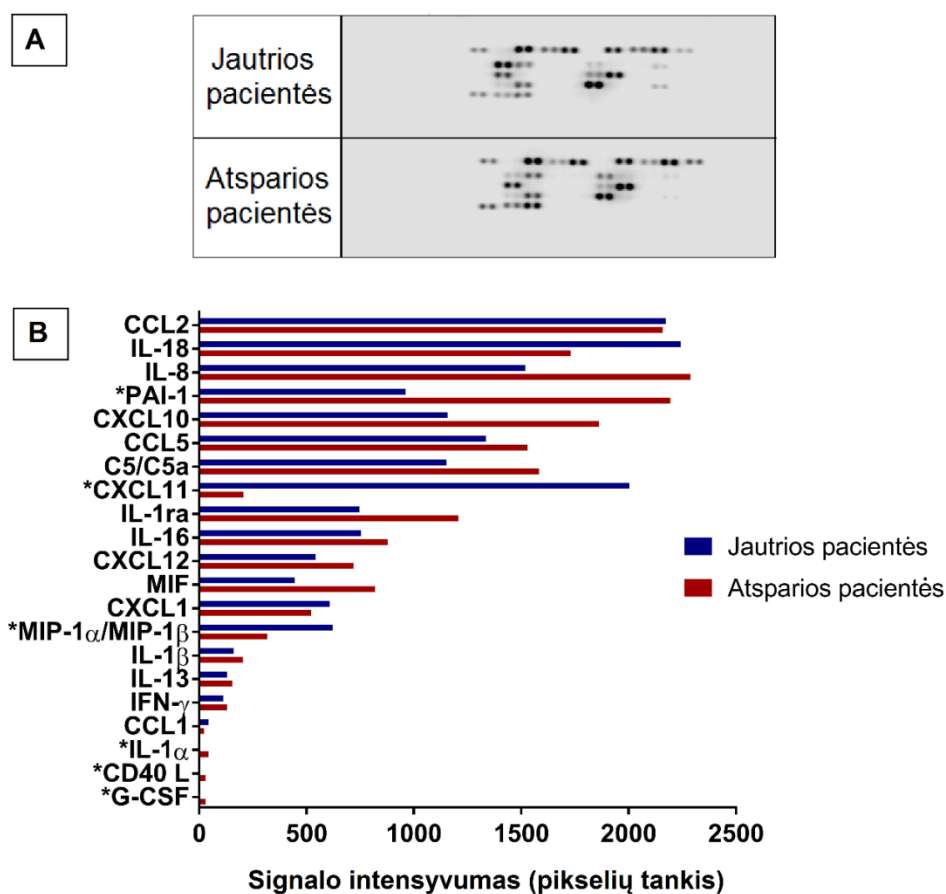
limfocitai (CD8+perforinas+), o imunosupresinėmis savybėmis pasižymi ne tik CD4+ Treg, bet ir neseniai atrasta CD8+ Treg populiacija [44, 46]. Todėl mes įvertinome CD8+perforinas+ ir abiejų Treg populiacijų santykį. Gauti tyrimo duomenys rodo, kad šis santykis platinos terapijai jautrių pacienčių periferiniame kraujyje varijuoja nuo 0,05 iki 14,2 (mediana 4,1), o atsparių pacienčių nuo 0,1 iki 31,9 (mediana 2,7) (9 pav. D). Dėl didelio duomenų išsibarstymo statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių nebuvo rasta (visais atvejais $p>0,05$).



9 pav. Kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių periferinio kraujo T reguliacinių limfocitų populiacijų bei citotoksinių ir T reguliacinių limfocitų populiacijų santykio vertinimas. A - pavaizduota CD4+ Treg limfocitų dalis (%) nuo visų limfocitų; B - pavaizduota CD8+ Treg limfocitų dalis (%) nuo visų limfocitų; C - vaizduoja CD8+ ir CD4+ Treg limfocitų santykį; D - pavaizduotas CD8+perforinas+ ir Treg santykis. Medianų palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas nparametrinis Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijus.

3.3. Citokinių tyrimas

Žinoma, kad EKV progresavimas yra susijęs su padidėjusia uždegiminių citokinių sinteze ir sekrecija. Autokrininiu ir parakrininiu būdu išskiriami citokinai gali ne tik slopinti bet ir skatinti naviko augimą ir plitimą [10]. Daugėja įrodymų, kad citokinai, veikdami įvairiais signaliniais keliais, gali lemti gydymo efektyvumą ir tai rodo jų galimą predikcinę reikšmę [11]. Pirmiausia mes atlikome bandomąjį eksperimentą siekiant tolesniems kiekybiniam tyrimams atrinkti svarbiausius citokinus, besiskiriančius tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupių. Šiam tikslui naudojome citokinių gardelių technologiją. Iš gautų tyrimo rezultatų buvo pasirinkti citokinai, kurių santykinis kiekis tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių skyrėsi daugiau nei du kartus arba santykinio kiekio padidėjimas buvo nustatytas tik vienoje tiriamoje grupėje. Tolesniems tyrimams iš naviko lizato mėginių buvo atrinkti 6 citokinai (PAI-1, MIP-1 α /MIP-1 β , CXCL11, CD40 L, IL-1 α , G-CSF) (10 pav.), o iš kraujo serumo mėginių buvo atrinkti 7 citokinai (IFN- γ , IL-8, CCL5, CXCL10, CCL2, MIP-1 α /MIP-1 β , CXCL11) (11 pav.).

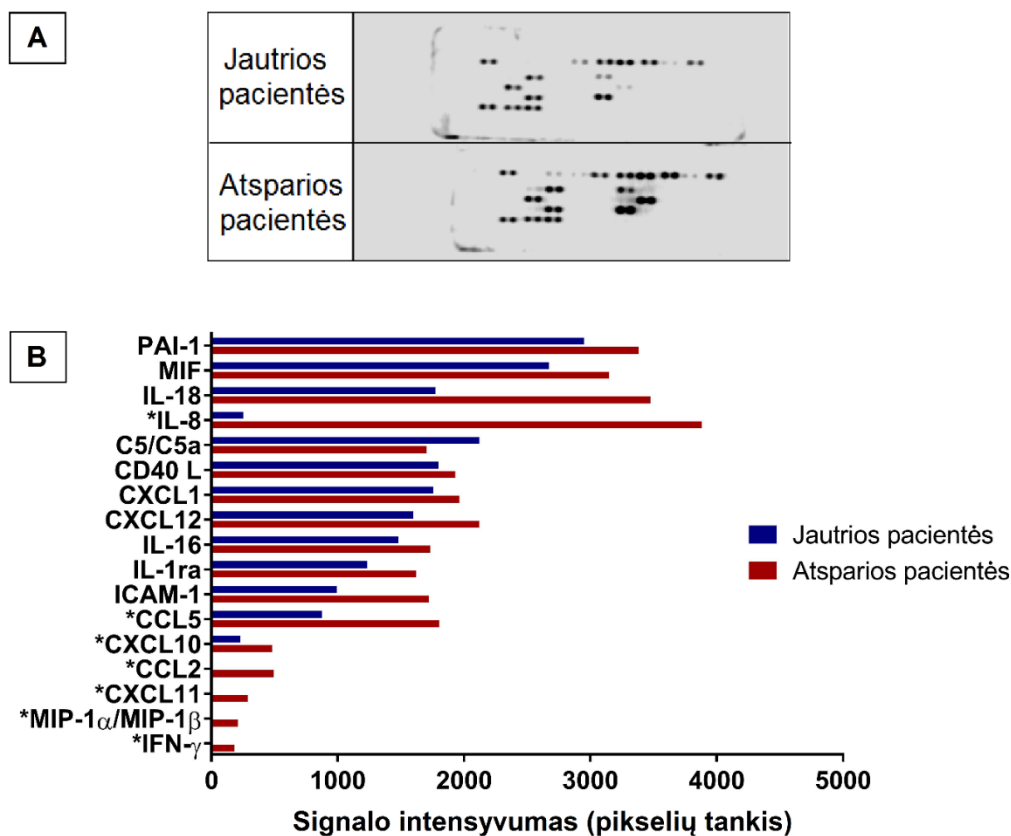


10 pav. Citokinių santykinio kiekio vertinimas pacienčių naviko lizato mėginiuose.

A – paveikslas vaizduoja citokinių gardelę, juodi taškai rodo signalo intensyvumą;

B – grafiškai vaizduoja jautrių ir atsparių pacienčių citokinių santykinį kiekį;

* pažymėti citokinai pasirinkti tolesniems tyrimams.



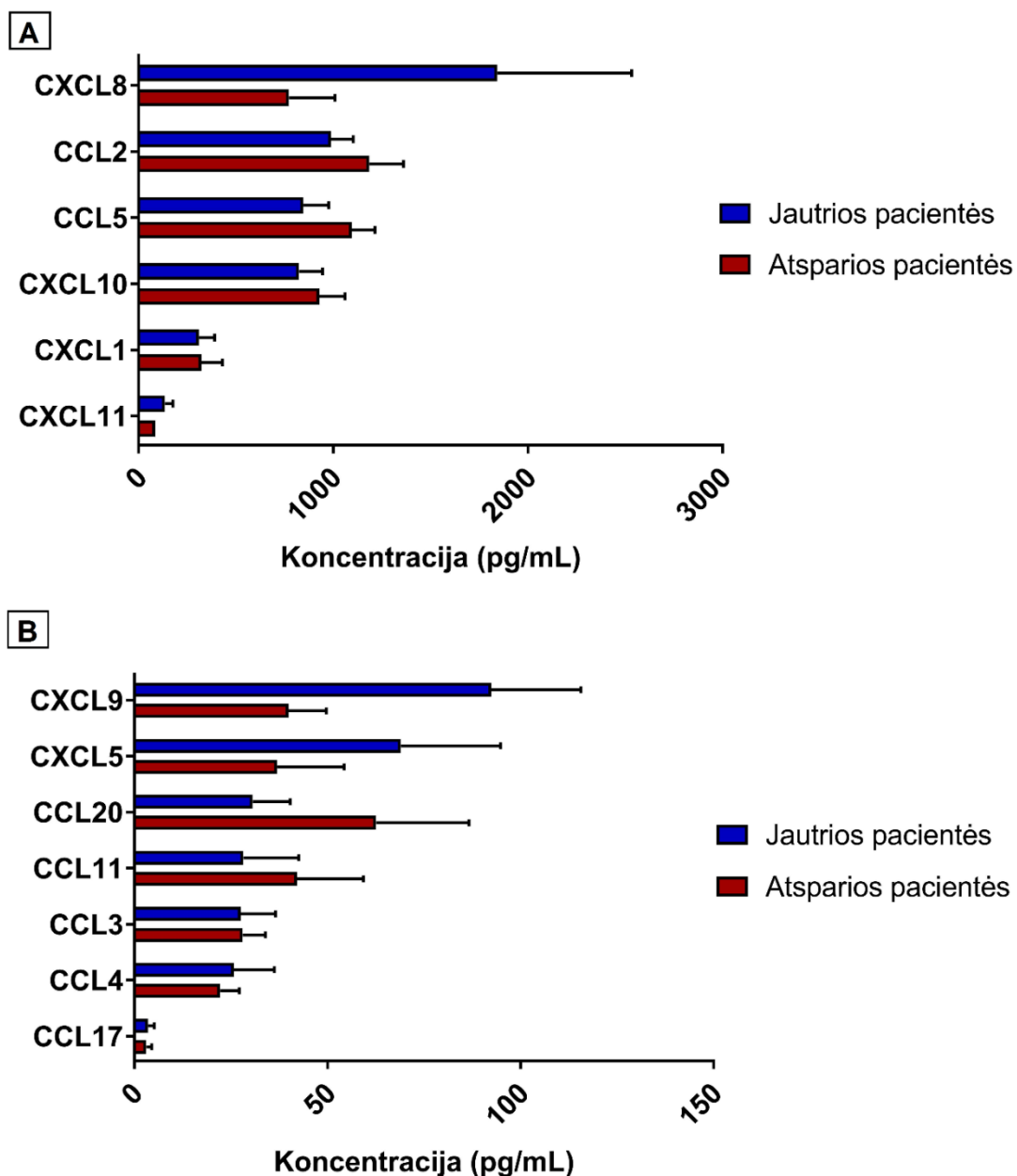
11 pav. Citokinių santykinio kiekio vertinimas pacienčių kraujo serumo mėginiuose.

A – vaizduoja citokinių gardelę, juodi taškai rodo signalo intensyvumą;

B – grafiškai vaizduoja jautrių ir atsparių pacienčių citokinių santykinį kiekį;

* pažymėti citokinai pasirinkti tolesniems tyrimams.

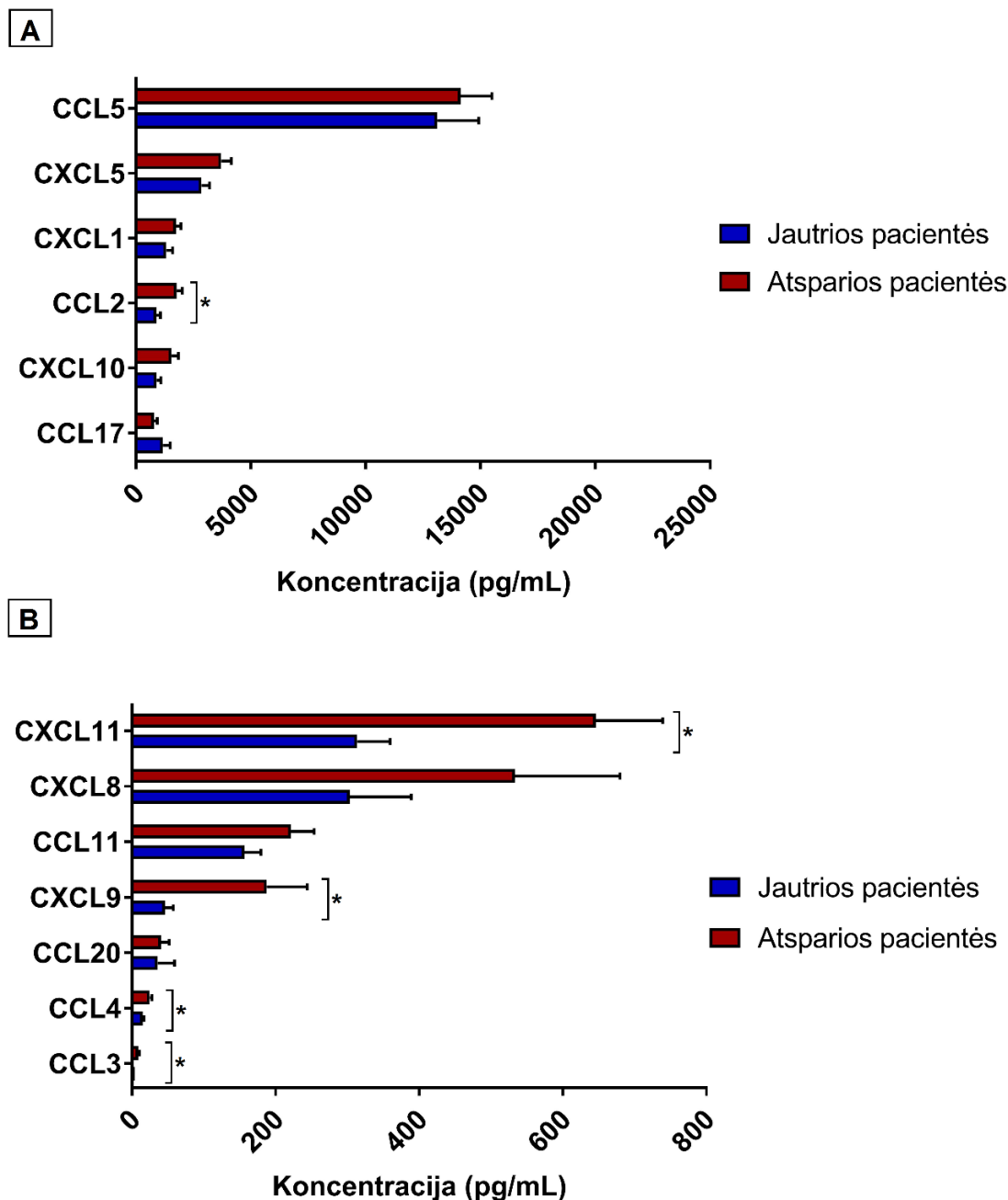
Didžiausią dalį mūsų atrinktų citokinių sudarė chemokinai, todėl kitoje eksperimentų serijoje mes tyrėme 13 uždegiminių chemokinių koncentraciją naviko lizato ir kraujo serumo mėginiuose taikant tėkmės citometrinių metodą. Tyrimo rezultatai parodė, kad statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių naviko lizato mėginiuose nebuvo rasta ($p > 0,05$) (12 pav. A ir B). Tačiau tiriant chemokinių koncentraciją pacienčių kraujo serumo mėginiuose, buvo nustatytos statistiškai reikšmingai didesnės CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β chemokinių koncentracijos gydymui atsparių pacienčių grupėje nei gydymui jautrių pacienčių ($p < 0,05$) (13 pav. A ir B). Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad chemoterapijai jautrių pacienčių vidutinės šių chemokinių koncentracijos kraujo serumo mėginiuose buvo: CCL4/MIP-1 β $14,8 \pm 1,5$ pg/mL, CCL3/MIP-1 α $3,9 \pm 0,3$ pg/mL, CXCL9/MIG $45,8 \pm 14,4$ pg/mL, CXCL11/I-TAC $313,7 \pm 45,7$ pg/mL, CCL2/MCP-1 $888,1 \pm 171,2$ pg/mL. Chemoterapijai atsparių pacienčių vidutinės šių chemokinių koncentracijos kraujo serumo mėginiuose buvo: CCL4/MIP-1 β $24,4 \pm 3,2$ pg/mL, CCL3/MIP-1 α $8,8 \pm 1,3$ pg/mL, CXCL9/MIG $187,5 \pm 56,3$ pg/mL, CXCL11/I-TAC $646,2 \pm 92,7$ pg/mL, CCL2/MCP-1 $1772,0 \pm 241,6$ pg/mL.



12 pav. Chemokinių koncentracija pacienčių naviko lizato mėginiuose. Pateikiami vidurkiai \pm standartinė paklaida. Vidurkių palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas t-testas. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių nebuvo pastebėta ($p > 0,05$).

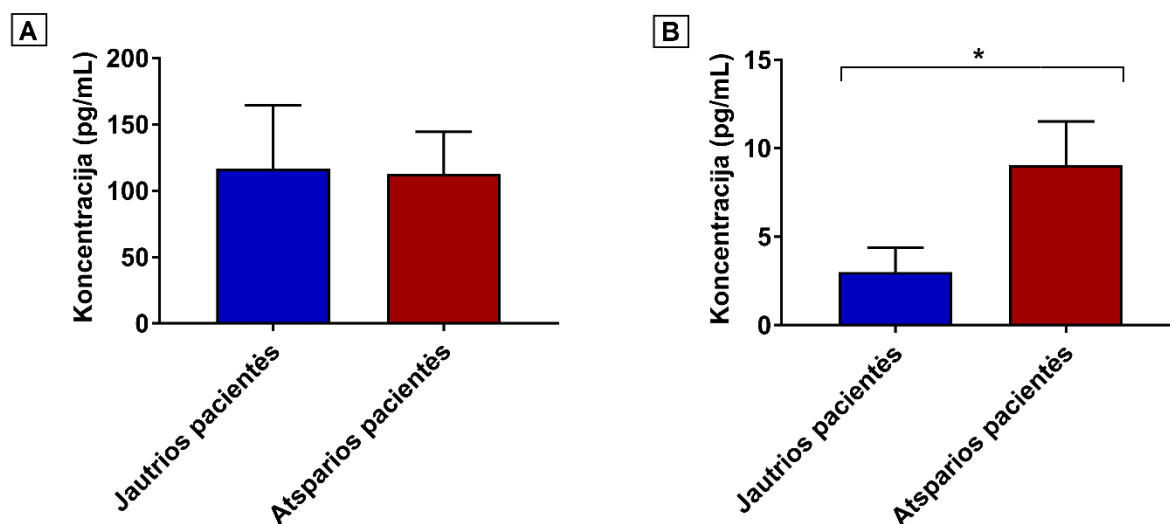
Remiantis literatūra, duomenys apie CCL2 reikšmę kiaušidžių vėžio vystymuisi ir gydymo efektyvumui yra kontroversiški. Fader AN ir kt. parodė, kad didesnė CCL2 raiška ir kiekis teigiamai koreliuoja su geresniu jautrumu platinos/paklitakselio chemoterapijai [50]. Tačiau neseniai kita mokslininkų komanda atskleidė, kad CCL2 lemia atsparumą chemoterapijai ir jį užblokavus galima pasiekti geresnių EKV gydymo rezultatų [52]. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad gydymui atsparių pacienčių kraujo serume vidutinė CCL2 koncentracija yra didesnė nei gydymui jautrių pacienčių. CCL2 koncentracijos skirtumai tarp tiriamųjų grupių atskleidžia reikšmingą šio chemokino predikcinę vertę ($p < 0,05$, lyginant gydymui jautrias ir atsparias

pacientes). Literatūroje duomenų apie CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL11 reikšmę EKV gydymo efektyvumui nėra. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad reikšmingai didesnės ($p < 0,05$) šių chemokinių koncentracijos yra nustatomos chemoterapijai atsparių pacienčių grupėje. Žinoma, kad CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL11 skatina imuninių ląstelių (aktyvintų T limfocitų, NK ląstelių, makrofagų) migraciją į uždegimo vietą ir infiltraciją [54, 56]. Padidėjusi šių chemokinių koncentracija gydymui atsparių pacienčių kraujo serume gali būti siejama su stipresniu priešvėžiniu imuniniu atsaku



13 pav. Chemokinių koncentracija pacienčių kraujo serumo mėginiuose. Pateikiami vidurkiai \pm standartinė paklaida. Vidurkių palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas t-testas. * - statistškai patikimas skirtumas tarp tiriamųjų grupių, $p < 0,05$.

Vėliau mes įvertinome IFN- γ koncentraciją pacienčių naviko lizato ir kraujo serumo mėginiuose tėkmės citometriniu metodu. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad vidutinė IFN- γ koncentracija chemoterapijai jautrių pacienčių naviko lizate buvo $116 \pm 47,9$ pg/mL, o atsparių pacienčių $112,8 \pm 31,5$ pg/mL (14 pav. A). Reikšmingų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nebuvo pastebėta ($p > 0,05$). Vidutinė IFN- γ koncentracija chemoterapijai jautrių pacienčių kraujo serume buvo $3,0 \pm 1,4$ pg/mL, o atsparių pacienčių $9,1 \pm 2,5$ pg/mL (14 pav. B). Nustatytas statistiškai reikšmingas IFN- γ koncentracijos skirtumas kraujo serume tarp tiriamųjų grupių ($p < 0,05$).

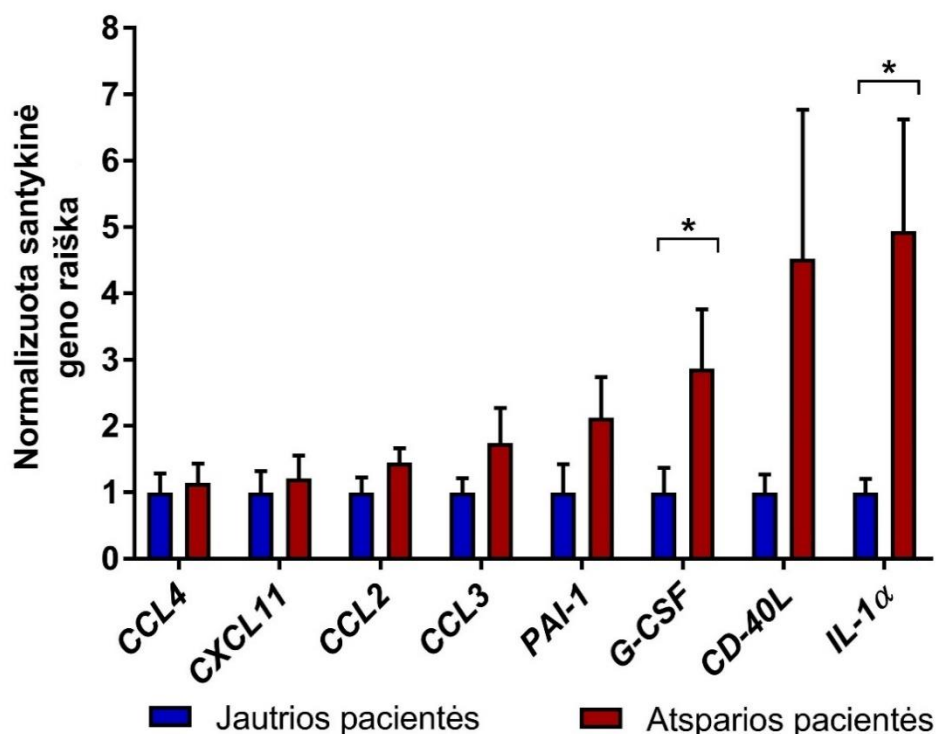


14 pav. IFN- γ koncentracija pacienčių naviko lizato ir kraujo serumo mėginiuose. A – vaizduoja IFN- γ koncentraciją naviko lizato mėginiuose. B – vaizduoja IFN- γ koncentraciją kraujo serumo mėginiuose. Pateikiami vidurkiai \pm standartinė paklaida. Vidurkių palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas t-testas. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp tiriamųjų grupių, $p < 0,05$.

Šiuo metu žinoma, kad IFN- γ pasižymi priešvėžiniu poveikiu. Jis skatina MHC I klasės molekulių raišką naviko ląstelėse, tokiu būdu didinant vėžinių ląstelių imunogeniškumą. Nustatyta, kad šis citokinas slopina kiaušidžių vėžio ląstelių proliferaciją bei skatina jų apoptozę. IFN- γ kartu su platinos chemoterapija veikia sinergistiškai ir slopina naviko augimą ir ligos progresavimą [60]. Naujausi tyrimai atskleidė, kad aktyvintų CD8⁺ T limfocitų išskiriamas IFN- γ didina jautrumą platinos terapijai [42]. Mūsų tyrimo duomenys parodė, kad vidutinė IFN- γ koncentracija gydymui atsparių pacienčių kraujo serume buvo statistiškai reikšmingai didesnė nei jautrių pacienčių ($p < 0,05$). Didesnės IFN- γ koncentracijos chemoterapijai atsparių pacienčių kraujyje taip pat gali būti siejamos su stipresniu priešvėžiniu imuniniu atsaku.

3.4. Genų raiškos vertinimas

Kitoje eksperimentų serijoje mes įvertinome su imunine sistema susijusių genų raiškos skirtumus tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupių taikant TL-PGR metodą. Siekiant išsiaiškinti, ar chemokinių koncentracijos kraujo serume skirtumai tarp tiriamųjų grupių yra susiję su pakitusia jų raiška navike, pirmiausia mes ištyrėme *CCL2/MCP-1*, *CCL3/MIP-1 α* , *CCL4/MIP-1 β* , *CXCL11/I-TAC* raišką kiaušidžių naviko mėginiuose. Tyrimo metu vidiniu standartu buvo pasirinktas *GAPDH* genas. Duomenys buvo normalizuoti gydymui jautrių pacienčių santykinę genų raišką (R) prilyginus 1. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad chemoterapijai jautrių pacienčių normalizuota santykinė genų raiška buvo: *CCL2* 1,0 \pm 0,2, *CCL3* 1,0 \pm 0,2, *CCL4* 1,0 \pm 0,3, *CXCL11* 1,0 \pm 0,3. Gydymui atsparių pacienčių normalizuota santykinė šių genų raiška buvo: *CCL2* 1,4 \pm 0,2, *CCL3* 1,7 \pm 0,5, *CCL4* 1,1 \pm 0,3, *CXCL11* 1,2 \pm 0,3. Nustatyta, kad navike *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CXCL11* raiška tarp tiriamųjų grupių statistiškai reikšmingai nesiskiria ($p>0,05$) (15 pav.). Tai rodo, kad chemokinių koncentracijų skirtumus kraujo serume lemia ne naviko ir jo mikroaplinkos ląstelės. Kadangi šiuos chemokinus gali sintetinti įvairios imuninės sistemos ląstelės, jų koncentracijos skirtumai tarp tiriamųjų grupių gali būti susiję su sisteminiu imuniniu atsaku į vėžio vystymąsi.



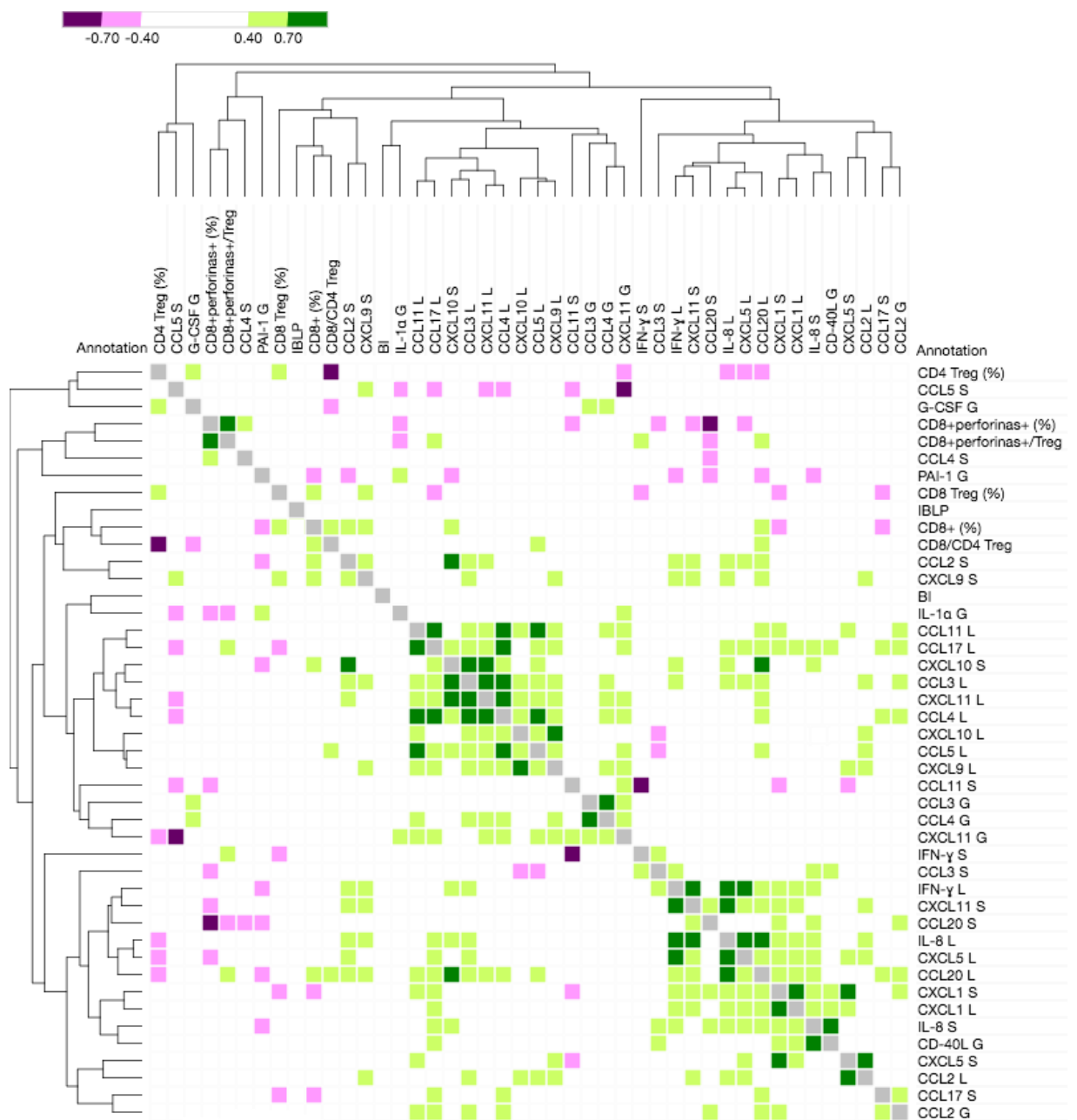
15 pav. Su imunine sistema susijusių genų raiškos vertinimas kiaušidžių naviko mėginiuose. Pateikiami vidurkiai \pm standartinė paklaida. Vidurkių palyginimui tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių buvo naudojamas t-testas. Duomenys normalizuoti gydymui jautrių pacienčių santykinę genų raišką (R) prilyginus 1. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupių, $p<0,05$.

Vėliau mes įvertinome *G-CSF*, *IL-1 α* , *PAI-1*, *CD40 L*, atrinktų citokinų gardelių metodu, genų raiškos skirtumus navike tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių grupių. Tyrimo rezultatai parodė, kad chemoterapijai jautrių pacienčių normalizuota santykinė genų raiška buvo: *G-CSF* 1,0 \pm 0,4, *IL-1 α* 1,0 \pm 0,2, *CD40 L* 1,0 \pm 0,3, *PAI-1* 1,0 \pm 0,4. Chemoterapijai atsparių pacienčių normalizuota santykinė šių genų raiška buvo: *G-CSF* 2,9 \pm 0,9, *IL-1 α* 4,9 \pm 1,7, *CD40 L* 4,5 \pm 2,2, *PAI-1* 2,1 \pm 0,6. Nustatytas statistiškai reikšmingas *G-CSF* ir *IL-1 α* raiškos skirtumas tarp tiriamųjų grupių ($p < 0,05$). Žinoma, kad daugiausiai šiuos citokinus išskiria aktyvinti makrofagai. Todėl didesnė *G-CSF* ir *IL-1 α* raiška chemoterapijai atsparių pacienčių navike rodo svarbią įgimto imuniteto reikšmę kiaušidžių vėžio vystymuisi [61, 62].

3.5. Imuninių parametrų koreliacijos vertinimas

Įvertinus EKV sergančių pacienčių kraujo limfocitų populiacijas, citokinų koncentraciją kraujo serume ir naviko lizate, imuninių žymenų raišką navike, mes siekėme patikrinti šių žymenų tarpusavio koreliaciją bei ryšį su atsparumu gydymui. Šiam tikslui pasiekti buvo skaičiuojamas Spirmeno koreliacijos koeficientas (r_s). Grafiškai ryšys bei jo stiprumas tarp skirtingų parametrų vaizduojamas naudojant koreliacijos koeficientų matricą, kurioje artimai susiję duomenys išdėliojami vienas šalia kito ir suskirstomi į grupes (klasterius) (16 ir 17 pav.). Chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupės buvo lyginamos atskirai.

Tendencija Nr. 1. Chemoterapijai jautrių pacienčių navike vėžio progresavimą skatinantys citokinai teigiamai koreliuoja su citokinais, lemiančiais priešvėžinį imuninį atsaką. Tokia tendencija stebima abiejuose gydymui jautrių pacienčių klasteriuose (16 pav.). Pirmame klasteryje tarpusavyje stipriai teigiamai ($r_s > 0,7$) koreliuoja CCL4, CCL5, CCL11, CCL17. Nors CCL17 ir CCL4 reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi nėra aiški, tačiau mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad jie koreliuoja su parametrais, atsakingais už naviko progresavimą [53, 55]. Tame pačiame klasteryje pastebėta stipri teigiama CCL3, CCL4, CXCL11 tarpusavio koreliacija. Šiuo atveju CCL3 ir CCL4 koreliuoja su CXCL11, kuris atsakingas už priešvėžinį imuninį atsaką [54]. Antrame chemoterapijai jautrių pacienčių klasteryje tarpusavyje stipriai teigiama koreliuoja IFN- γ , IL-8, CXCL5. Žinoma, kad IFN- γ pasižymi priešvėžiniu poveikiu, o IL-8, CXCL5 skatina naviko vystymąsi ir plitimą [54, 58 – 60]. Taigi, naviko progresavimą skatinantys citokinai (IL-8, CXCL5) stipriai teigiamai koreliuoja su naviko progresavimą slopinančiu citokinu (IFN- γ). Remiantis gautais tyrimų rezultatais galima daryti prielaidą, kad gydymui jautrių pacienčių organizme didėjant naviko progresavimui gali stiprėti priešvėžinis imuninis atsakas.

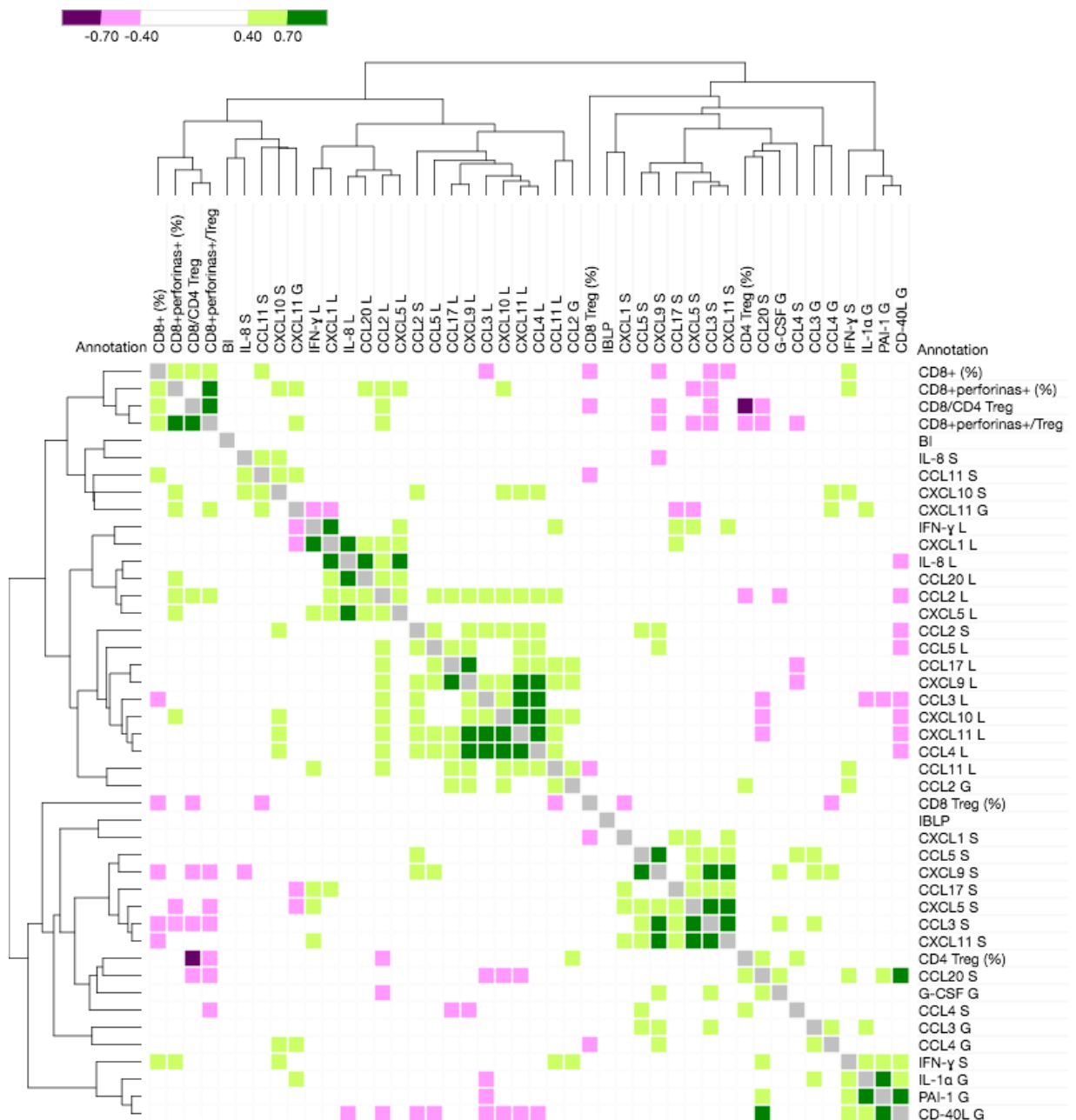


16 pav. Chemoterapijai jautrių pacienčių Spirmeno koreliacijos koeficientų matrica.

Paveiksle skirtingomis spalvomis vaizduojamas vidutinis ($r_s > |0,4|$) ir stiprus ($r_s > |0,7|$) tarpusavio ryšys. Teigiama koreliacija rodo tiesioginę priklausomybę (žalia spalva), o neigiama – atvirkštinę priklausomybę (violetinė spalva). Artimai susiję parametrai išdėlioti grupėmis (*angl. cluster*). S – kraujo serumas, L – navikos lizatas, G – genų raiška, % – procentai nuo visų limfocitų, BI – bendras išgyvenamumas, IBLP – išgyvenamumas be ligos progresavimo.

Tendencija Nr. 2. Chemoterapijai atsparių pacienčių navike vėžio progresavimą skatinatys citokinai nekoreliuoja su citokinais, lemiančiais priešvėžinį imuninį atsaką. Pirmame gydymui atsparių pacienčių klasteryje stipriai teigiamai ($r_s > 0,7$) tarpusavyje koreliuoja IL-8, CXCL1, CCL20 ir CXCL5 (17 pav.). Nors CCL20 reikšmė kiaušidžių vėžio vystymuisi nėra žinoma, tačiau tyrimo rezultatai rodo, kad jis koreliuoja su imuniniais parametrais, kurie lemia ne tik naviko progresavimą, bet ir atsparumą chemoterapijai [54, 57 – 59]. Antrame gydymui atsparių pacienčių klasteryje stipriai teigiamai tarpusavyje koreliuoja CCL3, CCL4,

CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL17. Literatūros duomeninis, CXCL9, CXCL10 ir CXCL11 slopina angiogenezę ir vėžio progresavimą [54]. Gydimui atsparių pacienčių grupėje, priešingai nei jautrių, navike nepastebėta jokio ryšio tarp vėžio progresavimą skatinančių ir slopinančių citokinų. Tai rodo, kad naviko progresavimas gydymui atsparių pacienčių organizme ne visada susijęs su stipresniu priešvėžiniu imuniu atsaku pačiame navike.



17 pav. Chemoterapijai atsparių pacienčių Spirmeno koreliacijos koeficientų matrica.

Paveiksle skirtingomis spalvomis vaizduojamas vidutinis ($r_s > |0,4|$) ir stiprus ($r_s > |0,7|$) tarpusavio ryšys. Teigiama koreliacija rodo tiesioginę priklausomybę (žalia spalva), o neigiama – atvirkštinę priklausomybę (violetinė spalva). Artimai susiję parametrai išdėlioti grupėmis (*angl. cluster*). S – kraujo serumas, L – navikos lizatas, G – genų raiška, % – procentai nuo visų limfocitų, BI – bendras išgyvenamumas, IBLP – išgyvenamumas be ligos progresavimo.

Tendencija Nr. 3. Chemoterapijai jautrių pacienčių navike vėžio progresavimą skatinantys citokinai teigiamai koreliuoja su vėžio progresavimą slopinančiais citokiniais kraujo serume. Nustatyta stipri teigiama koreliacija ($r_s > 0,7$) tarp IL-8 gydymui jautrių pacienčių navike ir CXCL11 kraujo serume. Šiuo metu žinoma, kad IL-8 skatina ne tik naviko vystymąsi, bet lemia atsparumą platinos ir paklitakselio terapijai [58, 59]. CXCL11 slopina angiogenezę ir neleidžia navikui plisti [54]. Todėl galima daryti prielaidą, kad didėjant naviko progresavimui, gali stiprėti sisteminis priešvėžinis imuninis atsakas. Chemoterapijai atsparių pacienčių grupėje, priešingai nei jautrių, imuniniai parametrai nekoreliuoja tarp kraujo serumo ir naviko.

Tendencija Nr. 4. Chemoterapijai atsparių pacienčių kraujo serume vėžio progresavimą skatinantys citokinai teigiamai koreliuoja su citokiniais, lemiančiais priešvėžinį imuninį atsaką. Nustatyta, kad gydymui atsparių pacienčių kraujo serume stipriai teigiamai ($r_s > 0,7$) tarpusavyje koreliuoja CCL3, CCL5, CXCL5, CXCL9, CXCL11. Kaip minėta anksčiau, CXCL9, CXCL11 slopina vėžio progresavimą [54]. Literatūros duomenimis, CCL5 ir CXCL5 pasižymi priešingu poveikiu – jie skatina naviko augimą, angiogenezę ir metastazavimą [53, 54]. Taigi, chemoterapijai atsparių pacienčių kraujo serume didėjant naviko progresavimą skatinančių citokinų koncentracijoms, didėja ir citokinų, atsakingų už priešvėžinį imuninį atsaką, koncentracijos. Tokia tendencija gydymui jautrių pacienčių grupėje nestebima.

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad koreliacijos tarp įvairių imuninių parametrų skiriasi chemoterapijai jautrių ir atsparių pacienčių grupėse. Pavyzdžiui, gydymui jautriose pacientėse vėžio progresavimą skatinantys citokinai koreliuoja su citokiniais, lemiančiais priešvėžinį imuninį atsaką, tik navike, bet ne kraujo serume, o gydymui atspariose pacientėse priešingai – tik kraujo serume, bet ne navike. Tačiau chemoterapijai atsparių pacienčių grupėje, priešingai nei jautrių, imuniniai parametrai nekoreliuoja tarp naviko ir kraujo serumo. Tokie skirtumai lemia nevienodas tendencijas tiriamose grupėse bei rodo, kad imuniniai mechanizmai, dalyvaujantys kiaušidžių vėžio patogenezėje, gali būti skirtingi. Tam išsiaiškinti, reikia atlikti papildomus tyrimus.

4. IŠVADOS

1. Periferinio kraujo suspresinių/citotoksinių limfocitų populiacijas nepakankamai informatyvu naudoti kaip epitelinio kiaušidžių vėžio predikcinius biožymenis.

2. CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , IFN- γ citokinų koncentracijos padidėjimas kraujo serume turi potencialią predikcinę vertę nustatant chemoterapijai atsparias pacientes. Naviko mikroaplinkoje tiriamų citokinų galima predikcinė reikšmė nepastebėta.

3. *G-CSF* ir *IL-1 α* raiškos padidėjimas navike leidžia atskirti chemoterapijai atsparias pacientes.

4. Imuninių parametrų tarpusavio ryšių ir jų stiprumo skirtumus chemoterapijai jautriose ir atspariose pacientėse gali lemti skirtingi imuninio atsako mechanizmai, kuriems pagrįsti ir išsiaiškinti reikia tolimesnių tyrimų.

SANTRAUKA

Darbo autorius: Greta Šalčiūnienė

Darbo pavadinimas: Epitelinio kiaušidžių vėžio predikcinių imuninių žymenų paieška

Darbo tikslas: nustatyti predikcinius imuninius atsparumo chemoterapijai žymenis žmogaus epitelinio kiaušidžių naviko mikroaplinkoje ir periferiniame kraujyje bei nustatyti jų tarpusavio sąsajas.

Uždaviniai: įvertinti pacienčių periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijas; nustatyti citokinų koncentraciją naviko mikroaplinkoje ir kraujo serume; įvertinti su imunine sistema susijusių genų raišką naviko audinyje; nustatyti sąsajas tarp imuninių žymenų raiškos, kraujo limfocitų populiacijų, citokinų koncentracijos naviko mikroaplinkoje ir kraujo serume bei patikrinti šių žymenų ryšį su atsparumu gydymui.

Tyrimo objektas. Tyrime dalyvavo 36 epiteliniu kiaušidžių vėžiu sergančios pacientės, kurios 2013 – 2017 m. gydėsi NVI Onkoginekologijos skyriuje. Atsižvelgiant į jautrumą pirmos eilės platinos chemoterapijai pacientės buvo suskirstytos į dvi grupes: jautrias ir atsparias. *Ex vivo* tyrimams buvo naudojami pacienčių periferinis kraujas ir kraujo serumas, naviko audinys bei jo lizatas.

Metodai. Pacienčių periferinio kraujo supresinių/citotoksinių limfocitų populiacijos buvo tiriamos tėkmės citometriniu metodu. Citokinų koncentracija kraujo serume ir naviko lizate buvo nustatyta pasitelkiant gardelių technologiją bei tėkmės citometrinių metodą. Su imunine sistema susijusių genų raiška navike buvo tiriama tikrojo laiko PGR metodu.

Rezultatai. Dėl didelio duomenų išsibarstymo periferinio kraujo suspresinių/citotoksinių limfocitų populiacijos tarp gydymui jautrių ir atsparių pacienčių statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p>0,05$). Tyrimo metu nustatytos reikšmingai didesnės CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , IFN- γ citokinų koncentracijos gydymui atsparių pacienčių kraujo serume nei gydymui jautrių pacienčių ($p<0,05$). Tačiau nebuvo pastebėta citokinų koncentracijos skirtumų tarp tiriamųjų grupių naviko lizato mėginiuose ($p>0,05$). Chemoterapijai atsparių pacienčių navike nustatyta reikšmingai didesnė *G-CSF* ir *IL-1 α* raiška nei chemoterapijai jautrių pacienčių ($p<0,05$). Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad koreliacijos tarp įvairių imuninių parametrų abiejose tiriamose grupėse skiriasi ($p<0,05$).

Išvados. Periferinio kraujo suspresinių/citotoksinių limfocitų populiacijas nepakankamai informatyvu naudoti kaip epitelinio kiaušidžių vėžio predikcinius biožymenis. CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , IFN- γ citokinų koncentracijos padidėjimas kraujo serume turi potencialią predikcinę vertę nustatant chemoterapijai atsparias pacientes. Naviko mikroaplinkoje tiriamų citokinų galima predikcinė reikšmė nepastebėta. *G-*

CSF ir *IL-1 α* raiškos padidėjimas navike leidžia atskirti chemoterapijai atsparias pacientes. Imuninių parametrų tarpusavio ryšių ir jų stiprumo skirtumus chemoterapijai jautriose ir atspariose pacientėse gali lemti skirtingi imuninio atsako mechanizmai, kuriems pagrįsti ir išsiaiškinti reikia tolimesnių tyrimų.

SUMMARY

Thesis author: Greta Šalčiūnienė

Full title of the thesis: The Search for Predictive Immune Biomarkers of Epithelial Ovarian Cancer

The aim of the study: To identify predictive immune biomarkers of chemotherapy resistance in the epithelial ovarian tumor microenvironment and peripheral blood, and to investigate the relationships among them.

Objectives: to evaluate the suppressive/cytotoxic lymphocyte populations in patients peripheral blood; to measure the concentration of cytokines in tumor microenvironment and peripheral blood; to detect the expression of relevant immune-related genes in tumor tissue; to identify the relationships between immune-related genes expression, blood lymphocytes and concentration of cytokines in serum and tumor microenvironment, and to determine their potential predictive value of foreseeing the chemotherapy outcome.

The object of the study. 36 epithelial ovarian cancer patients were involved in this study. All patients were treated in the Oncogynecology Department of National Cancer Institute during the period of 2013 – 2017. Patients were divided into chemotherapy-sensitive and resistant groups, depending on their treatment outcome. Patients' peripheral blood, serum, tumor tissue and its lysate were collected, processed and used for *ex vivo* experiments.

Methods. Suppressive/cytotoxic lymphocytes in the peripheral blood were subtyped by flow cytometry. Cytokine array and flow cytometry were used to measure the cytokine concentration in serum and tumor lysate. The expression of selected immune-related genes expression in the tumor tissue was analyzed by quantitative real-time PCR.

Results. There were no significant differences ($p > 0,05$) between chemotherapy-resistant and sensitive patients peripheral blood in terms of suppressive/cytotoxic lymphocyte populations. Concentrations of CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , IFN- γ in the blood were significantly higher ($p < 0,05$) in treatment-resistant versus sensitive patients. However, there was no difference in cytokine concentration ($p > 0,05$) in tumor lysates between two different groups. G-CSF and IL-1 α genes were found to be upregulated ($p < 0,05$) in chemotherapy-resistant group in comparison to sensitive patients. Our results show that correlations between various immune parameters in both groups are different ($p < 0,05$).

Conclusions. Suppressive/cytotoxic lymphocyte populations in peripheral blood are not informative enough to be used as predictive biomarkers of epithelial ovarian cancer. Elevated concentrations of CCL2/MCP-1, CXCL11/I-TAC, CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β ,

IFN- γ have the potential predictive value for selecting chemotherapy-resistant patients. However, cytokines from tumor microenvironment have no predictive power. Increased expression of G-CSF and IL-1 α genes allows identifying chemotherapy-resistant patients. Correlation patterns between sensitive and resistant patients are different, suggesting that tumor development and response to treatment may depend on the specific underlying immune mechanisms, which still need to be confirmed in future studies.

PADĖKA

Noriu padėkoti visiems, kurie padėjo rašyti šį darbą.

Reiškiu nuoširdžią padėką NVI Imunologijos laboratorijos vedėjai, savo baigiamojo darbo vadovei dr. Vitai Pašukonienei už galimybę atlikti magistro darbą jos vadovaujamoje laboratorijoje, už vertingus patarimus, pastabas bei suteiktas žinias.

Dėkoju konsultantei jaunesniajai mokslo darbuotojai doktorantei Agatai Mlynskai už pagalbą vykdant tyrimus, suteiktas praktines žinias bei patarimus, kantrybę ir nuoširdų palaikymą rašant magistro darbą.

Taip pat dėkoju visam NVI Imunologijos laboratorijos kolektyvui už gerą žodį ir palaikymą.

Su pagarba,
Greta Šalčiūnienė

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Morgan RJ, Alvarez RD, Armstrong DK, Boston B, Burger RA, Chen L, et al. Epithelial ovarian cancer. *JNCCN* 2011; 9: 82–113.
2. Kurman RJ, Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer – a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(3): 433–43.
3. Intaitė B, Tamošauskienė J. Apie kiaušidžių vėžį, informacija pacientams. Vilnius: UAB „Petro ofsetas“ I-kla; 2007. 1-29 p.
4. Epitelinio kiaušidžių vėžio (ligos kodas pagal TLK-10-AM C56) diagnostikos ir gydymo metodika. Interneto prieiga:
https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/Veiklos_sritys/Asmens_sveikatos_prieziura/Diagnostikos_metodikos_ir_rekomendacijos/Metodikos/Kiausidziu_vezio_diagnostikos_ir_gydymo_metodika.pdf
5. Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 1-14.
6. Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012; 13(8): 9545–71.
7. Thibault B, Castells M, Delord JP, Couderc B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev* 2014; 33(1): 17-39.
8. Santoiemma PP, Powell DJ. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(6): 807-20.
9. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2162–71.
10. Barbieri F, Bajetto A, Florio T. Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target. *J Oncol* 2010; 2010: 1-15.
11. Jones VS, Huang RY, Chen LP, Chen ZS, Fu L, Huang RP. Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1865(2): 255-65.
12. Stropus R, Vaičekauskas V, Tutkuviene J. Žmogaus anatomija, antrasis tomas. Kaunas: KMU I-kla; 2008. 318-19 p.
13. Česnys G, Tutkuviene J, Barkus A. Žmogaus anatomija, pirmas tomas. Vilnius: Vilniaus universiteto I-kla; 2008. 530-5 p.

14. Vitkus A, Baltrušaitis K, Valančiūtė A. Žmogaus histologija. Kaunas: KMU I-kla; 2003. 422-6 p.
15. Žmogaus reprodukcinė sistema, kiaušidžių struktūra. Interneto prieiga: <https://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Reproductive.html>
16. Praškevičius A, Lukoševičius L, Burneckienė J, Radovičius H, Dūdėnas H. Hormonai, universiteto vadovėlis. Kaunas: KMU spaudos ir leidybos centro I-kla; 2002. 213-30 p.
17. Pasaulio sveikatos organizacija. Tarptautinė vėžio tyrimų agentūra, GLOBOCAN 2012 projektas. Interneto prieiga: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
18. Nacionalinis vėžio institutas, Vėžio kontrolės ir profilaktikos centras. Vėžio registras, Vėžys Lietuvoje 2012 metais. Interneto prieiga: http://www.nvi.lt/wp-content/uploads/2016/04/Vezys_lietuvoje_2012.pdf
19. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164(5): 1511–18.
20. Janavičius R. Paveldimas krūties ir kiaušidžių vėžys. BRCA1 ir BRCA2 genų mutacijas turinčių pacientų priežiūros principai. Vilnius: Paveldimo vėžio asociacija; 2013. 1–52 p.
21. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302(5645): 643-46.
22. Gupta D, Lis CG. Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *J Ovarian Res* 2009; 2(13): 1-20.
23. Pepin K, Carmen M, Brown A, Dizon DS. Ca 125 and epithelial ovarian cancer: role in screening, diagnosis, and surveillance. *J Ovarian Res* 2014; 10(6): 22-9.
24. Simmons AR, Baggerly K, Bast RC. The emerging role of HE4 in the evaluation of advanced epithelial ovarian and endometrial carcinomas. *Oncology* 2013; 27(6): 548–56.
25. Vaitkienė D, Kajėnas S, Nadišauskienė R, Inčiūra A, Juozaitytė E, Vaidotienė R, ir kt. Chirurginis išplitusio epitelinio kiaušidžių vėžio gydymas. *Medicina* 2004; 40(3): 205-15.
26. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* 2015; 26(2): 87-9.
27. Sousa GF, Wlodarczyk SR, Monteiro G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Braz J Pharm Sci* 2014; 50(4): 693–701.
28. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014; 25(18): 2677–81.
29. Colombo N, Conte PF, Pignata S, Raspagliesi F, Scambia G. Bevacizumab in ovarian cancer: focus on clinical data and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 97: 335–48.
30. Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba prie Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerijos. Siūlomo įrašyti į ligų ir kompensuojamųjų vaistinių preparatų joms gydyti sąrašą

vaistinio preparato Avastin (Bevacizumabas) terapinės vertės nustatymo protokolas. Interneto prieiga:

https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/Struktura_ir_kontaktai/Darbo_grupes_ir_komisijos/Ligu_ir_vaistu_kompensavimo_komisija/Vaistiniu_preparatu_vertinimas/VVKTdelAvastin.pdf

31. Tapia G, Diaz-Padilla I. Molecular mechanisms of platinum resistance in ovarian cancer. In: Ovarian cancer – a clinical and translational update. Madrid: „InTech“; 2013. p. 205-23.
32. Colombo PE, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, Ray-Coquard I. Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89(2): 207-16.
33. Liu MX, Chan DW, Ngan HYS. Mechanisms of chemoresistance in human ovarian cancer at a glance. *Gynecol Obstet* 2012; 2(3): 100-4.
34. Garson K, Vanderhyden BC. Epithelial ovarian cancer stem cells: underlying complexity of a simple paradigm. *Reproduction* 2015; 149(2): 59-70.
35. Tomao F, Papa A, Rossi L, Strudel M, Vici P, Lo Russo G, et al. Emerging role of cancer stem cells in the biology and treatment of ovarian cancer: basic knowledge and therapeutic possibilities for an innovative approach. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32: 1-48.
36. Ling KS, Chen GD, Tsai HJ, Lee MS, Wang PH. Mechanisms involved in chemoresistance in ovarian cancer. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2005; 44(3): 209-17.
37. Didžiapetrienė J. Vėžio biologija. Mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas; 2013. 70-3 p.
38. Hardwick N, Frankel PH, Cristea M. New approaches for immune directed treatment for ovarian cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2016; 17(3): 1-14.
39. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(3): 203-13.
40. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8 +/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(51): 18538-43.
41. Knutson LK, Karyampudi L, Lamichhane P, Preston C. Targeted immune therapy of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2015; 34(1): 53–74.
42. Wang W, Kryczek I, Dostál L, Lin H, Tan L, Zhao L, et al. Effector T cells abrogate stroma-mediated chemoresistance in ovarian cancer. *Cell* 2016; 165(5): 1092-105.

43. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer; *PLoS ONE* 2013; 8(11): 80063-73.
44. Martins Filho A, Jammal MP, Nomelini RS, Murta EF. The immune response in malignant ovarian neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol* 2014; 35(5): 487-91.
45. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7(5): 370-5.
46. Zhang S, Ke X, Zeng S, Wu M, Lou J, Wu L, et al. Analysis of CD8 Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment. *Cell Mol Immunol* 2015; 12: 580–91.
47. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(23): 8326–31.
48. Erfani N, Hamed-Shahraki M, Rezaeifard S, Haghshenas M. FoxP3+ regulatory T cells in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer. *Iran J Immunol* 2014; 11(2): 105-12.
49. Milašienė V, Stratilaitovas E. Citokinų funkcija. Jų reikšmė vėžiu sergančių pacientų imuninei sistemai. *Medicinos teorija ir praktika* 2009; 15(4): 344–8.
50. Fader AN, Rasool N, Vaziri SA, Kozuki T, Faber PW, Elson P, et al. CCL2 expression in primary ovarian carcinoma is correlated with chemotherapy response and survival outcomes. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 4791-8.
51. Furukawa S, Soeda S, Kiko Y, Suzuki O, Hashimoto Y, Watanabe T, et al. MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2013; 33(11): 4785-90.
52. Moisan F, Francisco EB, Brozovic A, Duran GE, Wang YC, Chaturvedi S, et al. Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers. *Mol Oncol* 2014; 8(7): 1231-9.
53. Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm* 2014; 2014(8): 1-12.
54. Rainczuk A, Rao J, Gathercole J, Stephens AN. The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. *Reproduction* 2012; 144(3): 303-17.
55. Levina V, Nolen BM, Marrangoni AM, Cheng P, Marks JR, Szczepanski MJ, et al. Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(8): 2647-56.
56. Falcao-Junior JO, Teixeira-Carvalho A, Candido EB, Lages EL, Ferreira Freitas GG, Lamaita RM, et al. Assessment of chemokine serum levels in epithelial ovarian cancer patients. *Tumori* 2013; 99(4): 540-4.

57. Bolitho C, Hahn MA, Baxter RC, Marsh DJ. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(4): 929-40.
58. Dobrzycka B, Mackowiak-Matejczyk B, Terlikowska KM, Kulesza-Bronczyk B, Kinalski M, Terlikowski SJ, et al. Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur Cytokine Netw* 2013; 24(3): 106-13.
59. Wang Y, Qu Y, Niu XL, Sun WJ, Zhang XL, Li LZ. Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* 2011; 56(2): 365-75.
60. Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2487-96.
61. Woolery KT, Kruk PA. Ovarian epithelial-stromal interactions: role of interleukins 1 and 6. *Obstet Gynecol Int* 2011; 2011: 1-9.
62. Fanning J, Colgrove M, Phibbs G. Cisplatin-paclitaxel-cyclophosphamide with G-CSF in primary advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79(1): 97-100.
63. Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(2): 253-60.
64. Zhang ZM, Zhang C, Zhang FH, Shan BE, Nakagawa S, Tagawa M. Biological and antitumor effects of CD40L on ovarian cancer cell line OVHM. *Ai Zheng* 2006; 25(9): 1102-7.
65. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 2015; 137(2): 262-6.
66. Matuzevičienė R. Tėkmės citometrija ir jos taikymas laboratorinėje medicinoje. Mokomoji knyga. Vilnius: Petro ofsetas; 2013. 80 p.
67. Uždegiminių chemokinių tyrimo protokolas. Interneto prieiga: <https://www.biolegend.com/legendplex>
68. RNR išskyrimo protokolas. Interneto prieiga: <http://www.yeastern.com/Products.php?pid=147&pkid=9&ptype=56>

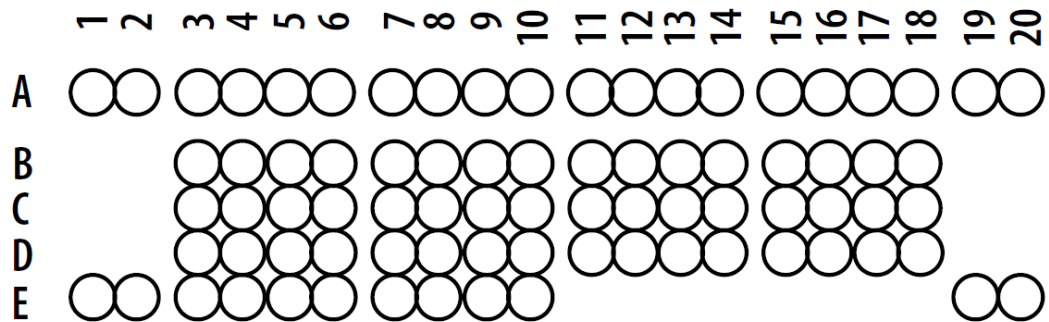
PRIEDAI

Priedas Nr.1. Tyrime naudota citokinių gardelė

1 lentelė. Citokinių gardelėje tiriami citokinai ir jų koordinatės

| Koordinatė | Citokinas/Kontrolė | Alternatyvus pavadinimas |
|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| A1, A2 | Teigiama kontrolė | _____ |
| A3, A4 | CCL1/I-309 | P500, SCYA1, SCYA2, TCA-3 |
| A5, A6 | CCL2/MCP-1 | MCAF |
| A7, A8 | MIP-1 α /MIP-1 β | CCL3/CCL4 |
| A9, A10 | CCL5/RANTES | _____ |
| A11, A12 | CD40 ligandas/TNFSF5 | CD154, CD40LG, gp39, TRAP |
| A13, A14 | Komplemento komponentas C5/C5a | C5/C5a |
| A15, A16 | CXCL1/GRO α | CINC-1, KC |
| A17, A18 | CXCL10/IP-10 | CRG-2 |
| A19, A20 | Teigiama kontrolė | - |
| B3, B4 | CXCL11/I-TAC | β -R1, H174 |
| B5, B6 | CXCL12/SDF-1 | PBSF |
| B7, B8 | G-CSF | CSF β , CSF-3 |
| B9, B10 | GM-CSF | CSF α , CSF-2 |
| B11, B12 | ICAM-1/CD54 | _____ |
| B13, B14 | IFN- γ | II tipo interferonas |
| B15, B16 | IL-1 α /IL-1F1 | _____ |
| B17, B18 | L-1 β /IL-1F2 | _____ |
| C3, C4 | IL-1ra/IL-1F3 | _____ |
| C5, C6 | IL-2 | TCGF |
| C7, C8 | IL-4 | BCDF, BSF1 |
| C9, C10 | IL-5 | _____ |
| C11, C12 | IL-6 | BSF-2 |
| C13, C14 | IL-8 | CXCL8, GCP1, NAP1 |
| C15, C16 | IL-10 | CSIF |
| C17, C18 | IL-12 p70 | CLMF p35 |
| D3, D4 | IL-13 | _____ |
| D5, D6 | IL-16 | LCF |
| D7, D8 | IL-17A | CTLA-8 |
| D9, D10 | IL-17E | IL-25 |

| Koordinatė | Citokinas/Kontrolė | Alternatyvus pavadinimas |
|------------|--------------------|--------------------------|
| D11, D12 | IL-18/IL-1F4 | IGIF |
| D13, D14 | IL-21 | _____ |
| D15, D16 | IL-27 | IL-27 A |
| D17, D18 | IL-32 α | _____ |
| E1, E2 | Teigiama kontrolė | _____ |
| E3, E4 | MIF | GIF, DER6 |
| E5, E6 | Serpinas E1/PAI-1 | Neksinas, PLANH1 |
| E7, E8 | TNF- α | TNFSF1A |
| E9, E10 | TREM-1 | CD354 |
| E19, E20 | Neigiama kontrolė | _____ |



1 pav. Citokinių gardelė