

VILNIAUS UNIVERSITETAS

AGATA MLYNSKA

SISTEMINIO IR VIETINIO IMUNITETO REIKŠMĖ VĖŽIO VYSTYMUISI IR  
ATSAKUI Į GYDYMĄ

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2018

Daktaro disertacija rengta 2013-2018 m. Vilniaus universitete, Nacionaliniame vėžio institute bei Šveicarijos federaliniame tyrimų institute Lozanoje.

Mokslinė vadovė – dr. Vita Pašukonienė (Nacionalinis vėžio institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje:

Pirmininkas – prof. dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Nariai:

prof. dr. (HP) Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

dr. Mykolas Mauricas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovtyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

doc. dr. Eiva Bernotienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovtyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

prof. dr. Simona Donina (Rygos Stradinio universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. rugsėjo mėn. 28 d. 13.00 val. Gyvybės mokslų centro R-104a auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2018 m. rugpjūčio mėn. 28 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)



VILNIUS UNIVERSITY

AGATA MLYNSKA

THE ROLE OF SYSTEMIC AND LOCAL IMMUNITY IN TUMOR  
DEVELOPMENT AND RESPONSE TO TREATMENT

Summary of doctoral dissertation  
Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2018

This doctoral dissertation was prepared in Vilnius University, National Cancer Institute, and Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne in 2013-2018.

Scientific supervisor – Dr. Vita Pašukonienė (National Cancer Institute, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

The defense of the doctoral dissertation will be held during the public meeting of the dissertation Defense board:

Chairman – Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

Members:

Prof. Dr. (HP) Aurelija Žvirblienė (Vilnius University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

Dr. Mykolas Mauricas (State Scientific Research Institute Centre for Innovative Medicine, Biomedical sciences, Biology – 01B).

Assoc. Prof. Dr. Eiva Bernotienė (State Scientific Research Institute Centre for Innovative Medicine, Biomedical sciences, Biology – 01B).

Prof. Dr. Simona Donina (Riga Stradins University, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

The defense of the doctoral dissertation will be held during the public meeting of the dissertation Defense board on September 28th, 2018 at 1 pm in the room R-104a in Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Saulėtekio al.7, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was sent on August 28th, 2018.

The doctoral dissertation is available at the Vilnius University library and Vilnius University website: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## TURINYS

<b>SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>6</b>
<b>ĮVADAS .....</b>	<b>7</b>
<b>REZULTATŲ APŽVALGA .....</b>	<b>10</b>
Vėžinių ląstelių lizato įtaka dendritinių ląstelių subrendimui ir imunostimuliacinėms savybėms .....	10
Vėžinių ląstelių kamieniškumo savybių įtaka jų gebėjimui paskatinti makrofagų poliarizaciją .....	12
Tarpusavio sąveikų tarp kiaušidžių vėžio ląstelių ir makrofagų tyrimas .....	15
Imuninės naviko mikroaplinkos vystymasis iBIP2 pelių melanomos modelyje .....	19
Imunoterapija imunomoduliuojančiais antikūnais iBIP2 pelių melanomos modelyje.....	21
Kiaušidžių vėžio navikų imuninės infiltracijos bei serumo chemokinių tyrimai.....	26
Predikcinių kiaušidžių vėžio atsinaujinimo žymenų tyrimai .....	31
<b>IŠVADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>36</b>
<b>PADĖKA.....</b>	<b>37</b>
<b>GYVENIMO APRAŠYMAS .....</b>	<b>38</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>39</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>41</b>

## **SANTRUMPŲ SĄRAŠAS**

AUC – plotas po kreive

BI – bendras išgyvenamumas

BRAF – B-raf onkogeną kodujantis genas

CTL – citotoksiniai T limfocitai

CTLA-4 – citotoksinių T limfocitų antigenas-4

CUI – klinikinio naudingumo indeksas

DL – dendritinės ląstelės

EMT – epitelinė-mezenchiminė transformacija

iBIP2 – indukuojamas BRAF Ink/ArF Pten pelių melanomos modelis

IBP – išgyvenimas be progresavimo

KV – kiaušidžių vėžys

LPS – lipopolisacharidas

MAPK – mitogenų aktyvuota baltymų kinazė

MDSC – mieloidiniai supresoriai

NK – natūralieji kileriai

PD-1 – programuotos ląstelių žūties baltymas-1

ROC – grafikas, rodantis klasifikatoriaus jautrumo ir specifiškumo ryšį

RL-kPGR – realaus laiko kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

SE - jautrumas

SP - specifiškumas

TCGA – vėžio genomo atlasas

Treg – reguliaciniai T limfocitai

## IVADAS

### PROBLEMA

Naviko mikroaplinką sudaro įvairūs ląstelių tipai. Jų tarpusavio sąveikos svarbios tiek naviko vystymosi, tiek gydymo metu [1,2]. Dėl įgytų mutacijų ir fenotipinio plastiškumo atsiradusios vėžinės ląstlės skiriasi pagal savo diferenciacijos ir kamieniškumo lygį [3,4]. Jos geba pritraukti ir perprogramuoti normalias stromos ląsteles (fibroblastus, endotelio ląsteles, pericitus, imuninės sistemos ląsteles) taip, kad jų atliekamos funkcijos būtų parankios navikui [5].

Imuninė sistema geba atpažinti navikinius neoantigenus, atsiradusius dėl didelio mutacinio krūvio vėžinėse ląstelėse [6]. Idealiu atveju, dendritinėms ląstelėms atpažinus ir pateikus T ląstelėms navikinį antigeną, pastarosios yra aktyvuojamos, migruoja į naviką, ir naikina vėžines ląsteles [7]. Tačiau vėžys išvysto įvairius būdus išvengti imuninio atsako [8–10]. Priklausomai nuo išvengimo strategijos išskiriami keli skirtingi imuniniai vėžio fenotipai [7,11]. Imuninio infiltrato tankis, sudėtis ir funkcinė būseną yra susiję su ligos prognoze ir atsaku į gydymą [12–14]. Navikai gali būti gydomi imunoterapija – gydymu, skirtu moduluoti paciento imuninę sistemą taip, kad ji vėl veiksmingai atpažintų ir naikintų vėžines ląsteles. Imunoterapijos tipas parenkamas pagal naviko imuninį fenotipą. Šiuo metu klinikiniam naudojimui jau patvirtinta kelių rūšių imunoterapija; nemažai naujų vaistų ir jų derinių yra klinikinių tyrimų stadijoje [7,15].

Nors naujausios navikų imunologijos ir imunoterapijos žinios sparčiai keičia šiuolaikinę klinikinę onkologiją, šioje srityje vis dar nemažai iššūkių, susijusių su su imuninių naviko elementų funkcijomis bei terapiniu taikymu. Visų pirma, genomine ir ląstelinė navikų įvairovė mažina gydymo (įskaitant ir imunoterapiją) efektyvumą. Antra, pacientų atrankai į klinikinius tyrimus trūksta patikimų biožymenų. Trečia, potencialių taikinių gausa ir išsivystantis atsparumas vaistams reikalauja kombinacinių vaistų efektyvumo tyrimų.

Su šiais iššūkiais susijusių procesų tyrimas molekulių, ląstelių, audinių ar organizmų lygmenyje reikalingas geresniam navikų imunologijos suvokimui bei naujų terapijų kūrimui. Šio tyrimo metu siekėme pateikti naujų įžvalgų apie imuninės navikų mikroaplinkos vaidmenį vėžio vystymosi ir atsako į gydymą metu.

### TIKSLAS

Šio darbo tikslas yra daugiapakopis imuninių ir vėžinių ląstelių sąveikų tyrimas siekiant geriau suprasti imuninės sistemos reikšmę navikų vystymuisi ir atsakui į gydymą.

### UŽDAVINIAI:

1. Įvertinti vėžinių ląstelių lizato poveikį dendritinių ląstelių subrendimui ir imunostimuliacinėms savybėms.
2. Įvertinti pagal kamieniškumo žymenis besiskiriančių storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimą poliarizuoti makrofagus.
3. Ištirti makrofagų ir pagal atsparumą chemoterapijai besiskiriančių kiaušidžių vėžio ląstelių abipusį poveikį genų raiškos profiliui.

4. Charakterizuoti imuninės melanomos mikroaplinkos formavimąsi iBIP2 pelių modelyje.
5. Išstirti imunomoduliuojančių antikūnų anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 efektyvumą gydant melanomą iBIP2 pelių modelyje.
6. Įvertinti kiaušidžių navikų imuninį fenotipą ir atrinkti potencialius imuninę navikų infiltraciją atspindinčius žymenis.
7. Įvertinti sistemiskai cirkuliuojančius serumo citokinus kaip potencialius predikcinius kiaušidžių vėžio žymenis.

## MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS

Šiame darbe vėžio ir imuniteto sąveikos buvo tiriamos keliais skirtingai aspektais.

Pirmiausia *in vitro* tyrinėjome vėžinių ir iš monocitų kilusių imuninės sistemos ląstelių (dendritinių ląstelių ir makrofagų) sąveikas. Mūsų gauti rezultatai akcentuoja netiesioginį imunosupresinį vėžinių ląstelių poveikį dendritinių ląstelių tolerogeniškumo vystymuisi, nepaisant to, kad dažnose gydomųjų dendritinių ląstelių vakcinų studijose šis aspektas paliekamas nuošalyje.

Tyrimai, lyginantys skirtingų ląstelių gebėjimą skatinti makrofagų poliarizaciją, taip pat reti. Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad kamieniškumo ir atsaprumo vaistams savybės daro įtaką vėžinių ląstelių imunomoduliacinėms savybėms. Be to tyrinėjome ne tik vėžinių ląstelių įtaką makrofagams, bet ir makrofagų įtaką vėžinėms ląstelėms chemoterapinio atsaprumo kontekste. Įrodėme, kad abu ląstelių tipai bendradarbiauja kurdami naviką skatinančią imunosupresinę mikroaplinką.

Mūsų tyrinėjamas iBIP2 pelių melanomos modelis iki šiol buvo naudojamas tik MAPK signalinio kelio slopiklių tyrimams. Mes pirmieji atlikome išsamią kiekybinę ir kokybinę imuninės mikroaplinkos analizę šiame modelyje bei ištyrėme imunomoduliuojančių antikūnų anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 efektyvumą. Taip pat pasiūlėme santykį tarp imunosupresinių ir priešvėžinių mieloidinių ląstelių kaip žymenį, atspindintį atsaką į gydymą, bei potencialų taikinių tolesniam imunoterapijos vystymui.

Vėžio-imuniteto ciklas bei vėžio imuniniai fenotipai tai sąlyginiai naujos sąvokos, tad publikuotų studijų, kuriose navikai būtų klasifikuojami pagal imuninius fenotipus, dar nėra daug. Mes pirmieji klasifikavome kiaušidžių navikus į skirtingus imuninius fenotipus pagal jų genų raišką, bei kiekvienam fenotipui priskyreme būdingą chemokinių raiškos profilį. Taip pat šiame darbe pasiūlėme du naujus cirkuliuojančių serumo žymenų rinkinius: CXCL9+CXCL10, skirtą atrinkti imuninių ląstelių infiltruotus navikus, bei CCL4+CCL20+CXCL1, skirtą atrinkti pacientės su didesne ligos progresavimo tikimybe. Šie žymenys galėtų pasitarnauti parenkant tinkamą antros eilės gydymą ar atrenkant pacientės klinikiškiems tyrimams.

Apibendrinant, mūsų rezultatai pagrindžia imuninės sistemos svarbą naviko vystymuisi ir atsakui į gydymą bei atskleidžia naujus žymenis ir taikinius vėžio imunoterapijai.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Brandinimas su vėžinių ląstelių lizatu skatina dendritinių ląstelių tolerogeniškumą.
2. Storosios žarnos vėžio ląstelių gebėjimas poliarizuoti makrofagus priklauso nuo jų kamieniškumo savybių.

3. Egzistuoja abipusės sąveikos tarp makrofagų ir kiaušidžių vėžio ląstelių, besiskiriančių pagal jautrumą chemoterapijai.
4. Navikų vystymasis iBIP2 pelių melanomos modelyje yra lydimas imunosupresinės naviko mikroaplinkos formavimosi.
5. Naviką infiltruojančių imunosupresinių mieloidinių ląstelių lygis atspindi atsaką į gydymą monokloniniais antikūnais iBIP2 pelių melanomos modelyje.
6. Imuninių ląstelių infiltruotiems kiaušidžių navikams būdingas specifinis cirkuliuojančių ir vidunavikinių chemokinių raiškos profilis
7. Priešoperacinis cirkuliuojančių chemokinių lygis gali prognozuoti kiaušidžių vėžio progresiją

## REZULTATŲ APŽVALGA

### Vėžinių ląstelių lizato įtaka dendritinių ląstelių subrendimui ir imunostimuliacinėms savybėms

#### PROBEMATIKA

Vėžinių ir stromos ląstelių sąveikos navike svarbios naviko vystymuisi ir metastazavimui. Navikų heterogeniškumas dažnai yra nesėkmingo vėžio gydymo priežastis. Viena iš gausiausių naviką infiltruojančių imuninių stromos ląstelių grupių yra mieloidinės ląstelės – makrofagai, monocitinės dendritinės ląstelės ir mieloidiniai supresoriai (MDS). Dendritinių ląstelių (DL) funkcijos priklauso nuo jų subrendimo lygios. Nesubrendusios ląstelės atpažįsta antigeną ir subręsta jį apdorodamos. Subrendusios dendritinės ląstelės ekspresuoja kostimuliacines molekules ir geba pateikti antigeną T limfocitams. Priklausomai nuo mikroaplinkos stimulų, DL gali būti imunogeniškos arba tolerogeniškos. Nuo jų fenotipo priklauso tolesnė imuninio atsako sėkmė. Publikuotose studijose imunogeninių ir tolerogeninių DL savybių balansas dažnai nepakankamai akcentuojamas. Todėl šiame tyrime siekėme įvertinti vėžinių ląstelių lizato poveikį DL subrendimui ir imunostimuliacinėms savybėms, ypatingą dėmesį skirdami DL tolerogeninių savybių analizei.

#### METODIKA

Iš sveikų kraujo donorų išskyrėme periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles ir *in vitro* 6 dienas GM-CSF ir IL-4 pagalba diferencijavome jas iki nesubrendusių DL. Toliau DL 24 val brandinome klasikine LPS+IFN $\gamma$  kombinacija. Tiriamosios grupės DL papildomai inkubavome su vėžinių ląstelių lizatu, sudarytu iš SK-MEL-28 (melanoma), 786-O (inkstų vėžys) ir U-87 (glioblastoma) ląstelių linijų lizatų mišinio. Tėkmės citometru vertinome dendritinių ląstelių subrendimą pagal jų paviršiaus žymenų raišką ir citokinų sekrecijos profilį. Taip pat 7 dienas kultivavome subrendusias DL su magnetiškai sortiruotais ir CFSE žymėtais CD3+ T limfocitais. Tokiu būdu vertinome DL indukuotą T limfocitų proliferaciją. Be to, po 14 dienų subrendusių DL ir magnetiškai išsortuotų CD4+ T limfocitų kokultivavimo, tėkmės citometru matavome reguliaciniams T limfocitams būdingus žymenis ir vertinome DL sukeltą imunosupresiją.

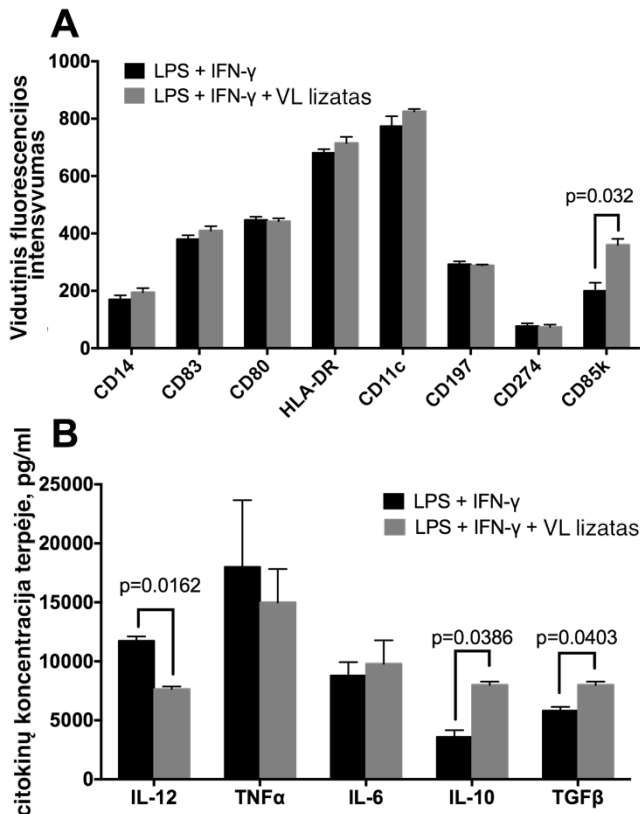
#### REZULTATAI

Norėdami iširti imunomoduliacines navikinių antigenų savybes, panaudojome trijų skirtingų ląstelių linijų (melanosos, glioblastomos, inkstų vėžio) lizatus dendritinių ląstelių brandinimui. Iš sveikų donorų periferinio kraujo išskirtus monocitus diferencijavome iki nesubrendusių dendritinių ląstelių, kurias brandinome standartiniu LPS ir IFN $\gamma$  mišiniu su vėžinių ląstelių lizatu (tiriamoji grupė) arba be jo (kontrolinė grupė).

Nepriklausomai nuo brandinimo būdo, po 24 valandų inkubacijos dendritinės ląstelės įgijo subrendusioms ląstelėms būdingą morfologiją. Tiek brandinimas su lizatu, tiek be jo, sugeneravo subrendusias dendritines ląsteles, kurioms būdinga CD14, CD11c, CD83, CD80, HLA-DR, CD197 žymenų raiška (1 A pav). Vis dėlto, ant dendritinių ląstelių, brandintų su lizatu, pastebėjome reikšmingai aukštesnę tolerogeninio žymens CD85k raišką, lyginantu su ląstelėmis, brandintomis be lizato. Nepriklausomai nuo



naudotos ląstelių linijos, su lizatu brandintų DL paviršiaus žymenu raiška nesiskyrė tarpusavyje, todėl tolesniems eksperimentams naudojome vėžinių ląstelių lizatų mišinį.



**1 paveikslas. Dendritinių ląstelių fenotipas ir sekrecijos profilis po brandinimo su vėžinių ląstelių lizatu arba be jo.** A. Dendritinių ląstelių paviršiaus žymenų raiška po 24 val. brandinimo su skirtingais mišiniais. B. Dendritinių ląstelių citokinių sekrecijos profilis po 24 val brandinimo su skirtingais mišiniais. Stulpelinė diagrama vaizduoja vidurkį ± standartinę nuokrypį iš 15 sveikų donorų imties. Vėžinių ląstelių lizatas buvo paruoštas iš žmogaus melanomos (SK-MEL-28), glioblastomos (U-87) bei inkstų vėžio (786-O) ląstelių linijų lizatų lygiomis dalimis. Palyginimui naudotas dvipusis Stjudento t-testas su Welch korekcija. VL – vėžinės ląstelės, LPS – lipopolisacharidas.

Pamatavę subrendusių dendritinių ląstelių citokinių sekrecijos profilį pastebėjome, kad su lizatu brandintos dendritinės ląstelės gamina daugiau imunosupresinių Th2 tipo citokinių IL-10, TGFβ ir mažiau Th1 tipo citokino IL-12, lyginant su ląstelėmis, brandintomis be lizato (1 B pav).

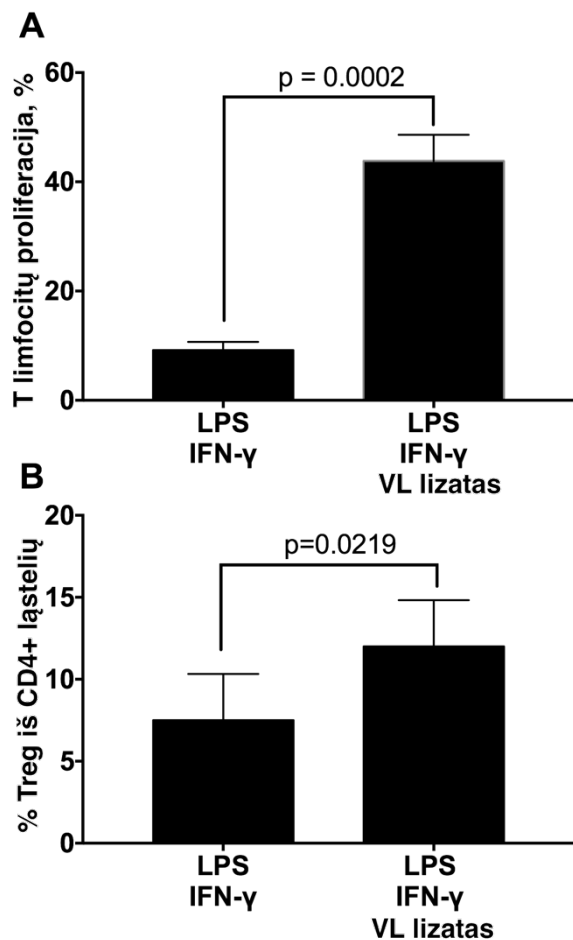
Šie duomenys rodo, kad dendritinės ląstelės, brandintos su vėžinių ląstelių lizatu gali būti linkusios sukelti mišrų Th1/Th2 tipo imuninį atsaką. Vėžinių ląstelių lizatas turi netiesioginį imunosupresinį poveikį ir iš dalies skatina dendritinių ląstelių tolerogeniškumą.

Taip pat tyrėme skirtingais būdais brandintų dendritinių ląstelių imunostimuliacines savybes. Mišrios limfocitų reakcijos tyrimas atskleidė, kad su lizatu brandintos dendritinės ląstelės paskatina reikšmingai didesnę T limfocitų proliferaciją (2 A pav.), greičiausiai dėl navikinių antigenų buvimo vėžinių ląstelių lizate. Tačiau didelę proliferavusių T limfocitų dalį sudaro Treg ląstelės (2 B pav.). Šie rezultatai patvirtina, jog su vėžinių ląstelių lizatu brandintos dendritinės ląstelės gali paskatinti imunosupresiją navike.

## APIBENDRINIMAS

Nors stromos ląstelių įtaka naviko vystymuisi yra neiginčytina, tikslūs mikroaplinkos sukelti reguliaciniai procesai, ypač liečiantys atsaką į gydymą, nėra iki galo žinomi. Šioje darbo dalyje parodėme, kad brandinimas su vėžinių ląstelių lizatu skatina dendritinių ląstelių tolerogeniškumo žymens CD85k raišką, nepriklausomai nuo vėžinių lokalizacijų kilmės. Su lizatu brandintos ląstelės sekretuoja imunosupresinius citokinius ir

skatina Treg proliferaciją. Šie rezultatai svarbūs ne tik fundamentiniu požiūriu, bet ir priešvėžinių dendritinių ląstelių vakcinų gamybai.



**2 paveikslas. Skirtingais būdais brandintų dendritinių ląstelių imunostimuliacinės savybės.** A. Magnetiškai išrūšiuotų ir CFSE nudažytų CD3+ T limfocitų proliferacija po 7 d. kokultivavimo su skirtingais būdais brandintomis dendritinėmis ląstelėmis. Proliferacija buvo vertinama tėkmės citometru atmetant neigiamą kontrolę (spontatinę T limfocitų proliferaciją). B. Treg indukcija buvo vertinama po 14 dienų magnetiškai išrūšiuotų CD4+ T limfocitų ir skirtingais būdais brandintų dendritinių ląstelių kokultivavimo terpėje su IL-2. Treg procentinė dalis buvo vertinama pagal CD4+CD25+FoxP3+CD127- fenotipo ląstelių dalį iš visų CD4+ limfocitų. Stulpelinė diagrama vaizduoja vidurkį  $\pm$  standartinį nuokrypį iš 15 sveikų donorų imties. Vėžinių ląstelių lizatas buvo paruoštas iš žmogaus melanomos (SK-MEL-28), glioblastomos (U-87) bei inkstų vėžio (786-O) ląstelių linijų lizatų lygiomis dalimis. Palyginimui naudotas dvipusis Stjudento t-testas su Welch korekcija. VL – vėžinės ląstelės, LPS – lipopolisacharidas.

## Vėžinių ląstelių kamieniškumo savybių įtaka jų gebėjimui paskatinti makrofagų poliarizaciją

### PROBLEMATIKA

Makrofagai yra plastiškos ląstelės, kurios vėžio atveju, priklausomai nuo aplinkos signalų, gali poliarizuotis į priešvėžinį M1 tipą arba vėžį skatinantį M2 tipą. Neseniai parodyta, jog makrofagai gali dalyvauti epitelinės-mezenchiminės transformacijos (EMT) reguliavime [16,17]. EMT lemia epitelinių ląstelių plastiškumą ir invaziją. Vykstant EMT, vėžinės ląstelės gali įgyti svarbias kamieniškumo savybes – gebėjimą atsinaujinti ir padidėjusį atsparumą chemoterapiniams preparatams. Nėra iki galo aišku, kaip plastiškos ir kamieniškumo savybėmis pasižyminčios ląstelės dalyvauja formuojant imuninę navikų mikroaplinką, todėl šiame tyrime siekėme įvertinti pagal kamieniškumo žymenis besiskiriančių storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimą poliarizuoti makrofagus.

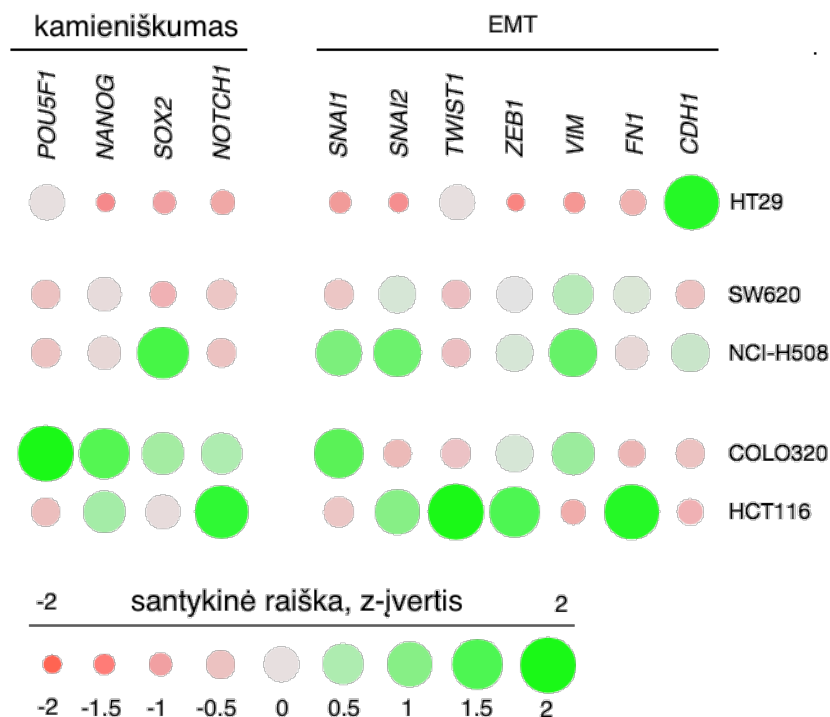
### METODIKA

RL-kPGR metodu vertinome su kamieniškumu ir EMT susijusių genų raiškos profilių penkiose žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijose. Tėkmės citometru matavome Th1/Th2 tipo citokininų koncentraciją ląstelių lizate ir augimo terpėje. Iš sveikų kraujo donorų buvo išskirtos periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės ir *in vitro* 7 dienas

diferencijuotos iki M0 makrofagų auginant su M-CSF. Toliau M0 makrofagai buvo 48 val inkubuoti su LPS+IFN $\gamma$  (M1 tipo poliarizacija), IL-4+IL-13 (M2 tipo poliarizacija) arba storosios žarnos vėžio ląstelių auginimo terpe. Tėkmės citometru buvo matuojama M1/M2 tipams būdingų žymenų raiška ir vertinamas storosios žarnos vėžio ląstelių gebėjimas poliarizuoti makrofagus.

## REZULTATAI

Siekėme įvertinti kaip vėžinės ląstelės veikia kito tipo mieloidinių ląstelių, makrofagų, poliarizaciją. Pasirinkome skirtingų molekulinų subtipų žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijas: gerai diferencijuotą HT29, vidutiniškai diferencijuotas SW620, NCI-H508, bei blogai diferencijuotas COLO320, and HCT116. Atlikę su kamieniškumu ir EMT susijusių genų raiškos tyrimą parodėme, kad HT29 linija nepasižymi išreikštais kamieniškumo ir mezenchiminiais žymenimis (3 pav), panašiai kaip ir SW620 linija. NCI-H508 linijoje buvo stebima didelė kelių su EMT susijusių transkripcijos faktorių raiška. COLO320 linijai būdingi stipriai išreikšti kamieniškumo žymenys, o HCT116 linijai – mezenchiminiai žymenys.



**3 paveikslas. Žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijų genų raiškos profilis.** RL-kPGR metodu matavome santykinę pasirinktų su kamieniškumu ir EMT susijusių genų raišką HT29, SW620, NCI-H508, COLO320 and HCT116 linijose. Santykinę genų raišką, transformuota į z-įvertį, vaizduojama intensyvumo diagramoje, kur apskritimų spalva ir dydis atspindi raiškos pokyčius. Kiekvienas apskritimas vaizduoja vidurkį iš dviejų nepriklausomų matavimų su trimis techniniais pakartojimais, normalizuotą pagal *GAPDH* ir *RPL13A* genų raišką. EMT – epitelinė-mezenchiminė transformacija.

Iš sveikų donorų periferinio kraujo išskyre monocitus diferencijuojame juos iki M0 makrofagų. Norėdami įvertinti koks yra skirtingų storosios žarnos vėžio linijų gebėjimas sukelti makrofagų poliarizaciją, 48 val. inkubavome diferencijuotus M0 makrofagus su vėžinių ląstelių linijų augimo terpe, atspindinčia jų sekretomą. Paveiktus makrofagus lyginome su kontroliniais M1 ir M2 makrofagais, vertindami jiems būdingų paviršiaus žymenų raišką tėkmės citometru (1 lentelė).

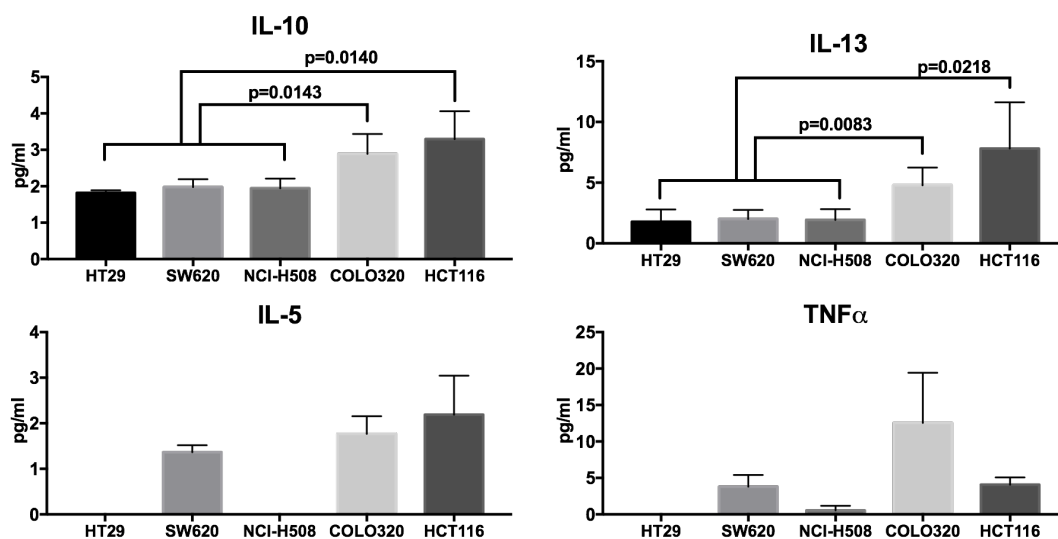
**1 lentelė.** Kontrolinių M0, M1, M2, bei su žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių auginimo terpe inkubuotų makrofagų paviršiaus žymenų raiška, išreikšta vidutiniu fluorescencijos intensyvumu. Makrofagai buvo nudažyti žymėtais monokloniniais antikūnais prieš išvardintus paviršiaus žymenis. Eksperimentas buvo pakartotas du kartus atliekant du techninius pakartojimus. Geresniam vaizdiniam suvokimui pateikiamos nuspalvintų langelių interpretacijos. AT – auginimo terpė.

	M0	M1	M2	M0 su HT29 AT	M0 su SW620 AT	M0 su NCI-H508 AT	M0 su COLO320 AT	M0 su HCT116 AT
CD80	99	1186	66	145	97	71	101	114
CD86	149	1686	143	113	42	112	87	108
CD69	59	302	50	75	33	73	59	57
CD274	152	1396	442	258	204,5	61	266	284
CD206	1077	496	3474	1772	1549	1665	3132	3325
HLA-DR	15721	27728	-77	3378	2422	72	-1	14
CD197	123	927	0	93	77	823	-2	0
CD11c	18499	12826	35	16639	12000	15574	37	48
CD195	254	183	-2	432	218	400	-1	0

Spalvų reikšmės

M0	M1	M2	M0 ir/ar M2	M0 ir/ar M1
----	----	----	-------------	-------------

M0 makrofagų kultivavimas su storosios žarnos vėžio ląstelių terpe nei vienu atveju nepaskatino klasikinių M1 žymenų raiškos: kostimuliacinių molekulių CD80, CD86, ar aktyvacijos žymens CD69. Klasikinio M2 žymens CD206 raiška reikšmingai padidėjo tik ant makrofagų, inkubuotų su HCT116 ar COLO320 linijų auginimo terpe. Taip pat M2 makrofagams būdingas HLA-DR, CD197, CD11c ir CD195 žymenų praradimas. Tik su HCT116 ir COLO320 auginimo terpe inkubuoti makrofagai nepasižymėjo nei vieno iš šių žymenų raiška. Taigi, tik šios dvi blogai diferencijuotos storosios žarnos vėžio linijos, pasižyminčios aukšta su EMT ir kamieniškumu susijusių genų raiška, geba indukuoti M2 tipo makrofagų poliarizaciją. Ištyrę visų tirtų linijų auginimo terpę pastebėjome, kad COLO320 ir HCT116 linijos sekretuoja reikšmingai daugiau imunosupresinių Th2 tipo citokinių IL-10 ir IL-13 nei likusios ląstelių linijos (4 pav). Šie rezultatai patvirtina hipotezę, kad ląstelės su stipriau išreikštomis kamieniškumo savybėmis turi didesnę potencialą poliarizuoti makrofagus į M2 tipą.



**4 paveikslas.** Sekretuojamų Th1/Th2 tipų citokinių koncentracija storosios žarnos vėžio auginimo terpėse. Citokinių koncentracija buvo pamatuota tėkmės citometru. Stulpelinė diagrama vaizduoja vidurkį ± standartinį nuokrypį, N=3. Palyginimui naudotas dvipusis Stjudento t-testas.

## APIBENDRINIMAS

Makrofagų savybės naviko mikroaplinkoje priklauso nuo jų M1/M2 fenotipo. Studijų, tyrinėjančių imunomoduliacines vėžio kamieninių ląstelių savybes nėra daug. Šiame tyrime ne tik parodėme, kad storosios žarnos vėžio ląstelės su stipriau išreikštomis mezenchiminėmis ir kamieniškumo savybėmis geba sukelti makrofagų poliarizaciją į M2 naviką skatinantį tipą, bet ir pabrėžėme potencialų šio reiškinio mechanizmą –IL-10 ir IL-13 sekreciją.

## Tarpusavio sąveikų tarp kiaušidžių vėžio ląstelių ir makrofagų tyrimas

### PROBLEMATIKA

Sąveikos tarp mieloidinių imuninių ląstelių ir skirtingo jautrumo vaistams vėžinių ląstelių yra mažai tyrinėtos, nors yra žinoma, kad imuninė naviko mikroaplinka gali padėti navikams adaptuotis ir išvystyti atsparumą chemoterapijai. Šiame darbe, pasitelkdami kokultivavimo modelį, siekėme iširti makrofagų ir pagal atsparumą chemoterapijai besiskiriančių kiaušidžių vėžio ląstelių abipusį poveikį genų raiškos profiliui.

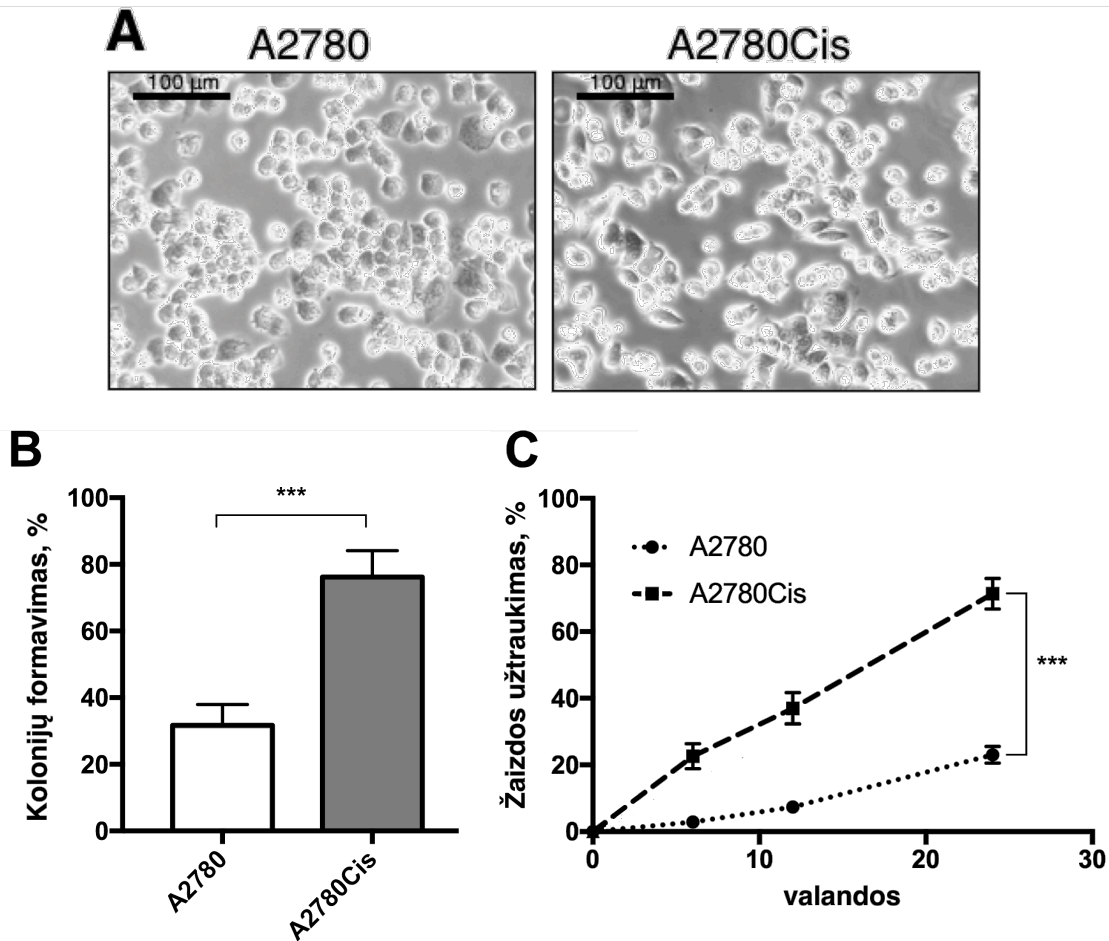
### METODIKA

Ilgą laiką veikdami vaistais žmogaus kiaušidžių vėžio (KV) ląstelių liniją A2780 *in vitro* išvedėme cisplatinai atsparią liniją A2780Cis. Pasitelkdami molekulinis ir funkcinius testus, palyginome jautrių ir atsparių linijų toksiškumo profilį, morfologiją, migraciją, klonogeniškumą ir genų raiškos profilį. Iš žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1 naudodami PMA diferencijavome M0 makrofagus, ir, veikdami atitinkamai LPS+IFN $\gamma$  arba IL-4+IL-13, poliarizavome juos iki M1 ir M2 tipo makrofagų. Po netiesioginio jautrių ir atsparių KV ląstelių linijų kokultivavimo su M0, M1 ir M2 makrofagais tyrėme pasirinktų genų raiškos pokyčius abiejuose ląstelių tipuose.

### REZULTATAI

Parodyta, kad kamieniškumo savybėmis pasižyminčios ląstelės dažnai būna atsparesnės vaistams [18,19,20] ir tokiu būdu yra susijusios su išsivystančiu navikų atsparumu chemoterapijai. Todėl nusprendėme iširti, kaip ląstelės, pasižyminčios skirtingu jautrumu chemoterapiniams vaistams, geba paveikti makrofagų poliarizaciją. Chemoterapiniu preparatu cisplatinu veikdami jautrią kiaušidžių vėžio liniją A2780, iš jos išvedėme šiam vaistui atsparią liniją A2780Cis. Vystant atsparią liniją, keitėsi jos morfologija: epitelinės ląstelės palaipsniui įgijo mezenchiminę verpstės formą (5 A pav.). Taip pat atsparioms ląstelėms buvo būdingos kitos su kamieniškumu susijusios funkcinės savybės: padidėjęs klonogeniškumas (5 B pav.) ir migracija (5 C pav.), lyginant su jautriomis ląstelėmis. Be to, vaistams atsparios ląstelės pasižymėjo aukštesne tiek Th1 tipo (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ ), tiek Th2 tipo (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13) citokinių gamyba nei jautri linija.

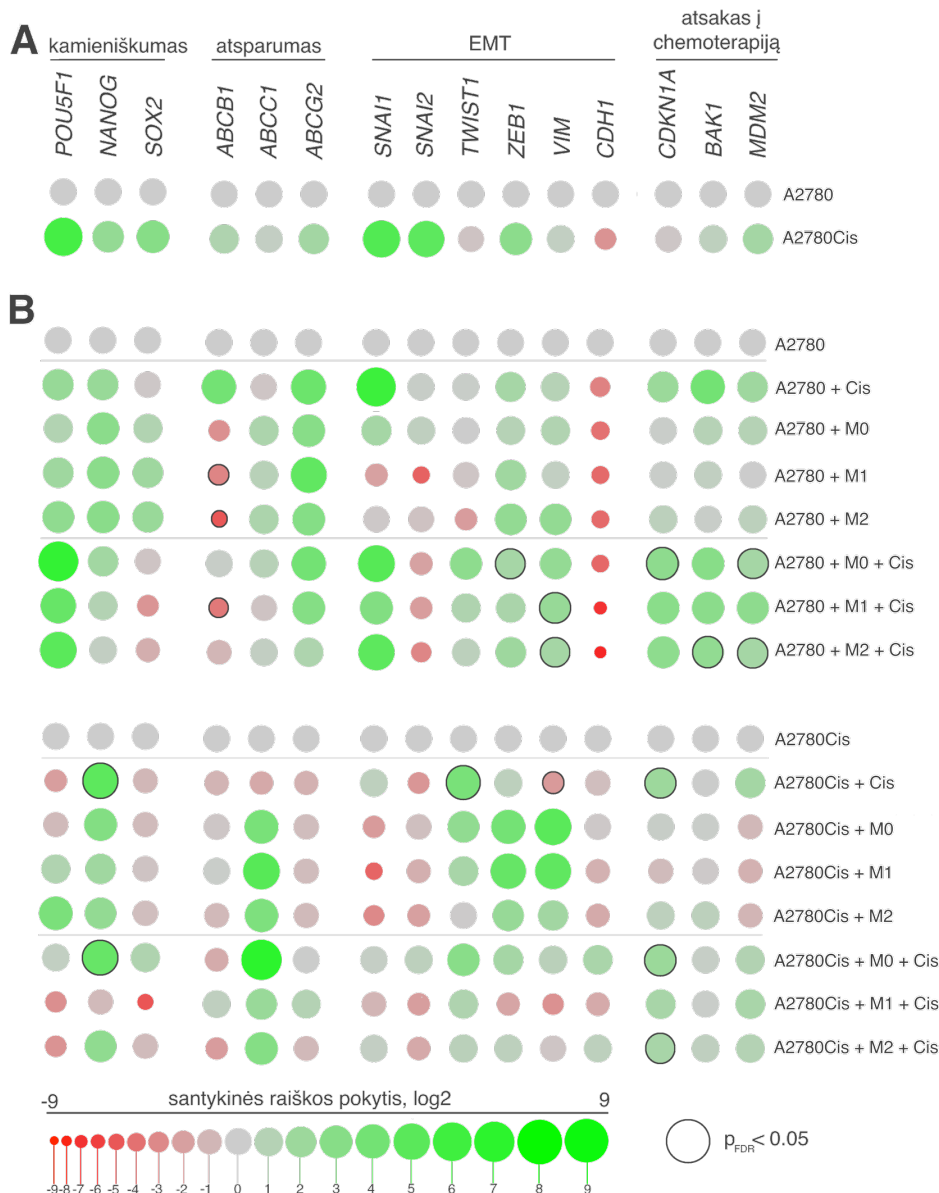
Skirtingo atsparumo lygio ląstelės skyrėsi ir molekuliniam lygmenyje. Vaistams atsparios ląstelės pasižymėjo aukštesne su kamieniškumu, EMT ir atsparumu susijusių genų raiška (6 A pav.). Funkciniai ir molekuliniai skirtumai įrodė, kad atsparumo cisplatinai išsivystymas A2780 linijoje yra susijęs su kamieniškumo savybių ir mezenchiminio fenotipo įgijimu.



**5 paveikslas. Jautrių A2780 bei atsparių A2780Cis žmogaus KV ląstelių charakterizavimas.** A. Ląstelių morfologiją atspindinčios nuotraukos (20× padidinimas). B. Ląstelės buvo užsėtos žemu tankiu ir auginamos 7 dienas įprastomis sąlygomis. Užaugusios kolonijos buvo nudažytos kristalo violetu ir suskaičiuotos. Kolonijas formuojančių vienetų procentinė dalis vaizduojama stulpelinėje diagramoje kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, N=6, lyginta naudojant dvipusį Stjudento t-testą. C. Stebėta, kaip migruoja ląstelės padarius įbrėžimą viensluoksnėje kultūroje. Įbrėžimo padengimo greitis vaizduojamas kaip linijinė diagrama. N=4, taškai rodo vidurkį ± standartinį nuokrypį, palyginimui naudota linijinė regresija, \*\*\*p<0.0001.

Toliau nusprendėme patikrinti abipusę įtaką genų raiškai kokultivuodami skirtingo poliarizacijos tipo makrofagus ir skirtingo jautrumo kiaušidžių vėžio ląsteles netiesioginėje kultūroje, ląstelėms nesiliečiant, tačiau naudojant tą pačią auginimo terpę. Taip pat, patikrinti vaisto įtakai ląstelių transkriptomui, į kokultyvavimo terpę dėjome 2 μM cisplatinos. M0, M1 ir M2 makrofagai buvo sugeneruoti iš žmogaus monocitinės leukemijos ląstelių linijos THP-1 naudojant standartinius diferenciacijos ir poliarizavimo metodus.

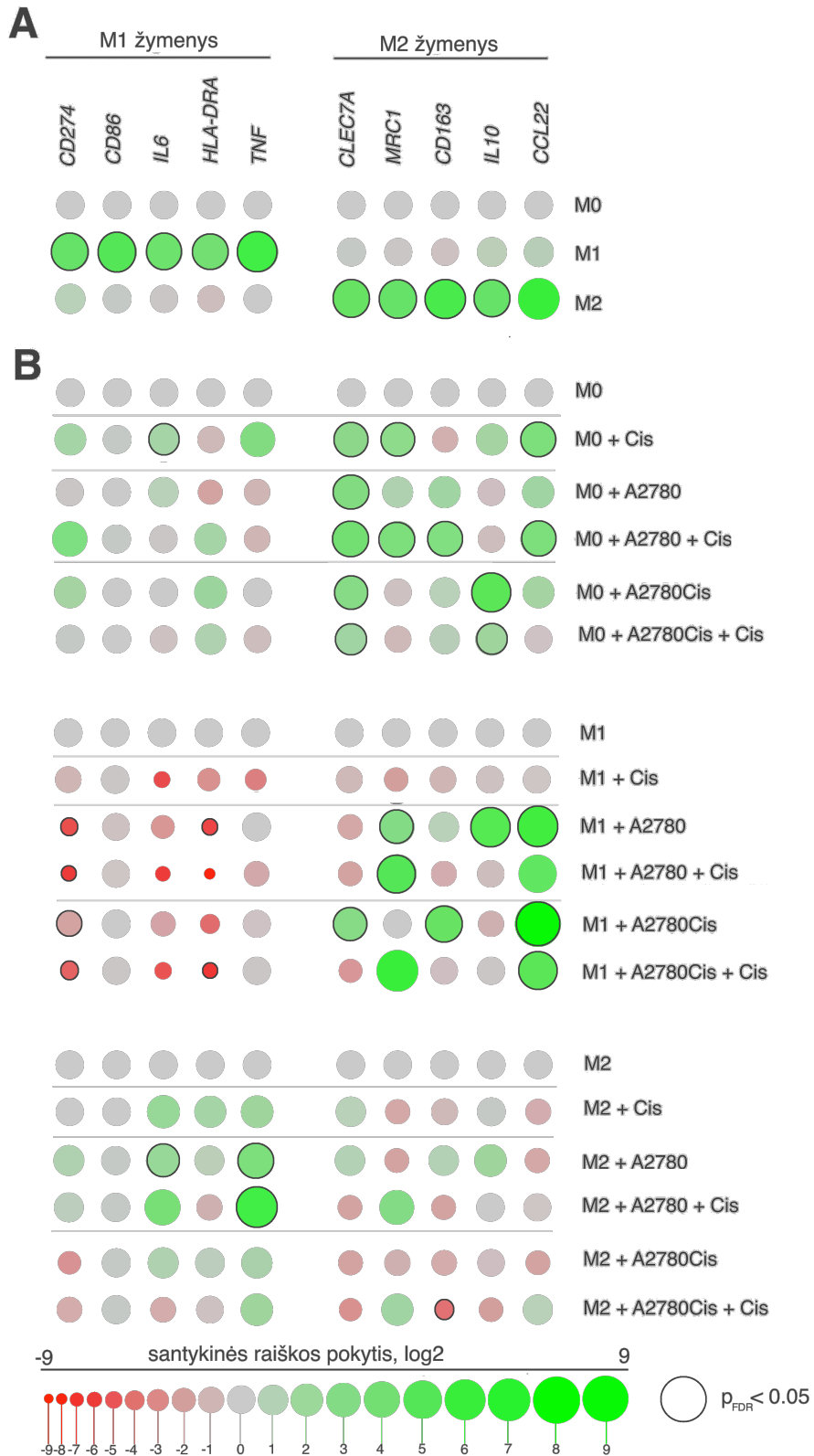
Atlikus kokultivuotų kiaušidžių vėžio ląstelių transkriptominių profiliavimą paaiškėjo, kad daugiausiai mRNR pokyčių makrofagai arba jų derinys su chemoterapija sukėlė jautrioje linijoje A2780 (6 B pav.). Su makrofagais kokultivuotose A2780 ląstelėse padaugėjo su kamieniškumu susijusių transkripcijos faktorių bei su atsparumu susijusio geno *ABCG2* raiška. Su makrofagais ir cisplatiną kokultivuotose A2780 ląstelėse daugėjo EMT transkripcijos faktorių, nepriklausomai nuo pradinės makrofagų poliarizacijos. Atsparioje ląstelių linijoje kokybiniai ir kiekybiniai genų raiškos pokyčiai po kokultyvavimo su makrofagais buvo mažesni.



**6 paveikslas. Su kamieniškumu, atsparumu ir EMT susijusių genų raiškos profilis kiaušidžių vėžio ląstelėse.**

A. Atsparios A2780Cis linijos genų raiškos profilis lyginant su jautria A2780. B. Kiaušidžių vėžio ląstelių linijų genų raiškos profilis po 48 val. kokultivavimo su M0, M1, M2 tipo iš THP-1 linijos išvestais makrofagais, terpėje be vaisto arba su 2  $\mu$ M cisplatinos. RT-kPGR metodu pamatuota ir log<sub>2</sub> transformuota santykinė genų raiška vaizduojama intensyvumo diagramoje, kur apskritimų spalva ir dydis atspindi raiškos pokyčius. Kiekvienas apskritimas vaizduoja vidurkį iš dviejų nepriklausomų matavimų su dviem techniniais pakartojimais, normalizuotą pagal santykinę geno raišką A2780 ląstelių linijoje (A) ar atitinkamoje neveiktoje ląstelių linijoje (B). Apibrėžti apskritimai žymi reikšmingus genų raiškos pokyčius ( $p < 0.05$ ). Lyginimui naudotas dvipusis Stjudento t-testas su FDR korekcija. EMT – epitelinė-mezenchiminė transformacija.

Siekėme išsiaiškinti ir vėžinių ląstelių poveikį makrofagų poliarizacijai. Kokultivuotų makrofagų genų raiškos profilį lyginome su kontroliniais M1 ir M2 tipo makrofagais, pasižyminčiais specifinių M1/M2 žymenų raiškos profiliu (7 A pav.). Įvairiomis sąlygomis kokultivuotuose M0 ir M1 tipo makrofaguose stebėjome M2 makrofagams būdingų žymenų raiškos padidėjimą (7 B). Be to, M1 tipo makrofaguose stebėjome M1 būdingų žymenų sumažėjimą. Tai įrodo, kad kiaušidžių vėžio ląstelių linijos, nepriklausomai nuo savo jautrumo vaistams lygio, geba poliarizuoti makrofagus į M2 tipą.



**7 paveikslas. M1/M2 žymenys atspindinčių genų raiškos profilis makrofaguose.** A. Poliarizuotų kontrolinių iš THP-1 linijos diferencijuotų M1 ir M2 makrofagų genų raiškos profilis lyginant su M0 makrofagais. B. Makrofagų genų raiškos profilis po 48 val. kokultivavimo su skirtingo jautrumo kiaušidžių vėžio linijomis A2780, A2780Cis, A2780Dox, tarpėje be vaisto arba su 2  $\mu$ M cisplatinos ar 0.5  $\mu$ M doksorubicino. RT-kPGR metodu pamatuota ir log2 transformuota santykinė genų raiška vaizduojama intensyvumo diagramoje, kur apskritimų spalva ir dydis atspindi raiškos pokyčius. Kiekvienas apskritimas vaizduoja vidurkį iš dviejų nepriklausomų matavimų su dviem techniniais pakartojimais, normalizuotą pagal santykinę geno raišką M0 makrofaguose (A) ar atitinkamame makrofagų tipe (B). Apibrėžti apskritimai žymi reikšmingus genų raiškos pokyčius ( $p < 0.05$ ). Lyginimui naudotas dvipusis Stjudento t-testas su FDR korekcija.



## APIBENDRINIMAS

Navikų mikroaplinka yra dinamiška ir gali kisti priklausomai nuo gydymo. Norėdami atspindėti kiaušidžių vėžio gydymo realijas, išvedėme cisplatinai atsparią kiaušidžių vėžio liniją, kuri pasižymėjo molekulinėmis ir funkcinėmis kamieniškumo savybėmis. Nors parodyta, kad tiek vėžinės, tiek vėžio kamieninės kiaušidžių vėžio ląstelės gali sukelti M2 tipo makrofagų poliarizaciją [21,22], mes ištyrėme šio reiškinio sąsajas su atsparumu chemoterapijai bei įrodėme, kad kiaušidžių vėžio ląstelės, nepriklausomai nuo jautrumo vaistiniams preparatams, ne tik poliarizuoja M0 tipo makrofagus į M2, bet ir geba repoliarizuoti M1 tipo makrofagus į M2 tipą. Makrofagai, savo ruožtu, sukelia kamieniškumo ir EMT žymenų mRNA padidėjimą vėžinėse ląstelėse, tokiu būdu skatindami ankstyvą atsparių klonų atsiradimą.

Apibendrinant, skirtingose *in vitro* modelinėse sistemose gauti duomenys leidžia daryti išvadą, jog vėžinės ir imuninės ląstelės bendradarbiauja kurdamos imunosupresinę mikroaplinką. Šie rezultatai svarbūs toliau tyrinėjant navikų mikroaplinkos dinamiką bei ieškant naujų gydymo taikinių.

## Imuninės naviko mikroaplinkos vystymasis iBIP2 pelių melanomos modelyje

### PROBLEMATIKA

Imunosupresiniai ląstelių subtipai yra potencialūs priešvėžinio imuninio atsako modulatoriai. Mieloidinės ląstelės yra susijusios su naviko invazija ir paprastai neigiamai koreliuoja su ligos prognoze. Tačiau imuninės naviko aplinkos vystymosi dinamika yra mažai tyrinėta. Šiame tyrime siekėme išsamiai charakterizuoti imuninės melanomos mikroaplinkos formavimąsi iBIP2 pelių modelyje.

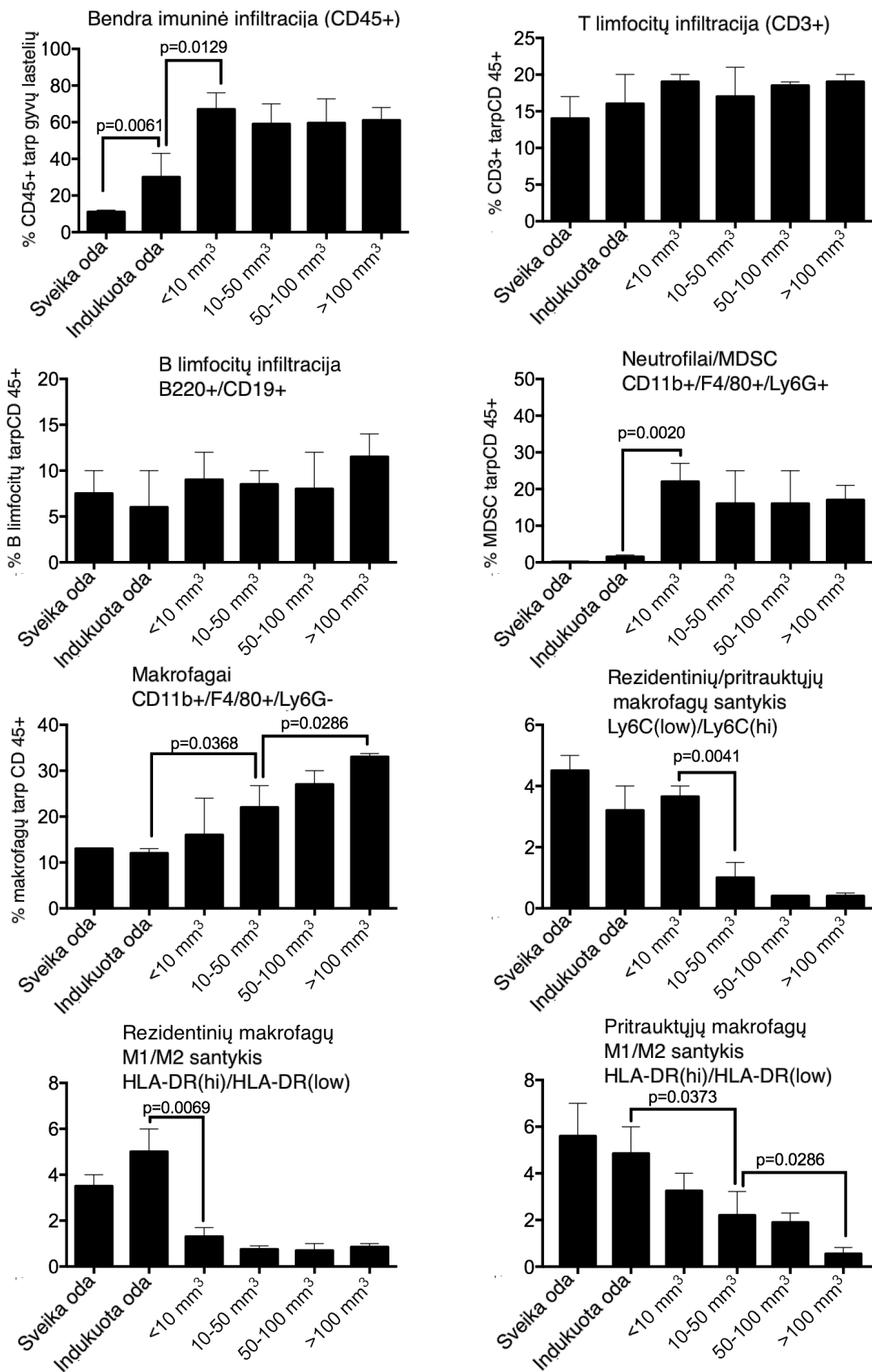
### METODIKA

Atlikome išsamią kokybinę ir kiekybinę navikų imuninės mikroaplinkos analizę masių citometru. Tirdami skirtingo išsivystymo lygio ir dydžio navikus, sudarėme dinaminę imuninės naviko mikroaplinkos ląstelių profilį, atspindintį naviko vystymąsi.

### REZULTATAI

iBIP2 pelių modelis - tai genetiškai modifikuotas BRAF mutotos melanomos modelis, atspindintis dažniausiai kliniškai diagnozuojamą išplitusios melanomos subtipą. Žmogaus BRAF transgenas yra aktyvuojamas paveikus pelės ausies odą tamoksifenu ir doksiciklinu. Imunofluorescencinis navikų pjūvių dažymas atskleidė, kad iBIP2 navikai gausiai infiltruoti imuninių ląstelių (CD45+), tarp kurių yra tiek makrofagai (F4/80+), tiek citotoksiniai T limfocitai (CD8+). Šis raiškos profilis leidžia daryti prielaidą, kad iBIP2 navikai reprezentuoja uždegiminį imuninį fenotipą, kuriame T limfocitai nefunkcionuoja tinkamai. Makrofagų ir kitų nelimfoidinių ląstelių gausa gali būti imunosupresinės mikroaplinkos požymis. Kadangi iBIP2 modelyje navikai vystosi dėl onkogeninės BRAF mutacijos, greičiausiai imuninės sistemos ląstelės atpažįsta šį neoantigeną, tačiau dėl vėžio naudojamų imuninio atsako išvengimo mechanizmų vėžio-imuniteto ciklas sustoja.

Masių citometrijos analizė atskleidė pagrindinių imuninių ląstelių subpopuliacijų dinamiką naviko mikroaplinkoje (8 pav). Pastebėjome, kad makroskopinis naviko išryškėjimas yra lydimas reikšmingo CD45+ imuninių ląstelių pritraukimo. Navikui išsivysčius, bendra imuninė infiltracija išlieka 60-65%.



**8 paveikslas.** Masių citometrinių kiekybinę ir kokybinę imuninių subpopuliacijų analizę skirtingose naviko vystymosi stadijose. Stulpelinėje diagramoje vaizduojami grupių vidurkiai  $\pm$  standartiniai nuokrypiai, N=7. Lyginimui buvo naudojamas Mann-Whitney testas.

Limfoidinių ląstelių populiacijose reikšmingų kiekybinių pokyčių nepastebėjome.

MDSC yra pritraukiamos į naviką po jo indukcijos; jau esant makroskopiškai apčiuopiamam darinui, MDSC sudaro net 15-20% nuo visų imuninių ląstelių.

Makrofagų infiltracija sveikoje arba indukuotoje odoje yra apie 12%. Tačiau navikui vystantis, makrofagų tolygiai daugėja, iki 30% dideliuose navikuose. Reziduojančių ir pritrauktųjų makrofagų santykis mažėja navikams vystantis. Tai rodo, kad navikai geba pritraukti monocitus ir paversti juos naviko makrofagais. Priešvėžinių M1 tipo ir naviką skatinančių M2 tipo makrofagų santykis yra didesnis odos mėginiuose, lyginant su naviko mėginiais. Tai reiškia, kad navikas repoliarizuoja M1 tipo makrofagus į M2, arba sukuria mikroaplinką, kuri skatina naujai pritrauktų monocitų diferenciaciją į M2 tipą. Rezidentinių makrofagų atveju greičiausiai vyksta repoliarizacijos procesas nes M1/M2 santykis staigiai sumažėja ankstyvojo naviko vystymosi metu, kai makrofagų pritraukimas dar yra minimalus, tačiau jau kuriasi imunosupresinė mikroaplinka. Taip pat navikai geba pritraukti nediferencijuotus monocitus ir poliarizuoti juos iki M2 tipo makrofagų.

## APIBENDRINIMAS

Ištyrę imuninės naviko mikroaplinkos vystymąsi iBIP2 melanomos modelyje pastebėjome, jog daugiau nei pusę visų naviko ląstelių sudaro imuninės sistemos ląstelės. Vystantis makroskopiškai matomam navikui, staigiai padaugėja MDSC ląstelių. Taip pat šis procesas lydimas cirkuliuojančių monocitų pritraukimo ir poliarizavimo į M2 makrofagus. Palaipsniui išsivystanti imunosupresinė mikroaplinka ir T ląstelių infiltracija leidžia daryti prielaidą jog iBIP2 melanomos modelio navikai pasižymi uždegiminiu imuniniu fenotipu.

## **Imunoterapija imunomoduliuojančiais antikūnais iBIP2 pelių melanomos modelyje**

### PROBLEMATIKA

Vėžio imunoterapijos tikslas yra moduluoti šeimininko imuninę sistemą taip, kad ši efektyviai atpažintų ir naikintų naviką. Viena iš vėžio imunoterapijos rūšių, imunomoduliuojantys antikūnai, padarė proveržį melanomos gydyme. Imunomoduliuojantys antikūnai blokuoja imuninę atsaką slopinančius patikros taškus, pvz. CTLA-4 ar PD-1. Terapija imunomoduliuojančiais antikūnais labiausiai tinka uždegiminio fenotipo navikams gydyti. Nors melanoma sergančių pacientų atsakas į anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 kombinaciją siekia 50%, dalis navikų pasižymi įgimtu ar įgytu atsparumu gydymui. Atsparumo imunoterapijai mechanizmai gali būti tiek vėžinėms ląstelėms specifiniai, tiek priklausomi nuo mikroaplinkos. Transkriptominė anti-PD-1 terapijai atsparių navikų analizė atskleidė su makrofagais ir MDSC, bei su angiogeneze ir EMT susijusių genų raiškos padidėjimą [23].

Pagrindinė imunoterapijos strategija gydant uždegiminio tipo navikus yra T limfocitų aktyvavimas naudojant imunomoduliuojančius antikūnus. Kadangi iBIP2 navikai pasižymi uždegiminiu imuniniu fenotipu, siekėme išstirti imunomoduliuojančių antikūnų anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 efektyvumą gydant melanomą iBIP2 pelių modelyje.

### METODIKA

iBIP2 pelių melanomos modelyje vykdėme imunomoduliuojančių antikūnų anti-

CTLA-4 ir anti-PD-1 bei jų kombinacijos poveikio naviko augimo greičiui tyrimus. Įvertinome trumpalaikį imunomoduliuojančių antikūnų poveikį skirtingų dydžių navikų mikroaplinkai. Ilgalaikio imunomoduliuojančių antikūnų kombinacijos efektyvumo tyrimo metu nustatėme imuninės mikroaplinkos pokyčius ir jų sąsajas su atsaku į gydymą.

## REZULTATAI

Trumpalaikio poveikio tyrimui, pelėms buvo suleista vienkartinė dozė anti-CTLA-4 antikūno (100 µg pelei intraperitoniškai), anti-PD-1 antikūno (250 µg pelei intraperitoniškai), arba jų kombinacija. Kontrolinė grupė buvo paveikta IgG izotipo antikūnais. Po 3 dienų poveikio buvo tiriami kiekybiniai ir kokybiniai imuninės mikroaplinkos profilio pokyčiai (9 paveikslas).

Bendros imuninės infiltracijos dalis nesikeitė. Tai patvirtina prielaidą, kad navikai išlaiko stabilų imuninės infiltracijos lygį (daugiau nei pusė visų ląstelių) ir dėl to net esant geram atsakui į imunoterapiją, pristabdomas tik naviko augimo greitis, bet nestebimas naviko tūrio mažėjimas.

Reikšmingų B limfocitų skirtumų nebuvo pastebėta, nors mažuose navikuose po gydymo ryškėjo jų mažėjimo tendencija, priešingai nei didelių navikų atveju.

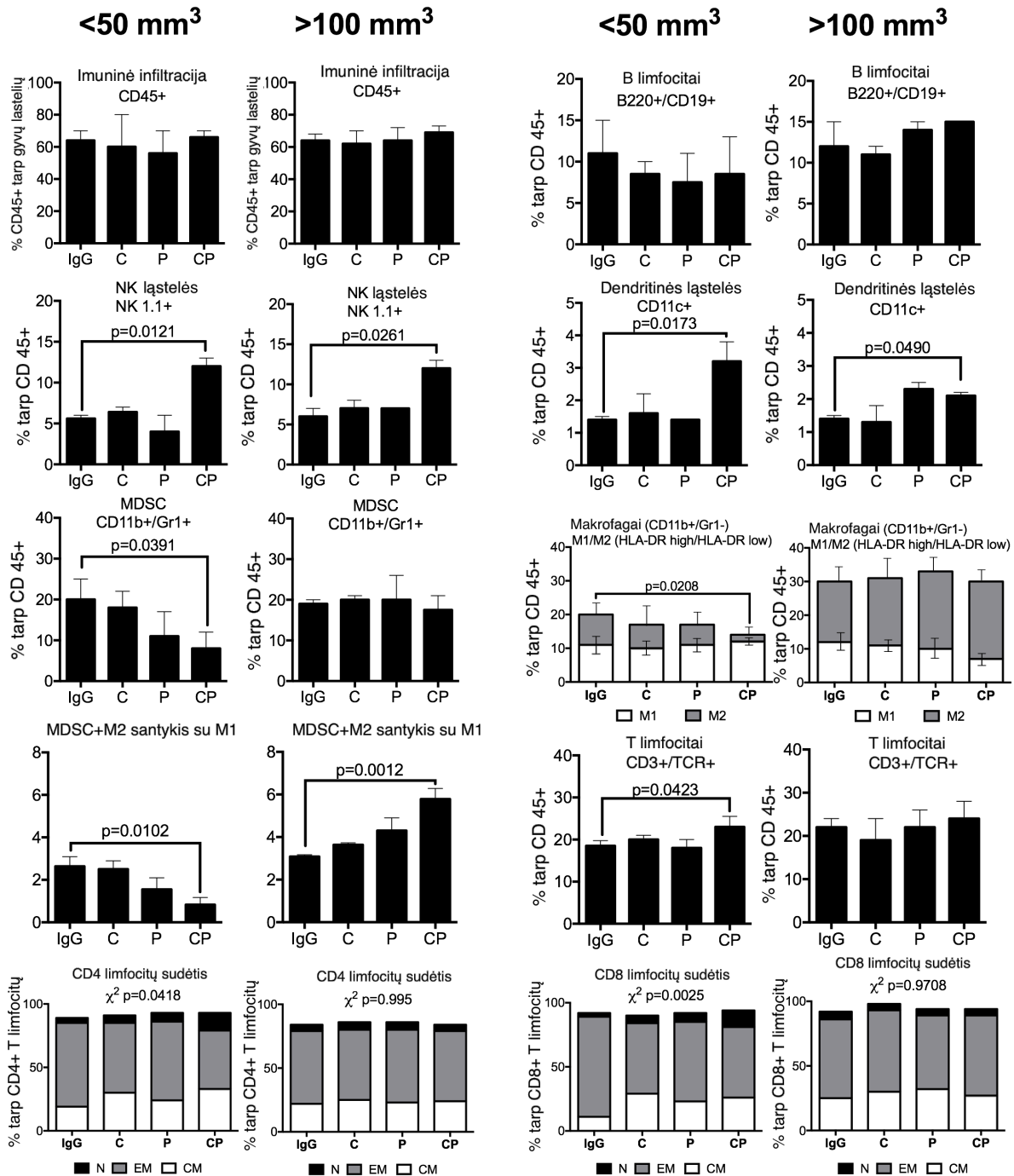
Abiejose dydžių grupėse stebėjome reikšmingą NK ir dendritinių ląstelių padidėjimą po kombinacinio gydymo, lyginant su kontrolinėmis ar monoterapija gydytomis pelėmis.

Mieloidinių ląstelių pokyčiai skyrėsi tarp skirtingo dydžio navikų. Nors po anti-CTLA-4 terapijos MDSC procentinė dalis nesikeičia, tačiau po gydymo anti-PD-1 arba kombinacinio gydymo, MDSC ląstelių reikšmingai mažėja. Dideliuose navikuose pokyčių neužfiksuota.

Panaši tendencija matoma ir makrofagų dinamikoje po gydymo. Tačiau įdomu tai, jog išskirsčius bendrą makrofagų infiltraciją į M1 ir M2 tipus, mažuose navikuose išlieka stabilus M1 tipo makrofagų lygis, kai tuo tarpu M2 makrofagų dalis mažėja. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą kad, bent jau mažuose navikuose, poveikis imunomoduliuojančiais antikūnais daro įtaką naviko gebėjimui pritraukti ir poliarizuoti monocitus į M2 tipo makrofagus. Tačiau dideliuose navikuose tendencija buvo kone priešinga, kadangi jau gydymo pradžioje jie yra gausiau infiltruoti makrofagų, tarp kurių vyrauja M2 tipas. Po gydymo imunomoduliuojančių antikūnų kombinacija stebėjome M1 makrofagų dalies mažėjimą lyginant su IgG veiktomis kontrolinėmis pelėmis ( $p=0.0312$ ).

Imunosupresinių (MDSC + M2 makrofagai) ir priešvėžinių (M1 makrofagų) mieloidinių ląstelių santykis mažuose navikuose buvo reikšmingai mažesnis anti-PD-1 arba antikūnų kombinacija veiktose pelėse. Priešingai, monoterapija arba kombinacinis didelių navikų gydymas sukėlė šio santykio padidėjimą gydymui atspariuose dideliuose navikuose.

Tiesioginis imunomoduliuojančių antikūnų poveikis yra slopinančių T limfocitų jungiklių išjungimas. CTLA-4 blokavimas skatina T limfocitų proliferaciją ir pritraukimą į naviką, o PD-1 blokavimas skatina priešvėžinių T limfocitų aktyvumą. iBIP2 modelyje, po vienos kombinacinio gydymo dozės, mažuose (bet ne dideliuose) navikuose buvo stebimas T limfocitų pritraukimas. Dideliuose navikuose naiviųjų, efektorinių bei atminties T limfocitų proporcijos išliko stabilios, o mažuose navikuose po kombinacinio gydymo padaugėjo tiek CD4, tiek CD8 naiviųjų ir atminties limfocitų.



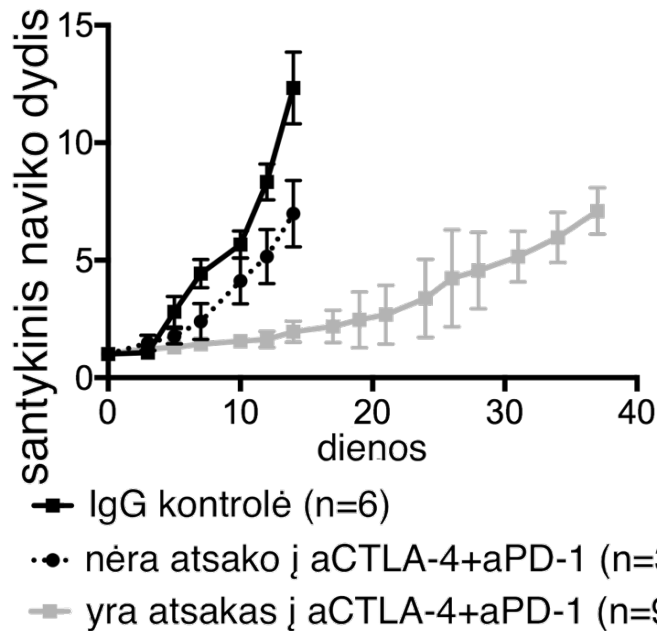
### 9 paveikslas. Imuninės mikroaplinkos poveikis po trumpalaikio gydymo imunomoduliuojančiais antikūnais.

Kiekybinė ir kokybinė masių citometrijos analizė buvo atlikta po vienos imunomoduliuojančių antikūnų (anti-CTLA-4, anti-PD-1 arba jų kombinacijos) dozės (3 d.) skirtingo dydžio (<50 mm<sup>3</sup> and >100 mm<sup>3</sup>) iBIP2 navikuose. Kontrolinei grupei buvo suleisti IgG izotipo antikūnai. Stulpelinėje diagramoje vaizduojami grupių vidurkiai  $\pm$  standartiniai nuokrypiai, N=6 kiekvienai grupei. Lyginimui buvo naudojamas Mann-Whitney testas. C – anti-CTLA-4 gydyta grupė; P – anti-PD-1 gydyta grupė; CP – anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 gydyta grupė. N – naivieji T limfocitai, EM – efektoriniai T limfocitai, CM – centrinės atimties T limfocitai.

Šie rezultatai rodo kad mažų navikų imuninė mikroaplinka, kuriai būdingas žemesnis makrofagų kiekis ir aukštesnis M1/M2 santykis lyginant su dideliais navikais, yra susijusi su geresniu atsaku į gydymą anti-CTLA4 ir anti-PD-1 imunomoduliuojančiais antikūnais. Vienos kombinacinio gydymo dozės pakanka sumažinti imunosupresinių ir priešvėžinių mieloidinių ląstelių santykį ir pritraukti naiviųjų T limfocitų.

Tai paskatino mus atlikti ilgalaikį kombinacinės terapijos tyrimą, jam atrenkant tik mažesnius nei 50 mm<sup>3</sup> navikus. Tiriamoji grupė (n=12) kas tris dienas buvo veikiami 100 µg anti-CTLA-4 ir 250 µg anti-PD-1. Kontrolinė grupė (n=6) buvo veikiami atitinkamais IgG izotipo antikūnų kiekiais. Pradinis navikų dydis nesiskyrė tarp grupių.

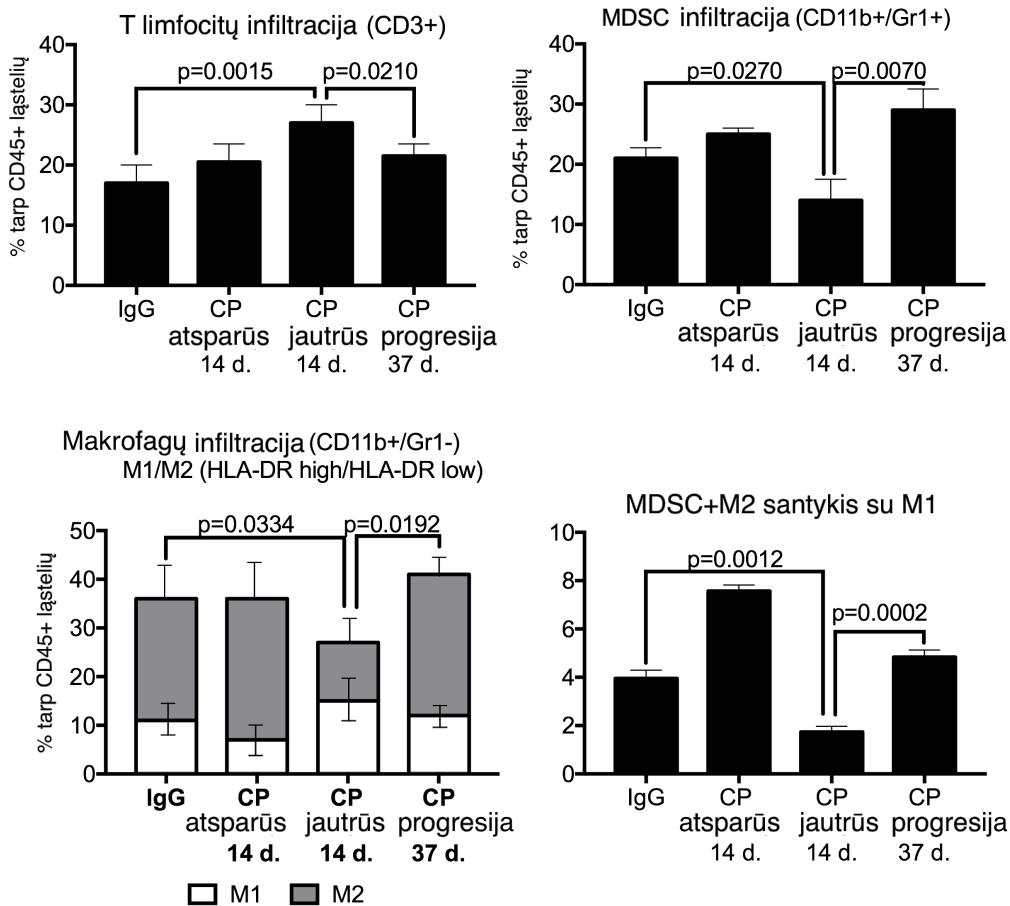
Iš 12 kombinacine imunomoduliuojančių antikūnų terapija gydytų pelių, trims individams terapija buvo neveiksminga (10 pav). Šių navikų mėginiai, kartu su kontrolinės grupės mėginiais, surinkti 14-ą terapijos dieną. Palyginimui surinkti keturi gydymui pasiduodančių navikų mėginiai. Likę penki navikai surinkti progresavimo fazėje, 37-ą terapijos dieną.



**10 paveikslas. iBIP2 navikų augimo kreivės po ilgalaikio gydymo imunomoduliuojančių antikūnų kombinacija.** Pelės buvo gydytos anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 kombinacija. Kontrolinei grupei buvo suteikti IgG izotipo antikūnai. Augimo kreivės taškai žymi naviko tūrio vidurkius ± standartinę nuokrypį.

Bendras imuninės infiltracijos lygis išliko stabilus ir nesiskyrė tarp aukščiau aprašytų grupių (p=0.623), todėl toliau tyrėme kiekybinius ir kokybinius T limfocitų, makrofagų bei MDSC infiltracijos pokyčius (11 pav.)

Gydymui pasiduodančiuose navikuose stebėjome padidėjusį T limfocitų lygį, lyginant su kontroline bei progresuojančia grupėmis. Progresuojančių navikų grupėje T limfocitų dalis buvo panaši kaip ir gydymui nepasiduodančiuose navikuose. MDSC infiltracija buvo reikšmingai žemesnė į gydymą reaguojančiuose navikuose, lyginant su nereaktyviais, progresuojančiais ar kontroliniais navikais. Panaši tendencija pastebėta ir tiriant bendrą makrofagų infiltraciją. Tačiau M1 tipo makrofagų lygis nekoreliavo su bendru makrofagų lygiu. Nors gydymui pasiduodančiuose navikuose makrofagų dalis buvo mažiausia, jų M1 proporcinė dalis buvo didžiausia. Imunosupresinių (MDSC+M2) bei priešvėžinių (M1) mieloidinių ląstelių santykio skaičiavimas parodė, kad 14-ą terapijos dieną gydymui nepasiduodantys navikai turėjo didžiausią imunosupresinių mieloidinių ląstelių dalį (santykis=7.5), lyginant su kontroliniais navikais (santykis=4). Į gydymą reaguojančiuose navikuose M1 makrofagai iš dalies kompensuoja MDSC ir M2 tipo makrofagų poveikį (santykis=1.5). Tačiau vystantis ilgalaikiam atsparumui imunosupresinės mieloidinės ląstelės vėl infiltruoja naviką (santykis=4.5).



**11 paveikslas. iBIP2 navikų imuninės mikroaplinkos profilis pirminio atsparumo, atsako ir progresijos fazėse, ilgą laiką veikiant imunomoduliuojančių antikūnų kombinacija.** Kiekybinė ir kokybinė masių citometrijos analizė buvo atlikta kontrolinės grupės pelėse, gydymui pasiduodančiuose ir nepasiduodančiuose navikuose 14-ą terapijos dieną, bei progresuojančiuose navikuose 37-ą terapijos dieną. Stulpelinėje diagramoje vaizduojami grupių vidurkiai ± standartiniai nuokrypiai. Lyginimui buvo naudojamas Mann-Whitney testas. CP – anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 kombinacinis gydymas.

Šie rezultatai rodo, kad nors iš pradžių didžioji mažo dydžio navikų dalis gerai pasiduoda gydymui anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 kombinacija ir jų augimo greitis sulėtėja, ilgainiui išsivysto atsparumas ir šie navikai vėl progresuoja. Padidėjęs imunosupresinių ir priešvėžinių mieloidinių ląstelių santykis yra būdingas tiek nuo pat pradžių gydymui nepasiduodantiems, tiek progresuojantiems navikams, ir gali būti išsivystančio atsparumo priežastis.

## APIBENDRINIMAS

Nors imunomoduliuojančių antikūnų, o ypač jų kombinacijų, priešvėžinis efektyvumas yra kliniškai įrodytas, daugėja duomenų apie išsivystantį mikroaplinkos sąlygotą atsparumą šiai terapijos rūšiai.

Anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 antikūnai nukreipti prieš skirtingus T limfocitus slopinančius receptorius, todėl dvigubas blokavimas gali veikti sinergistiškai, kaip parodyta klinikiniuose tyrimuose su melanomos pacientais [24,25]. Šių vaistų sinergistinis efektas buvo stebimas ir iBIP2 modelyje, tačiau parodėme, kad atsakas į gydymą priklauso nuo makrofagų infiltracijos lygio bei imunosupresinių M2 ir priešvėžinių M1 makrofagų santykio.

Klinikiniuose imunoterapijos tyrimuose dažniausiai stebimas trejopas atsakas į gydymą: ankstyvas ir ilgalaikis atsakas, staigus pirminis atsparumas (nėra atsako) arba išsivystęs įgytas atsparumas. iBIP2 modelyje, gydant anti-CTLA-4 ir anti-PD-1 imunomoduliuojančiais antikūnais, irgi stebėjome trejopą atsaką – nors per pirmąsias dvi gydymo kombinacine imunoterapija savaites navikų augimas reikšmingai sulėtėja, vėliau liga pradeda progresuoti. Naviko mikroaplinkoje atsakas į gydymą pasireiškė T ląstelių dalies padidėjimu bei MDSC ir M2 makrofagų dalies sumažėjimu. Pirminio ir išsivysčiusio atsparumo atveju tendencijos buvo priešingos.

Apibendrinant, įrodėme kad palaipsniui besiformuojanti imunosupresinė mikroaplinka neigiamai veikia iBIP2 melanomos atsaką į gydymą imunomoduliuojančiais antikūnais. Imunosupresinių (MDSC ir M2 makrofagų) bei priešnavikinių (M1 makrofagų) mieloidinių ląstelių santykis atspindi atsaką į gydymą anti-CTLA4 ir anti-PD-1. Šie rezultatai pabrėžia imunosupresinės mikroaplinkos, kaip atsparumo imunoterapijai priežasties ir potencialaus gydymo taikinio, reikšmę.

## **Kiaušidžių vėžio navikų imuninės infiltracijos bei serumo chemokinių tyrimai**

### **PROBLEMATIKA**

Molekulinė kiaušidžių vėžio transkriptomų analizė išryškino keturis navikų subtipus pagal būdingų genų raišką: mezenchiminį, imunoreaktyvų, diferencijuotą ir proliferacinį [26,27]. Vėlesni tyrimai pabrėžė aktyvų navikų mikroaplinkos vaidmenį kiaušidžių vėžio patogenezėje, parodydami, kad imunoreaktyvaus subtipo (T limfocitų infiltruoti) navikai pasižymi geresne ligos prognoze [28,29].

Dvejopa imuninės sistemos prigimtis dažnai išnaudojama vėžinių ląstelių norint sukurti imunosupresinę naviką skatinančią mikroaplinką. Kaip parodėme pirmojoje šio darbo dalyje, naudodami sistemiškai ir lokaliai veikiančius citokinus, vėžinės ląstelės geba poliarizuoti imuninės sistemos ląsteles. *In vivo* cirkuliuojantys chemokinai atspindi naviko mikroaplinką [30], todėl gali pasitarnauti kaip potencialūs biožymenys vėžio gydymui. Šiame darbe siekėme įvertinti kiaušidžių navikų imuninį fenotipą ir atrinkti potencialius imuninę navikų infiltraciją atspindinčius žymenis.

### **TYRIMO PLANAS**

Naudodami k-vidurkių klasterizavimą, nustatėme TCGA duomenų bazėje esančių pacienčių imuninį fenotipą pagal jų genų raiškos profilį. Nustatėme kiekvienam imuniniam fenotipui būdingų chemokinių raišką.

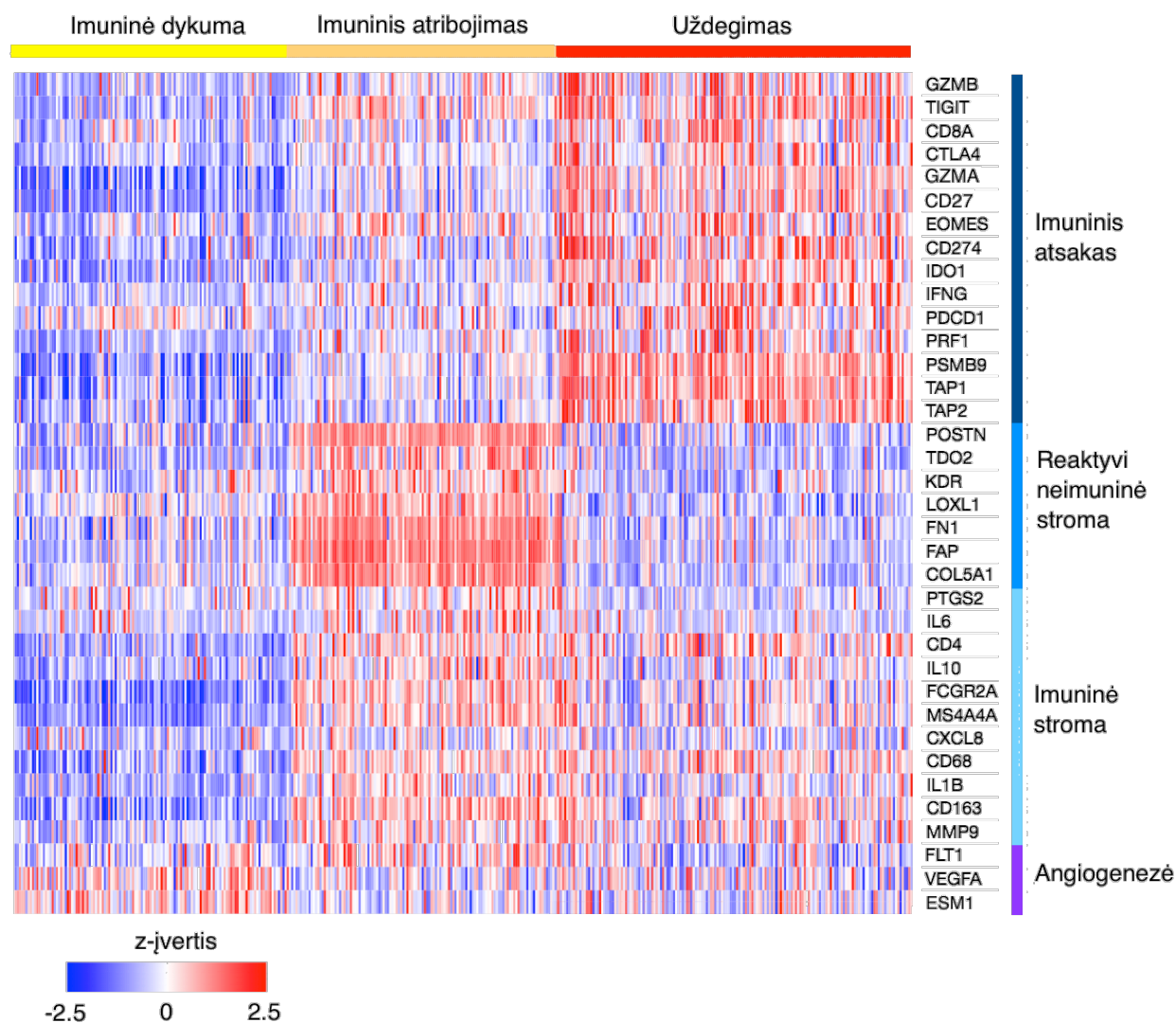
Iš 40 kiaušidžių vėžiu sergančių pacienčių surinkome priešoperacinius serumo mėginius ir chirurginiu būdu pašalinto navikinio audinio mėginius. Navikuose ištyrėme su imuniniu atsaku, mikroaplinka bei kamieniškumu susijusių genų raišką RT-kPGR metodu. Imuninę navikų infiltraciją matavome tėkmės citometru ir histologiškai. Atrinkome cirkuliuojančių chemokinių kombinaciją, kuri geriausiai gebėjo prognozuoti naviko imuninę infiltraciją.

### **REZULTATAI**

Siekėme išskirstyti KV pacientes pagal jų imuninį fenotipą ir priskirti jam būdingą chemokinių raišką. Tam tikslui pasitelkėme duomenis iš TCGA duomenų bazės kiaušidžių vėžio pacienčių imties (N=489). Kadangi TCGA duomenų bazėje nėra pateikiama histologinių duomenų, siekėme imuninius fenotipus išskirti tik pagal genų raišką.



Pacientes klasterizavome pagal iš literatūros atrinktų genų rinkinį, į kurį įėjo genai susiję su imuniniu atsaku, imuninėmis stromos ląstelėmis, neimuninėmis stromos ląstelėmis bei angiogeneze. K-vidurkių klasterizavimas išryškino tris pacienčių grupes, besiskiriančias savo genų raiškos profiliu (12 pav.) ir atitinkančias žinomus imuninius fenotipus. Imuninės dykumos klasteriui būdinga aukšta su angiogeneze susijusių genų raiška bei žema stromos ir imuninių žymenų raiška. Imuninio atribojimo klasteryje stebima aukšta neimuninės stromos žymenų raiška. Uždegimo klasteriui būdingas aukšta su imuniniu atsaku susijusių genų raiška. Tiek atribotame, tiek uždegiminiame klasteryje imuninės stromos žymenų raiška buvo nevienareikšmė.

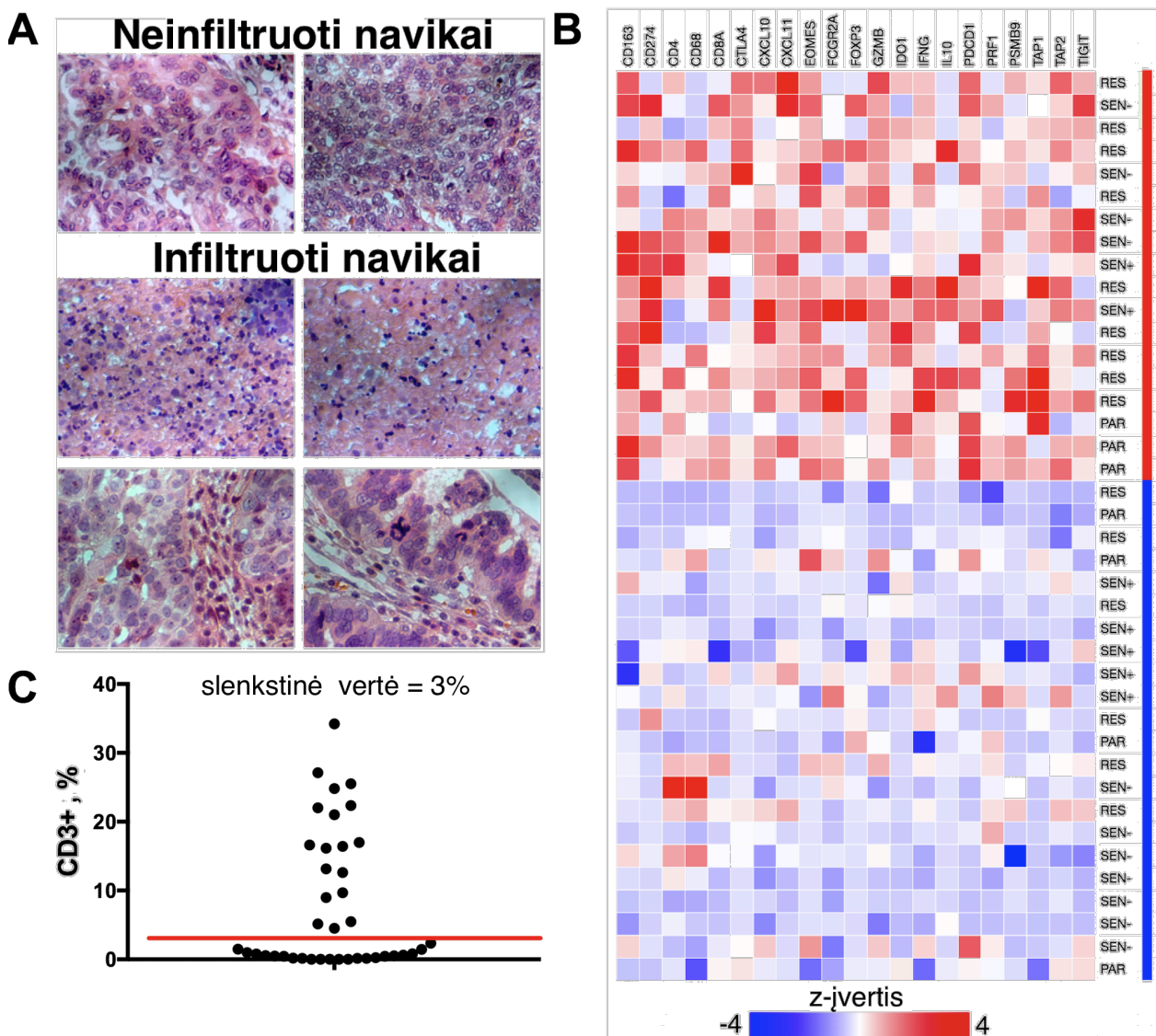


**12 paveiklas. Su imuniniu fenotipu susijusių genų raiškos profilis kiaušidžių navikuose.** Intensyvumo diagrama vaizduoja skirtingų genų rinkinio mRNR raiškos z-įverčius (eilutėse) tarp 489 pacienčių iš TCGA duomenų bazės (stulpeliuose). Prižiūrimasis k-vidurkių klasterizavimas išryškino tris skirtingus imuninius fenotipus (imuninę dykumą, imuninį atribojimą bei uždegimą) pagal jiems būdingą su imuniniu atsaku, stroma ir angiogeneze susijusių genų raišką.

Siekėme išsiaiškinti kiekvienam imuniniam fenotipui būdingą chemokinių raišką. Chemokinus koduojantys genai nebuvo įtraukti į klasterinę analizę. Imuninės dykumos fenotipas nepasižymėjo aukšta chemokinių raiška. Imuniškai atribotiems navikams būdinga aukšta CXCL1, CXCL5 bei CXCL8 chemokinių raiška. Uždegiminiams navikams

būdinga aukšta CCL1, CCL5, CCL17, CXCL9, CXCL10, CXCL11 chemokinių raiška. Tiek imuniškai atribotiems, tiek uždegiminiams navikams būdinga aukšta CCL2, CCL3, CCL4, CCL20 chemokinių raiška.

Toliau nusprendėme ištirti KVsergančių NVI operuotų pacienčių navikų imuninių kontekstą. Į tyrimą buvo įtraukta 40 pacienčių, kurioms diagnozuotas III-IV stadijos KV Visų pirma, vertinome limfocitų infiltraciją histologiniuose navikų pjūviuose, nudažytuose hematoksilinu ir eozinu (13 A pav.). Taip pat pamatavome su imuniniu atsaku susijusių genų raišką ir klasterizavome pacientus į aukštos (raudona) ir žemos (mėlyna) raiškos grupes (13 B pav). Tėkmės citometru vertinome CD3+ T limfocitų dalį navikuose, pasirinkdami 3% vertę kaip skiriamąją ribą tarp gausiai ir menkai infiltruotų navikų (13 C pav.). Priskyrėme tiriamus navikus imuniškai infiltruotai grupei (N=22), jei bent dviejuose iš trijų aukščiau išvardintų testų jie buvo charakterizuoti kaip gausiai imuniškai infiltruoti. Likę navikai (N=18) buvo priskirti neinfiltuotų navikų grupei.



**13 paveikslas. Imuniškai infiltruotų navikų požymiai.** Pacienčių navikai buvo sugrupuoti remiantis trimis skirtingais kriterijais. A. Navikai klasifikuojami kaip imuniškai infiltruoti, jei jų histologiniuose pjūviuose matoma T limfocitų infiltracija naviko židiniuose ar stromoje. B. Navikai klasifikuojami kaip imuniškai infiltruoti, jei juose stebima aukšta su imuniniu atsaku susijusių genų raiška, pamatuota RT-kPGR. C. Didesnė negu 3% CD3+ T limfocitų dalis navikuose, pamatuota tėkmės citometru, atspindi aukštą imuninių ląstelių infiltraciją navikuose.

Pažymėtina tai, kad bendras imuninės infiltracijos lygis (CD45+ ląstelių procentinė dalis, pamatuota tėkmės citometru) gausiai infiltruotuose navikuose buvo 38%, o menčiau infiltruotuose navikuose – 16% (p=0.0038). CD3+ limfocitų infiltracija irgi skyrėsi tarp grupių: 13% infiltruotose navikuose, lyginant su 2.5% neinfiltuotuose navikuose (p=0.0052). Mieloidinių ląstelių infiltracija (pamatuota pabal išsibarstymo profilį tėkmės citometru) gausiai infiltruotuose navikuose buvo 19%, o menčiau infiltruotuose – 13% (p=0.0112).

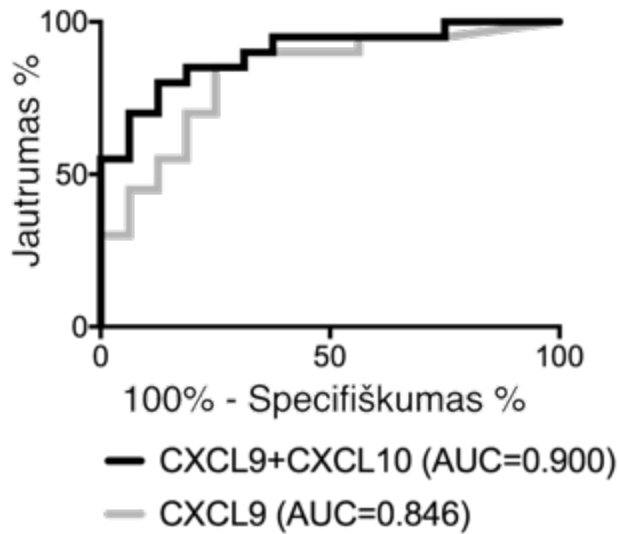
Imuniškai infiltruotų navikų lizatuose pamatavome reikšmingai didesnę CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 ir CXCL11 chemokinių koncentraciją, lyginant su menčiau infiltruotais navikais. Pamatavus priešoperacinę chemokinių koncentraciją serume paaiškėjo, kad reikšmingi skirtumai pacienčių grupėse, besiskiriančiose pagal imuninę navikų infiltraciją, matomi lyginant CXCL11, CCL2, CXCL10 ir CXCL9 chemokinių raišką, kuri buvo reikšmingai didesnė pacienčių su gausiai imuniškai infiltruotais navikais grupėje (2 lentelė).

**2 lentelė. Cirkuliuojančių chemokinių koncentracijų ir prognostinio potencialo rodiklių palyginimas tarp pacienčių, besiskiriančių pagal naviko imuninės infiltracijos lygį.** Chemokinių koncentracijų skirtumai identifiukuoti naudojant Mann-Whitney-U-testą. AUC ir jautrumas esant klinikinio požiūriu reikšmingam specifiškumui (94%) buvo paskaičiuoti iš ROC kreivės.

	Imuninė infiltracija (n=22) vidurkis (intervalas) pg/ml	Nėra infiltracijos (n=18) vidurkis (intervalas) pg/ml	p	AUC	Slenkstinė vertė pg/ml	SE %	SP %	CUI +	CUI -
<b>CXCL11</b>	870 (120-5740)	406 (36-1457)	0.0330	0.709	983	30	94	0.26	0.49
<b>CCL2</b>	1796 (649-3744)	864 (193-2269)	0.0006	0.825	2134	30	94	0.26	0.49
<b>CXCL10</b>	1625 (217-4988)	667 (124-2187)	0.0003	0.841	1410	40	94	0.36	0.52
<b>CXCL9</b>	190 (10-953)	44 (10-174)	0.0006	0.846	147	45	94	0.41	0.54
<b>Kombo CXCL9 CXCL10</b>	-	-	-	0.900	-	70	94	0.75	0.74

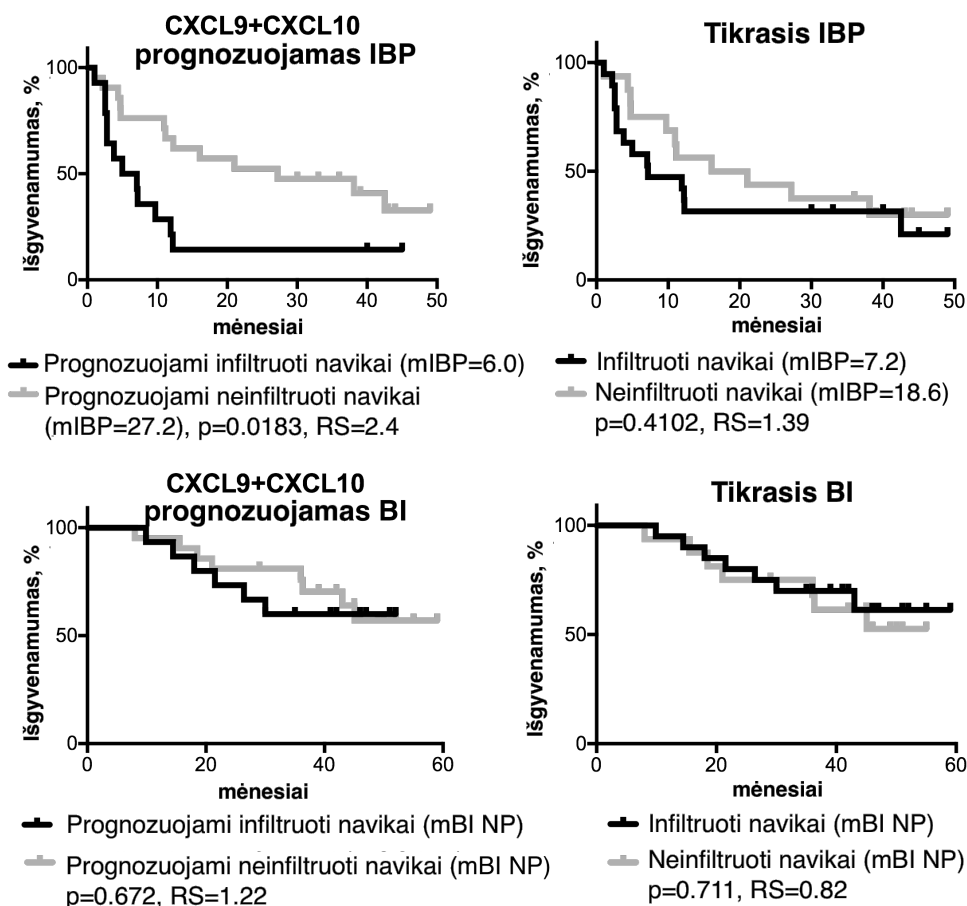
AUC – plotas po kreive, SE – jautrumas, SP – specifiškumas, CUI – klinikinė nauda.

Esant 94% specifiškumui, pavienių chemokinių jautrumas svyravo tarp 30% ir 45%. Taigi, nepaisant neblogų AUC verčių, klinikinė pavienių žymenų nauda nėra didelė. Iš visų įmanomų chemokinių kombinacijų geriausia pasirodė CXCL9+CXCL10, kurių jautrumas atrenkant pacientes su imuniškai infiltruotais navikais yra 70%, o teigiama ir neigiama klinikinė nauda – gera (>0.64). Lyginant su CXCL9, šios CXCL9+CXCL10 kombinacijos AUC vertė irgi yra geresnė (14 pav.)



14 paveikslas. Cirkuliuojančių chemokinių, potencialiai naudingų atrenkant pacientus su imuniškai infiltruotais navikais, ROC kreivės. ROC – klasifikatoriaus jautrumo ir specifiškumo ryšio kreivė, AUC – plotas po kreive.

Nors tikrosios IBP kreivės nesiskyrė tarp pacienčių grupių ( $p=0.4102$ ), pacientės, kurių serume CXCL9+CXCL10 raiška yra aukštesnė negu slenksstinė vertė, turi 2.4 karto padidėjusią ligos progresijos riziką (15 pav). Ryšio su bendru išgyvenamumu nebuvo.



15 paveikslas. Predikcinė CXCL9+CXCL10 vertė. Pateikiamos išgyvenamumo be progresijos ir bendro išgyvenamumo kreivės. Pacienčių, suskirstytų į grupes pagal navikų imuninę infiltraciją naudojantis pasirinkta chemokinių kombinacija, išgyvenamumo palyginimas su tikroju pacienčių išgyvenamumu. mIBP – išgyvenamumo be progresijos mediana – ir mBI – bendro išgyvenamumo mediana – išreikštos mėnesiais ir apskaičiuotos iš Kaplan-Meier išgyvenimo kreivių. Taip pat pateikiama Log-rank testo  $p$ -vertė ir atsinaujinimo arba mirties rizikos santykis (RS). NP – nepasiekta.

## APIBENDRINIMAS

Chemotaktiniai faktoriai svarbūs tiek imuninių ir stromos ląstelių pritraukimui į naviką, tiek jų tarpusavio komunikacijai. Cirkuliuojančios signalinės molekulės atspindi naviko mikroaplinką, todėl gali būti naudojami kaip potencialūs biožymenys. Šioje darbo dalyje pabrėžiame chemokinių svarbą formuojant imuninę kiaušidžių navikų mikroaplinką, kuri iki šiol buvo nagrinėta tik fragmentiškai. Atlikę TCGA duomenų bazės KV navikų tipavimą, kiekvienam fenotipui priskykome būdingą chemokinių raiškos profilį. Pamatavę šių chemokinių raišką mūsų studijos pacienčių navikuose ir serume pastebėjome, kad aukšta cirkuliuojančių CXCL9+CXCL10 chemokinių raiška randama pacienčių, kurių navikai gausiai imuniškai infiltruoti, serume.

Nors CXCL9 ir CXCL10 raiška yra būdinga imunoreaktyviam molekuliniam kiaušidžių vėžio subtipui [26,27], jų poveikis gali būti dvilypis. CXCL9 ir CXCL10 pritraukia T limfocitus, nepriklausomai nuo jų subtipo. Mūsų studijoje aukšta cirkuliuojančių CXCL9 ir CXCL10 koncentracija serume buvo susijusi su gausesne naviko imunine infiltracija, tačiau taip pat ir su blogesniu išgyvenamumu be progresijos. Genų raiškos analizė atskleidė, kad imuniškai infiltruotuose navikuose padidėjusi tiek priešvėžinių, tiek imunosupresinių su T limfocitų atsaku susijusių molekulių raiška. Detalesni imuninės infiltracijos pobūdžio tyrimai galėtų tiksliau susieti CXCL9 ir CXCL10 raišką su ligos prognoze.

## **Predikcinių kiaušidžių vėžio atsinaujinimo žymenų tyrimai**

### PROBLEMATIKA

Kiaušidžių vėžys dažnai diagnozuojamas vėlyvoje stadijoje. Standartinis gydymas remiasi kuo radikalesniu chirurginiu naviko pašalinimu ir platinos pagrindo chemoterapija. Tačiau daliai navikų išsivysto atsparumas ir jie recidyvuoja. Tikslus imuninės sistemos vaidmuo šiame procese nėra žinomas.

Nepaisant dažno atsinaujinimo ir ribotų gydymo galimybių, patikimų kiaušidžių vėžio biožymenų yra labai mažai. Šiame darbe siekėme įvertinti cirkuliuojančių imuninės sistemos signalinių molekulių ryšį su ligos prognoze ir imuniniu naviko kontekstu.

### TYRIMO PLANAS

Serumo mėginiuose atlikome chemokinių raiškos matavimą ir atrinkome chemokinus, kurių raiška labiausiai skyrėsi tarp pacienčių, kurioms liga progresavo, ir pacienčių, kurioms liga neprogresavo. Atrinkome cirkuliuojančių chemokinių kombinaciją, kuri geriausiai gebėjo prognozuoti pacienčių atsaką į gydymą.

### REZULTATAI

Į šį tyrimą buvo įtraukta 40 pacienčių, kurioms diagnozuotas III (90%) ar IV (10%) stadijos kiaušidžių vėžys. Po pilnos naviko rezekcijos, visoms pacientėms buvo skirti 6 ciklai chemoterapijos karboplatina ir paklitakseliu. Vidutiniškai pacienčių ligos eiga buvo stebėta 46 mėnesius po pirminės diagnozės. Naviko atsinaujinimas buvo patvirtintas radiologiškai. 73% pacienčių (n=29) navikas atsinaujino per stebėjimo laikotarpį. Išgyvenamumo be progresijos (IBP) mediana buvo 11.1 mėn. Pacienčių navikai buvo suklasifikuoti pagal tai, ar liga atsinaujino. Pacienčių klinikinių charakteristikų apžvalga pateikiama 3 lentelėje.

3 lentelė. Pacienčių klinikinių charakteristikų apžvalga (n=40).

	Progresuojantys navikai	Neprogresuojantys s navikai	P reikšmė
<b>N</b>	29	11	
<b>Amžius</b>			0.335
Mediana	63	67	
intervalas	32-76	32-74	
<b>Stadija</b>			0.109
III	25 (86%)	11 (100%)	
IV	4 (14%)	0 (0%)	
<b>IBP</b>			<0.0001
Mediana, mėn.	7.1	NP	
<b>BI</b>			0.0054
Mediana, mėn.	43.0	NP	

BI – bendras išgyvenamumas, IBP – išgyvenamumas be progresavimo, NP – nepasiekta.

Atlikę pusiau kiekybinį citokinų profiliavimą pastebėjome tendenciją, kad pacienčių, kurių liga progresavo, priešoperaciniame serume tam tikrų chemokinių lygis buvo aukštesnis negu pacienčių, kurių liga neatsinaujino, serume. Pamatavę tikslią šių chemokinių koncentraciją serume, pastebėjome reikšmingus skirtumus tarp CCL20, CXCL1, CCL3, CCL4 kiekio (4 lentelė). Visais atvejais jų koncentracija buvo didesnė pacienčių, kurioms liga atsinaujino, grupėje.

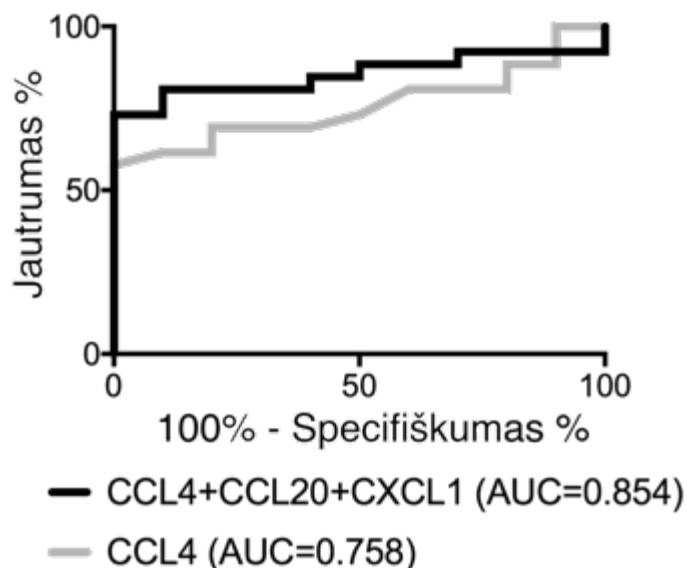
4 lentelė. Cirkuliuojančių chemokinių koncentracijų ir prognostinio potencialo rodiklių palyginimas tarp pacienčių, kurioms liga progresavo ir kurioms liga neprogresavo. Chemokinių koncentracijų skirtumai identifikuoti naudojant Mann-Whitney-U-testą. AUC ir jautrumas esant klinikiniu požiūriu reikšmingam specifiškumui (91%) buvo paskaičiuoti iš ROC kreivės.

	Atsinaujinusi liga (n=29) vidurkis (intervalas) pg/ml	Neatsinaujinusi liga (n=11) vidurkis (intervalas) pg/ml	p	AUC	Slenkstinė vertė pg/ml	SE %	SP %	CUI +	CUI -
<b>CCL20</b>	46 (2.5-357)	12 (2.5-61)	0.006	0.794	32	31	91	0.27	0.30
<b>CXCL1</b>	2058 (118-7542)	1105 (46-3632)	0.015	0.762	2028	42	91	0.39	0.34
<b>CCL3</b>	9.0 (2.8-31.3)	3.8 (2.3-5.8)	0.007	0.787	5.2	54	91	0.50	0.39
<b>CCL4</b>	28 (7.6-126)	14 (6.7-20)	0.016	0.758	20	62	91	0.58	0.42
<b>Kombo</b>									
<b>CCL4</b>	-	-	-	0.854	-	81	91	0.77	0.58
<b>CCL20</b>									
<b>CXCL1</b>									

AUC – plotas po kreive, SE – jautrumas, SP – specifiškumas, CUI – klinikinė nauda.

Norėdami įvertinti potencialią predikcinę šių chemokinių naudą, atlikome ROC analizę, kurios metu paskaičiavome kiekvieno chemokino slenkstinę vertę, plotą po kreive (AUC), jautrumą, specifiškumą ir klinikinę naudą. Iš pavienių chemokinių CCL4 pasižymėjo geriausiu jautrumu (62%) ir vidutiniška teigiama klinicine nauda (0.77) esant 20 pg/ml slenkstinei vertei. Išanalizavus visas įmanomas šių keturių skirtingų chemokinių

kombinacijas, atrinkome CCL4+CCL20+CXCL1 kombinaciją kaip turinčią didžiausią prognostinį potencialą, atsižvelgiant į AUC, jautrumo, bei klinikinio naudingumo vertes. CCL4 ir geriausios kombinacijos ROC kreivės pavaizduotos 16 paveiksle.



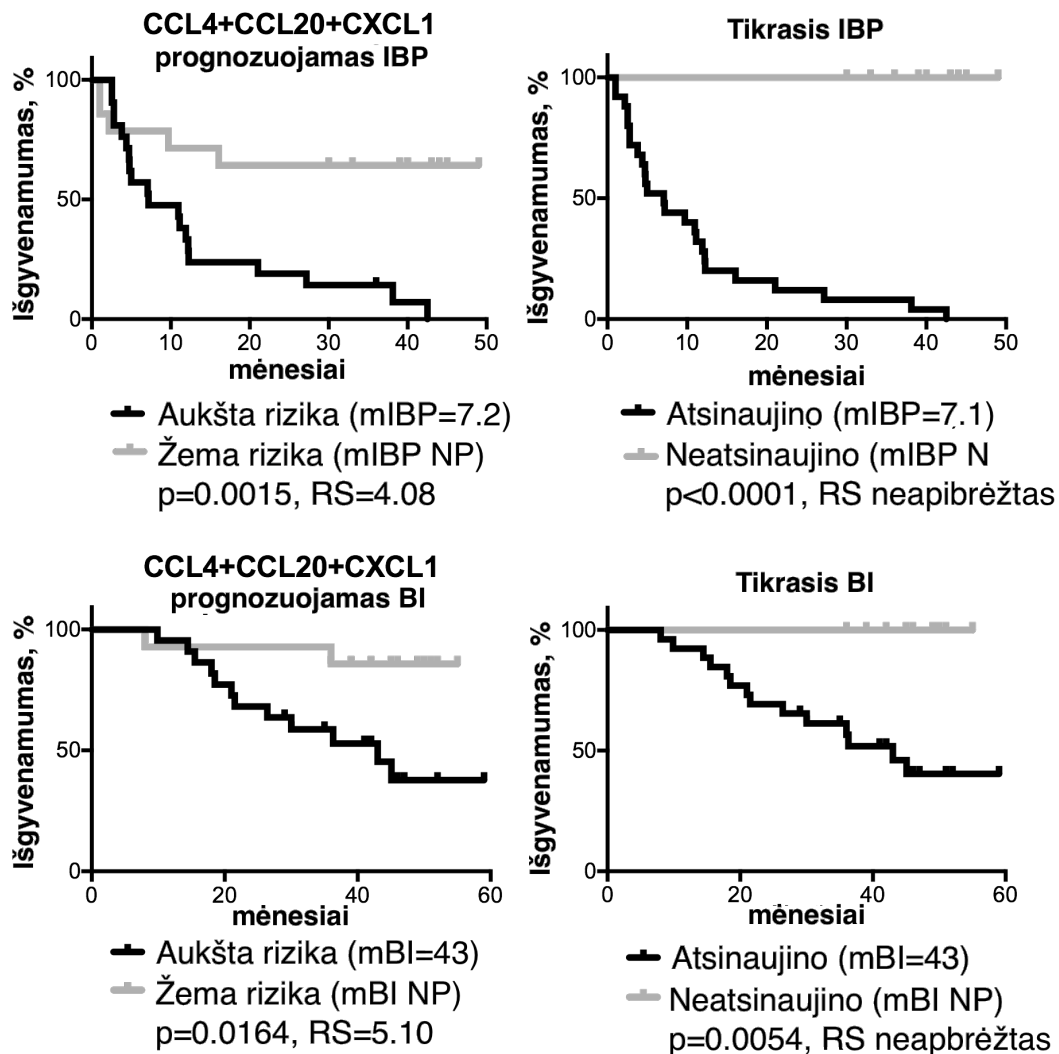
**16 paveikslas. Cirkuliuojančių chemokinių, potencialiai naudingų atrenkant pacientės su padidėjusia ligos atsinaujinimo rizika, ROC kreivės.** ROC – klasifikatoriaus jautrumo ir specifiškumo ryšio kreivė, AUC – plotas po kreive.

Priešoperacinė cirkuliuojančių chemokinių CCL4+CCL20+CXCL1 kombinacija geba prognozuoti IBP ir BI, statistiškai reikšmingai atspindėdama kohortos pacienčių išgyvenamumo tendencijas (17 pav.). Pacientės, kurių serume šių chemokinių raiška yra aukštesnė negu slenkstinė vertė, turi 4 kartus aukštesnę ligos atsinaujinimo riziką bei reikšmingai blogesnę išgyvenamumo prognozę.

Apibendrinant, KV sergančių pacienčių ligos eiga gali būti prognozuojama cirkuliuojančių chemokinių kombinacijos CCL4+CCL20+CXCL1.

## APIBENDRINIMAS

Šiame darbe pirmą kartą tyrinėjama potenciali predikcinė priešoperacinių sisiteminių chemokinių vertė prognozuojant KV atsinaujinimą. Atsparumas platina paremtai chemoterapijai yra pagrindinė KV atsinaujinimo priežastis. Nors vėžinių ląstelių atsparumo mechanizmai pakankamai gerai išnagrinėti, pastaruoju metu atsigrežiama į mikroaplinkos įtakos tyrimus. Pavyzdžiui, parodyta kad platinos pagrindo ir taksolių klasės chemoterapiniai vaistai didina nuo NF $\kappa$ B priklausomų chemokinių raišką ir taip skatina chemorezistentiškumo išsivystymą [31,32]. Mes užfiksavome aukštą CCL4, CXCL1 ir CCL20 chemokinių koncentraciją KV pacienčių, kurioms vėliau diagnozuotas ligos atsinaujinimas, priešoperaciniuose serumo mėginiuose. CXCL1 atsakingas už mieloidinių supresorių (MDSC) pritraukimą į naviką ir yra priklausomas nuo TNF- $\alpha$ . CCL4 ir CCL20 pritraukia skirtingus T limfocitų subtipus, atitinkamai CTL ir Treg. Šie rezultatai pabrėžia dvilypę imuninę chemoterapijai atsparių KV navikų mikroaplinką, kur priešvėžinis CCL4 poveikis yra nusveriamas vėžį skatinančio CLL20.



**17 pav. Predikcinė CCL4+CCL20+CXCL1 vertė.** Pateikiamos išgyvenamumo be progresijos ir bendro išgyvenamumo kreivės. Pacienčių, suskirstytų į aukštos arba žemos atsinaujinimo rizikos grupes pagal pasirinktos chemokinių kombinacijos vertę, išgyvenamumo palyginimas su tikruoju pacienčių išgyvenamumu. mIBP – išgyvenamumo be progresijos mediana – ir mBI – bendro išgyvenamumo mediana – išreikštos mėnesiais ir apskaičiuotos iš Kaplan-Meier išgyvenimo kreivių. Taip pat pateikima Log-rank testo p-vertė ir atsinaujinimo arba mirties rizikos santykis (RS). NP - nepasiekta.

Apibendrinant, mūsų rezultatai rodo, kad priešoperacinis cirkuliuojančių serumo chemokinių lygis skiriasi tarp pacientų. Nors pavienių citokinių prognostinis potencialas yra kuklus, jų kombinacijos gali būti kliniškai naudingos. Siūlome cirkuliuojančių CCL4+CCL20+CXCL1 chemokinių kombinaciją, kurių aukšta raiška yra susijusi su trumpesniu IBP ir BI. Validavus šiuos potencialius biožymenis, jie galėtų pasitarnauti kaip pacientų atrankos įrankiai tiriant papildomas gydymo galimybes.



## IŠVADOS

1. Nors su vėžiniu ląstelių lizatu brandintos dendritinės ląstelės pasižymi būdinga paviršiaus žymenų raiška ir gebėjimu aktyvuoti T limfocitus, jos taip pat iš dalies pasižymi tolerogeninėmis savybėmis bei gali paskatinti mišrų Th1/Th2 tipo priešvėžinį atsaką.
2. Stipriai išreikštos storosios žarnos vėžio ląstelių kamieniškumo savybės didina jų gebėjimą poliarizuoti makrofagus į M2 fenotipą, galimai dėl padidėjusios IL-10 ir IL-13 sekrecijos.
3. Kiaušidžių vėžio ląstelės, nepriklausomai nuo jautrumo cisplatinai, skatina M0 ir M1 tipo makrofagų poliarizaciją į M2 tipą. Lygiagrečiai, makrofagai indukuoja su EMT ir kamieniškumu susijusių genų raiškos padidėjimą kiaušidžių vėžio ląstelėse.
4. iBIP2 pelių melanomos modelis reprezentuoja uždegiminį naviko fenotipą, kuriam būdinga palaipsniui išsivystanti imunosupresinė mikroaplinka
5. Aukštas imunosupresinių (MDSC + M2 tipo makrofagų) ir priešvėžinių (M1 makrofagų) mieloidinių ląstelių santykis iBIP2 pelių melanomos navikuose žymi atsparumą gydymui imunomoduliuojančiais antikūnais anti-CTLA-4 ir anti-PD-1.
6. Uždegiminiams ir imuniškai atribotiems kiaušidžių navikams būdinga specifinė chemokinių raiška. Aukštas priešoperacinis cirkuliuojančių serumo chemokinių CXCL9+CXCL10 lygis padeda atrinkti gausiai imuninėmis ląstelėmis infiltruotus navikus.
7. Aukštas priešoperacinis cirkuliuojančių serumo chemokinių CCL4+CCL20+CXCL1 lygis gali prognozuoti kiaušidžių vėžio atsinaujinimą,

## MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

### Su disertacijos tematika susijusios publikacijos:

#### *Išleistos:*

1. **Mlynska A**, Povilaityte E, Zemleckaite I, Zilionyte K, Strioga M, Krasko J, Dobrovolskiene N, Peng MW, Intaite B, Pasukoniene V. Platinum sensitivity of ovarian cancer cells does not influence their ability to induce M2-type macrophage polarization. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018:e12996. Epub ahead of print.
2. Dobrovolskiene N, Pasukoniene V, Darinskas A, Krasko JA, Zilionyte K, **Mlynska A**, Gudleviciene Z, Miseikyte-Kaubriene E, Schijns V, Lubitz W, Kudela P, Strioga M. Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Vaccine*. 2018;36:4171-4180.

#### *Parengtas rankraštis:*

3. **Mlynska A**, Salciuniene G, Zilionyte K, Garberyste S, Strioga M, Intaite B, Barakauskiene A, Lazzari G, Dobrovolskiene N, Krasko JA, Pasukoniene V. Chemokine profiling in ovarian cancer patients serum reveals candidate biomarkers for recurrence and immune infiltration. *Šiuo metu recenzuojamas Oncology Reports*.

### Kitos publikacijos:

1. Krasko JA, Zilionyte K, Darinskas A, Dobrovolskiene N, **Mlynska A**, Riabceva S, Zalutsky I, Derevyanko M, Kulchitsky V, Karaman O, Fedosova N, Smychych TV, Didenko G, Chekhun V, Strioga M, Pasukoniene V. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. *Oncology Letters*. 2018;15:5098-5104.
2. Liubaviciute A, Krasko JA, **Mlynska A**, Lagzdina J, Suziedelis K, Pasukoniene V. Evaluation of low-dose proton beam radiation efficiency in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cell line vitality and H2AX formation. *Medicina (Kaunas)*. 2015;51:302-6.
3. Strioga M, Darinskas A, Pasukoniene V, **Mlynska A**, Ostapenko V, Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: to use or not to use? *Vaccine*. 2014;32:4015-24.
4. Pasukoniene V, **Mlynska A**, Steponkiene S, Poderys V, Matulionyte M, Karabanovas V, Statkute U, Purviniene R, Krasko JA, Jagminas A, Kurtinaitiene M, Strioga M, Rotomskis R. Accumulation and biological effects of cobalt ferrite nanoparticles in human pancreatic and ovarian cancer cells. *Medicina (Kaunas)*. 2014;50:237-44.

Disertacinio darbo rezultatai pristatyti 11-oje tarptautinių mokslinių konferencijų žodinių ir stendinių pranešimų pavidalu.

## **PADĖKA**

Noriu nuoširdžiai padėkoti visiems, vienu ar kitu būdu prisidėjusiems prie šios disertacijos gimimo.

Dėkoju savo vadovei dr. Vitai Pašukonienei už jos begalinį entuziazmą ir pasitikėjimą manimi. Vita, Jūs esate įkvėpimas mums visiems. Savo brangiems Imunologijos laboratorijos kolegoms už jų kuriamą mikroaplinką. Karolinai ir Neringai už mūsų motyvacinius ritualus. Mariui už dalijimąsi savo giliomis vėžio imunologijos žiniomis. Visiems Nacionalinio vėžio instituto kolegoms, su kuriais teko malonumas dirbti. Daktarei Birutei Intaitei už gerą valią ir tiriamųjų pacienčių atranką. Daktarei Aušrinei Barakauskienei už pagalbą atliekant histologinį navikų vertinimą. Savo studentams, kurie prisidėjo prie šio darbo.

Dėkoju prof. Hanahano laboratorijai EPFL, ypač savo vadovui dr. Krisztian Homicsko, kuris manimi patikėjo ir pakvietė kartu dirbti. Laikas, kurį praleidau Šveicarijoje, buvo vienas sunkiausių, bet kartu labiausiai apdovanojančių laikotarpių mano moksliniame kelyje. Dėkoju Mei, už bendradarbiavimą ir palaikymą įvairiausiose situacijose. Sylvie, Stephan ir Bruno už pagalbą atliekant ikiklinikinius pelių tyrimus. Visiems žmonėms, su kuriais teko garbė dirbti ir kurie praplėte mano akiratį.

Dėkoju VU Biochemijos ir Molekulinės biologijos katedrai, savo Alma mater, kur pradėjau kelionę po gyvybės mokslų pasaulį. Esu ypač dėkinga savo pirmajai mokslinei vadovei doc. dr. Elenai Bakienei už jau dešimtmetį trunkantį palaikymą ir dėmesį, bei prof. Editai Sužiedelienei už teigiamą nusiteikimą ir konsultacijas ruošiant disertaciją.

Dėkoju savo šeimai ir draugams, kurie priima mane tokią, kokia esu, net ir pastaruoju iššūkių pilnu laikotarpiu. Už Jūsų visų meilę ir palaikymą, kurio gavau daugiau nei jaučiuosi nusipelnusi, ir už suteiktą erdvę ir vienatvę, kai man to reikėjo.

## **GYVENIMO APRAŠYMAS**

Agata Mlynska (1988-09-29)

### **Darbovietė:**

Imunologijos laboratorija  
Nacionalinis vėžio institutas  
Santariškių g. 1, LT-08660, Vilnius, Lietuva

### **Kontaktai:**

Elektroninis paštas: [agata.mlynska@gmail.com](mailto:agata.mlynska@gmail.com)  
Telefonas: +370 677 34601  
LinkedIn: <https://www.linkedin.com/in/agata-mlynska-79355a1b/>  
ResearchGate: [https://www.researchgate.net/profile/Agata\\_Mlynska](https://www.researchgate.net/profile/Agata_Mlynska)  
ORCID ID: 0000-0002-3646-0258

### **Išsilavinimas:**

- Biochemijos doktorantūros studijos, Vilniaus universitetas, 2013-2018 m.
- Biochemijos magistras, Vilniaus universitetas, 2010-2012 m.
- Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas 2006-2010 m.

### **Mokslinio darbo patirtis:**

- Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Nacionalinis vėžio insitutas, nuo 2011 m.
- Doktorantė-stažuotoja, Šveicarijos federalinių tyrimų institutas, 2014-2017 m.
- Magistro studentė, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos, 2010-2012 m.
- Stažuotoja, Oslo universitetinė ligoninė, 2010 m.
- Bakalauro studentė, Vilniaus universitetas, 2009-2010 m.

### **Mokslinė produkcija:**

6-ių mokslinių publikacijų, turinčių citavimo indeksą, bendraautorė; pranešėja 11-oje tarptautinių mokslinių konferencijų.

### **Moksliniai projektai:**

dalyvavimas 8-iose mokslo projektuose projects, iš jų 3 tebevykstantys.

### **Sertifikatai:**

Pažengusio lygio tėkmės citometrijos kursas; Laboratorinių gyvūnų mokslo kursas (FELASA B kategorija); Geros gamybos praktikos (GGP) kursas.

### **Laimėjimai:**

SCIEX Šveicarijos mokslinių mainų stipendija; Geriausio stendinio pranešimo apdovanojimas THE COINS 2016 konferencijoje.

### **Narystė:**

Lietuvos imunologų draugija.

## SUMMARY

In this study, we have approached the crosstalk of cancer and immune system at local and systemic levels during the processes of tumor development and response to treatment.

The surrounding immune microenvironment in the tumor can polarize the immune response from antitumor to tumor promoting. The goal of immune-based therapies is to balance the host immunity in a way that it destroys cancer cells. Here, we investigated the frequently underestimated balance between immunogenic and tolerogenic properties of tumor antigen-matured DCs, *in vitro* differentiated from monocytes. We demonstrated that using cancer cell lysate resulted in the maturation of DCs expressing tolerogenic marker CD85k, producing immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF $\beta$ , and inducing Tregs. The tolerogenicity of DCs was induced independently on the histological origin of cancer cells used for lysate preparation, suggesting the presence of immunosuppressive components inside the cancer cells.

We then aimed to analyze how cancer cells affect another type of monocyte-derived myeloid cells, macrophages, in terms of inducing their M1/M2 polarization. Our findings suggest a novel hypothesis, relating the cancer cell stemness potential and macrophage polarization abilities. We found that stem-like colon cancer cell lines, characterized by the higher mRNA expression of CSC and EMT markers in comparison to non-stem-like cells are able to induce the acquisition of the representative M2-like surface marker expression profile in differentiated PBMC-derived macrophages. The possible mechanism behind this polarization is the significantly increased secretion of Th2 cytokines IL-10 and IL-13 in stem-like cell line HCT116 and COLO320 in comparison to non-stem-like cell lines HT29, SW620 and NCI-H508. Nevertheless, other soluble factors or extracellular vesicles, not addressed in this study, could also account for increased M2-like polarization ability in stem-like cells.

After demonstrating the unidirectional effect of cancer cell secretome on macrophage polarization, we next aimed to analyze the bidirectional interplay between these two cell types. By co-culturing the macrophages and ovarian cancer cells in the drug resistance background, we show that, independently of the initial platinum resistance level, cancer cells act towards inducing the M2-like phenotype in macrophages. In resistant cancer cells, this may be determined by the acquisition of molecular and functional EMT- and stemness-related properties, as well as increased production of immunomodulatory cytokines. In platinum-sensitive cells, EMT- and stemness-related transcriptional profile is upregulated upon the co-culture with macrophages. We hypothesize that these alterations may promote the early development of resistant cancer cell sub-clones. Together, these findings suggest that macrophage-promoted EMT-induction in cancer cells and M2-like macrophage polarization in co-culture are the results of cancer and immune cells collaboration towards the creation of immunosuppressive microenvironment.

The M2-like macrophage polarization observed in *in vitro* crosstalk studies, representing the early process of tumor formation encouraged us to analyze the dynamics of immune microenvironment formation during development of melanoma tumors *in vivo*. During tumor development in BRAF V600E mutation-driven iBIP2 mouse model, we observed a gradual reprogramming of the immune microenvironment from antitumor-oriented (prevalence of M1 macrophages) to immunosuppression-oriented (prevalence of M2 macrophages). As iBIP2 tumors are massively infiltrated with immune cells, we

considered using checkpoint blockade as a suitable immune-targeting melanoma treatment. We found that tumor size as well as the level of immunosuppressive myeloid cells are related to intrinsic and acquired resistance to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 combination and therefore are potential targets to improve the efficacy of immunotherapy. We propose the intratumoral ratio of immunosuppressive (MDSC + M2 macrophages) to antitumor (M1 macrophages) as a marker of response to double checkpoint blockade.

After showing that the qualitative and quantitative analysis of immune microenvironment presents as a valuable approach for tumor characterization and monitoring the response to therapy, we were encouraged to translate these findings for ovarian cancer. The unsatisfactory clinical outcome of patients with advanced OC urges the search for novel prognostic and predictive biomarkers, and therefore dictated the exploratory nature of this study. We first classified ovarian tumors based on their immune phenotype. For this, we used TCGA dataset patients, which were clustered into immune-desert (non-infiltrated) and -excluded or inflamed subtypes (immune-infiltrated) based on their mRNA expression. We assigned a specific chemokine expression pattern for immune-infiltrated phenotypes. We next translated the *in silico* results into the dataset of ovarian cancer patients, for which we had collected sera and tumor samples.

After classifying patients based on their tumor immune infiltration, we showed that preoperative circulating CXCL9+CXCL10 chemokine combination reflects the level of immune infiltration in ovarian tumors. Also, after classifying patients based on their response to primary treatment with platinum-based chemotherapy, we suggested that the increased preoperative levels of circulating CCL4+CCL20+CXCL1 chemokine combination in OC patients serum is associated with shorter RFS and OS. Further validations on a larger scale are needed to confirm that these chemokine combinations could successfully model the outcome in other patient populations. Also, determining the exact source and function of these chemokines in ovarian cancer setting is necessary for dissecting and targeting the tumor microenvironment.

In summary, our study provides the evidence for the elements of the immune system to be actively involved in shaping the tumor microenvironment and serving as predictive biomarkers or therapeutic targets. As we used different tumor models, the direct translation of discussed findings from one model to another would require additional validation. However, the general principles and hypotheses introduced in this study, such as stemness-induced macrophage polarization, macrophage-induced EMT, the ratio of immunosuppressive and antitumor myeloid cells or immune-phenotype specific chemokine expression patterns, could be applied for cancers of other localizations.

## LITERATŪROS SARAŠAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
2. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309–22.
3. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14:275–91.
4. Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*. 2016;9:74.
5. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2016;18:1–11.
6. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348:69–74.
7. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1–10.
8. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329–60.
9. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007;117:1137–46.
10. Kim R. Cancer immunoediting: from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121:1–14.
11. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321–330.
12. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:717–34.
13. Lyons YA, Wu SY, Overwijk WW, Baggerly KA, Sood AK. Immune cell profiling in cancer: molecular approaches to cell-specific identification. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1:26.
14. Syn NLX, Yong WP, Goh BC, Lee SC. Evolving landscape of tumor molecular profiling for personalized cancer therapy: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2016;12:911–22.
15. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*. 2015;125:3335–7.
16. Su S, Liu Q, Chen J, Chen J, Chen F, He C, et al. A Positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*. 2014;25:605–20.
17. Fan QM, Jing YY, Yu GF, Kou XR, Ye F, Gao L, et al. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014;352:160–8.

18. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:611–29.
19. Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: Implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2017;28:52.
20. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29:4741–51.
21. Deng X, Zhang P, Liang T, Deng S, Chen X, Zhu L. Ovarian cancer stem cells induce the M2 polarization of macrophages through the PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B pathways. *Int J Mol Med*. 2015;36:449–54.
22. Zhang Q, Cai DJ, Li B. Ovarian cancer stem-like cells elicit the polarization of M2 macrophages. *Mol Med Rep*. 2015;11:4685–93.
23. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016;165:35–44.
24. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372:2006–17.
25. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373:23–34.
26. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474:609–15.
27. Tothill RW, Tinker A V., George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5198–208.
28. Nelson BH. Nelson BH. New insights into tumor immunity revealed by the unique genetic and genomic aspects of ovarian cancer. *Curr Opin Immunol*. 2015;33:93–100.
29. Hwang W-T, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124:192–8.
30. Gnjatic S, Bronte V, Brunet LR, Butler MO, Disis ML, Galon J, et al. Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2017;5:44.
31. de Visser KE, Jonkers J. Towards understanding the role of cancer-associated inflammation in chemoresistance. *Curr Pharm Des*. 2009;15:1844–53.
32. Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2009;28:4353–63.