

**ZNAČAJ PRISUSTVA SUPRESORSKIH ĆELIJA
MIJELOIDNOG POREKLA KOD BOLESNIKA SA SPORADIČNIM
KOLOREKTALNIM KARCINOMOM**

Kandidat:

Dr Irina Brčerević

Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju,

VMA, Crnotravska 17, 11 000 Beograd

Telefon 064 1114127,

e-mail: irinabrc@gmail.com

Mentor:

Pk prof dr Radoje Doder

Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju,

VMA, Crnotravska 17, 11 000 Beograd

e-mail: radoje.doder@yahoo.com

SADRŽAJ

SPISAK SKRAĆENICA.....	5
1. UVOD.....	9
1.1. Genske promene u nastanku CRC.....	10
1.2. Imunska osnova tumora.....	12
1.3. Tumorska mikrosredina.....	13
1.4. Supresorske ćelije mijeloidnog porekla u TME i cirkulaciji.....	17
1.5. Faze u produkciji i aktivaciji MDSC.....	20
1.6. Mehanizmi supresije MDSC.....	23
1.7. Neimunska funkcija MDSC.....	26
1.8. Klinički značaj MDSC.....	30
2. HIPOTEZA I CILJEVI.....	33
2.1. Hipoteza.....	33
2.2. Ciljevi.....	33
3. ISPITANICI I METODE.....	34
3.1. Pacijenti i zdrave osobe (kontrolna grupa).....	34
3.2. Kliničko ispitivanje.....	34
3.3. Uzorci i analize.....	35
3.4. Imunofenotipska analiza ćelija.....	38
3.5. Statistička analiza.....	39
4. REZULTATI.....	40
4.1. Detekcija subpopulacija MDSC kod bolesnika sa CRC i zdravih osoba.....	40
4.2. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja MDSC kod pacijenata sa CRC i zdravih osoba.....	46
4.3. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema TNM/AJCC klasifikaciji.....	48
4.4. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema Dukes klasifikaciji.....	53

4.5. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema Astler-Coller klasifikaciji.....	55
4.6. Korelacija zastupljenosti MDSC sa metastatskim širenjem bolesti.....	58
4.7. Korelacija MDSC i stepena diferencijacije tumora.....	61
4.8. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na limfoidnu, vensku i perineuralnu invaziju.....	63
4.9. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na veličinu tumora.....	64
4.10. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na lokalizaciju tumora.....	65
4.11. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC pre i posle hirurškog lečenja pacijenata.....	69
4.12. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC kod zdravih osoba i pacijenata sa CRC nakon učinjenog hirurškog lečenja.....	71
4.13. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različite starosne dobi.....	73
4.14. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog pola.....	75
4.15. Korelacija BMI indeksa i zastupljenosti MDSC.....	76
4.16. Korelacija zastupljenosti MDSC sa faktorima upale i tumorskim markerima.....	77
4.17. Korelacija između PMN-MDSC, M-MDSC i preživljavanja (Overall survivor OS).....	78
4.18. Korelacija između OS i drugih parametara (NLR;LMR;Neu/PMN-MDSC;M/M-MDSC).....	81
4.19. Klinička tačnost broja i procentualne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC i odnosa NLR, LMR, Neu/ PMN-MDSC i M/ M-MDSC u predviđanju ishoda bolesti.....	82
5. DISKUSIJA.....	89
5.1. Detekcija MDSC podgrupa.....	90

5.2. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja MDSC kod pacijenata sa CRC i zdravih osoba.....	92
5.3. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema TNM/AJCC klasifikaciji.....	93
5.4. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema Dukes i Astler-Coller klasifikaciji.....	95
5.5. Korelacija zastupljenosti MDSC sa metastatskim širenjem bolesti.....	96
5.6. Odnos MDSC i stepena diferencijacije tumora.....	96
5.7. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na limfoidnu, vensku i perineuralnu invaziju.....	97
5.8. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na veličinu i lokalizaciju tumora.....	97
5.9. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC pre i posle hirurškog lečenja pacijenata.....	98
5.10. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC kod zdravih osoba i pacijenata sa CRC nakon učinjenog hirurškog lečenja.....	99
5.11. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različite starosne dobi, pola i BMI.....	100
5.12. Korelacija zastupljenosti MDSC sa faktorima upale i tumorskim markerima.....	102
5.13. Korelacija PMN-MDSC, M-MDSC i preživljavanja (Overall survivor OS).....	103
5.14. Korelacija između OS i drugih parametara (NLR; LMR; Neu/PMN-MDSC; M/M-MDSC).....	104
6. ZAKLJUČAK.....	108
7. LITERATURA.....	109

SPISAK SKRAĆENICA

AJCC	American Joint Committee on Cancer – Američki komitet za karcinom
ANGPT 1	Angiopoietin 1 – angiopoetin 1
APC	Adenomatous polyposis coli - Adenomatозна polipoza kolona
ApoE	Apolipoproteine E- apolipoprotein E
ARG1	Arginase 1 – arginaza 1
ATRA	All-Trans-Retinoic Acid – al-trans retinoična kiselina
b-FGF	Basic Fibroblasts Growth Factor – osnovni faktor rasta fibroblasta
BRAF	Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
Bv8	Bombina variegata peptid 8
CAF	Cancer-associated fibroblasts – fibroblasti povezani sa karcinomom
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2 - CC motiv ligand 2
CD	Cluster of Differentiation – klaster diferencijacije
CIMP	The CpG island methylator phenotype – CpG metilacioni fenotip
CIN	Chomosomal instability – hromozomska nestabilnost
CRC	Colorectal carcinoma – kolorektalni karcinom
CTC	Circulating Tumor cells – cirkulišuće tumorske ćelije
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte – citotoksični T limfociti
CXC	Chemokine Ligand 9 - hemokin liganda 9
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern – molekulski obrasci oštećenja
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid – etilendiamintetrasirćetna kiselina
ECM	Extracellular matrix – ekastracelularna sredina
EGF	Epidermal growth factor – factor rasta epiderma
E-MDSC	Early Myeloid-Derived Suppressor Cells - rane mijeloidne ćelije supresorskog porekla
e-NOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase – endotelna azot oksid sintaza
ER	Endoplasmic reticulum – endoplazmatski retikulum

FGF	Fibroblasts growth factor – faktor rasta fibroblasta
Foxp ³	Forkhead Box P3– transkripcioni faktor iz „forkhead” familije koji je eksprimiran u regulatornim T-ćelijama
G-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor – faktor stimulacije kolonija granulocita
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor - faktor stimulacije kolonija granulocita, makrofaga/monocita
HGF	Hepatocyte growth factor - faktor rasta hepatocita
HSC	Hematopoietic stem cells – hematopoetske stem ćelije
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-D Related – humani leukocitni antigen- DR
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha - hipoksijom inducibilni faktor 1 α
HSC	Hematopoetic Stem Cells – hematopoetske stem ćelije
IFN γ	Interferon γ - interferon gama
IGF	Insulin like growth factor – insulinu sličan faktor rasta
IL	Interleukin - interleukin
IMC	Immature Myeloid Cells – nezrele mijeloidne ćelije
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase – inducibilna azot oksid sintaza
IRF-8	Interferon Regulatory Factor 8 - interferon regulatorni faktor 8
Jak	Janus kinase – janus kinaza
KRAS	Kirsten ras
LMR	Lymphocyte monocite ratio – limfocitno monocitni odnos
LOH	Loss of heterozigosity – gubitak heterozigotnosti
LOX 1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1 - lektin-tip oksidisani LDL receptor 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase - mitogenom aktivirana proteinska kinaza
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor – faktor stimulacije kolonija makrofaga/monocita

MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells – supresorske ćelije mijeloidnog porekla
MHC	Major Histocompatibility Complex – glavni kompleks tkivne podudarnosti
MMP	Matrix Metalloproteinase – matriksna metaloproteinaza
M-MDSC	Monocytic Myeloid-derived suppressor cells – monocitne supresorske ćelije mijeloidnog porekla
MSI	Microsatellite instability – mikrosatelitska nestabilnost
NET	Neutrophil trap - neutrofilne zamke
NF-κB	Nuclear Factor-κB – nuklearni faktor κB
NK	Natural Killer – urođeno ubilačke ćelije
NLR	Neutrophil/Lymphocyte Ratio – neutrofilno limfocitni odnos
NO	Nitric Oxide – azot oksid
ORN	Ornithine – ornitin
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern – molekularni obrasci patogena
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1- ligand za PD-1
PG	Prostaglandine – prostaglandin
PGDF	Platelet-derived growth factor - faktor rasta porekla trombocita
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT - protein inhibitor aktiviranog STAT
PMN-MDSC	Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells - polimorfonuklearne supresorske ćelije mijeloidnog porekla
PMN	Premetastatic niche - premetastatske niše
RNS	Reactive Nitrogen Species – reaktivne vrste azota
ROS	Reactive Oxygen Species – reaktivne vrste kiseonika
SD	Standard Deviation – standardna devijacija
SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling – supresor citokinske signalizacije
SS	Side Scatter – bočno rasipanje
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription – prenosnik signala i aktivator

transkripcije

TAM	Tumor-Associated Macrophage – makrofag udružen sa tumorom
TAN	Tumor-Associated neutrophile neutrofili povezani sa tumorom
TCR	T cell receptor – T ćelijski receptor
TEM	Tie2-expressing monocytes – tumorom indukovani monociti
TGFβ	Transforming growth factor β – transformišući faktor rasta beta
Th	T helper – T pomoćničke ćelije
TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes - tumor infiltrišući limfociti
TLR	Toll-Like Receptors – receptor sličan Tollu
TME	Tumor microenvironment - tumorsko mikrokruženje
TNF	Tumor Necrosis Factor - faktor nekroze tumora
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis – tumor, limfna žlezda, metastaza
TP53	Tumor proteine 53 – tumorski protein 53
Treg	Regulatory T Lymphocytes – regulatorni T limfociti
TSG	Tumor suppressor gene - tumor supresor gen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor – vaskularni endotelni faktor rasta
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 – receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta

1. UVOD

Smanjenjem stope mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti poslednjih godina, karcinomi postaju vodeći uzrok smrti savremenog čoveka. Smatra se da je tokom 2020.g. u svetu od karcinoma obolelo oko 19,3 miliona ljudi, a preminulo oko 10 miliona. Najčešće dijagnostikovani karcinom je karcinom dojke (11,7 %), potom pluća (10 %), a na trećem mestu se nalazi kolorektalni karcinom (eng. colorectal carcinoma, CRC). On je i drugi uzročnik smrti od karcinoma sa 1 931 590 obolelih i 935 173 umrlih tokom 2020.godine (1). CRC je više prisutan kod muškaraca nego kod žena. Njegova najveća incidenca je u zemljama istočne i severne Evrope (Mađarska 51,2 na 100 000 stanovnika), potom u Južnoj Koreji i Japanu (41,5 i 38,9 na 100 000 stanovnika), Australiji i Novom Zelandu, Severnoj Americi,... Srbija je na 13. mestu u svetu po učestalosti kolorektalnog karcinoma kod oba pola (36,7 na 100 000 stanovnika), a na 8. mestu po učestalosti kod muškaraca (49 na 100 000 stanovnika) (2). Smatra se da je CRC marker socioekonomskog razvoja zemlje i da se povećava sa porastom indeksa ljudskog razvoja (HDI). Indeks ljudskog razvoja meri prosečno dostignuće tri ključne dimenzije ljudskog razvoja: dug i zdrav život, znanje i dostojan životni standard. Tako je incidenca CRC niska u većini zemalja Afrike i Azije. Gojaznost, loše prehrambene navike, slaba fizička aktivnost, duži životni vek uz neadekvatan skrining su doveli do toga da veliki broj zemalja u razvoju ima povećanu incidencu bolesti. U bogatijim zemljama sa razvijenom mrežom prevencije i dugogodišnjeg skrininga kao i odličnim mogućnostima lečenja uočeno je smanjenje incidence ali i smrtnosti kod bolesnika (3, 4). Prema poslednjim navedenim podacima od strane Američkog udruženja za karcinome relativna stopa petogodišnjeg preživljavanja od trenutka postavljanja dijagnoze kod lokalizovane bolesti je 91 % za karcinom kolona, a 90 % za karcinom rektuma. Kada je u pitanju lokalno uznapredovala bolest stopa je 72 % i 73 %, redom, a za postojanje udaljenih metastaza kolona 14 % i rektuma 17 %.

(5). Najveći broj obolelih ima sporadični kolorektalni karcinom, kod manjeg broja bolesnika je tumor nastao na terenu dugotrajnih, zapaljenskih bolesti creva (npr. ulcerozni kolitis) ili se radi o grupi bolesnika sa hereditarnim kolorektalnim karcinomom (familijarna adenomatozna polipoza, Gardnerov i Lynch sindrom, juvenilni polipozni sindrom, Peutz-Jeghers sindrom,...)(6). Sporadični CRC je prisutan u 95 % slučajeva. Nastaje obično kod osoba starijih od 50 godina, mada je poslednjih godina u razvijenim zemljama (USA, Australija, Kanada,...) uočena tendencija porasta oboljelih nešto niže starosne dobi, te je 2018.g. od strane Američkog komiteta

za karcinome (AJCC) predloženo pomeranje granica za skrining sa 50 na 45 godina života. U praksi su u širokoj upotrebi testovi na okultno krvarenje u stolici ili fekalni imunohistohemijski testovi, kao i DNK testovi iz stolice. Najpouzdaniji i najbolji način otkrivanja CRC je kolonoskopski pregled, ali se u cilju dijagnostike mogu koristiti i irigografija i virtuelna kolonoskopija. Na žalost, kao i kod većine drugih malignih oboljenja, mali broj pacijenta se otkriva u ranoj fazi bolesti. Stadijumi CRC se određuju prema TNM klasifikaciji (AJCC) koji je baziran na tri ključne činjenice (T - veličina tumora, N - zahvatanje limfnih žlezda i M - metastaziranje u druge organe). Karcinom debelog creva je inicijalno obično asimptomatska bolest, ali se vremenom može razviti različita klinička slika – dijarealni sindrom ili opstipacija, anorektalni sindrom, krvarenje, bolovi u stomaku, nenamerni gubitak telesne mase, slabost, umor. Sa napredovanjem bolesti dolazi i do poremećaja funkcije udaljenih organa (najčešće jetra, pluća, centralni nervni sistem), a moguć je i razvoj paraneoplastičnog sindroma (7). Terapijski pristup zavisi od kliničkog stadijuma i lokalizacije bolesti, patohistološkog nalaza kao i opšteg stanja pacijenta. Najčešće se primenjuje hirurško lečenje, hemio i radioterapija. Poslednjih godina se sve više upotrebljava biološka i ciljana terapija (8). U terminalnoj fazi bolesti dominira palijativna i simptomatska terapija.

1.1. GENSKE PROMENE U NASTANKU CRC

Sporadični CRC se javlja kao posledica genetskih promena koje su se razvile slučajno tokom života. Za njegov nastanak presudno je sticanje genske nestabilnosti. Postoji nekoliko različitih puteva u patogenezi ovog karcinoma, ali su tri najčešća: put hromozomske nestabilnosti (CIN), put mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) i pojava CpG metilacionog fenotipa (CIMP).

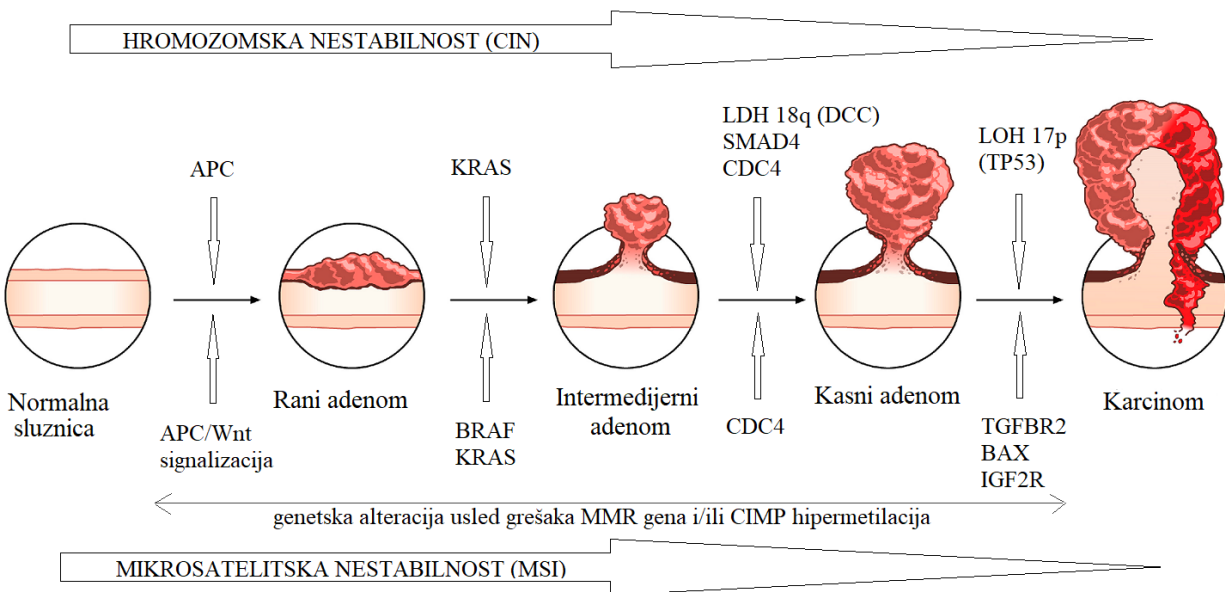
Većina sporadičnih CRC ima prisutnu hromozomsku nestabilnost (80-85%) koja se karakteriše promenom strukture i broja hromozoma (9). CIN dovodi do poremećaja kariotipa kao posledice aneuploidije, subkariotipske amplifikacije, hromozomskog preuređenja i gubitka heterozigotnosti (LOH - Loss of heterozigosity) na genskim lokusima supresorskih ćelija (10). Nastaju mutacije tumor supresorskih gena (TSG) i protoonkogeni. TSG su važni u održavanju ukupne stabilnosti genoma, regulaciji ćelijskog ciklusa, kontroli proliferacije i diferencijacije. Protoonkogeni su normalni geni koji su prisutni u svim organizmima i imaju ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, procesu proliferacije i diferencijacije. Ako u protoonkogeni dođe do izmena i razvoja mutacije,

on se može transformisati u onkogen koji ima sposobnost indukcije karcinoma. Najpoznatije su mutacije protoonkogeno KRAS i BRAF, kao i tumor supresorskih gena APC, tumorskog proteina 53 (TP53), SMAD4 i CDC4 (11). Zbog činjenice da CRC ima visoku genetsku heterogenost znatno je teže odrediti posledice pojedinačnih mutacija. CRC ima dugogodišnju evoluciju koja polazi od aberantnog kript fokusa preko adenoma do invazivnog karcinoma koji može da metastazira (Slika 1.1.1) (12).

Mikrosateliti predstavljaju ponavljajuće DNK sekvence, obično između jednog do pet parova nukleotida. Manji broj tumora ima prisutnu mikrosatelitsku nestabilnost koja nastaje zbog inaktivacije nekog od gena koji su povezani sa mehanizmom reparacije delova DNK nakon replikacije. Kao posledicu toga, pacijenti sa MSI fenotipom pokazuju visoku učestalost grešaka u replikaciji. U slučaju hereditarnog CRC kao kod Lynch sindroma, inaktivacija ovih gena je nasledna, dok je kod sporodačnih CRC ona stečena. Smatra se da kod sporadičnih CRC MSI nastaje kao rezultat metilacije promotorskog regiona MLH1 (13).

CpG metilacioni fenotip (CIMP) ili aberantna DNK metilacija je češće prisutna kod sporadičnih formi CRC (do 35 % slučajeva) (14). Radi se o hipermetilaciji DNK promotorskog regiona tumor supresorskih gena što za posledicu ima inaktivaciju transkripcije i utišavanje gena (15). To je još jedan važan mehanizam kancerogeneze.

Danas se u onkološkoj praksi sve više određuju genetske karakteristike CRC, jer se na osnovu toga može primeniti najefikasnija terapija, predvideti odgovor na primenjeno lečenje, a samim tim uticati i na ishod bolesti (16).



Slika 1.1.1. Konvencionalni put nastanka karcinoma - Modifikovano i prilagođeno prema De Palma et al. 2018. (12)

1.2. IMUNSKA OSNOVA TUMORA

Kao i kod drugih malignih bolesti i pri pojavi CRC dolazi do aktivacije i urođenog i stečenog imunog odgovora. Prva linija odbrane u borbi sa karcinomom je urođeni imuni odgovor. Čine ga epitelne ćelije, makrofagi/monociti, mastociti, dendritske ćelije, urođenoubilačke ćelije (NK) i neki od proteina plazme poput sistema komplementa. Urođeni imuni odgovor sprečava prodor mikroorganizama i može da kontroliše ili čak eliminiše infekciju. Takođe, pruža korisne informacije stečenom imunom odgovoru pripremajući ga za efikasniju reakciju. Stečeni imuni odgovor je nastao kasnije tokom evolutivnog razvoja i čine ga limfociti i njihovi produkti. Za ovaj vid imunosti neophodno je da antigenski receptori prepoznaju antigene. Stečena imunost može biti humoralna, kada B limfociti sekretuju antitela koja eliminišu ekstracelularne mikroorganizme, i celularna, koja se odnosi na T ćelije koje mogu da uklone proteinske antigene koji se nalaze intracelularno (17).

Komunikacija između imunskog odgovora domaćina i malignih ćelija nije jednosmerna i predstavlja dinamičan i složen proces u kome tumorske ćelije raspolažu mehanizmima kojima preoblikuju imunski odgovor i uspevaju da opstanu izbegavajući destrukciju i indukujući

specifičnu imunsku nereaktivnost. Tumorske ćelije izbegavaju imunski napad koristeći dve glavne strategije: izbegavanje imunološkog prepoznavanja i uništavanja, kao i podsticanje imunosupresivne tumorske mikrosredine (TME) (18).

Izbegavanje imunološkog prepoznavanja i eliminacije se dešava kada tumorska ćelija prestane da eksprimira antigene, kostimulatore ili molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC) te se antigen tumora ne može prikazati T ćelijama. Takođe, tumorske ćelije mogu da luče citokine, glavne medijatore komunikacije ćelija imunskog sistema, koji suprimiraju imunski odgovor (npr. TGF- β , IL-10), kao i da ekspimiraju ligande za inhibitorne receptore T ćelija kao što je npr. PD-1 (17).

1.3. TUMORSKA MIKROSREDINA

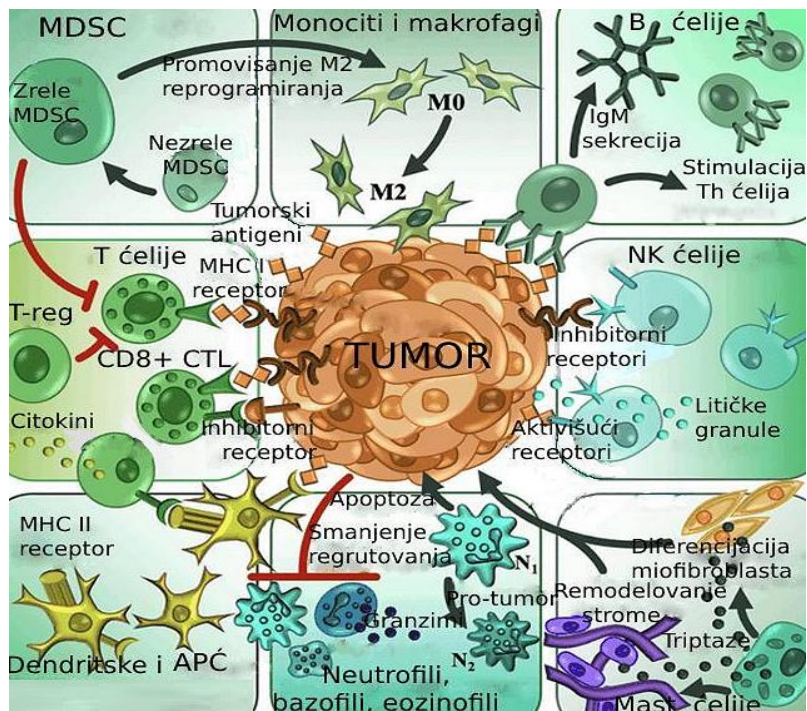
Tumorska mikrosredina (TME) je hipoksičan ambijent koji je blisko povezan i u stalnoj komunikaciji sa ćelijama karcinoma, a sastoji se od imunski aktivnih ćelija, fibroblasta povezanih sa karcinomom, signalnih molekula, ćelija koje grade krvne sudove i ekstracelularnog matriksa (ECM). Može se zaključiti da TME sadrži elemente i urođenog i stečenog imunog odgovora. Hipoksija pogoduje napredovanju tumora, jer u takvim uslovima dolazi do genske nestabilnosti. Smatra se da je parcijalni pritisak kiseonika u više od 50 % tumorskog tkiva < 5 mm Hg (ne treba zaboraviti da je parcijalni pritisak kiseonika u venskoj krvi oko 40 mm Hg)(19). Interakcija TME i ćelija karcinoma omogućava opstanak tumorskih ćelija, njihovu proliferaciju i diseminaciju. Iz toga proizlazi da bi TME predstavljalo značajnu metu u borbi protiv karcinoma. Sada ćemo se osvrnuti na neke od najvažnijih elemenata TME (slika 1.3.1.)(20).

Svakog dana se u koštanoj srži stvori skoro 10^{11} neutrofila koji su važne odbrambene ćelije našeg organizma kako u slučajevima infekcije i traume, tako i kod postojanja tumora. Njihov broj u krvi je često veći kod pacijenata sa karcinomom u odnosu na zdrave osobe. Neutrofilno/limfocitni odnos (NLR) u cirkulaciji se odavno koristi kao jedan od prognostičkih faktora preživljavanja kod karcinoma. U meta analizi Templetona i saradnika koja je objavljena 2014.g. gde su obrađeni podaci iz 100 studija kod bolesnika sa različitom vrstom i stadijumom bolesti, uočeno je da je neutrofilno/limfocitni odnos > 4 udružen sa nižom stopom preživljavanja (21). Zreli neutrofilni sadrže granule koje u sebi imaju spremne enzime (npr. metaloproteinaze, elastaze, mijeloperoksidaze) koje su važne u odbrani organizma. Nakon kratkog boravka u cirkulaciji

neutrofili migriraju u tkiva. U slučaju da je u pitanju tkivo tumora, ova seoba neutrofila je regulisana različitim hemokinima koje oslobađaju ćelije karcinoma. Zapaženo je da je povećano nakupljanje neutrofila u tumoru povezano sa lošijom prognozom bolesti. Ovi neutrofili su u literaturi nazvani neutrofili povezani sa tumorom (TAN) i imaju protumorski i antitumorski efekat. Fridlender je predložio njihovu podelu na N1 neutrofile koji imaju antitumorski i N2 neutrofile sa protumorskim efektom koji se manifestuje suprimacijom T ćelijskog odgovora (22). Treba naglasiti da ova podela može biti primenjiva kod miševa, ali da još uvek ne postoje markeri koji bi razlikovali N1 i N2 populaciju kod ljudi.

Tumor infiltrišući limfociti (TIL) su takođe stanovnici TME. Oni predstavljaju posebnu populaciju T ćelijskih limfocita koji imaju specifičan antitumorski efekat. Međutim, ćelije karcinoma različitim mehanizmima uspevaju da inaktiviraju ove limfocite kako bi pobegele od imunološkog nadzora i preživele (23).

Bazofili čine manje od 1% leukocita u cirkulaciji. Dosadašnja ispitivanja ukazuju da su u manjoj meri prisutni u TME, a više u limfnim strukturama uz TME. Imaju protumorski ali i antitumorski efekat. Bazofili oslobađaju nekoliko angiogenih faktora poput vaskularnog endotelnog faktora rasta A i B (VEGF-A i VEGF-B), angiopoetina 1 (ANGPT1) i faktor rasta hepatocita (HGF) (24). Angiopoetin je faktor rasta koji pomaže u angiogenezi i u limfangiogenezi. Bazofili proizvode IL-4 i IL-13 koji mogu pogodovati M2 polarizaciji makrofaga povezanih s tumorima (25). S druge strane, bazofili mogu ispoljavati antitumorogene efekte oslobađanjem granzima B i TNF α koji imaju citotoksične efekte na ćelije raka (26). Uočeno je da je bazopenija udružena sa lošijom prognozom kod CRC (27).



Slika 1.3.1. TME i njegovi elementi - Modifikovano i prilagođeno prema Bregenzner i sar. (20)

U TME se nalaze i B i T ćelije koje su privučene od strane tumora i regrutovane iz cirkulacije i limfnih struktura. Smatra se da TME dovodi T ćelije u anergično stanje uz supresiju CD8⁺ citotoksičnih (CTL) i CD4⁺ T helper (Th) limfocita (28). Takođe, regrutuje se i veći broj regulatornih T ćelija (Treg) što doprinosi imunosupresiji. B ćelije u TME mogu imati imunosupresivno dejstvo promovišući Treg. Treg svoju supresivnu funkciju izražavaju proizvodnjom interleukina 10 (IL-10) i transformišućeg faktora rasta beta (TGFβ). U mnogim studijama je zapaženo da veliki broj Treg u TME korelira sa lošijom prognozom (29).

NK ćelije i dendritske ćelije takođe infiltrišu tumorski stromu. I ako su prisutne u TME i NK ćelije mogu imati anergičan fenotip koji je indukovano posredstvom faktora nekroze tumora beta (TGFβ) (28). Dendritske ćelije su kao što je poznato deo urođenog imunog odgovora koje imaju važan zadatak u prezentaciji antigena. U TME one ne mogu adekvatno podstaći imuni odgovor na antigene tumora. Tome doprinosi i hipoksična sredina u kojoj se nalaze.

Fibroblasti povezani sa karcinomom (CAF) čine sastavni deo TME. Nastaju iz normalnih fibroblasta, ali se mogu diferencirati i iz fibrocita, pericita (zvezdaste ćelije vezivnog tkiva koje su značajne za izgradnju kapilara i venula), mezenhimalnih stem ćelija, glatkomišićnih ćelija

putem epitel ili endotel mezenhimalne tranzicije. Postoje studije koje ukazuju da CAF mogu nastati čak i iz adipocita (30). Smatra se da kontakt između fibroblasta i ćelije karcinoma može podstaći prelazak ovih ćelija u CAF. Diferencijaciju podstiču i TGF- β , stres, reaktivne vrste kiseonika (ROS), inflamatorni signali (IL1, IL6, TNF), faktor rasta porekla trombocita (PGDF) i faktor rasta fibroblasta (FGF), ali i fizičke promene u ekstracelularnom matriksu, kao i zračenje i hemioterapija (oštećenje DNK) (31). CAF utiču pozitivno na razvoj tumora lučeći mnoge proangiogene signale, VEGF, faktor rasta fibroblasta (FGF), faktor rasta trombocita (PDGF). Smatra se da je njihova najznačajnija uloga u TME imunosupresija, pomoću IL6, TGF β , CXC hemokin liganda 9 (CXCL9) kada dolazi do smanjenja odgovora T ćelija, prvenstveno citotoksičnih CD8⁺ ćelija (32, 33).

Fibroblasti su važni u stvaranju ekstracelularnog matriksa (ECM). Oni u ECM odlažu kolagen, proteoglikane, elastin, glikoproteine, glikozaminoglikane. Kada dođe do njihovog prelaska u CAF, remeti se struktura ECM. Matriksne metaloproteinaze koje stvaraju CAF mogu da cepaju proteinske veze u ECM i oštete ga, olakšavajući put prolaska ćelijama karcinoma u krvotok, a samim tim i metastaziranje tumora. Oštećen ECM može otpuštati citokine i faktore rasta koji doprinose napredovanju tumora (npr. osnovni faktor rasta fibroblasta (bFGF), VEGF, epidermalni faktor rasta (EGF), insulinu slične faktore rasta 1 i 2 (IGF1 i 2), faktor nekroze tumora (TNF)), ali i citokine koji doprinose smanjenju razvoja tumora (npr. endostatin, restin,...) (34).

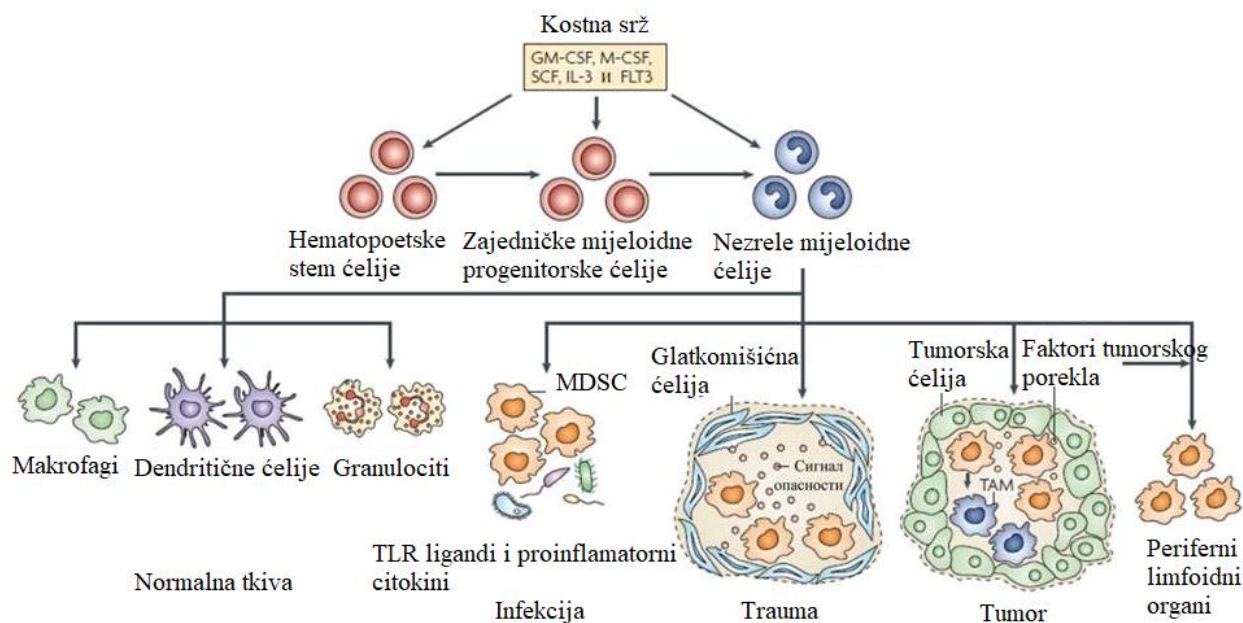
Makrofagi povezani sa tumorom (TAM) su najčešće ćelije u TME (prisutne su u oko 30%) i za razliku od običnih makrofaga nemaju citotoksičnu aktivnost (35). Po svojim karakteristikama su slični M2 makrofagima. TAM su značajni u procesu proliferacije tumora (izlučuju EGF i pregrađuju ekstracelularni matriks), angiogeneze (produkuju VEGF, PDGF) kao i metastaziranja (pomoću matriksnih metaloproteinaza - MMP, tumor indukovanog faktora rasta CSF1) (36). Oni sprečavaju citotoksične T limfocite i NK ćelije da napadaju tumor, vrše „izgladnjivanje“ T ćelija, ali i indukuju regulatorne T ćelije (Treg) i stem ćelije karcinoma (37). Smatra se da su povezani i sa lošijom prognozom bolesti, a više autora je utvrdilo da su TAM povezani i sa otpornošću na hemio i radioterapiju (38-40).

1.4. SUPRESORSKE ĆELIJE MIJELOIDNOG POREKLA U TME I CIRKULACIJI

Osim povećanja broja neutrofila kod bolesnika sa karcinomom se registruje i porast broja nezrelih mijeloidnih ćelija imunosupresivne aktivnosti nazvanih supresorke ćelije mijeloidnog porekla (eng. myeloid-derived suppressor cells - MDSC) kako u TME tako i u perifernoj krvi (41, 42). Njihov istorijat počinje 70-tih godina 20. veka kada su objavljeni radovi o imunosupresivnoj ulozi ćelija kostne srži kod miševa (43). Tokom narednih 20-tak godina dokazano je da neke vrste mijeloidnih ćelija mogu inhibisati imunski odgovor kod karcinoma. Naravno, prva ispitivanja su vršena na životinjama, te je i prvo definisanje ovih mijeloidnih ćelija učinjeno kod miševa. One su tada okarakterisane kao Gr1⁺CD11b⁺ ćelije. Potom su uočene dve podskupine ovih ćelija, polimorfonuklearna (PMN-MDSC), sa površinskim markerima CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C^{low}, i mononuklearna (M-MDSC), sa markerima CD11b⁺Ly6G^{low}Ly6C^{hi} (44). Još je veći izazov bio definisati ove heterogene ćelije kod ljudi. Ove ćelije su 2007.g. dobile svoje zvanično ime - supresorske ćelije mijeloidnog porekla (eng. myeloid-derived suppressor cells - MDSC), a 2016.g. je predložena njihova fenotipizacija (45). Fenotipsko određivanje MDSC je vršeno pomoću protočne citofluorimetrije. PMN-MDSC su morfološki slične neutrofilima i definisane su kao CD14⁻CD15⁺CD11b⁺CD33⁺HLA-DR-lin⁻ i CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺. Nedavno je otkriven lektin-tip oksidisani LDL receptor 1 (LOX 1) kao marker PMN-MDSC kod ljudi. Ovaj receptor omogućava bolje razlučivanje između neutrofila i PMN-MDSC bez upotrebe gradijenta. LOX 1 marker je povezan sa stresom endoplazmatskog retikuluma (ER) i metabolizmom lipida i mogao bi poslužiti za njihovo bolje određivanje (46). Takođe, uočeno je da su LOX 1 + ćelije jaki supresori proliferacije T ćelija za razliku od LOX 1 - , koje verovatno odgovaraju zrelim neutrofilima. M-MDSC su morfološki slične monocitima i definisane su kao CD14⁺CD15⁻CD11b⁺CD33⁺HLA-DR-/lin⁻ i CD14⁺CD15⁺CD11b⁺CD33⁺HLA-DR-/lin⁻. Osim ove dve populacije ćelija, postoji i manja grupa MDSC u ranom stadijumu (e-MDSC) koje nemaju markere ni za monocitnu ni za granulocitnu populaciju, a čiji je fenotip Lin-HLA-DR-CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁻ i sadrže nezrelije progenitorske i prekursorske ćelije. E-MDSC su prisutne u manje od 3 % ukupnih MDSC, a kod većine karcinoma PMN-MDSC čine više od 80 % MDSC (47, 48).

MDSC potiču iz kostne srži i one su prisutne u malom procentu kod zdravih osoba. U normalnim okolnostima, kod zdravih, hematopoetske stem ćelije prelaze u zajedničke mijeloidne

progenitorske ćelije, potom u nezrele mijeloidne ćelije (Immature myeloid cells, IMC). Iz kostne srži IMC odlaze u periferna tkiva gde se diferenciraju u zrele granulocite, dendriidske ćelije i monocite/makrofage (slika 1.4.1.) (49). U stanju ravnoteže, ove se ćelije neprestano stvaraju i osvežavaju novim ćelijama iz hematopoetskog sistema sa idejom da odbrane organizam od različitih patogena. Pri pojavi snažnog signala (najčešće kao posledice molekulskih obrazaca patogena (PAMP - molekuli mikroorganizama koji stimulišu urođenu imunost) ili molekulskih obrazaca oštećenja (DAMP - molekuli koji se oslobađaju iz oštećenog ili nekrotičnog tkiva a koje prepoznaje urođeni imunski odgovor) dolazi do pojačanog stvaranja ćelija („hitna mijelopoeza”) i njihove aktivacije. Stvaraju se veće količine zrelih, ali i nezrelih mijeloidnih ćelija čime se želi potpomoći odbrani organizma i vratiti ga u prethodno, uravnoteženo stanje. Pojačava se fagocitoza, oslobađanje antiinflamatornih citokina i dolazi do pojave respiratornog praska. Ovaj vid aktivacije je kratkotrajan i prestaje nakon prestanka nadražaja. U slučaju njegovog dužeg i nekontrolisanog trajanja došlo bi do opsežnog oštećenja organizma. Da bi se organizam zaštitio od ovakvih posledica, kada je prisutan slabiji, ali dugotrajniji signal (npr. hronična inflamacija ili karcinom) neophodno je uspostaviti ravnotežu između jačine imunološkog odgovora i zaštite organizma od istog. Jedno od rešenja je delimičan prekid diferencijacije IMC i stvaranje ćelija koje su fenotipski slične neutrofilima i monocitima, ali za razliku od njih imaju izraženo imunosupresivno dejstvo. U takvim uslovima dolazi do aktivacije MDSC (50).



Slika 1.4.1. Razvoj supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (Gabrilovich 2009) (46)

MDSC su prisutne u koštanoj srži, limfnim žlezdama i krvi, kao i u tumorskom tkivu (51). Porast njihovog broja je udružen sa pojavom infekcije, traume, solidnih ili hematoloških maligniteta, kao i progresijom maligne bolesti (52-55). U hroničnim bolestima, kao što su između ostalog i karcinomi, tumor pomoću različitih citokina, faktora rasta i egzozoma želi da što duže održi neuravnotežen hematopoetski odgovor. Ova stanja su glavni pokretači za pojačano stvaranje MDSC.

Povećan broj MDSC može nekada imati pozitivan efekat na ljudski organizam. Veoma mali broj studija je obuhvatio bolesnike sa autoimunim bolestima. I dok su neke studije ukazivale na pozitivne efekte i davale nadu za potencijalno lečenje, druge to nisu potvrdile. Ispitivanja su vršena kod zapaljenskih bolesti creva (Kronova bolest i ulcerozni kolitis), autoimunog hepatitisa, reumatoidnog artitrisa, sistemskog lupusa, ali na žalost mnoga pitanja su i dalje ostala nerazjašnjena (56, 57). Studije koje su urađene kod bolesnika sa transplantiranim solidnim organom (jetra ili bubreg) su ukazale da bolesnici koji su imali veći broj MDSC nakon učinjene transplantacije imaju manji procenat akutnog odbacivanja grafta i njegovo duže preživljavanje (58, 59). Smatra se da se to dešava pomoću direktnog inhibitornog efekta MDSC na efektorske T ćelije koje su odgovorne za odbacivanje organa, kao i preko T regulatornih ćelija (T-reg) (60). MDSC imaju važnu ulogu tokom trudnoće u toleranciji majke i ploda. Kod žena kod kojih je došlo do pobačaja registrovan je manji broj MDSC u cirkulaciji i u endometriju u odnosu na žene koje su imale normalan porođaj (61). Porast MDSC je povezan sa estradiolom. Uočeno je da je efekat MDSC ostvaren na direktan i indirektan način preko T efektorskih ćelija. Kao što znamo, u nastanku i progresiji maligniteta važnu ulogu ima i gojaznost. Hronična upala niskog intenziteta koja je prisutna u gojaznosti može povećati stvaranje MDSC. Ispitivanja koja su učinjena kod miševa uočila su da adipociti i adipocit infiltrišući makrofagi mogu proizvoditi faktor nekroze tumora alfa (TNF α), interleukine 1-beta i 6 (IL-1 β , IL6) kao i prostaglandin E2 (PGE2) koji su značajni u inflamaciji. Smatra se da MDSC igra važnu ulogu u insulinskoj toleranciji (62). Malo se zna o uticaju starenja na MDSC. Ispitivanje koje je obuhvatilo samo 12 pacijenata je utvrdilo da je broj PMN-MDSC u cirkulaciji veći kod osoba starosne dobi preko 80 godina u odnosu na mlađu populaciju (63). Naravno, s obzirom na mali broj ispitanika potrebna su dodatna ispitivanja.

1.5. FAZE U PRODUKCIJI I AKTIVACIJI MDSC

Danas je poznato da je diferencijacija hematopoetskih stem ćelija (HSC) u MDSC proces koji zahteva prisustvo dva signala. Prvi signal uglavnom obuhvata faktore koje proizvode tumor i stromalne ćelije kostne srži i on je značajan za mobilizaciju, ekspanziju i poremećaj diferencijacije mijeloidnih ćelija, tj. za širenje nezrelih mijeloidnih ćelija i inhibiciju njihove krajnje diferencijacije. Drugi signal je „aktivacioni signal“ koji MDSC ćelijama omogućava imunosupresivi efekat (64).

Prvi signal - faza ekspanzije MDSC

Za ekspanziju i mobilizaciju MDSC značajni su faktor stimulacije kolonija granulocita/makrofaga (GM-CSF), potom specifičniji faktori - faktor stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF) i faktor stimulacije kolonije granulocita (G-CSF), zatim IL6, IL-1 β , faktor rasta fibroblasta beta (β -FHF) i VEGF (65). Kao što možemo zaključiti, nema razlike između faktora koji su značajni za normalnu mijelopoezu i ekspanziju MDSC.

Citokini IL-1 β i IL-6 su snažni proinflamatorni faktori i pokretači ekspanzije MDSC. Smatra se da imaju ulogu i u njihovom imunosupresivnom dejstvu (66). Takođe, IL-1 β ne samo da preko STAT3 utiče direktno na povećanje broja MDSC, već indukuje proizvodnju i drugih molekula potrebnih za njihovo širenje (IL-6, VEGF, GM-CSF).

Pacijenti sa karcinomom često imaju pojačanu mijelopoezu zbog poremećaja regulacije proizvodnje faktora rasta koji utiču na hematopoezu. GM-CSF za razliku od M-CSF i G-CSF ima širi efekat. U studiji sa miševima Lutz i saradnika uočeno je da je dozno zavisna (67). GM-CSF ima svoj receptor, GM-CSF2 (CSF2R) (68). Vezivanjem liganda za ovaj receptor dolazi do aktivacije JAK/STAT puta. Za razvoj MDSC su neophodni i faktori M-CSF i G-CSF. G-CSF se vezuje za CSF3 receptor (CSF3R) koji takođe aktivira JAK/STAT signalni put dovodeći do stvaranja i mobilizacije MDSC. VEGF luče ćelije karcinoma i osim što je moćan aktivator angiogeneze i metastaziranja tumora, važan je i za ekspanziju MDSC. On privlači MDSC iz kostne srži u cirkulaciju. Receptor za VEGF je VEGF2R. Vezivanjem VEGF za njegov receptor dolazi do aktivacije JAK2/STAT3 signalnog puta (69, 70).

Prenosnik signala i aktivator transkripcije (STAT) je posrednik mnogih bitnih ćelijskih funkcija (proliferacija, diferencijacija, apoptoza) i nalazi se u citoplazmi ćelije. Identifikovano je više članova porodice STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A i B, STAT6. Može se

aktivirati pomoću JAK (Janus kinaza) i MAPK (mitogenom aktivirana protein kinaza). Proteinskog je sastava, a u stanju mirovanja je u inaktivnoj formi. Aktivator transkripcije (STAT3) se smatra glavnim faktorom transkripcije koji reguliše ekspanziju, aktivaciju ali i funkciju MDSC. Takođe, on reguliše gene koji su značajni za preživljavanje zajedničkih mijeloidnih progenitora, kao i proliferaciju ćelija (71). Njegova fosforilacija može da se odvija na tirozinu (Y705) i serinu (S727), a na jednom ostatku lizina (K685) je moguća reverzibilna acetilacija posredovana histonskom aciltransferazom. STAT3 fosforilacija na tirozinu je uglavnom regulisana od strane JAK. Fosforilacija na serinu nije vezana za transkripcionu ulogu već za povećanje ćelijske respiracije i Ras transformaciju (72). Regulacija STAT je pod kontrolom negativnih regulatora: protein inhibitora aktiviranog STAT (PIAS), supresora citokinske signalizacije (SOCS) i proteina tirozin fosfataze. PIAS na više načina može negativno regulisati aktivnost STAT, najčešće blokirajući njegovo vezivanje za DNK (73). SOCS preko tirozin kinaze sprečava da JAK aktivira STAT3 mehanizmom razgradnje JAK, a tirozin fosfataza uklanja fosfatne grupe iz aktiviranih STAT (74).

Faza ekspanzije se odvija u nekoliko etapa. Inicijalno je neophodan stimulus koji će dovesti do dimerizacije transmembranskog receptora i fosforilacije Janus kinaze (JAK), koja može aktivirati STAT. Nakon aktiviranja fosforilacijom, STAT proteini formiraju homo ili heterodimere (npr. pod dejstvom IL-6, STAT 3 može dimerizovati sa STAT1) i prelaze u jedro. U jedru se vezuju za specifične sekvence promotorskih regiona različitih gena i stimulišu njihovu transkripciju (75). STAT 3 reguliše gene koji su neophodni za preživljavanje i proliferaciju mijeloidnih ćelija, kao što su Bcl-XL, MYC, survivin i ciklin D1. On pokreće i ekspresiju S100A8/S100A9 koga mogu proizvoditi i same MDSC i koji se nalaze na površini ćelije. Za receptore S100A8/S100A9 može da se veže kalcijum i cink. Ovaj heterodimer je značajan u regulaciji zapaljenskog odgovora, očuvanju nezrelih mijeloidnih ćelija od dalje diferencijacije, a služi i kao fenotipski i funkcionalni marker za MDSC. Njegova prekomerna ekspresija inhibira proces diferencijacije što za posledicu ima porast broja MDSC uz smanjenje dendritskih ćelija i makrofaga, a nedostatak S100A9 kod miševa može uzrokovati snažan antitumorski odgovor (76). Aktivacija STAT3 modulira interferon regulatorni faktor 8 (IRF-8), transkripcioni faktor odgovoran za diferencijaciju mijeloidnih ćelija koji ima negativnu regulatornu ulogu na MDSC. Uočeno je da njegova prekomerna ekspresija smanjuje nivo ovih ćelija na mestu tumora, potom u slezini i kostnoj srži, kao i njihov imunosupresivni efekat (77).

U regulaciji nivoa MDSC učestvuju i dodatni faktori transkripcije. Jedan od njih je i CCAAT-pojačavač vezujućih proteina (C/EBP) koji je značajan za završno blokiranje njihove diferencijacije i ekspanzije. C/EBP β , jedan od članova porodice C/EBP je odgovoran za hitnu mijelopoezu koja je često prisutna kod bolesnika sa karcinomom (78). MikroRNA (miRNA) su male, nekodirajuće RNA koje se nalaze unutar ćelije i značajne su za ekspanziju, diferencijaciju i imunosupresivnu funkciju MDSC. Najverovatnije da ove funkcije regulišu više različitih miRNA (79). Njihova uloga je najviše ispitana u eksperimentalnim uslovima kod miševa, a vrlo malo kod ljudi obolelih od karcinoma. Stoga je neophodno dalje istraživanje vezano za uticaj microRNA na MDSC.

Drugi signal - faza aktivacije MDSC

Nakon prve faze u kojoj dolazi do ekspanzije i akumulacije, sledi naredna faza u razvoju MDSC prilikom koje se ove ćelije aktiviraju. Tumorske stromalne ćelije sekretuju faktore TNF- α , IL1- β , IL-13, PGE2, IFN- γ , a za aktivaciju je važan i ligand receptora sličan Tollu (TLR) (64). U ovoj fazi dominira nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) put. To je familija transkripcionih faktora proteinskog sastava koja je značajna za transkripciju brojnih gena bitnih i za urođenu i za stečenu imunost. IKK kinaza kompleks je mesto integracije svih signala za aktivaciju NF- κ B. Njegovom aktivacijom se fosforiliše I κ B protein u okviru kompleksa sa NK- κ B (80). Kao rezultat toga dolazi do razgradnje I κ B, a NF- κ B iz citoplazme odlazi u jedro gde se vezuje za DNK i započinje transkripciju gena. Osim ovog puta, značajan je i put koga pokreće PGE2. PGE2 je važan proinflamatorni medijator koga proizvode ćelije karcinoma i koji vezivanjem za receptor pokreće MAPK/ERK put. Kao posledicu toga registruje se povećanje TGF- β . TGF- β ima supresivnu ulogu na T i NK ćelije (81). Osim imunosupresivne funkcije, PGE2 je važan i za diferencijaciju MDSC iz hematopoetskih ćelija. Bolje poznavanje uloge PGE2 i MAPK/ERK puta stvara mogućnost i za značajniji terapijski efekat. Tako je uočeno na COX 2 inhibitori koji su često prisutni u lečenju reumatoloških bolesti mogu smanjiti broj MDSC (82).

Kao što nam je poznato, endoplazmatski retikulum (ER) sintetizuje različite materije (npr. proteine, lipide) i organizuje njihov transport kroz ćeliju preko transportnih vezikula. U TME postoji hipoksija, nizak pH i izražen oksidativni stres. Kao posledica toga dolazi i do stresa ER prilikom čega se remeti njegova adekvatna funkcija. I ako bi ovi mehanizmi trebali da dovedu do oštećenja ćelije i apoptoze, kod MDSC doprinose njenoj akumulaciji (83). Danas se intenzivno istražuje uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u patogenezi mnogih bolesti (npr. dijabetes).

1.6. MEHANIZMI SUPRESIJE MDSC

Supresija MDSC se ostvaruje pomoću više različitih mehanizama koji uključuju metabolizam, arginina, cisteina, prisustvo oksidativnog stresa, regrutovanje i indukciju drugih supresivnih ili regulatornih ćelija kao i posredno preko uticaja na makrofage. Ovi mehanizmi su prisutni i u tumorskom okruženju i na periferiji, ali se smatra da tumorske MDSC imaju veći supresivni efekat u TME gde je uočena i veća količina imunosupresivnih citokina, arginaze 1 i azot monoksida (NO) (tabela 1.6.1.) (84).

MDSC i supresija povezana sa metabolizmom L-arginina – MDSC imaju mogućnost da smanje količinu određenih aminokiselina u TME koje su potrebne za normalan razvoj i funkcionisanje ćelija. Jedna od njih je i arginin. Dejstvom arginaze L-arginin se razlaže na L-ornitin i ureu, a dejstvom enzima NO sintetaze na L-citrulin i NO. Glavni izvori arginaze su PMC-MDSC, a glavni izvori NO sintetaze M-MDSC. Razlaganjem L-arginina nastaje njegov deficit koji dovodi do poremećaja funkcije T ćelija. Disfunkcija T ćelija se manifestuje smanjenjem ispoljavanja CD ζ lanca T ćelijskog receptora (TCR) koji sadrži aktivaciona mesta za vezivanje signalnih medijatora, sprečavanjem produkcije regulatora ćelijskog ciklusa što rezultira zastojem u G0-G1 fazi ćelijskog ciklusa T limfocita (68). Ne treba zaboraviti da metabolizmom arginina pomoću arginaze nastaju i reaktivne vrste azota i reaktivne vrste kiseonika. Svi ovi faktori doprinose ometanju antitumorskog efekta T ćelije (85).

MDSC i supresija povezana sa metabolizmom cisteina - Cistein je aminokiselina veoma važna za T limfocite koji inače nisu u stanju da ga sami obezbede. Postoje dva mehanizma pomoću kojih ćelije sebi obezbeđuju ovu esencijalnu aminokiselinu. Prvi koji se odvija preko enzima cistationaze, kada se iz metionina u samoj ćeliji sintetiše cistein i drugi preko cistin transportera Xc koji omogućava preuzimanje cistina. Činjenica je da T ćelije nemaju ni cistin transporter Xc a ni cistationazu i da su u zavisnosti od antigen prezentujućih ćelija (APC). APC unosi cistin koji se potom konvertuje u cistein, a preko membranskog ASC transportera ga isporučuje T limfocitima. Međutim, cistein je takođe potreban i MDSC. One kao i APC preuzimaju cistin iz ekstracelularnog prostora, ali za razliku od njih nemaju ASC transporter za cistein pa ne mogu nakon njegove konverzije da ga izluče u ekstracelularni prostor već ga zadržavaju. Na taj način T limfociti ostaju uskraćeni za značajnu količinu cisteina i u njegovom nedostatku one „gladuju”.

Dolazi do inhibicije T ćelijske funkcije i aktivacije (86). Osim kod T ćelija registrovano je „gladovanje“ i kod NK ćelija.

Tokom oksidativnog stresa dolazi do oslobađanja reaktivnih vrsta kiseonika i azota što takođe doprinosi inhibiciji T ćelija. Ta inhibicija se ostvaruje gubitkom ekspresije i inhibicije ζ lanca TCR i kočenjem aktivacije T ćelija, kao i povećanjem ekspresije arginaze 1. PMN-MDSC uglavnom proizvode ROS. Uočena je i značajna razlika u načinu delovanja PMN-MDSC i M-MDSC. PMN-MDSC deluje inhibirajući T ćelijsku proliferaciju peroksinitrita zavisnog od endotelne azot oksid sintetaze (eNOS), a M-MDSC deluje pomoću inducibilne azot oksid sintetaze (iNOS) oslobađanjem NO (87). Proizvodnja iNOS-a je kontrolisana različitim citokinima (IFN- γ , IL-1 β) kao i hipoksijom koja normalno postoji u TME.

SUBTIP MDSC	MARKERI KOD LJUDI	MEDIJATORI IMUNOSUPRESIJE	MEHANIZAM IMUNOSUPRESIJE
PMN-MDSC	CD11b+CD14-CD15+HLADR- ili CD11b+CD14-CD66b+ ili LOX-1+	ARG1, ROS	Supresija imunskih odgovora uglavnom na antigen specifičan način; proizvodnja ROS
M-MDSC	CD11b+CD14+CD15-HLADR _{low} /-	NO, ARG1 i citokini kao što su TGF- β i IL-10	Supresija T ćelijskog odgovora, kako na antigen specifičan, tako i na nespecifičan način; proizvodnja NO i citokina

Tabela 1.6.1. PMN-MDSC i MDSC - fenotipske karakteristike i njihova imunosupresivna funkcija. Modifikovano po Farshidpour M (84).

Regrutovanje i indukciju drugih supresivnih ili regulatornih ćelija – Regulatorne T ćelije (Treg) predstavljaju sastavni deo imunološkog odgovora organizma. Nastaju u timusu i u perifernim tkivima. Čuvaju organizam od sopstvenih antigena i regulišu aktivaciju drugih T ćelija. Kod bolesnika sa karcinomom Treg kao i MDSC doprinose imunosupresiji, a samim tim i progresiji tumora. Uočeno je da je produkcija Treg zavisna od IL-10 i TGF- β koga proizvode MDSC. Takođe, MDSC regulišu i ligande za pojedine kostimulatorne molekule (CD86 i PD-L1) koji obezbeđuju signale za razvoj Treg. MDSC imaju još jednu važnu ulogu koja doprinosi povećanju broja MDSC, a to je transdiferencijacija Th17 T ćelije u Treg (88). Smatra se da je komunikacija između MDSC i Treg dvosmerna, tako da i Treg mogu uticati na ekspanziju i njihovu supresivnu funkciju pomoću TGF- β (89).

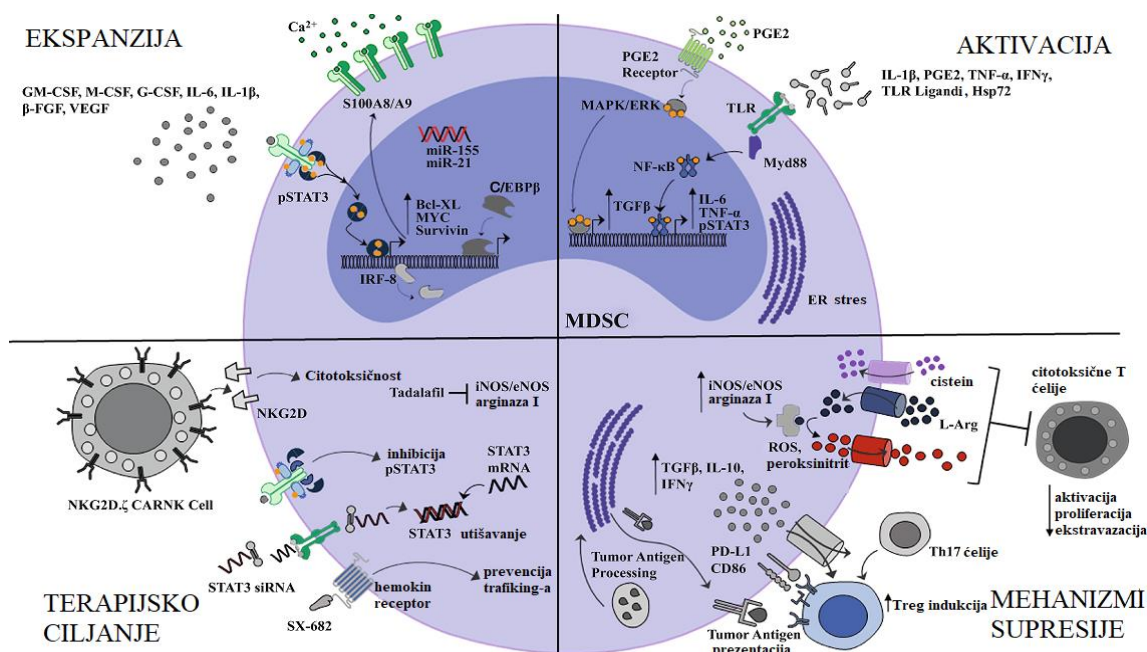
Efekat na makrofage – Makrofagi kao što znamo čine urođeni imuni odgovor, a u zavisnosti od svog fenotipa imaju i različit odnos prema tumorima. Oni mogu biti aktivirani klasičnim putem kada govorimo o M1 makrofagima koji imaju antitumorsko dejstvo i alternativnim putem u slučaju M2 makrofaga koji stimulišu progresiju tumora. M1 makrofagi po citokinskom profilu liče na Th1 limfocite. Aktiviraju se pod dejstvom IFN γ i lipopolisaharida Gram negativnih bakterija (LPS) što za posledicu ima produkciju velike količine IL12 i male količine IL10. Za razliku od njih, M2 makrofagi koji su po citokinskom profilu slični Th2 limfocitima se aktiviraju pomoću IL4 i IL13, a stvaraju malo IL12 i dosta IL10 (90).

Između makrofaga, MDSC i tumora postoji unakrsna komunikacija. Ona najčešće zahteva direktan kontakt između ćelija. Smatra se da MDSC oslobađanjem IL-10 prikupljaju M2 makrofage. U isto vreme MDSC u maloj količini oslobađaju IL-12 (91). U prisustvu MDSC M1 makrofagi se mogu konvergovati u M2 makrofage. Ta repolarizacija makrofaga je posledica njihove međusobne uzajamne komunikacije koja za posledicu ima povećanu produkciju IL-10 i smanjenu produkciju IL-12 (92). Kao što smo mogli videti, MDSC mogu direktno uticati na makrofage i T limfocite, ali njihov efekat može biti i indirektan. Makrofagi i MDSC proizvode IL10 i IL-12 koji su značajni za funkcionisanje NK i dendritskih ćelija. IL12 koga u većoj količini proizvode M1 makrofagi (manje prisutni u TME), a znatno manje MDSC i M2 makrofagi, povećava antitumorsko dejstvo NK ćelija. Velika količina IL10 čiji su glavni izvori MDSC i makrofagi ometa sazrevanje dendritskih ćelija.

Na slici 1.6.1. se mogu uočiti faze kroz koje prolaze MDSC, opisani mehanizmi supresije i mogućnost terapijskog dejstva na MDSC (87).

Važna osobina MDSC je sposobnost promene fenotipa, razvojnog puta i funkcionalnih karakteristika, odnosno njihova plastičnost koja omogućava lakše prilagođavanje izmenjenim uslovima okruženja. Time se objašnjava razlika u MDSC na mestu tumora i na periferiji. Uočeno je da M-MDSC koji infiltrišu tumor imaju izraženiju aktivnost arginaze-1, azot oksid sintetaze, odnosno faktora koji inhibišu T ćelije u odnosu na M-MDSC koje nisu u TME, što upućuje na činjenicu da mikrookruženje može da usmeri funkcionisanje MDSC (93). U takvoj sredini dolazi do aktivacije hipoksičnog faktora 1 alfa (HIF-1 α) koji iz citoplazme odlazi u jedro u kome dolazi do dimerizacije sa HIF1 β čineći HIF kompleks koji reguliše više gena (VEGF, NOS2, MMP). Kod karcinoma HIF1 α je prekomerno izražen i povećava ekspresiju Arg-1, iNOS, čineći MDSC supresivnim i olakšavajući im konverziju u TAM (94). U nekim studijama je uočena čak i

diferencijacija M-MDSC u osteoklaste (95). MDSC takođe ima mogućnost da u prisustvu karcinoma stekne nove receptore na ćelijskoj površini, a shodno s tim i nove funkcije. U ispitivanju koje je urađeno kod pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća uočeno je sticanje NAD-aza ektoenzima CD38 u MDSC ćelijama. Visok nivo ovog receptora daje veću mogućnost za suzbijanje aktiviranih T ćelija i ubrzava rast karcinoma u poređenju sa MDSC koje imaju nizak nivo ovog receptora (96).



Slika 1. 6.1. Faza ekspanzije i aktivacije MDSC, mehanizmi kojima postižu supresivni efekat i potencijalne terapijske mogućnosti koje bi dovele do smanjenja učestalosti i efekta MDSC - Modifikovana slika prema Dysthe M (87).

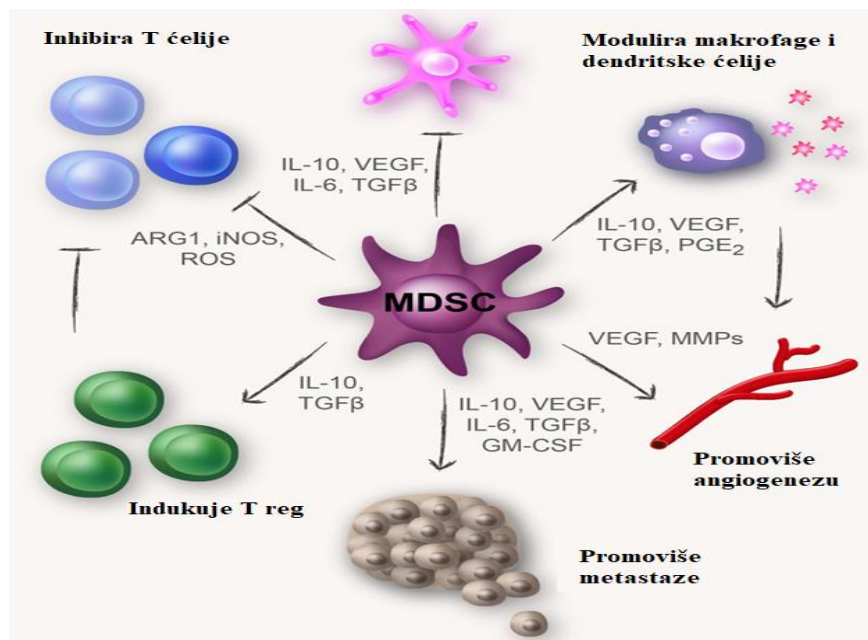
1.7. NEIMUNSKA FUNKCIJA MDSC

Najznačajnije neimunske funkcije MDSC su angiogeneza i metastaziranje tumora (slika 1.7.1.) (97). Angiogeneza predstavlja prirodni odgovor organizma na ishemiju koji se karakteriše rastom novih krvnih sudova iz već postojećih. Da bi se tumoru obezbedio adekvatan dotok kiseonika i hranjivih materija, kao i uklonili nepotrebni produkti dolazi do stvaranja patološke angiogeneze.

Sa današnjeg stanovišta, angiogeneza predstavlja moćan mehanizam lečenja karcinoma i drugih urođenih i stečenih vaskularnih bolesti.

MDSC pomažu u angiogenezi pomoću više različitih mehanizama. Jedan od važnijih je aktivacija faktora rasta (VEGF, bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF), bombina variegata peptid 8 (Bv8) i faktor rasta porekla trombocita (PDGF)). VEGF ima imunosupresivnu ulogu (može inhibirati funkciju T-ćelija, povećati regrutovanje Treg i ometati diferencijaciju i aktivaciju dendritskih ćelija), ali i važnu funkciju u angiogenezi. To je inače familija proteina koju čine VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i faktor rasta placente (PGF) (98). Oni se vezuju sa različitim afinitetom za receptore na tri endotelne receptorske tirozin kinaze (RTK), kao što su VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3. Ovi receptori mogu da pokrenu veći broj signala koji potom indukuju JAK2/STAT3 signalni put što dovodi do još veće produkcije angiogenih molekula (99). VEGF-A je glavni faktor rasta u angiogenezi i obično se označava samo kao VEGF. Najčešće se vezuje za VEGFR1 i VEGFR2. U endotelnim ćelijama krvnih sudova, glavni signalni receptor je VEGFR2. VEGFR1 je vezan za monocitnu i makrofagnu migraciju. Ispitivanja koja su rađena kod miševa sa karcinomom jajnika su uočila da MDSC imaju i VEGFR1 i VEGFR2 receptore (100). VEGF se vezuje za VEGFR na MDSC ali i na endotelnim ćelijama stimulišući proliferaciju i preživljavanje endotelnih ćelija, ali i propustljivost krvnih sudova i regrutovanje vaskularnih prekursorskih ćelija iz koštane srži. Po aktivaciji VEGFR MDSC stvaraju matriksne metaloproteinaze (MMP2, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14), enzime koji učestvuju u preuređenju ekstracelularnog prostora čiji je cilj da se olakša put širenja karcinoma ka cirkulaciji, a potom ka drugim strukturama organizma. Smatra se da je ovaj proces više karakterističan za PMN-MDSC (101). Ostali navedeni faktori rasta koji su povezani sa MDSC se smatraju alternativnim varijantama angiogeneze.

MDSC podstiču angiogenezu i produkcijom egzozoma koji su ispunjeni efektorskim proteinima. Uočeno je da je polarizacija M1 makrofaga u M2 makrofage potpomognuta egzozomima (102). Takođe, MDSC su sposobne da reprogramiraju druge ćelije u tumor promovišući fenotip (npr. Tie2⁺TAM, TAN i Treg).

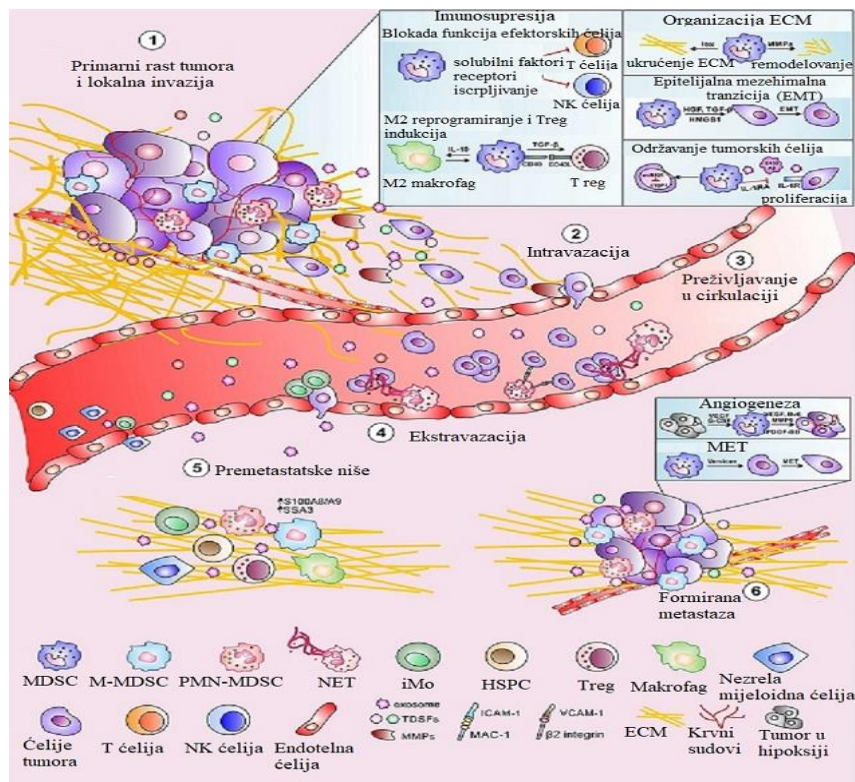


Slika 1.7.1. Uloga MDSC - modifikovana slika prema Millrud CR (97)

MDSC osim što potpomažu rast tumora, olakšavaju i njegovo metastaziranje. Ovaj proces se odvija u više etapa. Poznato je da sa porastom tumora, maligne ćelije mogu izvršiti invaziju okolnih organa, limfnih žlezda i krvnih sudova. MDSC potpomažu ulazak malignih ćelija u cirkulaciju moduliranjem vaskularnih struktura tako što oslobađaju proteolitičke enzime (npr. MMP2, MMP9), što za posledicu ima pojačanu propustljivost njihovog zida (103, 104). Ulaskom u cirkulaciju, ove ćelije pokušavaju da opstanu u za njih nepovoljnom okruženju. Neke od njih zbog svoje veličine ostaju zarobljene u kapilarima, neke nemaju mogućnost adhezije za endotel, a neke su zaustavljene od strane makrofaga i NK ćelija. Da bi se uspešno odbranile, za ove ćelije je najvažnije da izbegnu imunski nadzor. Pojedine cirkulišuće tumorske ćelije (CTC) uspevaju da opstanu. MDSC svojom imunosupresivnom funkcijom mogu potpomoći CTC, kao i pojedini neutrofili i inflamatorni monociti u tumorskom mikrookruženju koji po svojim karakteristikama liče na MDSC (105). Još jedan uspešan način imunološkog izbegavanja je takozvano generisanje klastera. CTC klasteri su prisutni u malom procentu u cirkulaciji, a njihova prednost se zasniva u činjenici da grupisane ćelije lakše nego pojedinačne mogu dovesti do stvaranja metastaza (106). Najčešće je reč o klasterima koji u sebi imaju više cirkulišućih ćelija karcinoma ili kombinaciju drugih ćelija i CTC (npr. neutrofila ili PMN-MDSC), kada lakše preživljavaju. Većina studija sa klasterima je rađen na miševima, u manjoj meri kod ljudi (Ca dojke, melanom), a ono što je

nedvosmisleno potvrđeno je da su oni doveli do bržeg stvaranja metastaza i lošije prognoze (107). CTC pomoću metaloproteinaza ali i proinflamatornih faktora (IL-1b) mogu povećati propustljivost krvnih sudova i na taj način omogućiti ulazak malignih ćelija u tkivo. Tome potpomažu i tkzv. neutrofilne zamke (NETs) koje mogu da produkuju PMN-MDSC. Njihova uloga je da fiksiraju CTC za endotel krvnih sudova, a bolji kontakt omogućava lakšu ekstravazaciju ćelija u tkiva (108).

Da bi se potom obezbedilo „sejanje“ metastaza u različite organe, potrebna je adekvatna priprema „terena“, odnosno stvaranje premetastatske niše (pMN) (109). To podrazumeva reorganizaciju prethodno zdravog tkiva kojoj doprinose nezrele mijeloidne ćelije koje ekspimiraju VEGFR i sposobne su da infiltrišu potencijalna metastatska tkiva pre CTC (110). Kao što je ranije navedeno, tumor produkuje veliki broj citokina npr. CC motiv ligand 2 (CCL2), koji mogu aktivirati infiltraciju MDSC u prethodno zdravom tkivu i podržati stvaranje pMN (111). Takođe, diferencijacija mijeloidnih progenitorskih ćelija u PMN-MDSC je dokazana u perifernim tkivima. Da bi CTC opstale u pMN neophodno je na vreme obezbediti hranu i kiseonik, a to se ostvaruje neovaskularizacijom kao reakcijom na hipoksičnu sredinu čemu ponovo doprinose MDSC (112). U cilju napredovanja karcinoma, oslobađanjem različitih faktora MDSC mogu privremeno uticati na to da tumorske ćelije izgube svoje epitelne karakteristike i dobiju mezenhimalni fenotip (epitelna u mezenhimalnu tranziciju), ali nakon odlaska u pMN ćelije karcinoma ponovo vraćaju svoj prethodni fenotip (mezenhimalna u epitelnu tranziciju) (113). Put od primarnog tumora do razvoja metastaza je prikazan na slici 1.7.2. (114).



Slika 1.7.2. Prikaz razvoja metastaza. Modifikovana slika prema Trovato R. (114).

1.8. KLINIČKI ZNAČAJ MDSC

Danas važnu ulogu u borbi sa karcinomom čini imunoterapija. MDSC imaju bitnu ulogu u izbegavanju i inhibiciji antitumorskog odgovora zbog čega je sve veći broj ispitivanja usmeren na potencijal ovih ćelija u proceni težine bolesti, lečenja i prognoze. MDSC obavlja svoje funkcije na različite načine pa je izazov osmisliti adekvatan terapijski pristup koji bi smanjio broj ovih ćelija u TME i cirkulaciji ili zaustavio njihovo širenje uz zadovoljavajući terapijski efekat. Angažman je usmeren ka četiri osnovna načina dejstva na MDSC, a to su: 1) inhibiranje njihove ekspanzije i širenja, 2) diferencijacija MDSC u zrele, manje supresivne mijeloidne ćelije, 3) inhibiranje njihove imunosupresivne funkcije i 4) iscrpljivanje MDSC u tumorskom mikrokruženju.

Inhibicija ekspanzije i širenja MDSC - U fazi mobilizacije i ekspanzije MDSC aktiviranje STAT3 se pokazalo presudnim. Ispitivanja koja su vršena sa sunitinibom (inhibitor receptora tirozin kinaze) kod karcinoma bubrega (RCC) ukazalo je na smanjenje broja MDSC i Treg na mestu tumora najpre na modelu sa miševima (115). Ispitivanje je potom učinjeno i kod ljudi kada je

ustanovljeno da kod pacijenata sa RCC primena ovog leka dovodi do povećanja broja TIL koji su u suprotnoj korelaciji sa brojem MDSC u tumoru (116). Kod pacijenata sa metastatskim karcinomom kolona učinjena je studija sa bevacizumab-om (Avastin), monoklonskim antitelom koje se selektivno vezuje za protein vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGFA). Lek je dat uz 5- fluorouracil (5-FU) i oksaliptin (FOLFOX protokol). Uočen je smanjen broj PMN-MDSC kod 15 od 25 pacijenata i njihovo bolje preživljavanje (117). Ispitivanja su rađena i sa inhibitorima PGE2, kao i COX2 gde je uočeno smanjenje broja MDSC (118).

Drugi pristup u lečenju je pokušaj da se MDSC prevedu u zrele ćelije koje nemaju imunosupresivni efekat. Najčešća ispitivanja su vršena sa all-trans retinoičnom kiselinom (ATRA) i vitaminom D. ATRA reguliše diferencijaciju ćelija i nastaje iz vitamina A. U praksi se često koristi kod lečenja akutne promijelocitne leukemije. Tumori solidnih organa najčešće sadrže veliku količinu MDSC. Studija koju su uradili Bauer i saradnici u Hamburgu i koja je obuhvatila bolesnice sa karcinomom dojke kod kojih je ATRA data u kombinaciji sa antiangiogenom terapijom je ukazala da je primena all-trans retinoične kiseline sprečila nakupljanje MDSC i smanjila proizvodnju matriksne metaloproteinaze 9, što nam posredno govori o mogućem smanjenju broja MDSC. Smatra se da je ATRA poboljšala terapijski efekat anti-VEGFR antitela (119). Vitamin D3 je takođe sposoban da potencira diferencijaciju nezrelih mijelocita. Ispitivanje koje je učinjeno kod bolesnika sa skvamocelularnim karcinomom glave i vrata je pokazalo da je upotreba vitamina D3 dovela do povećanja CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija u tumoru, kao i ćelijsku ekspresiju limfoidnog aktivacionog markera CD69 i duže preživljavanje bez relapsa (120).

Inhibicija supresivne funkcije MDSC - Najviše ispitivanja je učinjeno primenom inhibitora fosfodiesteraze kao što su sildanefil i tadalafil. Primena sildanefila je uticala na regulaciju arginaze-1 i ekspresiju NOS što je dovelo do povećanja T ćelija u tumoru i posledičnom sporijem rastu tumora. Ispitivanja koja su vršena kod miševa kod kojih je DSS-om (DSS - rastvor dekstrana, sulfata i natrijuma) izazvan kolitis uočila su da je primenom sildanefila došlo do smanjenja tumorogeneze kod miševa direktno smanjujući broj MDSC u kolonu (121). Studije koje su rađene sa tadalafilom kod skvamocelularnog karcinoma glave i vrata su takođe uočile smanjenje arginaze-1 i iNOS uz smanjenje MDSC u cirkulaciji i periferiji (122).

Iscrpljivanje MDSC iz mikrosredine tumora – Ispitivanja koja su rađena su bila okrenuta ka selektivnom targetiranju intratumorskih MDSC. Najznačajnija je američka studija Tavazoie i

saradnika koji su ispitivali uticaj agonista nuklearnih receptora jetre (LXR) uz apolipoprotein E (ApoE) na MDSC. Zapaženo je da je tretman ovim agonistom LXR/ApoE doveo do iscrpljivanja MDSC u in vitro i in vivo uslovima. Agonista RGX-104 LXR smanjio je količinu PMN-MDSC i M-MDSC u samom tumoru kao i u cirkulaciji pokretanjem apoptoze. Kod miševa kod kojih je nedostajao Apo E nije uočen ovaj efekat, što je ukazalo na činjenicu da je za dejstvo agoniste LXR neophodan sinergizam sa ApoE kod karcinoma (123).

Poslednjih godina sve je više ispitivanja vezanih za MDSC, prvenstveno zbog boljeg razumevanja njihove prirode i napora koje treba uložiti u korišćenje MDSC kao potencijalnih pokazatelja preživljavanja i meta lečenja karcinoma. Pokušavaju se bolje shvatiti mehanizmi koji se kriju iza njihove ekspanzije, aktivacije i supresije. Takođe, potencira se njihov supresivni efekat vezan za transplantaciju solidnih organa i autoimune bolesti.

2. HIPOTEZA i CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

Vrednost MDSC u uzorcima periferne krvi bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (CRC) je povišena u odnosu na zdrave osobe.

Vrednosti MDSC koreliraju sa stadijumom bolesti, lokalizacijom i veličinom tumora kao i metastatskim širenjem bolesti.

Vrednosti MDSC u cirkulaciji se mogu koristiti kao prognostički biomarker preživljavanja kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti procentualnu zastupljenost i apsolutni broj MDSC u perifernoj krvi kod obolelih od kolorektalnog karcinomoma i zdravih osoba
2. Utvrditi korelaciju procentualne zastupljenosti i apsolutnih vrednosti MDSC u perifernoj krvi osoba sa kolorektalnim karcinomom sa kliničkim stadijumom, veličinom, lokalizacijom i diferencijacijom tumora
3. Odrediti procentualnu zastupljenost i apsolutni broj MDSC u perifernoj krvi kod obolelih pre i posle operacije CRC
4. Utvrditi korelaciju procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja MDSC sa faktorima upale i tumorskim markerima
5. Utvrditi korelaciju između dužine preživljavanja i procentualne i apsolutne vrednosti MDSC, kao i NLR, LMR, Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC odnosa

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Pacijenti i zdrave osobe (kontrolna grupa)

Ispitivanje je obuhvatilo 95 ispitanika i sprovedeno je kao prospektivna studija tokom 5 godina. U istraživanje su uključeni bolesnici sa patohistološki dokazanim kolorektalnim karcinomom kao i zdravi ispitanici koji su činili kontrolnu grupu. Sve osobe koje su bile podvrgnute ispitivanjima su bile punoletne i potpisale su pristanak za učešće u studiji. Studija je prethodno dobila pristanak od strane etičkog komiteta VMA. Studija je sprovedena u skladu sa principima Dobre kliničke prakse u kliničkom ispitivanju (službeni glasnik RS broj 28/2008). Iz istraživanja su isključeni bolesnici sa zapaljenskim bolestima, autoimunim oboljenjima, cirozom, transplantirani bolesnici, trudnice, osobe sa drugim malignim bolestima ili one koje su bile prethodno podvrgnute hemio ili radioterapiji, kao i osobe koje upotrebljavaju lekove koji utiču na hematopoezu.

3.2 Kliničko ispitivanje

Sva ispitivanja su učinjena u Vojnomedicinskoj akademiji. Svi ispitanici su bili lečeni u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju i Klinici za opštu hirurgiju. Svim pacijentima je uzeta detaljna anamneza, urađen je fizikalni pregled kao i neophodne laboratorijske i dijagnostičke procedure (kolonoskopija, MSCT i/ili MR pregled).

Standardne laboratorijske analize su određivane u Institutu za medicinsku biohemiju, a određivanje MDSC u Institutu za medicinska istraživanja. Kolonoskopija sa biopsijom je učinjena u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju. MSCT grudnog koša, abdomena i male karlice je urađen u Institutu za radiologiju, a patohistološka dijagnostika je učinjena u Institutu za patologiju.

Uzorci kontrolnih ispitanika su uzeti od zdravih osoba u okviru sistematskog pregleda ili tokom ispitivanja u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju. Na osnovu učinjenih pretraga i prethodne medicinske dokumentacije oni nisu imali malignu bolest. U trenutku uzimanja uzorka nisu imali infekcije niti znake neke druge bolesti. Osobe ženskog pola nisu bile u drugom stanju. Ispitanici su praćeni tokom 3 godine od prvog uzimanja uzoraka.

3.3 Uzorci i analize

Svakom ispitaniku je uzet uzorak venske krvi u zapremini od 3 ml u epruveti sa Na-EDTA antikoagulansom tokom hospitalizacije u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju kada je patohistološki potvrđeno postojanje kolorektalnog karcinoma, kao i prilikom kontrolnog pregleda nakon učinjene hirurške intervencije. Uzorci za kontrolnu, zdravu grupu su uzimani nakon učinjenih pretraga u Klinici, ali i ambulantno u sklopu sistematskog pregleda. Uzorci periferne krvi su uzeti kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (83 ispitanika) i kod zdravih ispitanika koji pripadaju kontrolnoj grupi (12 ispitanika). Analizirani su sveži uzorci periferne krvi do sat vremena od uzimanja uzorka.

Nakon 30 minuta inkubacije, učinjeno je liziranja eritrocita pomoću lizing pufera (EDTA, NH₄Cl, KHCO₃) tokom 20 minuta uz konstantno mešanje i dvostruko pranja nukleisanih ćelija u kultivacionom medijumu (RPMI640) sa 5% normalnog humanog seruma. Potom je učinjeno centrifugiranje i resuspendovanje. Separacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) za komparativnu analizu je učinjena korišćenjem limfocitnog separacionog medijuma LSM 1077. Separacija je izvedena centrifugiranjem tokom 20 minuta. Interfazni sloj je ekstrahovan Pasterovom pipetom i opran dva puta u kultivacionom medijumu. Određivan je broj ćelija manuelno u Nojbauerovoj komori i automatski na Beckman Coulter ACT differ brojaču krvnih ćelija. Ćelije su potom resuspendovane u konačnoj koncentraciji 1×10^6 u 100 μ L suspenzije za dalje bojenje. Nakon inicijalnog poređenja prinosa ćelija sa navedenim fenotipom, između liziranih uzoraka i onih koji su dobijeni gradijentom centrifugiranja, analiza je nastavljena samo sa liziranim uzorcima da bi izbegli gubitak ćelija i utvrdili učestalost i apsolutni broj PMN-MDSC i M-MDSC kod svih učesnika studije. Iz uzoraka periferne krvi određivana je kompletna i diferencijalna krvna slika ispitanika na krvnom brojaču (Beckman Coulter differ). Odnos između neutrofila i limfocita kao i limfocita i monocita izračunat je deljenjem između neutrofila i limfocita u prvom slučaju i limfocita i monocita u drugom slučaju. Odnos između neutrofila i PMN-MDSC je takođe dobijen njihovim deljenjem, kao i monocita i M-MDSC.

Ispitivane grupe:

Ispitanici koji su učestvovali u istraživanju su klasifikovani u nekoliko grupa prema sledećim kriterijumima:

-prema polu

- 1) grupa pacijenata ženskog pola
- 2) grupa pacijenata muškog pola

-prema godinama života

- 1) grupa pacijenata < 65 g.
- 2) grupa pacijenata \geq 65 g.

-prema BMI

-prema prisustvu i odsustvu CRC

- 1) grupa pacijenata sa CRC
- 2) grupa zdravih (kontronih) osoba

-prema lokalizaciji primarnog tumora

- 1) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom cekuma
- 2) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom ascendentnog kolona
- 3) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom transverzuma
- 4) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom descendensa
- 5) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom sigme
- 6) grupa pacijenata sa primarnim karcinomom rektuma

-prema TNM /AJCC klasifikaciji (prikaz dat u tabeli 1)

- prema modifikovanoj Astler Coller klasifikaciji

Stadijum A: tumor ograničen na mukožu

Stadijum B1: tumor se ne širi do muskularis proprije, ne zahvata lgl

Stadijum B2: tumor zahvata čitav zid creva, ali ne zahvata susedne organe

Stadijum B3: tumor zahvata čitav zid creva i susedne organe

Stadijum C1: tumor odgovara B1 na osnovu invazije zida creva ali uz metastaze u regionalnim limfnim žlezdama

Stadijum C2: tumor odgovara B2 na osnovu invazije zida creva ali uz metastaze u regionalnim limfnim žlezdama

Stadijum C3: tumor odgovara B3 na osnovu invazije zida creva ali uz metastaze u regionalnim limfnim žlezdama

Stadijum D: prisutne udaljene metastaze

- prema Dukes klasifikaciji

1) Dukes A: invazija u zid creva, ali ne kompletnog zida creva

2) Dukes B: invazija zida creva koja zahvata mišićni sloj ali ne i limfne žlezde

3) Dukes C: invazija uključuje i limfne žlezde

4) Dukes D: prisutne su i udaljene metastaze

- prema diferentovanosti tumora (G1, G2, G3)

-prema invaziji (limfoidna, venska, perineuralna)

- prema veličini tumora

1) tumor < 5 cm

2) tumor > 5 cm

-prema metastatskoj proširenosti bolesti (metastaza u 1 organu, 2 organa, 3 i više organa)

- prema vrednostima tumorskih markera CEA i Ca-19.9 u perifernoj krvi

- prema vrednosti faktora upale (SE, CRP, fibrinogen)

- prema sprovedenoj terapijskoj proceduri (pre i posle operacija)

-prema nivou MDSC kod zdravih i osoba posle operacije

- prema dužini preživljavanja

- prema vrednosti neutrofilno-limfocitnog (NLR) i limfo-monocitnog odnosa (LMR)

-prema Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC odnosu

AJCC stadijum	TNM stadijum	Objašnjenje
Stadijum 0	Tis N0 M0	Tis: tumor ograničen na mukozu – Ca in situ
Stadijum I	T1 N0 M0	T1: Tumor zahvata submukozu
	T2N0M0	T2: Tumor zahvata muskularis propriju
Stadijum IIA	T3N0M0	T3: Tumor zahvata subserozu ili dublje strukture (bez zahvatanja drugih organa)
Stadijum IIB	T4aN0M0	T4a: Tumor perforira visceralni peritoneum
Stadijum IIC	T4bN0M0	T4b: Tumor zahvata susedne organe
Stadijum IIIA	T1-2 N1 M0 ili T1N2aM0	N1: Metastaze u 1 to 3 regionalne lgl; T1 ili T2 N2a: Metastaze u 4-6 regionalnih lgl; T1
Stadijum IIIB	T3-4a N1 M0 ili T2-3N2aM0 ili T1-2N2bM0	N1: Metastaze u 1 do 3 regionalne lgl; T3 ili T4 N2a: Metastaze u 4-6 regionalnih lgl; T2 ili T3 N2b: Metastaze u 7 ili više regionalnih lgl; T1 ili 2
Stadijum IIIC	T4aN2aMo ili T3-4aN2bM0 ili T4bN1-2M0	N2a: Metastaze u 4-6 regionalnih lgl; T4a N2b: Metastaze u 7 ili više regionalnih lgl; T3-4a N1-2: Metastaze u najmanje 1 regionalnu limfnu žlezdu; T4b
Stadijum IVa	bilo koji T, N, M1a	M1a:Metastaze u 1 organ van debelog creva, rektuma ili regionalnih lgl. Bilo koji T i N.
Stadijum IVb	bilo koji T, N, M1b	M1b: Metastaze u više od 1 organa van debelog creva, rektuma ili regionalnih lgl. Bilo koji T i N.
Stadijum IVc	bilo koji T, N, M1c	M1c: Metastaze na površini peritoneuma. Bilo koji T i N

Tabela 3.3.1. TNM/AJCC stadijum bolesti prema međunarodnoj odrednici (The Eight Edition AJCC Cancer Staging)

3.4. Imunofenotipska analiza ćelija

U cilju imunofenotipizacije sveži uzorci periferne krvi su bojeni monoklonskim humanim antitelima u različitim kombinacijama za multikolornu analizu. Korišćeni su: CD15-FITC i PECy7, CD33-PE i PECy7, CD45-ECD, HLA-DR PECy5, CD14-PECy7, CD16-FITC, CD11b-PE, CD10 -PECy7, CD3-FITC, CD19-FITC i CD56-FITC (Beckman Coulter, USA). Obojene ćelije analizirane su na Beckman Coulter FC 500 protočnom citofluorimetru pomoću CXP analitičkog softvera. Skraćenice M-MDSC i PMN-MDSC odnose se na fenotipski korespondirajuće ćelije. MDSC su definisane kao Lin-(CD3-/CD19-/CD56-)/HLA-DR-/lowCD11b+ ćelije. Polimorfonuklearni i monocitni subtipovi MDSC su određivani na osnovu ekspresije CD14 i CD 15. PMN-MDSC su definisane kao CD14-CD15+, a M-MDSC kao CD14+CD15-. Za dodatno razlikovanje PMN-MDSC korišćeni su markeri CD10 i CD16.

3.5. Statistička analiza

Sve statističke analize rađene su u programu GraphPad Prism 9.0.2. Za najznačajnije neprekidne varijable pre statističkih testiranja prikazana je deskriptivna analiza, koja podrazumeva izračunate srednje vrednosti, standardnu devijaciju (SD), medijanu, minimalnu i maksimalnu vrednost. Prvi korak u statističkoj analizi je ispitivanje da li raspodela podataka prati normalnu distribuciju, za šta su korišćeni Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson i Shapiro-Wilk testovi. Preduslov za korišćenje parametarskih testova je normalnost raspodele, a ukoliko je ova pretpostavka narušena dalja analiza rađena je odgovarajućim neparametarskim testovima. Za poređenje dva nezavisna uzoraka čiji su podaci odgovarali normalnoj distribuciji korišćen je neuparen Studentov T test, a ukoliko raspoloživi podaci nisu ispunjavali uslov normalnosti korišćen je Mann Whitney test.

Pored testiranja razlika između nezavisnih uzoraka, u radu je bilo potrebno ispitati da li postoji statistički značajna razlika kod ponovljenih merenja - pre i nakon obavljenog medicinskog tretmana pojedinca. S obzirom da se radi o zavisnim uzorcima (u našem radu raspoložemo sa 25 uparenih uzorka), za ovu vrstu merenja je korišćen Wilcoxon-ov test.

Spearmanov koeficijent korelacije rangova ρ je primenjen da bi se ispitaio nivo povezanosti između dve promenljive. Koeficijenti korelacije imaju vrednost u intervalu $[-1, 1]$. Što je vrednost koeficijenta korelacije bliža 1, odnosno -1 postoji veći stepen povezanosti između varijabli. Vrednosti veće od 0 upućuju na postojanje pozitivne veze, a manje od 0 na postojanje negativne veze, dok ukoliko je vrednost 0 ovo upućuje na odsustvo veze između posmatranih varijabli.

Da bi se utvrdila senzitivnost i specifičnost varijabli koje smo koristili u proceni preživljavanja, analizirane su ROC krive i površine ispod krivih (AUC). Jačina statističke povezanosti između varijabli i ishoda, odnosno dužine preživljavanja izračunata je pomoću odnosa šansi uz korespondirajući 95 % interval pouzdanosti.

Statistički značajne razlike su bile ukoliko je snaga poređenja (p) manja ili jednaka 0.05, visoko značajne ako je p manji ili jednak 0.01 i veoma visoko statistički značajne ukoliko je p manji ili jednak 0.001. Ekstremne vrednosti su bile vrednosti koje su udaljene više od 3 standardne devijacije (SD) u odnosu na srednju vrednost (Mean).

4. REZULTATI

4.1. Detekcija subpopulacija MDSC kod bolesnika sa CRC i zdravih osoba

Istraživanjem je obuhvaćeno 83 bolesnika sa CRC i 12 zdravih osoba koji su činili kontrolnu grupu. Kod 25 pacijenata sa CRC uzet je drugi uzorak venske krvi na kontrolnom pregledu nakon učinjene operacije tumora. Prosečna starost bolesnika je bila 63.57 godina (raspon od 18-86 godina), a ispitanika koji su činili kontrolnu grupu 62.58 godina. Prosečna starosna dob pacijenata u studiji je bila ujednačena između polova (muškarci 63.04 g., žene 64.14 g.). I ako postoje male razlike između pacijenata i kontrolne grupe, statističko testiranje je pokazalo da nema značajne razlike između ovih grupa u pogledu njihove prosečne starosti ($t=0.263$; $p=0.793$), proporcije muškaraca i žena ($\chi^2=2.438$; $p=0.118$), kao i BMI (Mann Whitney test; $U=555.5$; $p=0.381$). U ispitivanju je učestvovalo 29 obolelih osoba od CRC ženskog pola i 54 osobe muškog pola ($\chi^2=5.568$; $p=0.018$). Veći broj obolelih muških ispitanika je u saglasnosti sa činjenicom da se CRC češće javlja kod muškaraca. Na osnovu TNM klasifikacije bolesnici su bili podeljeni prema stadijumima bolesti: I stadijum 5 bolesnika, II stadijum 31 bolesnik, III stadijum 18 bolesnika i IV stadijum 29 bolesnika. Detaljniji podaci su prikazani u tabeli 4.1.1.

Ukupan broj ispitanika	95	
	Pacijenti sa CRC	Kontrolna grupa
Ukupan broj	83	12
Prosečna starosna dob	63.57	62.58
Pol (broj i procenat)		
Ženski	29 (34.94 %)	7 (58.33 %)
Muški	54 (65.06 %)	5 (41.67 %)
Indeks telesne mase	26.01 kg/m ²	24.9 kg/m ²
Lokalizacija karcinoma		
Cekum	9	
Ascendens	11	
Transverzum	19	
Descendens	4	
Sigma	27	
Rektum	13	
Stadijumi bolesti		
I	5	
II	31	
III	18	
IV	29	

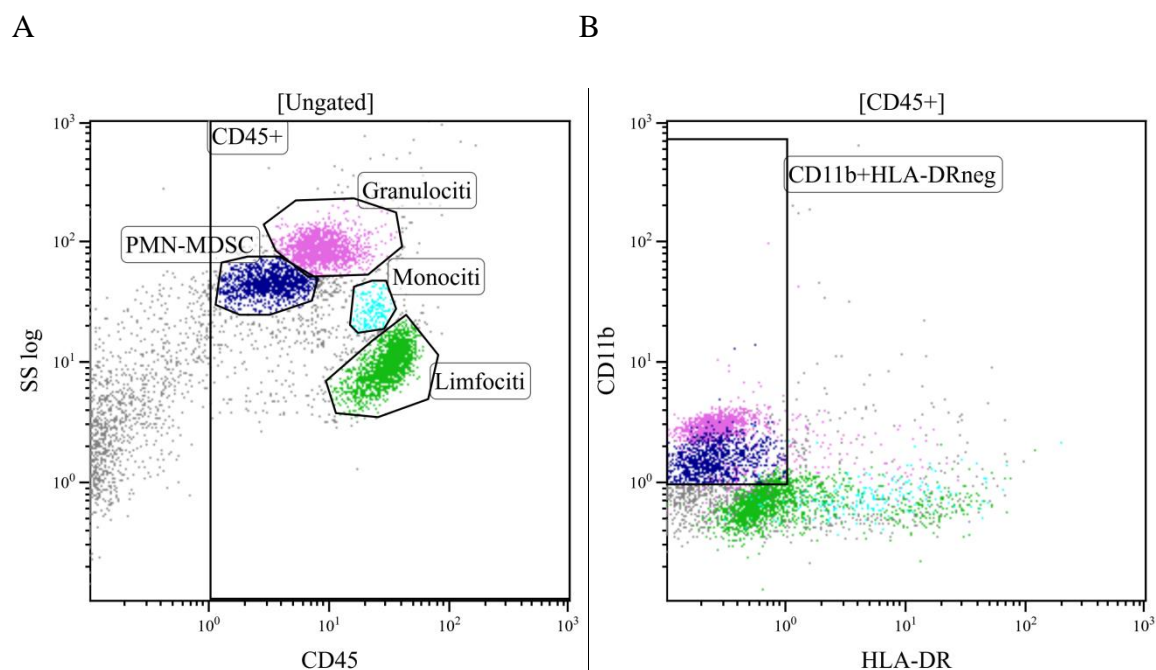
Tabela 4.1.1. Osnovni demografski podaci ispitanika, lokalizacija i stadijum bolesti

Detekcija supresorskih ćelija mijeloidnog porekla iz periferne krvi je učinjena kod ukupno 95 ispitanika (83 bolesnika i 12 zdravih osoba). I u grupi obolelih od CRC kao i u kontrolnoj, zdravoj grupi je utvrđeno prisustvo oba subtipa MDSC: PMN-MDSC i M-MDSC, osim kod jedne bolesnice sa prisutnim CRC kod koje nisu detektovane M-MDSC. Detekcija i razdvajanje navedenih subpopulacije učinjena je na osnovu prisustva ili odsustva odgovarajućih CD (Cluster of differentiation) molekula na površini ćelija. PMN-MDSC i M-MDSC su identifikovane prema ekspresiji CD15 i CD14, poštujući redosled, unutar HLA-DR-/lowCD11b+CD33lowLin-populacije kod svih ispitanika. Najpre su ćelije hematopoeznog sistema definisane na CD45 pozitivnim događajima (pan-leukocitarni antigen) kako bi se razdvojile od detritusa (CD45+ kvadratni graničnik, slika 4.1.1.A i slika 4.1.1.E u detekciji PMN-MDSC, odnosno 4.1.2.A i slika 4.1.2.E u detekciji M-MDSC, reprezentativni pacijent i zdrava kontrola, poštujući redosled). U narednom koraku, CD45 pozitivni događaji su projektovani na HLA-DR CD11b tačkasti dijagram, gde su HLA-DR negativni/niski, i istovremeno CD11b pozitivni događaji odabrani za dalju evaluaciju (slika 4.1.1.B i slika 4.1.1.F u detekciji PMN-MDSC, odnosno slika 4.1.2.B i slika 4.1.2.F u detekciji M-MDSC).

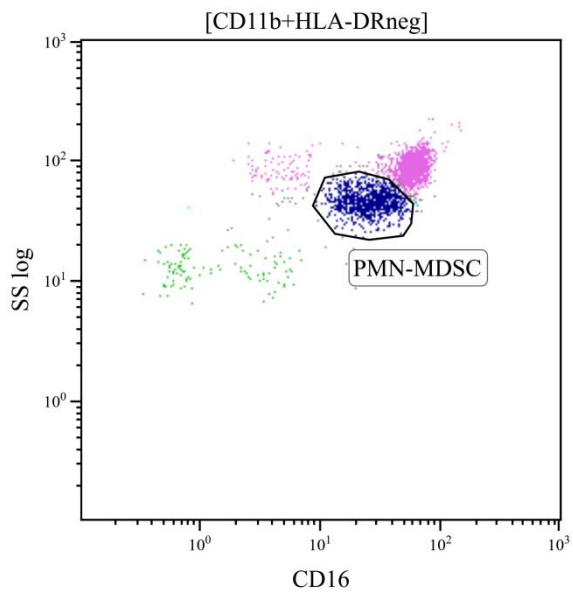
Za dalju detekciju PMN-MDSC, CD11b+HLA-DRneg/niski događaji projektovani su na CD16/SS log tačkasti dijagram (side scatter logaritmic, bočni detektor rasipne svetlosti) gde su pokazali nižu ekspresiju CD16 i niže pozicioniranje na bočnom detektoru u poređenju sa zrelim granulocitima. Na istom tačkastom dijagramu ciljnoj populaciji dodeljena je odgovarajuća boja radi dalje evaluacije. Reprezentativni uzorci pacijenta i zdrave kontrole prikazani su na slikama 4.1.1.C i 4.1.1.G, poštujući redosled. Polimorfonuklearno poreklo CD45+/Lin-/CD33+/CD11b+/HLA-DRneg/low/CD16low ćelija je potvrđeno snažnom ekspresijom CD15 na ovim ćelijama (slika 4.1.1.D i 4.1.1.H, pacijent i kontrola, redom). Procena negativnosti linijskog koktela (CD3Fitc/CD19Fitc/CD56Fitc) i CD33 pozitivnosti obavljena je u različitim kombinacijama epruveta (LinFitc/CD11bPE/CD45ECD/HLA-DRPECy5/CD16PECy7 i CD16Fitc/CD11bPE/CD45ECD/HLA-DRPECy5/CD33PECy7, redom).

Za detekciju M-MDSC, CD45+CD11b+HLA-DRneg/low događaji su projektovani na CD14/SSlog tačkasti dijagram kako bi se potvrdilo njihovo monocitno poreklo, gde su označene kvadratnim graničnikom uz dodelu odgovarajuće boje radi daljeg praćenja (slika 4.1.2.C i slika 4.1.2.G, pacijent i kontrola, poštujući redosled). Za razliku od polimorfonuklearnih ćelija, M-

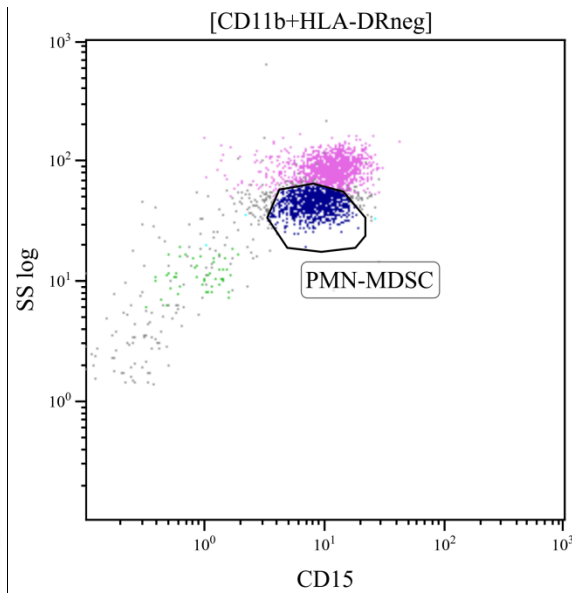
MDSC ćelije pokazale su niži signal bočne rasipne svetlosti na CD45 tačkastom dijagramu i pozicionirale su unutar monocitnog regiona (slika 4.1.2.A). Evidentno niža ekspresija HLA-DR molekula M-MDSC u odnosu na zdrave monocite prikazana je na preklapajućem histogramu (slika 4.1.2.D i 4.1.2.H, pacijent i kontrola, poštujući redosled). Procena negativnosti linijskog koktela (CD3Fitc/CD19Fitc/CD56Fitc) i CD33 pozitivnosti obavljena je u različitim kombinacijama epruveta na osnovu CD14 pozitivnih događaja (LinFitc/CD11bPE/CD45ECD/HLA-DRPECy5/CD14PECy7 i LinFitc/CD33PE/CD45ECD/HLA-DRPECy5/CD14PECy7).



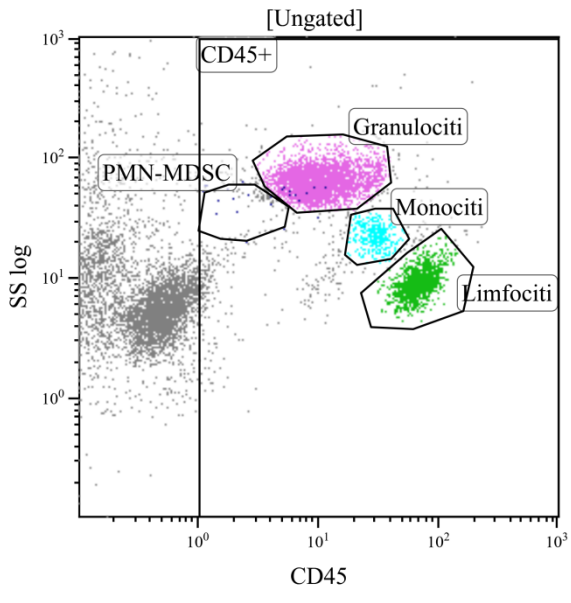
C



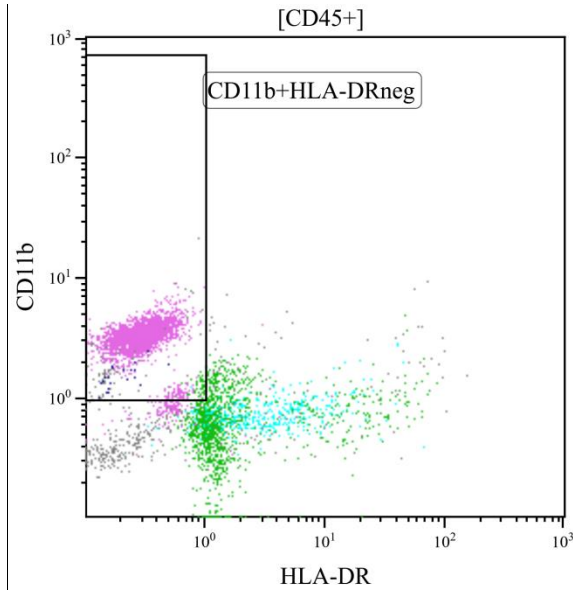
D



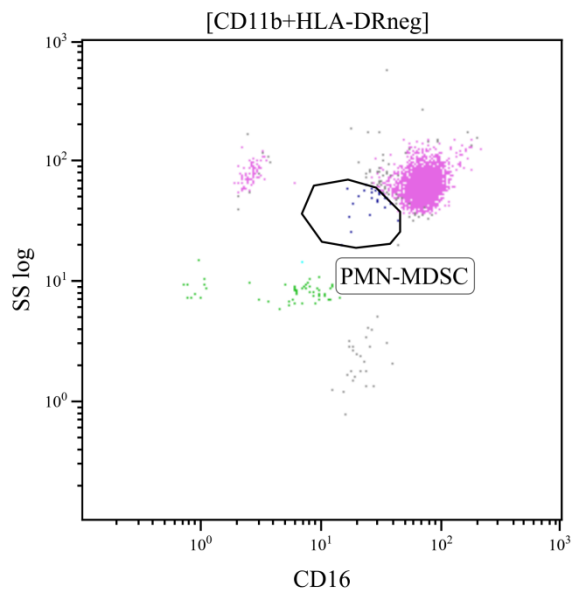
E



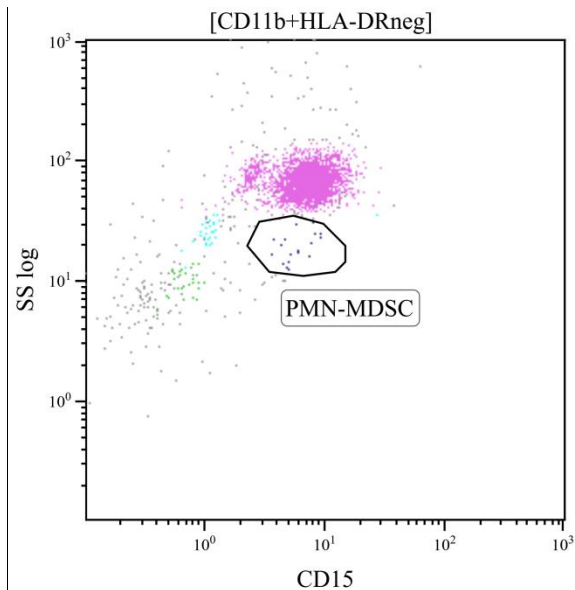
F



G

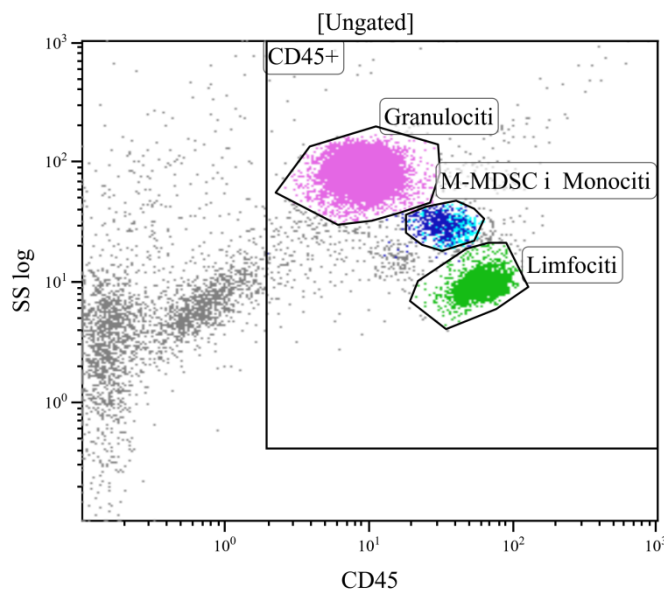


H

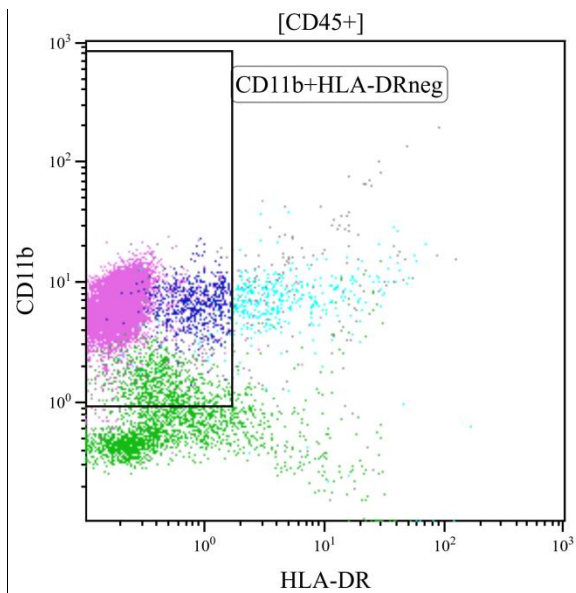


Slika 4.1.1. Detekcija PMN-MDSC protočnom citofluorimetrijom A-D kod pacijenata, E-H kod zdravih kontrola

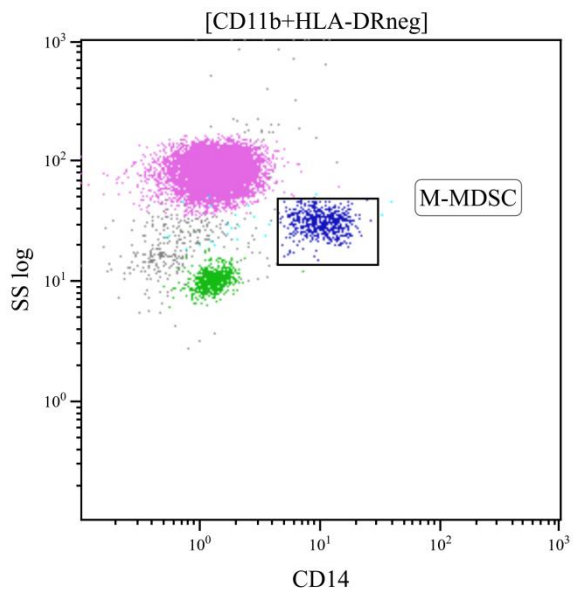
A



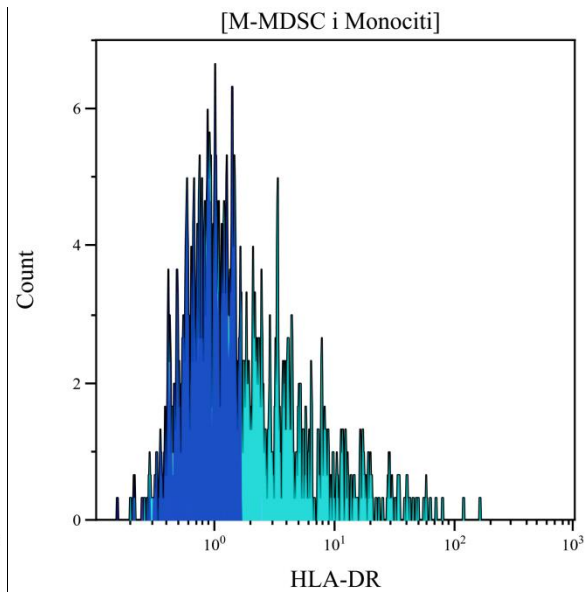
B



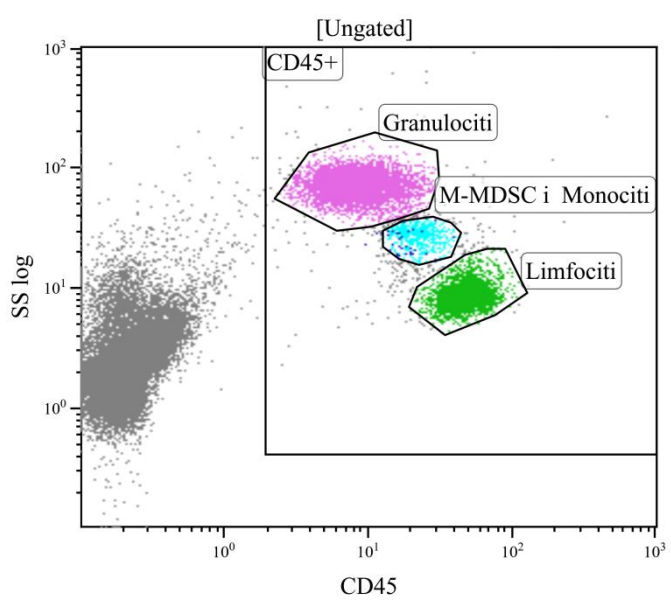
C



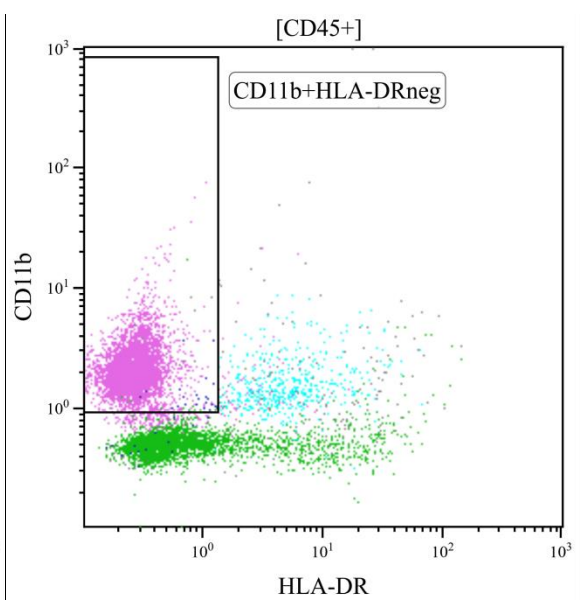
D



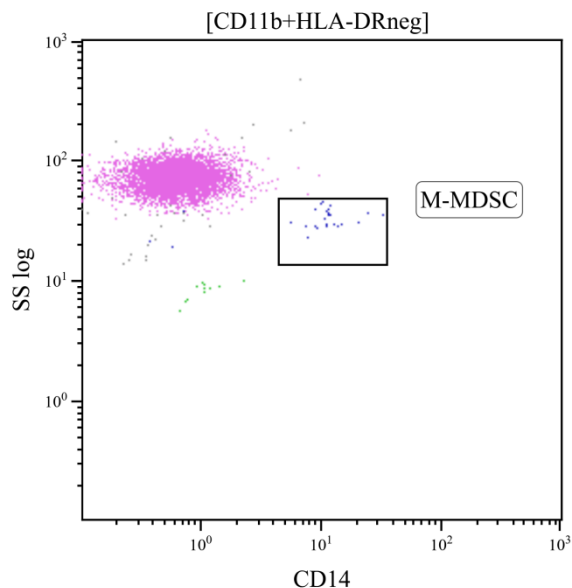
E



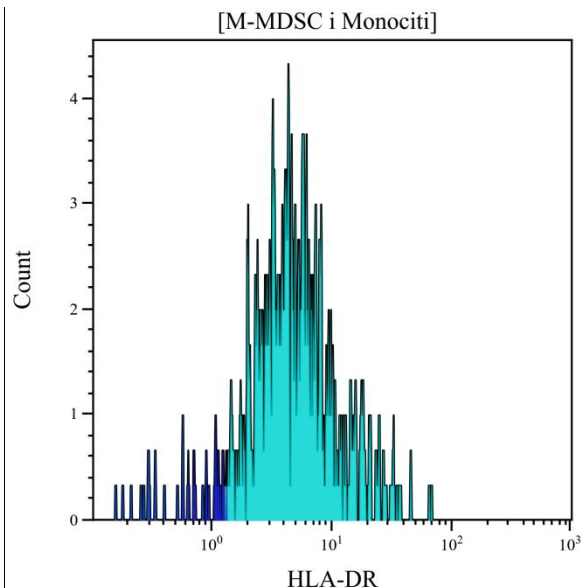
F



G



H



Slika 4.1.2. Detekcija M-MDSC protočnom citofluorimetrijom A-D kod pacijenata, E-H kod zdravih kontrola

4.2. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja MDSC kod pacijenata sa CRC i zdravih osoba

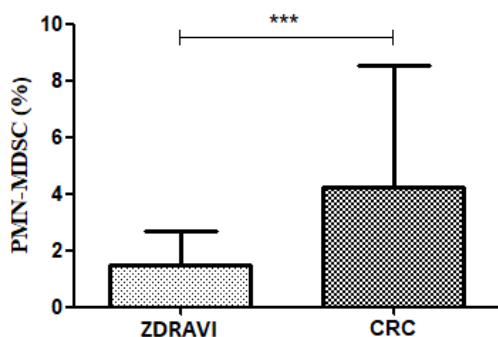
Ispitivanje MDSC je učinjeno kod 83 bolesnika i 12 zdravih osoba koji su činili kontrolnu grupu. Kod jedne pacijentkinje sa karcinomom cekuma u IIIb stadijumu bolesti nisu uočene M-MDSC. Osnovne karakteristike kontrolne grupe, kao i grupe bolesnika sa CRC prikazane su u tabeli 4.2.1.

Podela		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
ZDRAVI (kontrolna grupa)	N	12	12	12	12
	Srednja vrednost	1.463	0.093	0.389	0.028
	SD	1.238	0.087	0.333	0.215
	Medijana	1.005	0.057	0.290	0.250
	Min. vrednost	0.440	0.020	0.030	0.001
	Maks. vrednost	4.07	0.308	1.05	0.675
BOLESNI (CRC)	N	83	83	82	82
	Srednja vrednost	4.212	0.360	0.705	0.051
	SD	4.301	0.597	0.333	0.065
	Medijana	2.810	0.198	0.315	0.023
	Min. vrednost	0.51	0.035	0.20	0.001
	Maks. vrednost	30.14	4.763	4.35	0.311

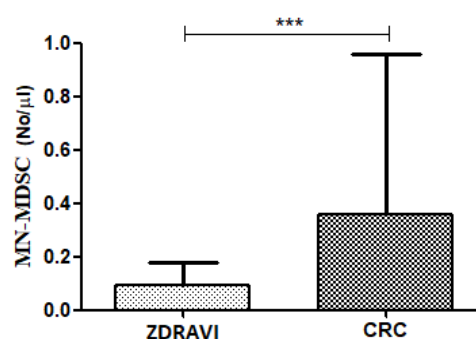
Tabela 4.2.1. Osnovni podaci vezani za kontrolnu grupu (zdravi ispitanici) i grupu bolesnika sa CRC. N - broj ispitanika; SD – standardna devijacija.

Na osnovu testiranja (Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson i Shapiro-Wilk testovi) zaključeno da raspodele promenljivih ne prate distribuciju normalne raspodele, te je u analizi korišćen neparametarski Mann-Whitney test. U uzorku periferne krvi, istraživanjem je uočeno da je kod bolesnika sa CRC prisutan visoko statistički značajan porast procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC u odnosu na zdrave osobe ($4.212 \pm 4.301 / 1.463 \pm 1.2386$, $p < 0.0001$ i $0.36 \pm 0.597 / 0.093 \pm 0.087$, $p < 0.0001$ retrospektivno). Isto statističko poređenje sa M-MDSC nije moglo da potvrdi postojanje statističke značajnosti ($0.705 \pm 0.333 / 0.389 \pm 0.333$, $p = 0.3027$ za procentualnu zastupljenost M-MDSC, a $0.051 \pm 0.065 / 0.028 \pm 0.215$, $p = 0.4346$ za apsolutni broj M-MDSC kod oboljelih od CRC i zdravih osoba), slika 4.2.1. A-D.

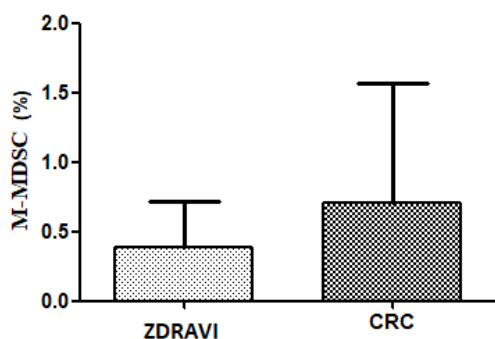
A



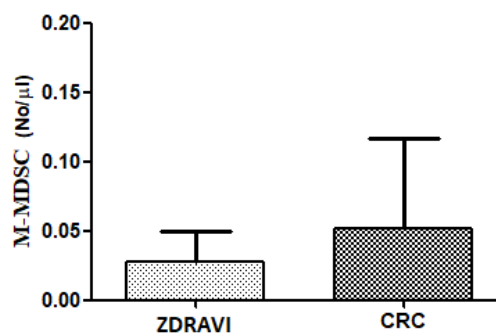
B



C



D



Slika 4.2.1. Poređenje zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC između zdravih (kontrolna grupa) i bolesnika sa CRC (A) Prosečna procentualna zastupljenost PMN-MDSC kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (B) Prosečna apsolutna zastupljenost PMN-MDSC (No/μl) kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (C) Prosečna procentualna zastupljenost M-MDSC kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (D) Prosečna apsolutna zastupljenost M-MDSC (No/μl) kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. Mann-Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

4.3. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema TNM/AJCC klasifikaciji

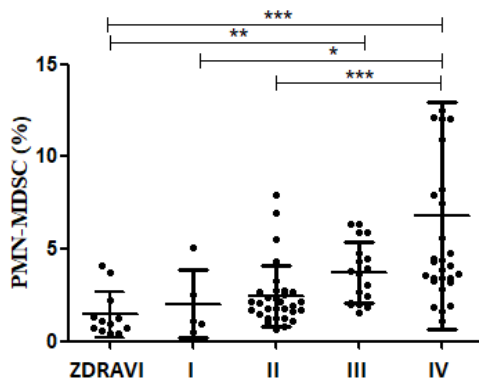
Prilikom ispitivanja, pacijenti su podeljeni u pet grupa. Prvu su sačinjavale zdrave osobe, a ostali ispitanici su bili svrstani u četiri pripadajuće grupe prema stadijumima bolesti na osnovu AJCC/TNM klasifikacije. Osnovna deskriptivna statistika za pripadajuće grupe je prikazana u tabeli 4.3.1.

Podela ispitanika		PMN-MDSC procenat (%)	PMN-MDSC aps.broj (No/ μ l)	M-MDSC procenat (%)	M-MDSC aps.broj (No/ μ l)
Zdrave osobe	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
I	N	5	5	5	5
	Sr.vrednost	2.02	0.12	0.55	0.03
	Mediana	1.09	0.06	0.48	0.02
	SD	1.85	0.10	0.54	0.03
	Minimum	0.51	0.03	0.10	0.01
	Maksimum	5.05	0.29	1.44	0.08
II	N	31	31	31	31
	Sr.vrednost	2.45	0.16	0.40	0.03
	Mediana	2.07	0.13	0.15	0.01
	SD	1.66	0.12	0.53	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	0.67	1.98	0.23
III	N	18	18	17	17
	Sr.vrednost	3.72	0.32	0.61	0.04
	Mediana	3.70	0.24	0.30	0.04
	SD	1.64	0.29	0.62	0.04
	Minimum	1.53	0.10	0.05	0.00
	Maksimum	6.36	1.35	2.29	0.15
IV	N	29	29	29	29
	Sr.vrednost	6.78	0.64	1.12	0.08
	Mediana	4.32	0.36	0.63	0.05
	SD	6.15	0.92	1.13	0.08
	Minimum	1.09	0.08	0.10	0.01
	Maksimum	30.14	4.76	4.35	0.31

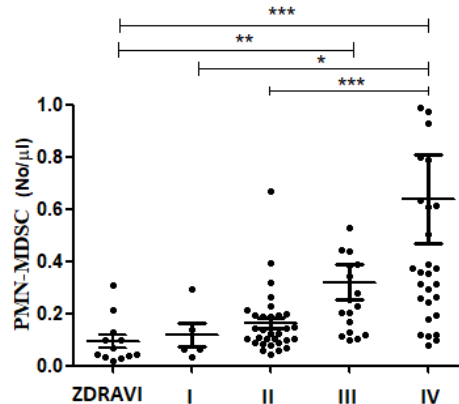
Tabela 4.3.1. Deskriptivni prikaz podataka prema podeli CRC na osnovu poslednje AJCC klasifikacije. Sr. vrednost – srednja vrednost; SD –standardna devijacija; aps. broj – apsolutni broj (No/ μ l).

Prateći neophodne korake statističke analize, testirana je normalnost raspodele na osnovu čega je zaključeno da podaci iz nezavisnih uzoraka ne prate normalnu raspodelu, te je testiranje izvršeno neparemetarskim metodama. Poređenjem PMN-MDSC između stadijuma može se uočiti statistički signifikantna razlika između kontrole grupe i bolesnika u III i IV stadijumu bolesti ($1.46 \pm 1.24 / 3.72 \pm 1.64$, $p=0.0032$ i $1.46 \pm 1.24 / 6.78 \pm 6.15$, $p<0.0001$ za procentualne i $0.09 \pm 0.09 / 0.32 \pm 0.29$, $p=0.0003$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.64 \pm 0.92$, $p<0.0001$ za apsolutne vrednosti, redom), kao i kod bolesnika između I i IV ($2.02 \pm 1.85 / 6.78 \pm 6.15$, $p=0.0161$ i $0.12 \pm 0.10 / 0.64 \pm 0.92$, $p=0.0065$, redom) i II i IV stadijuma bolesti ($2.45 \pm 1.66 / 6.78 \pm 6.15$, $p<0.0001$ i $0.16 \pm 0.12 / 0.64 \pm 0.92$, $p<0.0001$, redom). Poređenjem M-MDSC statistička značajnost je uočena prilikom upoređivanja procentualne i apsolutne vrednosti kod bolesnika II i IV stadijumu CRC ($0.40 \pm 0.53 / 1.12 \pm 1.13$, $p=0.0014$ i $0.03 \pm 0.05 / 0.08 \pm 0.08$, $p=0.0002$, redom). Izmerene vrednosti i PMN-MDSC i M-MDSC su bile najviše kod bolesnika u IV stadijumu bolesti (Slika 4.3.1.)

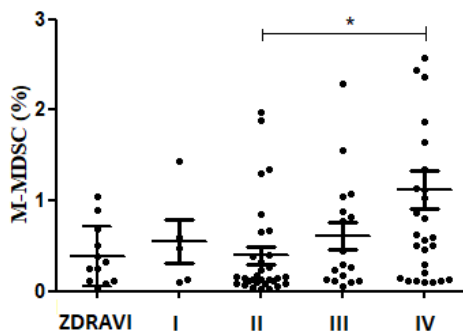
A



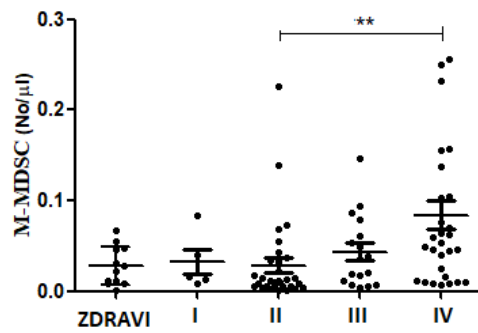
B



C



D



Slika 4.3.1. A-D Poređenje zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC između zdravih (kontrolna grupa) i bolesnika sa CRC podeljenih prema četiri stadijuma bolesti prema TNM klasifikaciji kao i između različitih stadijuma bolesti (A) Prosečna procentualna zastupljenost PMN-MDSC kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (B) Prosečna apsolutna zastupljenost PMN-MDSC (No/ μ l) kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (C) Prosečna procentualna zastupljenost M-MDSC kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. (D) Prosečna apsolutna zastupljenost M-MDSC (No/ μ l) kod zdravih i bolesnih osoba sa CRC. Mann Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

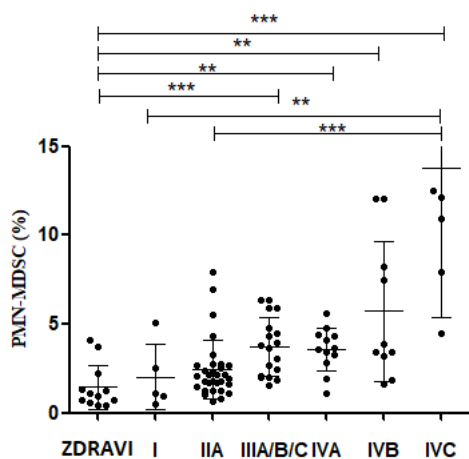
Potom su ispitanici podeljeni u grupe prema detaljnijoj podeli učinjenoj prema poslednjoj osmoj AJCC klasifikaciji za CRC. Osnovni deskriptivni podaci su dati u tabeli 4.3.2.

AJCC		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
Zdrave osobe	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
I	N	5	5	5	5
	Sr.vrednost	2.02	0.12	0.55	0.03
	Mediana	1.09	0.06	0.48	0.02
	SD	1.85	0.10	0.54	0.03
	Minimum	0.51	0.03	0.10	0.01
	Maksimum	5.05	0.29	1.44	0.08
IIA	N	31	31	31	31
	Sr.vrednost	2.45	0.16	0.40	0.03
	Mediana	2.07	0.13	0.15	0.01
	SD	1.66	0.12	0.53	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	0.67	1.98	0.23
IIIA	N	1	1	1	1
	Sr.vrednost	2.04	0.13	0.77	0.05
	Mediana	2.04	0.13	0.77	0.05
	Minimum	2.04	0.13	0.77	0.05
	Maksimum	2.04	0.13	0.77	0.05
IIIB	N	16	16	15	15
	Sr.vrednost	3.96	0.35	0.49	0.04
	Mediana	3.88	0.27	0.26	0.02
	SD	1.58	0.30	0.47	0.03
	Minimum	1.83	0.11	0.05	0.00
	Maksimum	6.36	1.35	1.56	0.09
IIIC	N	1	1	1	1
	Sr.vrednost	1.53	0.10	2.29	0.15
	Mediana	1.53	0.10	2.29	0.15
	Minimum	1.53	0.10	2.29	0.15
	Maksimum	1.53	0.10	2.29	0.15
IVA	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	3.57	0.29	1.03	0.08
	Mediana	3.64	0.31	0.55	0.05
	SD	1.23	0.12	1.35	0.10
	Minimum	1.09	0.08	0.10	0.01
	Maksimum	5.60	0.50	4.35	0.31
IVB	N	10	10	10	10
	Sr.vrednost	5.72	0.41	1.30	0.08
	Mediana	3.67	0.28	1.19	0.07
	SD	3.95	0.32	1.08	0.07
	Minimum	1.61	0.10	0.12	0.01
	Maksimum	12.02	0.97	3.15	0.23
IVC	N	7	7	7	7
	Sr.vrednost	13.79	1.56	1.01	0.10
	Mediana	12.13	0.93	0.60	0.06
	SD	8.40	1.56	0.87	0.09
	Minimum	4.45	0.37	0.14	0.01
	Maksimum	30.14	4.76	2.57	0.26

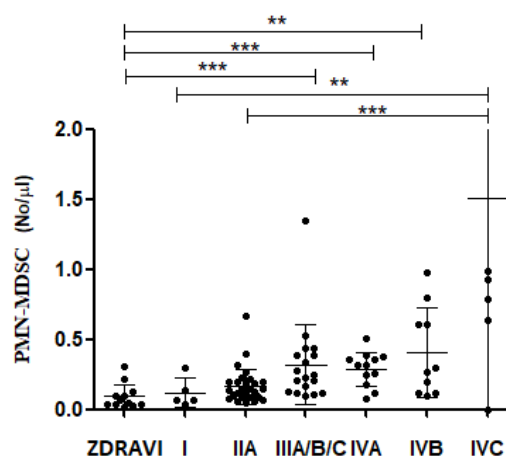
Tabela 4.3.2. Deskriptivni podaci zdravih i bolesnika sa CRC prema poslednjoj AJCC klasifikaciji

Ni jedan pacijent se na osnovu prikupljenih podataka nije mogao svrstati u IIB i IIC stadijum bolesti (T4aN0M0 za IIB i T4bN0M0 za IIC). U IIIa i IIIc stadijumu nalazio se samo po 1 pacijent, radilo se o malom uzorku koji bi mogao statistički pouzdano da se obradi, te su oni pripojeni grupi pacijenata u IIIb stadijumu bolesti i zajedno obrađeni. Poređenjem prikazanih srednjih vrednosti pojedinačnih stadijuma prema AJCC klasifikaciji može se uočiti da su najviše vrednosti PMN-MDSC, ali i M-MDSC prisutne u IVC fazi bolesti, odnosno kod bolesnika sa diseminovanom bolešću sa zahvatanjem peritoneuma čija je i prognoza bolesti najlošija. Upoređivanjem između grupa postoji statistička značajnost koja se uočava između kontrolne grupe i ispitanika u IIIA/B/C stadijumu ($1.46 \pm 1.24 / 3.72 \pm 1.64$, $p=0.0032$ za procentualnu i $0.09 \pm 0.09 / 0.32 \pm 0.29$, $p<0.0001$ za apsolutnu vrednost PMN-MDSC), kao i između kontrolne grupe i osoba u IVA ($1.46 \pm 1.24 / 3.57 \pm 1.23$, $p=0.0193$ i $0.09 \pm 0.06 / 0.29 \pm 0.12$, $p=0.006$, redom), IVB ($1.46 \pm 1.24 / 5.72 \pm 3.95$, $p=0.0044$ i $0.09 \pm 0.06 / 0.41 \pm 0.32$, $p=0.0089$) i IVC stadijumu ($1.46 \pm 1.24 / 13.79 \pm 8.4$, $0.09 \pm 0.06 / 1.56 \pm 1.56$, gde je $p<0.0001$ i za procentualnu i za apsolutnu vrednost PMN-MDSC). Takođe, značajnost je uočena i prilikom komparacije ispitanika u I i IVC stadijumu ($2.02 \pm 1.85 / 13.79 \pm 8.4$, $p=0.0055$ i $0.12 \pm 0.10 / 1.56 \pm 1.56$, $p=0.0027$ za procentualne i apsolutne vrednosti MDSC) i IIA i IVC stadijumu CRC ($2.45 \pm 1.66 / 13.79 \pm 8.4$ i $0.16 \pm 0.12 / 1.56 \pm 1.56$, redom, $p=0.0002$ u oba slučaja). Ispitivanjem M-MDSC postoji statistička značajnost prilikom poređenja bolesnika koji su klasifikovani u IIA i IVB grupu ($0.03 \pm 0.05 / 0.08 \pm 0.07$, $p=0.0447$ za apsolutne vrednosti). Prikaz dobijenih statističkih podataka je dat na slici 4.3.2.

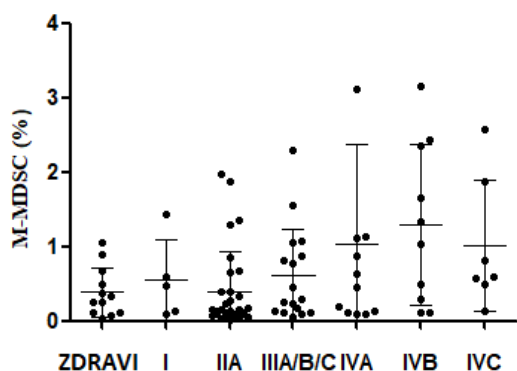
A



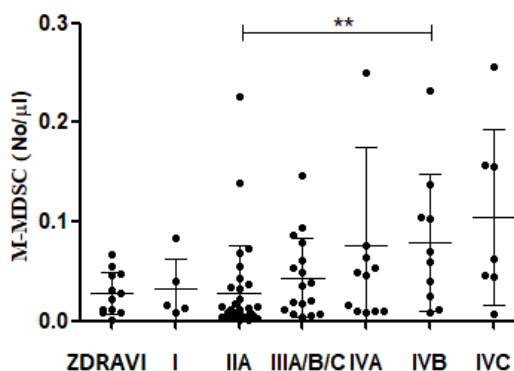
B



C



D



Slika 4.3.2. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC kod zdravih osoba i kod osoba sa CRC u/između različitih stadijuma bolesti (AJCC). Prikazana je povezanost stadijuma bolesti u odnosu na (A) relativan broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativan broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/ μ l). Mann Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

4.4. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema Dukes klasifikaciji

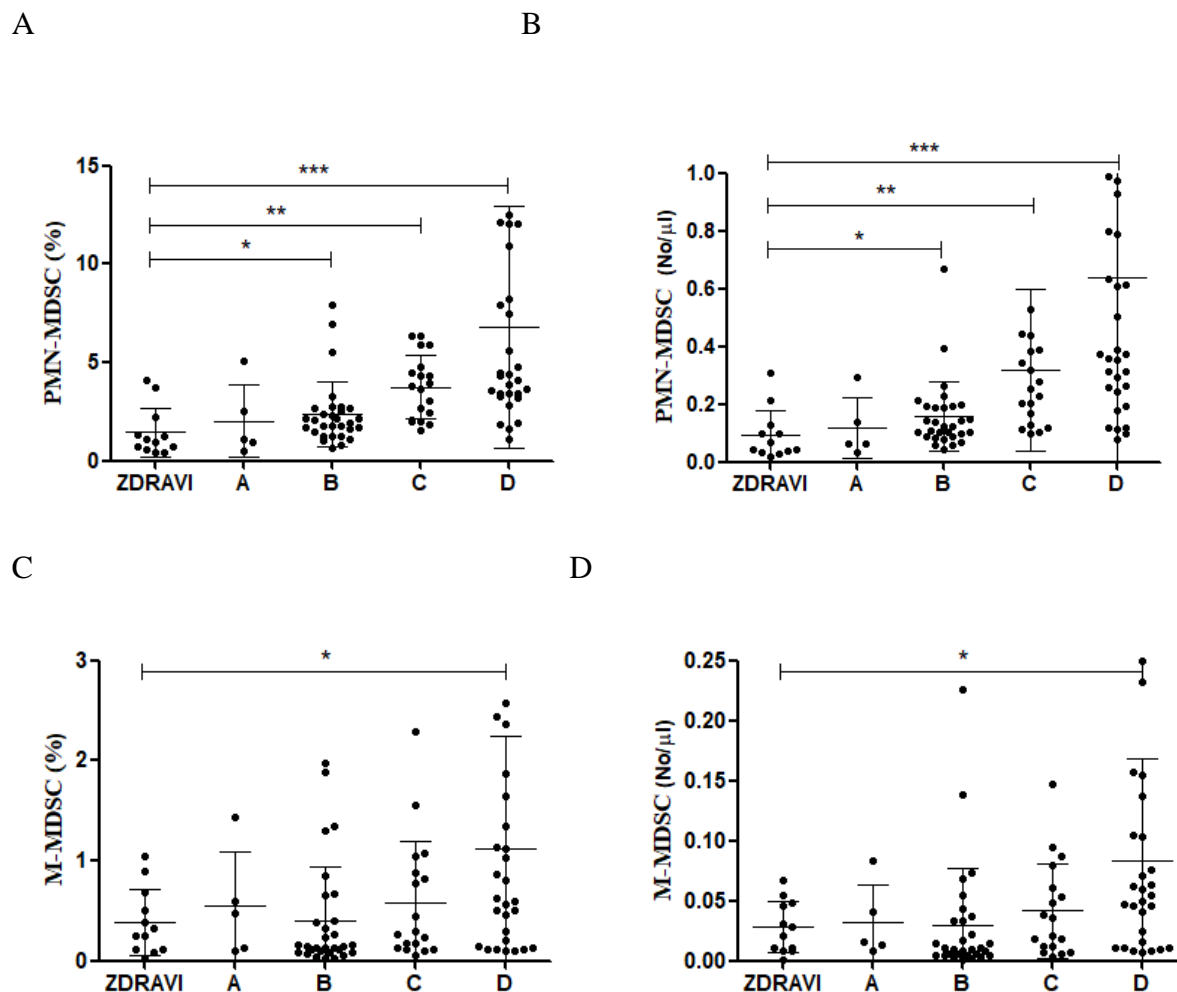
Osim TNM/AJCC klasifikacije koja se inače najčešće koristi kod obolelih od CRC, jedna od standardnih podela koja je u svakodnevnoj primeni je i Dukes klasifikacija. Upoređujući rezultate prema Dukes klasifikaciji uočen je porast PMN-MDSC i M-MDSC sa napredovanjem bolesti. Prikaz deskriptivne statističke analize dat je u tabeli 4.4.1.

Dukes klasifikacija		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
zdravi	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
	A	N	5	5	5
A	Sr.vrednost	2.02	0.12	0.55	0.03
	Mediana	1.09	0.06	0.48	0.02
	SD	1.85	0.10	0.54	0.03
	Minimum	0.51	0.03	0.10	0.01
	Maksimum	5.05	0.29	1.44	0.08
	B	N	30	30	30
B	Sr.vrednost	2.39	0.16	0.40	0.03
	Mediana	2.01	0.12	0.15	0.01
	SD	1.65	0.12	0.54	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	0.67	1.98	0.23
	C	N	19	19	18
C	Sr.vrednost	3.75	0.32	0.59	0.04
	Mediana	3.78	0.25	0.28	0.03
	SD	1.60	0.28	0.61	0.04
	Minimum	1.53	0.10	0.05	0.00
	Maksimum	6.36	1.35	2.29	0.15
	D	N	29	29	29
D	Sr.vrednost	6.78	0.64	1.12	0.08
	Median	4.32	0.36	0.63	0.05
	SD	6.15	0.92	1.13	0.08
	Minimum	1.09	0.08	0.10	0.01
	Maksimum	30.14	4.76	4.35	0.31

Tabela 4.4.1. Osnovni podaci deskriptivne statistike za ispitanike sa CRC prema Dukes klasifikaciji

Posmatrajući odnos između grupa, koristeći neparametrijski Mann Whitney test postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti PMN-MDSC između zdravih osoba i osoba u B ($1.46 \pm 1.24 / 2.39 \pm 1.65$, $p=0.0137$ za procentualne vrednosti PMN-MDSC i $0.09 \pm 0.09 / 0.16 \pm 0.12$, $p=0.0127$ za apsolutne vrednosti), C ($1.46 \pm 1.24 / 3.75 \pm 1.60$, $p=0.0003$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.32 \pm 0.28$, $p=0.0002$, redom) i D stadijumu ($1.46 \pm 1.24 / 6.78 \pm 6.15$, $p<0.0001$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.64 \pm 0.92$, $p<0.0001$) CRC. Posmatrajući zastupljenost M-MDSC, uočena je statistički značajna razlika

između zdravih ispitanika i obolelih koji su raspoređeni u Dukes D grupu ($0.39 \pm 0.33 / 1.12 \pm 1.13$, $p=0.0351$ za relativne i $0.03 \pm 0.02 / 0.08 \pm 0.08$, $p=0.0352$ za apsolutne vrednosti) (slika 4.4.1.).



Slika 4.4.1. Poređenje PMN-MDSC prema Dukes klasifikaciji. Prikazana je povezanost stadijuma bolesti u odnosu na (A) relativan broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/μl), (C) relativan broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/μl). Mann Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

4.5. Poređenje procentualne vrednosti i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema modifikovanoj Astler-Coller klasifikaciji

Inicijalno su prikazane osnovne karakteristike statističkih merenja za kontrolnu grupu i osobe sa CRC klasifikovane prema modifikovanoj Astler Coller klasifikaciji. S obzirom da se u C1 stadijumu bolesti nalazio samo jedan pacijent, on je prilikom obrade podataka pripojen najbližoj

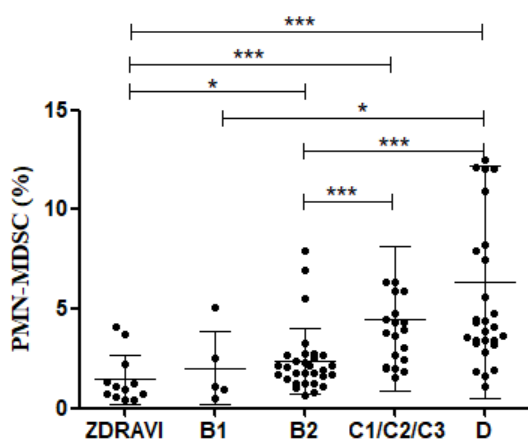
pripadajućoj grupi (C2 stadijumu). Ni jedan pacijent prema nalazu patologa nije klasifikovan u u B3 i C3 stadijum bolesti. U tabeli 4.5.1 je dat deskriptivni prikaz statističkih podataka.

Astler-Coller klasifikacija		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
zdravi	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
B1	N	5	5	5	5
	Sr.vrednost	2.02	0.12	0.55	0.03
	Mediana	1.09	0.06	0.48	0.02
	SD	1.85	0.10	0.54	0.03
	Minimum	0.51	0.03	0.10	0.01
	Maksimum	5.05	0.29	1.44	0.08
B2	N	30	30	30	30
	Sr.vrednost	2.39	0.16	0.40	0.03
	Mediana	2.01	0.12	0.15	0.01
	SD	1.65	0.12	0.54	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	0.67	1.98	0.23
C1	N	1	1	1	1
	Sr.vrednost	2.04	0.13	0.77	0.05
	Mediana	2.04	0.13	0.77	0.05
	Minimum	2.04	0.13	0.77	0.05
	Maksimum	2.04	0.13	0.77	0.05
C2	N	19	19	18	18
	Sr.vrednost	4.61	0.56	0.58	0.05
	Median	3.97	0.28	0.28	0.03
	SD	3.68	1.05	0.61	0.05
	Minimum	1.53	0.10	0.05	0.00
	Maksimum	18.42	4.76	2.29	0.16
D	N	28	28	28	28
	Sr.vrednost	6.36	0.49	1.14	0.08
	Mediana	4.21	0.35	0.72	0.05
	SD	5.83	0.47	1.14	0.09
	Minimum	1.09	0.08	0.10	0.01
	Maksimum	30.14	2.43	4.35	0.31

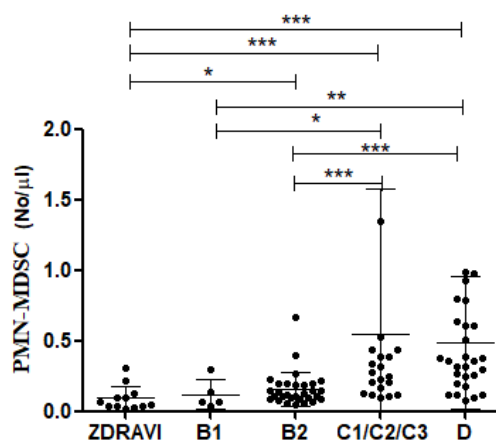
Tabela 4.5.1. Osnovne karakteristike ispitanika i učinjenih statističkih merenja na osnovu podele po grupama prema modifikovanoj Astler-Coller klasifikaciji

Analizirajući odnos između grupa ispitanika koristeći Mann Whitney test zapažena je statistički značajna razlika relativne i apsolutne vrednosti PMN-MDSC između zdravih osoba i pripadnika B2 ($1.46 \pm 1.24 / 2.39 \pm 1.65$, $p=0.0137$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.16 \pm 0.12$, $p=0.0127$, redom), C ($1.46 \pm 1.24 / 4.48 \pm 3.68$, $p=0.0002$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.54 \pm 1.05$, $p=0.0002$, redom) i D ($1.46 \pm 1.24 / 6.36 \pm 5.83$, $p<0.0001$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.49 \pm 0.47$, $p<0.0001$, redom) grupe obolelih prema Astler Coller klasifikaciji. Takođe, postoji značajna razlika i između bolesnika B1 i D ($2.02 \pm 1.85 / 6.36 \pm 5.83$, $p=0.0183$ i $0.12 \pm 0.10 / 0.49 \pm 0.47$, $p=0.0072$), B2 i C ($2.39 \pm 1.65 / 4.48 \pm 3.68$, $p=0.001$ i $0.16 \pm 0.12 / 0.54 \pm 1.05$, $p=0.0072$) i B2 i D stadijuma bolesti ($2.39 \pm 1.65 / 6.36 \pm 5.38$, $p<0.0001$ i $0.16 \pm 0.12 / 0.49 \pm 0.47$, $p<0.0001$). Nakon sagledavanja apsolutnih vrednosti PMN-MDSC zapažena je statistički značajna razlika i između B1 i C stadijuma ($0.12 \pm 0.10 / 0.54 \pm 1.05$, $p=0.0229$) koja nije uočena kod procentualne vrednosti ovih ćelija. Posmatranjem relativnih i apsolutnih vrednosti M-MDSC, razlika je uočena samo između kontrolne grupe koju su sačinjavale zdrave osobe i poslednjeg D stadijuma ove klasifikacije za obe vrste vrednosti ($0.39 \pm 0.33 / 1.14 \pm 1.14$, $p=0.0374$ i $0.03 \pm 0.02 / 0.08 \pm 0.09$, $p=0.0464$). Na slici 4.5.1. prikazani su rezultati za Mann Whitney testa koji je korišćen za statističko testiranje.

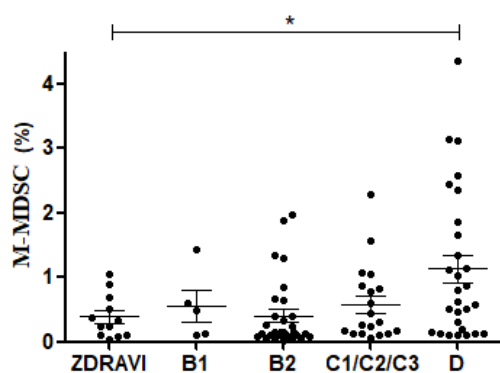
A



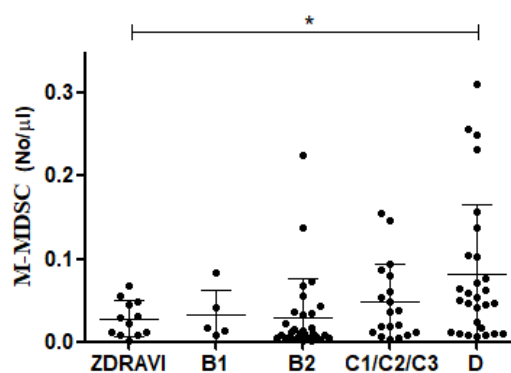
B



C



D



Slika 4.5.1. Prikazana je povezanost stadijuma bolesti (Astler-Coller klasifikacija) u odnosu na (A) relativan broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativan broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/ μ l). Mann Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

4.6. Korelacija zastupljenosti MDSC sa metastatskim širenjem bolesti

Svi bolesnici su podeljeni u 4 grupe u odnosu da li imaju ili ne prisutne udaljene metastaze CRC. Grupa bez udaljenih metastaza je bila najveća i označena je kao grupa 0. Potom je napravljena podela na još tri grupe u zavisnosti da li su udaljene metastaze učinjenim ispitivanjima uočene u jednom ($n=11$; grupa 1), dva ($n=13$; grupa 2) ili 3 i više organa ($n=4$; grupa 3). U tabeli 4.6.1. prikazane su deskriptivne statističke analize.

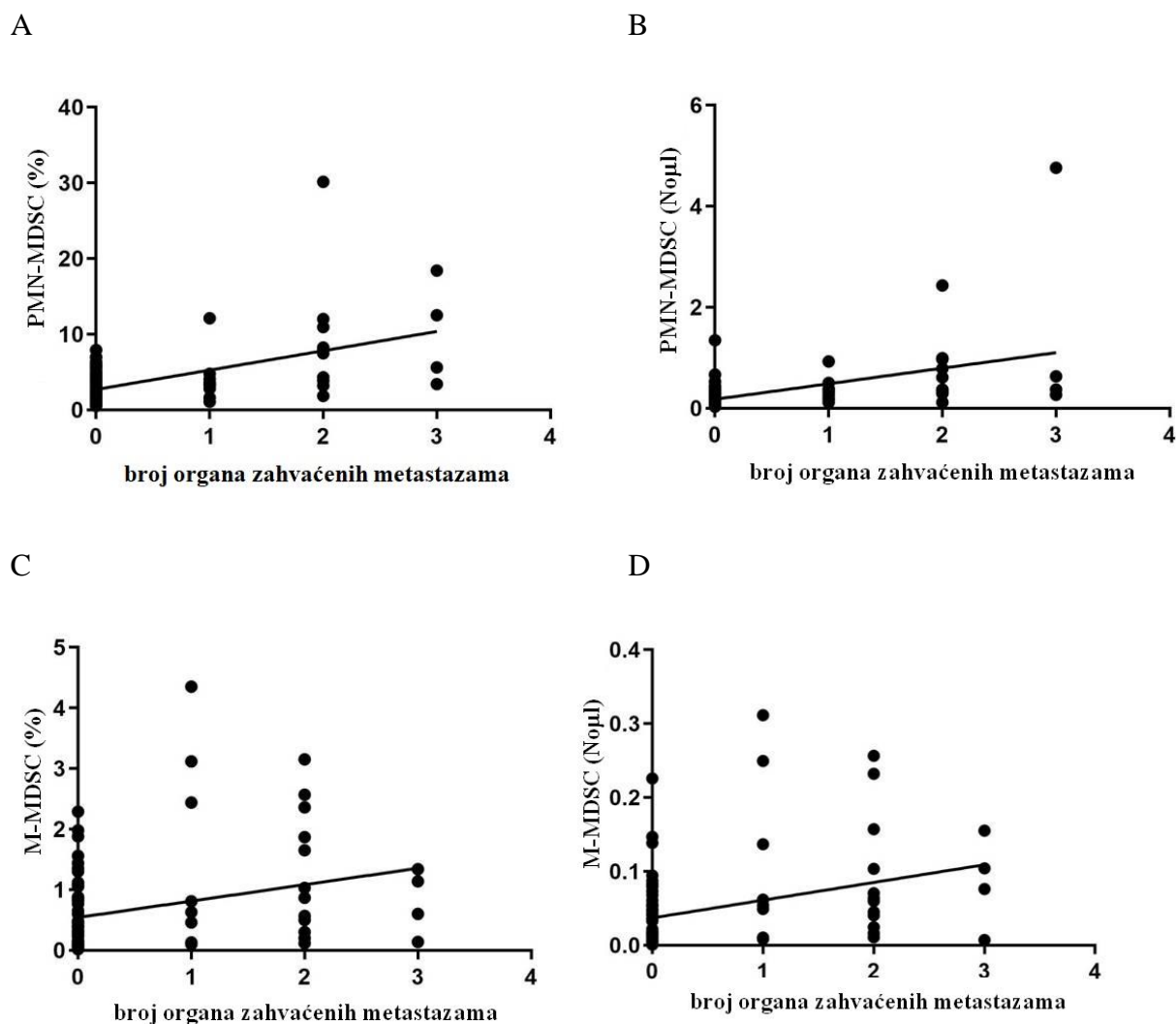
Podela ispitanika po grupama		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
zdravi	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
Sa CRC ali bez metastaza	N	55	55	54	54
	Sr.vrednost	2.82	0.21	0.49	0.03
	Mediana	2.18	0.14	0.20	0.02
	SD	1.75	0.20	0.56	0.04
	Minimum	0.51	0.03	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	1.35	2.29	0.23
1	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	3.99	0.33	1.12	0.08
	Mediana	3.45	0.26	0.46	0.05
	SD	2.90	0.23	1.48	0.11
	Minimum	1.09	0.12	0.10	0.01
	Maksimum	12.13	0.93	4.35	0.31
2	N	13	13	13	13
	Sr.vrednost	8.53	0.67	1.21	0.09
	Mediana	7.48	0.61	0.87	0.06
	SD	7.33	0.61	1.01	0.08
	Minimum	1.86	0.10	0.12	0.01
	Maksimum	30.14	2.43	3.15	0.26
≥ 3	N	4	4	4	4
	Sr.vrednost	9.99	1.51	0.81	0.09
	Mediana	9.06	0.50	0.87	0.09
	SD	6.83	2.17	0.54	0.06
	Minimum	3.42	0.27	0.14	0.01
	Maksimum	18.42	4.76	1.34	0.16

Tabela 4.6.1. Deskriptivna statistika za pacijente sa različitim brojem organa zahvaćenih metastazama

Preliminarnim poređenjem može se uočiti da pacijenti sa metastatskom bolesti imaju više vrednosti MDSC. Međutim, da bi se doneo konačan zaključak mora se proveriti i statistička značajnost te veze. Na osnovu Spirmanovog koeficijenta korelacije i statističkih testova uočeno je da postoji pozitivna korelacija između zastupljenosti MDSC i broja organa koji su bili zahvaćeni metastatskim promenama. Ovo bi značilo da što je veća (apsolutna i procentualna) zastupljenost MDSC to je i veći broj organa zahvaćenih metastazama kod bolesnika sa CRC. Ova veza je umereno jaka za PNM-MDSC, dok je nešto slabija za M-MDSC (pogledati tabelu 4.6.2. i sliku 4.6.1. sa grafičkim prikazom korelacije).

	Metastaze i PNM-MDSC(%)	Metastaze i PNM-MDSC (No/ μ l)	Metastaze i M-MDSC (%)	Metastaze i M-MDSC (No/ μ l)
Spearmanov koeficijent	0.5126	0.5115	0.3234	0.3793
P vrednost	<0.0001	<0.0001	0.003	0.0004

Tabela 4.6.2. Spearmanov koeficijent korelacije sa testiranjem statističke značajnosti između PMN-MDSC i M-MDSC i broja metastazama zahvaćenih organa kod bolesnika sa CRC



Slika 4.6.1. Grafički prikaz Spearman-ove korelacije između MDSC i broja metastazama zahvaćenih organa kod bolesnika sa CRC za (A) relativan broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativan broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/ μ l)

4.7. Korelacija MDSC i stepena diferencijacije tumora

Histološko gradiranje CRC može imati dvostepenu, trostepenu, četvorostepenu, a nekada i petostepenu skalu u zavisnosti od ustanove i patologa koji je koristi. Prema stepenu diferencijacije karcinom kolona može biti dobro diferentovan (G1), umereno diferentovan (G2), slabo diferentovan (G3), ali i nediferentovan (G4). Nekada su prisutna i preklapanja (npr. G1-G2). Procena je vrlo često subjektivna i zavisi od patologa. Međutim, ova podela se zajedno sa AJCC klasifikacijom koristi za procenu načina lečenja i prognoze bolesti. Deskriptivne statističke vrednosti vezane za stepen diferencijacije date su u tabeli 4.7.1. Za tri pacijenta ne postoje podaci i oni su isključeni iz analize.

Podela prema stepenu diferencijacije adenokarcinoma		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC aps.broj (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC aps.broj (No/ μ l)
neklasifikovano	N	3	3	3	3
	Sr. vrednost	7.12	0.69	1.06	0.11
	Mediana	7.90	0.79	0.50	0.05
	SD	4.26	0.36	1.33	0.13
	Minimum	2.52	0.29	0.10	0.02
	Maksimum	10.94	0.99	2.57	0.26
G1	N	26	26	26	26
	Sr. vrednost	3.40	0.25	0.94	0.07
	Mediana	3.02	0.19	0.47	0.03
	SD	2.10	0.19	1.13	0.08
	Minimum	0.99	0.06	0.03	0.00
	Maksimum	8.26	0.67	4.35	0.31
G2	N	39	39	38	38
	Sr. vrednost	3.44	0.33	0.59	0.04
	Mediana	2.42	0.17	0.20	0.01
	SD	3.26	0.75	0.71	0.05
	Minimum	0.51	0.03	0.02	0.00
	Maksimum	18.42	4.76	2.44	0.23
G3	N	14	14	14	14
	Sr. vrednost	7.15	0.58	0.54	0.04
	Mediana	3.97	0.29	0.37	0.04
	SD	7.73	0.65	0.46	0.03
	Minimum	1.47	0.10	0.05	0.00
	Maksimum	30.14	2.43	1.34	0.10
G4	N	1	1	1	1
	Sr. vrednost	5.87	0.53	0.23	0.02
	Mediana	5.87	0.53	0.23	0.02
	Minimum	5.87	0.53	0.23	0.02
	Maksimum	5.87	0.53	0.23	0.02

Tabela 4.7.1. Deskriptivna statistika za pacijente sa CRC sa različitim stepenom diferencijacije

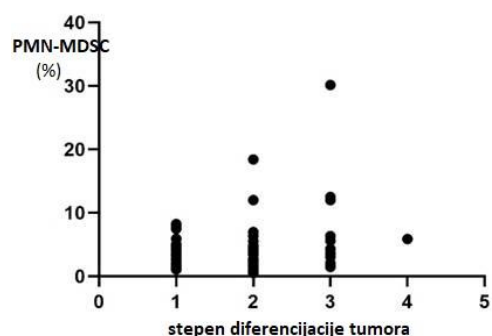
Analizom deskriptivnih podataka može se uočiti da su vrednosti PMN-MDSC veće što je prisutan manji stepen diferencijacije tumora osim za stadijum G4. Da bi se testiralo postojanje veze između ovih varijabli računamo Spirmanov koeficijent korelacije i proveravamo njegovu

statističku značajnost. Na osnovu sprovedenih testova možemo zaključiti da ne postoji statistički značajno linearno slaganje između zastupljenosti MDSC i stepena diferencijacije (Tabela 4.7.2.). Iako je na bazi prethodnih istraživanja bilo očekivano da se pokaže postojanje veze između ovih varijabli moguće je da je subjektivan faktor prilikom klasifikovanja doprineo da se ova veza izgubi. Grafički pregled je dat na slici 4.7.1.

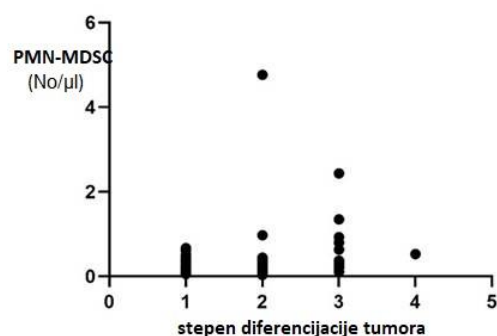
	Stepen diferencijacije i PNM-MDSC (%)	Stepen diferencijacije i PNM-MDSC (No/μl)	Stepen diferencijacije i M-MDSC (%)	Stepen diferencijacije i M-MDSC (No/μl)
Spearmanov koeficijent	0.149	0.1973	-0.1338	-0.1003
P vrednost	0.1872	0.0794	0.2397	0.3791

Tabela 4.7.2. Spearmanov koeficijent korelacije - korelacija MDSC sa stepenom diferencijacije

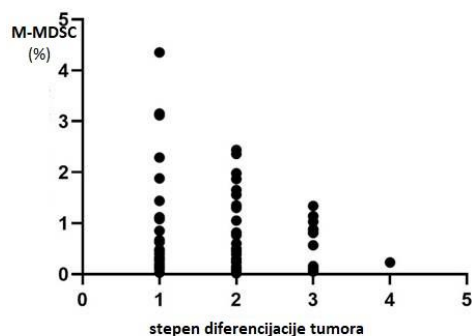
A



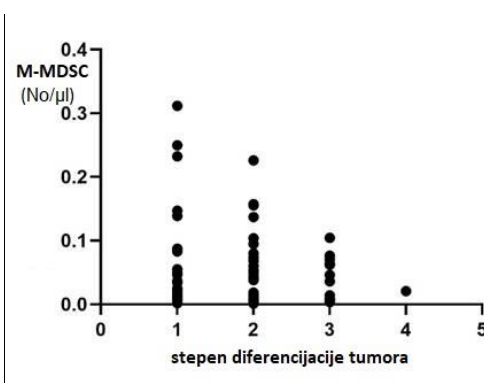
B



C



D



Slika 4.7.1. Spearmanovi koeficijenti korelacije između MDSC i stepena diferencijacije kod bolesnika sa CRC za (A) relativan broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/μl), (C) relativan broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/μl)

4.8. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na limfoidnu, vensku i perineuralnu invaziju

Ispitivanjem se pokušala odrediti povezanost između invazije limfoidnih, venskih i perineuralnih struktura i zastupljenosti MDSC. Podaci o eventualno prisutnoj invaziji su dobijeni od strane patologa nakon operativnog lečenja pacijenata. Deskriptivni prikaz je dat u tabeli 4.8.1.

	Limfoidna invazija				Venska invanzija				Perineuralna invazija			
	PMN-MDSC (%)	PMN-MDS (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
N (prisutna invazija):	36	36	35	35	11	11	11	11	20	20	19	19
Sr.vrednost	3.04	0.24	0.61	0.04	2.80	0.18	0.80	0.04	3.08	0.22	0.60	0.04
Mediana	2.57	0.19	0.17	0.02	3.07	0.19	0.30	0.02	2.60	0.17	0.16	0.01
SD	1.57	0.23	0.73	0.04	1.13	0.07	0.92	0.04	1.48	0.14	0.78	0.05
Minimum	0.82	0.06	0.05	0.00	1.09	0.10	0.05	0.00	1.09	0.10	0.02	0.00
Maksimum	6.36	1.35	2.44	0.16	4.34	0.32	2.44	0.14	5.90	0.53	2.36	0.16
N (bez prisutne invazije):	24	24	24	24	49	49	48	48	40	40	40	40
Sr.vrednost	2.54	0.16	0.56	0.04	2.85	0.21	0.54	0.04	2.72	0.20	0.58	0.04
Mediana	1.88	0.12	0.36	0.02	2.18	0.14	0.20	0.01	2.09	0.14	0.29	0.02
SD	1.93	0.14	0.60	0.05	1.84	0.22	0.61	0.05	1.84	0.22	0.64	0.05
Minimum	0.51	0.03	0.02	0.00	0.51	0.03	0.02	0.00	0.51	0.03	0.03	0.00
Maksimum	7.93	0.67	1.98	0.23	7.93	1.35	2.29	0.23	7.93	1.35	2.44	0.23

Tabela 4.8.1. Deskriptivna statistička analiza za limfoidnu, vensku i perineuralnu invaziju

U nastavku rada cilj je da se testira da li je uočana razlika između pacijenata koji imaju neku od invazija statistički značajna u odnosu na ispitanike koji nemaju potvrđenu invaziju. Učinjeno je statističko testiranje za dva nezavisna uzorka Mann Whitney-ovim U testom. Na osnovu sprovedenih testova može se zaključiti da jedino statistički značajna razlika postoji kod prosečne apsolutne zastupljenosti PMN-MDSC između pacijenata koji imaju i nemaju limfoidnu invanziju (tabela 4.8.2.). U svim ostalim slučajevima ne postoji statistički značajna razlika između pacijenata.

	Limfoidna invazija				Venska invanzija				Perineuralna invazija			
	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
p-vrednost	0.0847	0.0333	0.8035	0.5149	0.6407	0.6647	0.4272	0.4708	0.1962	0.1868	0.7325	0.8282
Statistički značajno (za $\alpha=5\%$)	NE	DA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Tabela 4.8.2. P vrednosti za Mann Whitley test za razliku zastupljenosti MDSC između pacijenata koji imaju i nemaju neki od oblika invazije(* $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$; **** $p<0.00001$).

4.9. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na veličinu tumora

Naredni korak se odnosio na utvrđivanje eventualne linearne veze između veličine tumora merene u cm i zastupljenosti MDSC. S obzirom da pretpostavka normalnosti nije ispunjena izračunat je Spirmanov koeficijent korelacije i testirana njegova značajnost. Na osnovu dobijenih rezultata (videti tabelu 4.9.1.) zaključeno je da ne postoji linearna veza između posmatranih varijabli.

	veličina tumora i PNM-MDSC (%)	veličina tumora i PNM-MDSC (No/ μ l)	veličina tumora i M-MDSC (%)	veličina tumora i M-MDSC (No/ μ l)
Spearmanov koeficijent	0.01574	0.04405	-0.05988	-0.02976
P vrednost	0.892	0.7036	0.6073	0.7986

Tabela 4.9.1. Spearmanov koeficijent korelacije - korelacija MDSC sa veličinom tumora

Nepreciznost merenja može biti jedan od razloga gubitka ove veze, pa je testiranje nastavljeno tako što su ispitanici podeljeni u 2 grupe u odnosu na veličinu tumora (tumor veći ili manji od 5 cm). Za ovakvu podelu statistički podaci su dati u tabeli 4.9.2. Međutim, ni u ovoj podeli razlika između posmatranih grupa u odnosu na zastupljenost MDSC nije statistički značajna (p-vrednosti su 0.94 i 0.77 za relativne i apsolutne vrednosti PMN-MDSC i 0.81 i 0.92 za relativne i apsolutne vrednosti M-MDSC).

		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
Veličina tumora <5 cm< nema podataka	N	6	6	6	6
	Sr.vrednost	3.46	0.26	1.55	0.11
	Mediana	2.94	0.22	0.79	0.05
	SD	2.53	0.21	1.78	0.13
	Minimum	1.12	0.07	0.10	0.01
	Maksimum	8.26	0.61	4.35	0.31
<5 cm	N	40	40	39	39
	Sr.vrednost	4.40	0.34	0.65	0.05
	Mediana	2.73	0.19	0.30	0.02
	SD	5.11	0.44	0.71	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	30.14	2.43	2.57	0.26
>5 cm	N	37	37	37	37
	Sr.vrednost	4.13	0.40	0.62	0.05
	Mediana	3.23	0.21	0.30	0.02
	SD	3.58	0.77	0.74	0.06
	Minimum	0.51	0.03	0.05	0.00
	Maksimum	18.42	4.76	3.12	0.25

Tabela 4.9.2. Deskriptivni podaci za pacijente sa CRC veličine do 5 cm i preko 5 cm

4.10. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na lokalizaciju tumora

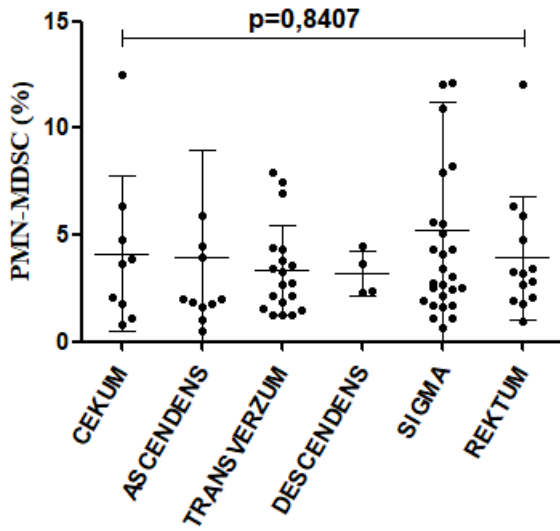
Tokom analiza CRC je prema anatomske lokalizaciji na kojoj je uočen podjeljen u 6 grupa (cecum, ascendentni kolon, transversum, descendentni kolon, sigma i rektum). Deskriptivna analiza je prikazana u tabeli 4.10.1.

Lokalizacija tumora		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
cecum	N	9.00	9.00	8.00	8.00
	Sr.vrednost	4.11	0.35	0.65	0.03
	Mediana	3.66	0.13	0.16	0.02
	SD	3.64	0.42	0.84	0.03
	Minimum	0.82	0.06	0.09	0.01
	Maksimum	12.52	1.35	2.36	0.08
ascendens	N	11.00	11.00	11.00	11.00
	Sr.vrednost	3.95	0.61	0.45	0.04
	Mediana	1.98	0.19	0.23	0.02
	SD	5.06	1.38	0.54	0.06
	Minimum	0.51	0.03	0.04	0.00
	Maksimum	18.42	4.76	1.87	0.16
transverzum	N	19.00	19.00	19.00	19.00
	Sr.vrednost	3.35	0.26	1.07	0.08
	Mediana	2.77	0.20	0.67	0.05
	SD	2.09	0.19	1.14	0.09
	Minimum	1.26	0.08	0.08	0.01
	Maksimum	7.90	0.79	4.35	0.31
descendens	N	4.00	4.00	4.00	4.00
	Sr.vrednost	3.21	0.20	0.53	0.04
	Mediana	3.02	0.19	0.50	0.03
	SD	1.05	0.11	0.51	0.04
	Minimum	2.30	0.10	0.06	0.00
	Maksimum	4.5	0.34	1.05	0.08
sigma	N	27.00	27.00	27.00	27.00
	Sr.vrednost	5.17	0.40	0.61	0.05
	Mediana	2.81	0.21	0.33	0.02
	SD	5.97	0.49	0.88	0.06
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	30.14	2.43	3.15	0.25
rektum	N	13.00	13.00	13.00	13.00
	Sr.vrednost	4.09	0.27	0.66	0.04
	Mediana	3.23	0.20	0.48	0.01
	SD	2.90	0.21	0.58	0.04
	Minimum	0.94	0.06	0.05	0.00
	Maksimum	12.02	0.80	1.56	0.10

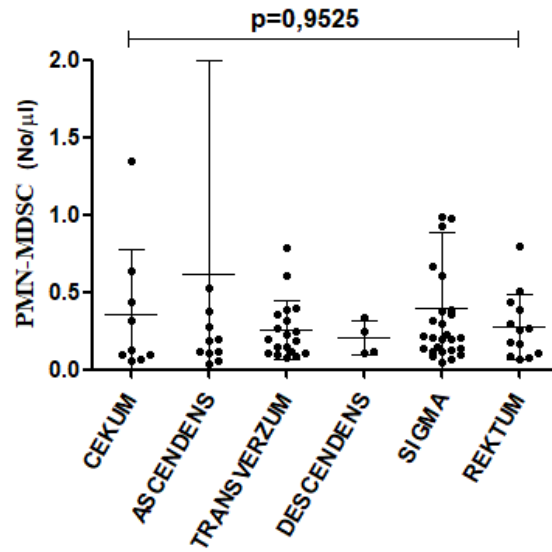
Tabela 4.10.1. Deskriptivni prikaz podataka kod pacijenata u odnosu na lokalizaciju CRC

Analizom PMN-MDSC i M-MDSC nije uočena statistički značajna razlika njihove zastupljenosti u zavisnosti od lokalizacije. Grafički prikaz rezultata Mann Whitney testa dat je na slici 4.10.1.

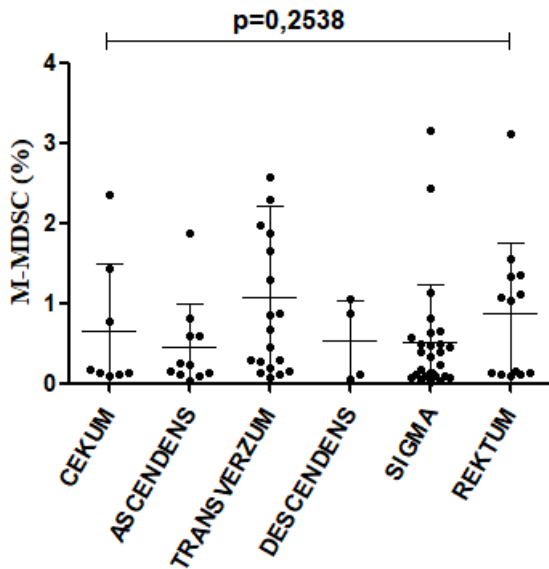
A



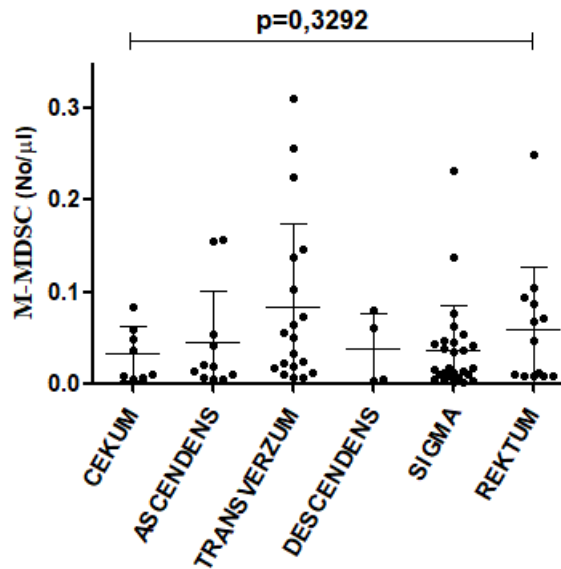
B



C



D



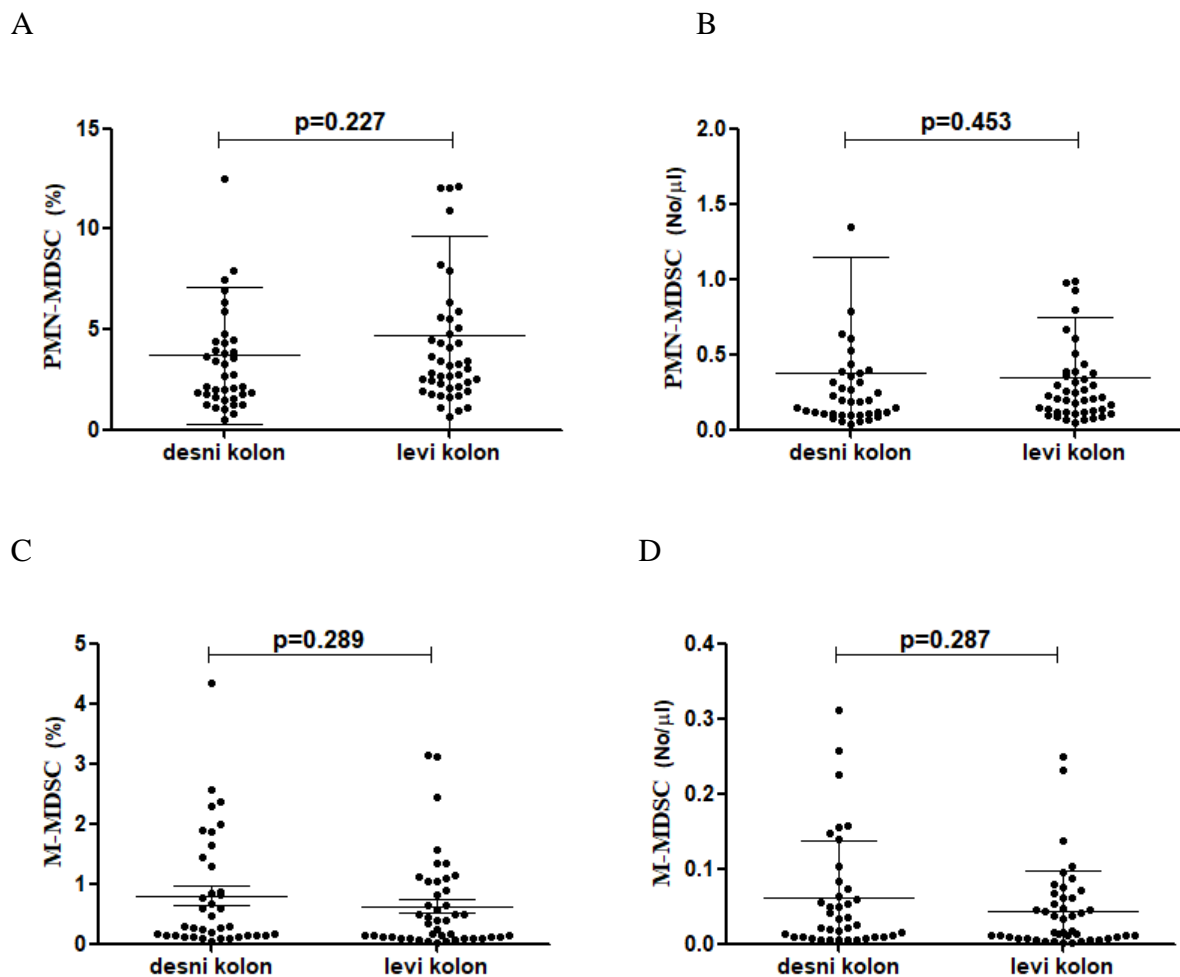
Slika 4.10.1. A-D Prikazan je odnos između lokalizacije CRC i (A) relativnog broja PMN-MDSC (%), (B) apsolutnog broja PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativnog broja M-MDSC (%), (D) apsolutnog broja M-MDSC (No/ μ l). Mann Whitney (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

Potom je napravljena podela koja se često primenjuje u kliničkoj praksi na 2 grupe. Prvu grupu su činili pacijenti sa tumorom na desnom kolonu (cecum, ascendens, proksimalne 2/3 transverzuma) dok su drugu grupu činili pacijenti sa tumorom na levom kolonu (distalna trećina transverzuma, descendens, sigma, rektum). Statistički podaci navedeni su u tabeli 4.10.2.

		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
desni kolon	N	39	39	38	38
	Sr.vrednost	3.69	0.38	0.80	0.06
	Mediana	2.69	0.19	0.30	0.03
	SD	3.42	0.76	0.96	0.08
	Minimum	0.51	0.03	0.04	0.00
	Maksimum	18.42	4.76	4.35	0.31
levi kolon	N	44	44	44	44
	Sr.vrednost	4.67	0.34	0.62	0.04
	Mediana	3.15	0.21	0.36	0.02
	SD	4.95	0.41	0.76	0.05
	Minimum	0.68	0.04	0.02	0.00
	Maksimum	30.14	2.43	3.15	0.25

Tabela 4.10.2. Deskriptivna statistika zastupljenosti MDSC prema lokalizaciji (desni i levi kolon)

Na osnovu Kolmogorov-Smirnov testa uočava se da posmatrane varijable nemaju normalnu raspodelu i stoga je za statističko ispitivanje korišćen Mann-Whitney test. Na osnovu sprovedenog testa možemo zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u relativnoj i apsolutnoj zastupljenosti PMN-MDSC ($3.69 \pm 3.42 / 4.67 \pm 4.95$, $p=0.227$ i $0.28 \pm 0.76 / 0.34 \pm 0.41$, $p=0.453$, redom dok je za apsolutnu zastupljenost p vrednost 0.437) prilikom ove podele. Slično, ne postoji statistički značajna razlika ni u zastupljenosti relativnih i apsolutnih vrednosti M-MDSC vezano za lokalizaciju tumora ($0.80 \pm 0.96 / 0.62 \pm 0.76$, $p=0.289$ i $0.06 \pm 0.08 / 0.04 \pm 0.05$, $p=0.287$, redom). Grafički prikaz rezultata testa dat je na slici 4.10.2.



Slika 4.10.2. A-D Prikaz rezultata za Mann-Whitney test o testiranju različite zastupljenosti MDSC u zavisnosti od lokalizacije tumora (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

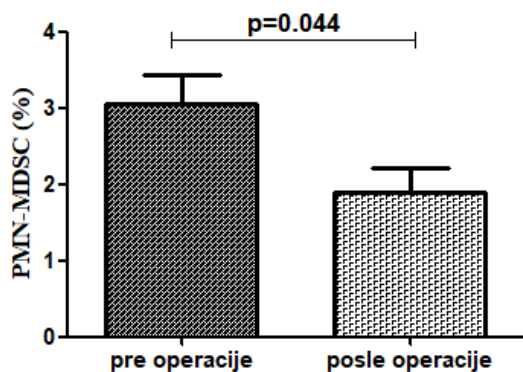
4.11. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC pre i posle hirurškog lečenja pacijenata

Učinjenim ispitivanjem su obuhvaćeni pacijenti sa dijagnostikovanim CRC koji su operativno lečeni. Prvi uzorak krvi je uzet bolesnicima neposredno pre hirurške intervencije, a drugi uzorak četiri do šest nedelja po učinjenoj operaciji tumora. Ispitivanje je učinjeno kod 25 bolesnika. Osnovne karakteristike vrednosti MDSC pre i nakon operacije date su u tabeli 4.11.1, a grafički prikaz na slici 4.11.1.

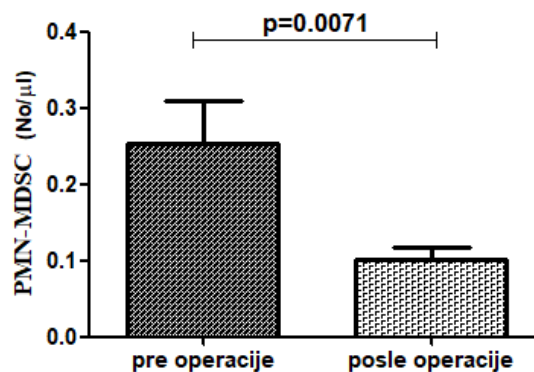
Uzorci periferne krvi		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
Pre operacije	N	25	25	25	25
	Sr.vrednost	3.05	0.25	0.55	0.04
	Mediana	2.52	0.14	0.17	0.02
	SD	1.92	0.28	0.70	0.04
	Minimum	0.99	0.06	0.02	0.00
	Maksimum	7.93	1.35	2.44	0.15
Nakon operacije	N	25	25	25	25
	Sr.vrednost	1.88	0.10	0.38	0.02
	Mediana	1.46	0.08	0.21	0.02
	SD	1.65	0.08	0.47	0.03
	Minimum	0.21	0.01	0.02	0.00
	Maksimum	5.85	0.32	1.64	0.11

Tabela 4.11.1. Deskriptivni prikaz statističkih podataka uzoraka periferne krvi kod bolesnika sa CRC pre i posle operacije

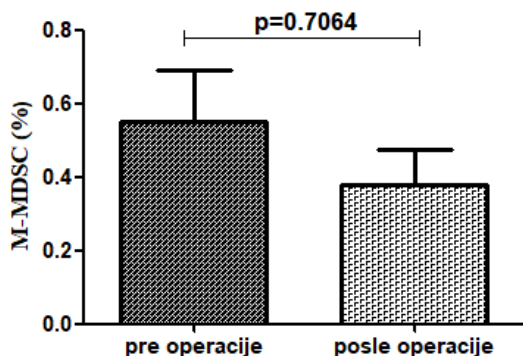
A



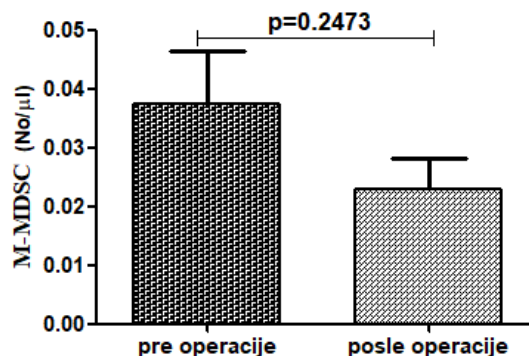
B



C



D



Slika 4.11.1. A-D Zastupljenost procentualnih i apsolutnih vrednosti PMN-MDSC i M-MDSC pre i posle operacije; Wilcoxon-ov test (Mean+SEM)

I ako se očekivalo značajno statističko smanjenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja kod obe subpopulacije MDSC, prema Wilcoxon-ovom testu analizom je uočeno statistički značajno smanjenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC ($3.05 \pm 1.92 / 1.88$, $0.25 \pm 0.28 / 0.10 \pm 0.08$, $p < 0.0071$, redom), ali ne i M-MDSC ($0.55 \pm 0.70 / 0.38 \pm 0.47$, $p = 0.7064$ i $0.04 \pm 0.04 / 0.02 \pm 0.03$, $p = 0.2473$, redom).

4.12. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC kod zdravih osoba i pacijenata sa CRC nakon učinjenog hirurškog lečenja

Bilo je interesantno razmotriti da li se zastupljenost MDSC kod bolesnika sa CRC nakon operativnog uklanjanja tumora vraća na nivo zastupljenosti koji je prisutan kod zdravih osoba. U uzroku imamo 12 zdravih osoba i 25 osoba koje su operisane. Deskriptivni pregled statističkih podataka dat je u tabeli 4.12.1.

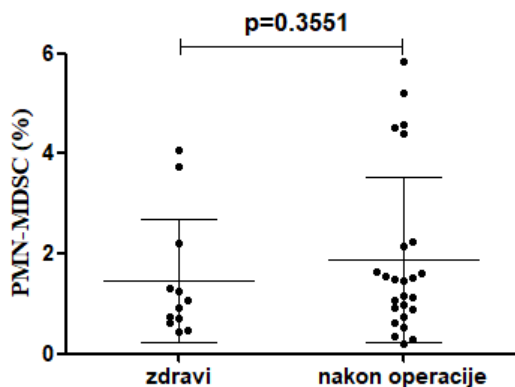
		PMN- MDSC (%)	PMN- MDSC (No/ μ l)	M- MDSC (%)	M- MDSC (No/ μ l)
zdravi (kontrolna grupa)	N	12	12	12	12
	Sr.vrednost	1.46	0.09	0.39	0.03
	Mediana	1.01	0.06	0.29	0.03
	Minimum	0.44	0.02	0.03	0.00
	Maksimum	4.07	0.31	1.05	0.07
	SD	1.24	0.09	0.33	0.02
ispitanici nakon hirurškog lečenja	N	25	25	25	25
	Sr.vrednost	1.88	0.10	0.38	0.02
	Mediana	1.46	0.08	0.21	0.02
	Minimum	0.21	0.01	0.02	0.00
	Maksimum	5.85	0.32	1.64	0.11
	SD	1.65	0.08	0.47	0.03

Tabela 4.12.1. Deskriptivna statistika za zastupljenost MDSC kod zdravih osoba i osoba nakon operacije

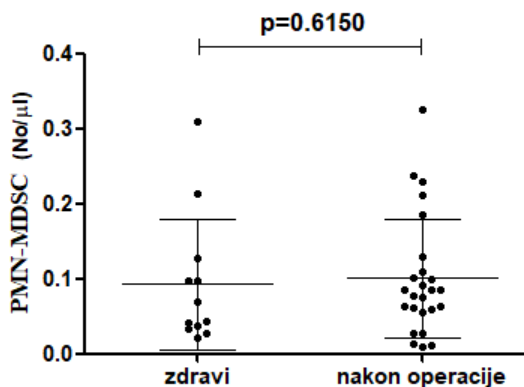
Na osnovu Kolmogorov Smironov testa zaključujemo da podaci ne prate normalnu raspodelu i stoga je ispitivanje rađeno na osnovu Mann Whitey-evog testa. Možemo zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika između zdravih i operisanih u zastupljenosti PMN-MDSC, ni za procentualne, ni apsolutne vrednosti ($1.46 \pm 1.24 / 1.88 \pm 1.65$, $p=0.3551$ i $0.09 \pm 0.09 / 0.10 \pm 0.08$ $p=0.615$, redom). Slično, ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti M-MDSC između kontrolne (zdravi) i tretirane grupe ($0.39 \pm 0.33 / 0.38 \pm 0.47$, $p=0.5163$ za procentualnu zastupljenost, a za apsolutnu zastupljenost $0.03 \pm 0.02 / 0.02 \pm 0.03$, $p=0.2494$). Grafički uvid dat je na slici 4.12.1.

A

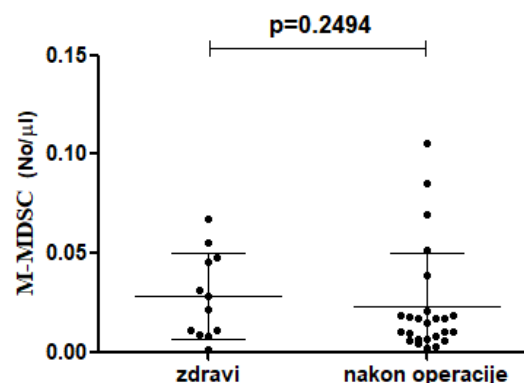
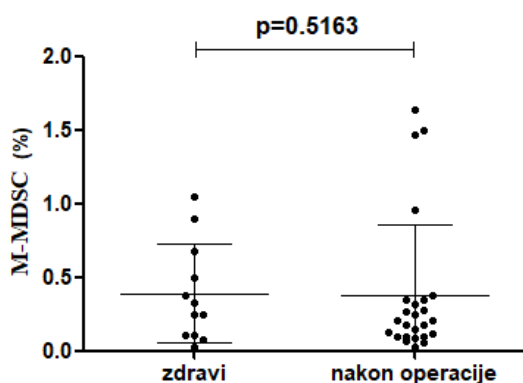
B



C



D



Slika 4.12.1. Rezultati Mann Whitney testa za ispitivanje razlika između zastupljenosti MDSC kod zdravih osoba i bolesnih ispitanika nakon operacije za (A) relativni broj PMN-MDSC (%), (B) apsolutni broj PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativni broj M-MDSC (%), (D) apsolutni broj M-MDSC (No/ μ l) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

4.13. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različite starosne dobi

CRC se kao i većina karcinoma češće javlja u starijoj životnoj dobi. Naredno ispitivanje je imalo za cilj da utvrdi da li postoji razlika u zastupljenosti MDSC u zavisnosti od starosne dobi. Sve pacijente smo podelili u dve grupe. Prvu su sačinjavale ispitanici koji imaju manje od 65 godina ($n=42$), a drugu grupu ispitanici preko 65 godina ($n=41$). Osnovna deskriptivna statistika za navedene grupe data je u tabeli 4.13.1.

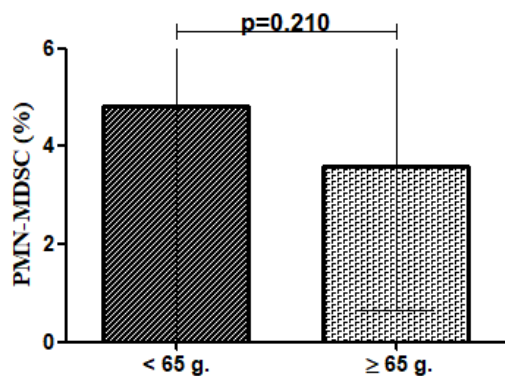
	PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
--	--------------	------------------------	------------	----------------------

< 65 g.	N	42	42	41	41
	Sr.vrednost	4.81	0.46	0.59	0.05
	Mediana	3.54	0.24	0.26	0.18
	SD	5.27	0.80	0.67	0.06
	Minimum	0.82	0.06	0.04	0.00
	Maksimum	30.14	4.76	2.57	0.26
≥ 65 g.	N	41	41	41	41
	Sr.vrednost	3.61	0.25	0.82	0.06
	Mediana	2.64	0.14	0.45	0.04
	SD	2.96	0.23	1.01	0.07
	Minimum	0.51	0.03	0.02	0.00
	Maksimum	12.52	0.99	4.35	0.31

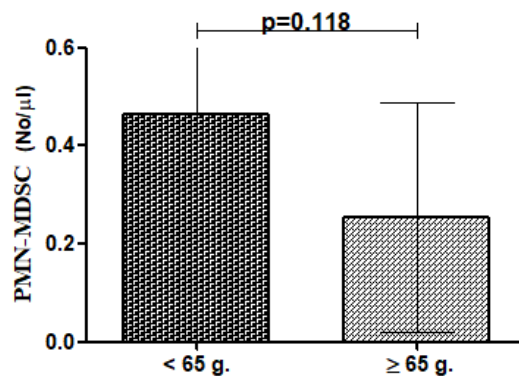
Tabela 4.13.1. Deskriptivna statistika za MDSC prema godinama starosti

Testiranje razlike u zastupljenosti MDSC između posmatranih starosnih grupa su izvršene Mann Whitney testom s obzirom na činjenicu da raspodela podataka ne odgovara normalnoj distribuciji. Na osnovu sprovedenog testa se može zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti PMN-MDSC ($4.81 \pm 5.27 / 3.61 \pm 2.96$, $p=0.210$ za procentualnu zastupljenost, dok je za apsolutnu zastupljenost $0.46 \pm 0.80 / 0.25 \pm 0.23$, $p=0.118$). Slično ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti M-MDSC za pacijente ovih starosnih grupa ($0.59 \pm 0.67 / 0.82 \pm 1.01$, $p=0.767$ i $0.05 \pm 0.06 / 0.06 \pm 0.07$, $p=0.860$, redom). Grafički prikaz rezultata dat je na slici 4.13.1.

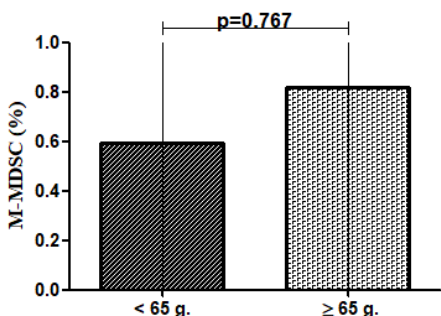
A



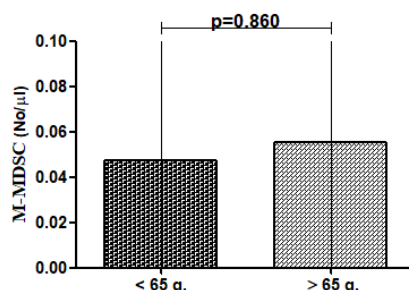
B



C



D



Slika 4.13.1. A-D. Prikaz rezultata za Mann-Whitney test koji je korišćen radi poređenje rezultata starosne dobi pacijenta i (A) relativnog broja PMN-MDSC (%), (B) apsolutnog broja PMN-MDSC (No/ μ l), (C) relativnog broja M-MDSC (%), (D) apsolutnog broja M-MDSC (No/ μ l) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$).

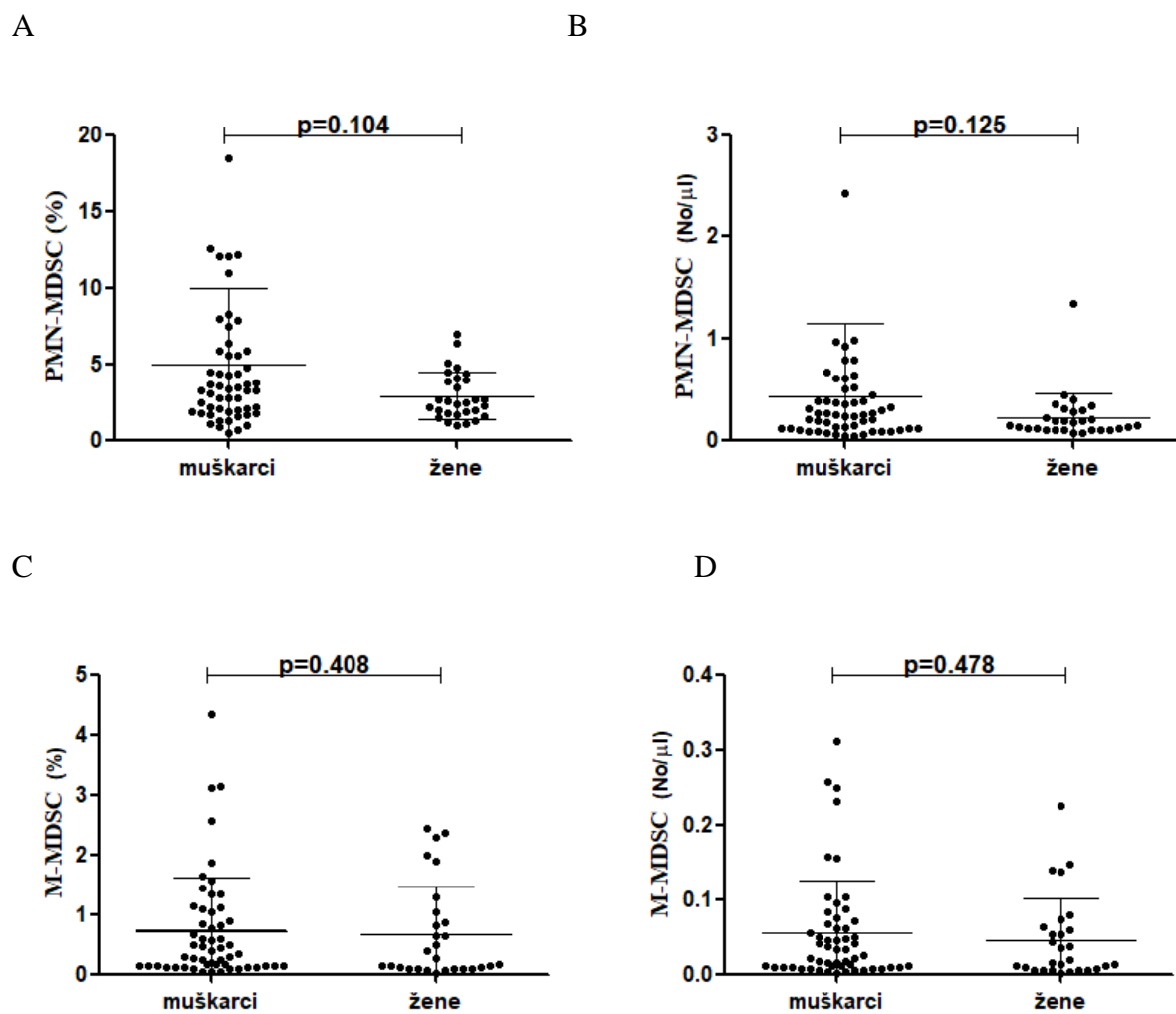
4.14. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog pola

Ispitivanje je obuhvatilo sve bolesnike sa CRC koji su podeljeni u 2 grupe u zavisnosti od pola. Kao što je poznato, CRC se češće javlja kod osoba muškog pola. U našem uzorku pacijenata sa CRC nalazi se 29 osoba ženskog pola i 54 osobe muškog pola. Uvidom u podatke dobijene deskriptivnom statistikom (tabela 4.14.1.) može se uočiti određena razlika između vrednosti aritmetičke sredine za PMN-MDSC za različite polove. Za tačan zaključak da li je ona statistički značajna potrebno je sprovesti statističko testiranje.

POL		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
ženski	N	29	29	29	29
	Sr.vrednost	2.90	0.23	0.67	0.05
	Mediana	2.49	0.15	0.22	0.02
	Minimum	0.94	0.06	0.02	0.00
	Maksimum	6.98	1.35	2.44	0.23
	SD	1.57	0.24	0.80	0.06
muški	N	54	54	54	54
	Sr.vrednost	4.92	0.43	0.72	0.05
	Mediana	3.32	0.25	0.37	0.03
	Minimum	0.51	0.03	0.03	0.00
	Maksimum	30.14	4.76	4.35	0.31
	SD	5.09	0.71	0.89	0.07

Tabela 4.14.1. Deskriptivna statistika za zastupljenost MDSC prema polu

Za testiranje razlike zastupljenosti MDSC prema polu koristimo neparametarski Mann-Whitney test. Na osnovu sprovedenog testiranja zaključujemo da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti MDSC kod različitih polova. Relevantni rezultati za procentualne i apsolutne vrednosti PMN-MDSC su $2.9 \pm 1.57 / 4.92 \pm 3.32$, $p=0.104$ i $0.23 \pm 0.24 / 0.43 \pm 0.71$, $p=0.125$, redom, a za M-MDSC su $0.67 \pm 0.80 / 0.72 \pm 0.89$, $p=0.408$ i $0.05 \pm 0.06 / 0.05 \pm 0.07$, $p=0.478$, redom. Dijagram sa prikazom dat je na slici 4.14.1.



Slika 4.14.1. A-D. Prikaz rezultata za Mann-Whitney test o testiranju različite zastupljenosti MDSC u zavisnosti od pola (prikaz mediane sa rangovima) u odnosu na (A) procentualnu zastupljenost PMN-MDSC (%), (B) apsolutnu zastupljenost PMN-MDSC (No/ μ l), (C) procentualnu zastupljenost M-MDSC (%), apsolutnu zastupljenost M-MDSC (No/ μ l). (* $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$; **** $p<0.00001$).

4.15. Korelacija BMI indeksa i zastupljenosti MDSC

U ovom delu rada je testirana veza između BMI i zastupljenosti MDSC. Najpre se testiranje odnosilo na sve ispitanike (i kontrolnu grupu i osobe sa CRC). Kako pretpostavka o normalnoj raspodeli podataka nije ispunjena za testiranje se koristi Spearmanov koeficijent, koji pripada grupi neparametarskih testova. Vrednost izračunatog koeficijenta je bliska 0, dok se na osnovu relevantnih p vrednosti može zaključiti da ne postoji statistički značajna veza između zastupljenosti MDSC i BMI. Za više detalja pogledati tabelu 14.15.1.

	BMI i PNM-MDSC (%)	BMI i PNM-MDSC (No/μl)	BMI i M-MDSC (%)	BMI i M-MDSC (No/μl)
Spearmanov koeficijent	-0.05109	-0.0827	0.02969	-0.00408
P vrednost	0.6286	0.4332	0.78	0.9694

Tabela 14.15.1. Spearmanov koeficijent korelacije sa testiranjem njegove statističke značajnosti (BMI i relativne i apsolutne vrednosti oba subtipa MDSC kod svih učesnika studije)

Potom je ispitivanje nastavljeno, odvajanjem kontrolne grupe iz istraživanja i korelacijom BMI i zastupljenosti oba subtipa MDSC kod bolesnika sa CRC bez obzira na stadijum bolesti kome su pripadali. Kako pretpostavka o normalnoj raspodeli podataka ni u ovom slučaju nije ispunjena za testiranje je ponovo korišćen Spearmanov koeficijent. Vrednost izračunatog koeficijenta je i ovaj put bila bliska 0, a na osnovu relevantnih p vrednosti je konstatovano da ne postoji statistički značajna veza između zastupljenosti MDSC i BMI. Pikaz je dat u tabeli 14.15.2.

	BMI i PNM-MDSC (%)	BMI i PNM-MDSC (No/μl)	BMI i M-MDSC (%)	BMI i M-MDSC (No/μl)
Spearmanov koeficijent	-0.05747	-0.0568	0.1026	0.1144
P vrednost	0.6103	0.6145	0.3652	0.3122

Tabela 14.15.2. Spearmanov koeficijent korelacije sa testiranjem njegove statističke značajnosti (BMI i relativne i apsolutne vrednosti oba subtipa MDSC kod osoba sa CRC)

4.16. Korelacija zastupljenosti MDSC sa faktorima upale i tumorskim markerima

Za ispitivanje postojanja veze između MDSC i faktora upale, odnosno tumorskih makera korišćen je Spirmanov test. Skoro kod svih posmatranih kombinacija varijabli postoji umerena

pozitivna korelacija (pogledati tabelu 4.16.1.). Izuzetak je veza između relativnog i apsolutnog broja M-MDSC i CA 19.9 koja se pokazala da nije statistički značajna.

		PMN-MDSC (%)	PMN-MDSC (No/ μ l)	M-MDSC (%)	M-MDSC (No/ μ l)
SE	Spearmanov koeficijent	0,451	0,454	0,324	0,345
	P vrednost	<0.0001	<0.0001	0.0018	0.0009
CRP	Spearmanov koeficijent	0.4939	0.4971	0.3335	0.3799
	P vrednost	<0.0001	<0.0001	0.0012	0.0002
Fibrinogen	Spearmanov koeficijent	0,475	0,463	0,259	0,276
	P vrednost	<0.0001	<0.0001	0.0131	0.008
CEA	Spearmanov koeficijent	0.37	0.321	0.3725	0.3541
	P vrednost	0.0003	0.0019	0.0003	0.0006
Ca 19.9	Spearmanov koeficijent	0.2274	0.2087	0.0678	0.05268
	P vrednost	0.0284	0.0447	0.5208	0.618

Tabela 4.16.1. Vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije uz testiranje njegove statističke značajnosti

4.17. Korelacija između PMN-MDSC, M-MDSC i preživljavanja (Overall survivor OS)

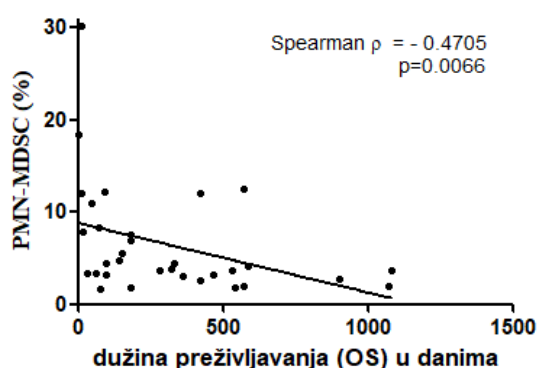
Tokom trogodišnjeg praćenja selektovani su pacijenti u III i IV stadijumu bolesti prema AJCC klasifikaciji. Podaci su bili relevantni za 32 bolesnika. Iz ispitivanja su bili isključeni oni pacijenti čiji uzrok smrti nije bio povezan sa CRC. Istraživanjem je uočeno da pacijenti sa kraćim preživljavanjem imaju veću procentualnu zastupljenost i apsolutni broj PMN-MDSC. Drugim rečima, Spearmanov koeficijent korelacije pokazuje umereno negativnu linearnu vezu između broja dana koje pacijent preživi i zastupljenosti MDSC. Analizom je dokazano da su pacijenti

koji su imali veću zastupljenost procentualnih ili apsolutnih vrednosti PMN-MDSC imali kraće preživljavanje ($p < 0,0066$ za procentualnu zastupljenost PMN-MDSC i $p < 0,0013$ za apsolutni broj PMN-MDSC). Kada su u pitanju M-MDSC statistička značajnost je primećena samo kod apsolutnog broja M-MDSC ($p < 0,0119$) (tabela 4.17.1., slika 4.17.1.).

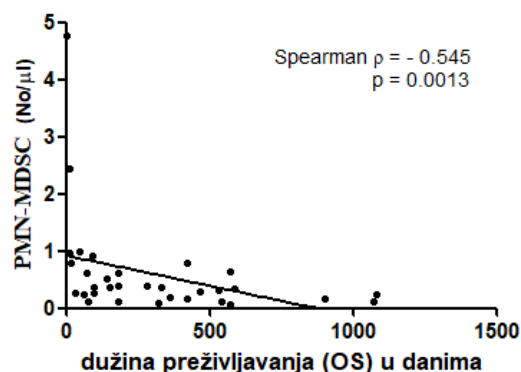
	OS (dani) i PNM-MDSC (%)	OS (dani) i PNM-MDSC (No/ μ l)	OS (dani) i M-MDSC (%)	OS (dani) i M-MDSC (No/ μ l)
<i>Spearmanov koeficijent</i>	-0.4705	-0.545	-0.3081	-0.4394
<i>P vrednost</i>	0.0066	0.0013	0.0863	0.0119

Tabela 4.17.1. Spearmanov koeficijent korelacije između PMN-MDSC i M-MDSC i OS kod bolesnika u III i IV stadijumu CRC prema AJCC klasifikaciji

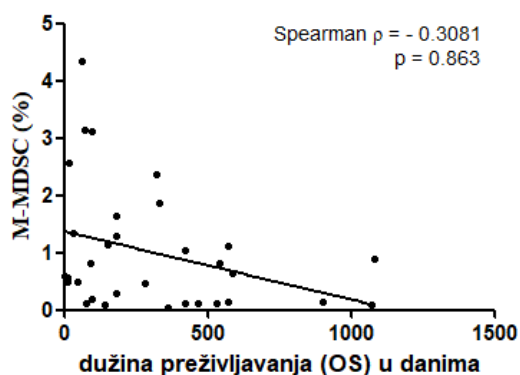
A



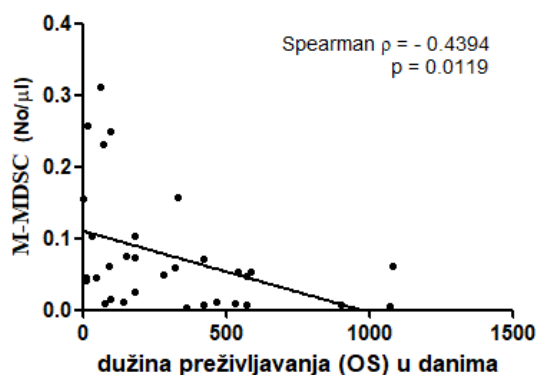
B



C



D



Slika 4.17.1. Prikaz procentualne i apsolutne zastupljenosti PMN-MDSC (slika A i B) i M-MDSC (slika C i D) u odnosu na dužinu preživljavanja osoba - Spearman

Potom smo pratili preživljavanje samo kod bolesnika u IV stadijumu CRC. Ispitivanje je obuhvatilo 27 bolesnika. I ovim istraživanjem se zapaža negativna statistička veza između preživljavanja i zastupljenosti MDSC. Primetno je da je kraće preživljavanje bolesnika povezano sa većim procentualnim i apsolutnim vrednostima PMN-MDSC ($p=0.0311$ i $p=0.0101$ redom), kao i većim apsolutnim brojem M-MDSC ($p=0.0224$) (tabela 4.17.2).

	OS (dani) i PNM-MDSC (%)	OS (dani) i PNM-MDSC (No/ μ l)	OS (dani) i M-MDSC (%)	OS (dani) i M-MDSC (No/ μ l)
<i>Spearmanov koeficijent</i>	-0.4155	-0.4865	-0.3035	-0.4376
<i>P vrednost</i>	0.0311	0.0101	0.1238	0.0224

Tabela 4.17.2. Spearmanov koeficijent korelacije između PMN-MDSC i M-MDSC i OS kod bolesnika u IV stadijumu CRC prema AJCC klasifikaciji

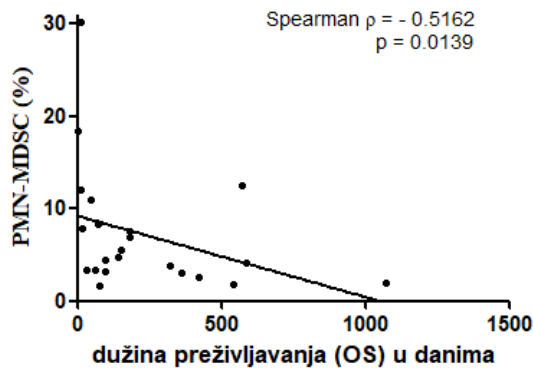
Da bi proverili da li je eventualna primena hemioterapije kod bolesnika u IV stadijumu bolesti prema AJCC klasifikaciji imala uticaj na MDSC i preživljavanje iz grupe pacijenata smo isključili one koji su bili podvrgnuti ovoj vrsti lečenja nakon uzimanja uzoraka krvi za određivanje MDSC. Potom smo analizirali preživljavanje kod 22 preostala pacijenta koja nisu primala hemioterapiju niti su bila izložena eventualnoj zračnoj terapiji (tabela 4.17.3, slika 4.17.2). Može se primetiti da je i u ovom slučaju Spearmanov koeficijent korelacije pokazao umereno negativnu linearnu vezu između broja dana koje pacijent preživi i zastupljenosti MDSC. Kod pacijenata kod kojih su obe subpopulacije PMN-MDSC bile više zastupljene registrovano je kraće preživljavanje ($p=0.0139$ i $p=0,0029$). Takva veza je uočena samo kod apsolutnog broja M-MDSC ($p=0.0183$).

	OS (dani) i PNM-MDSC (%)	OS (dani) i PNM-MDSC (No/ μ l)	OS (dani) i M-MDSC (%)	OS (dani) i M-MDSC (No/ μ l)
<i>Spearmanov koeficijent</i>	-0.5162	-0.6043	-0.3431	-0.4982
<i>P vrednost</i>	0.0139	0.0029	0.1180	0.0183

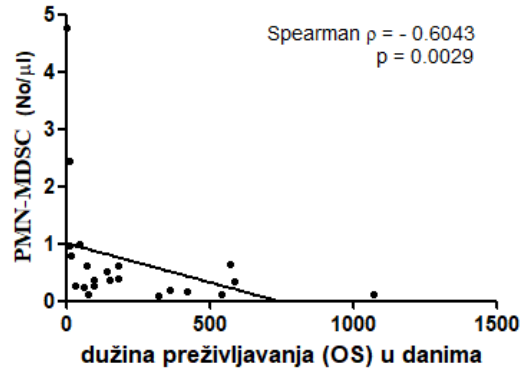
Tabela 4.17.3. Spearmanov koeficijent korelacije između PMN-MDSC i M-MDSC i OS kod bolesnika u IV stadijumu CRC koji nisu primali hemio ili radioterapiju tokom lečenja

A

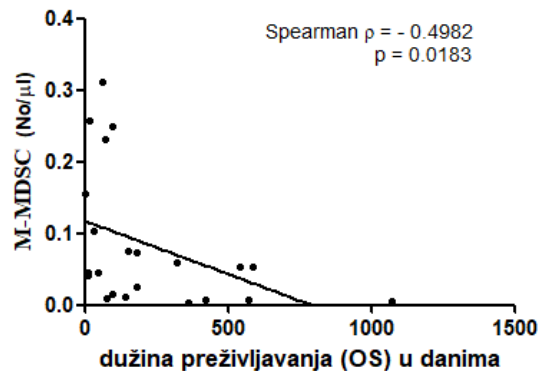
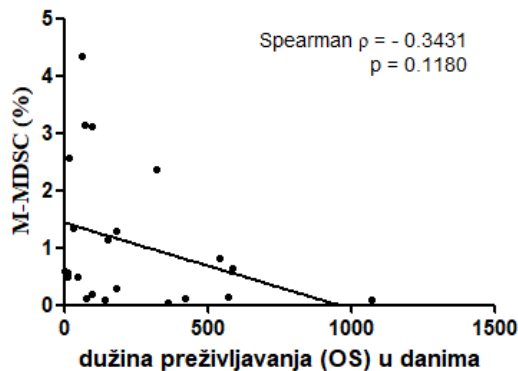
B



C



D



Slika 4.17.2. Prikaz procentualne i apsolutne zastupljenosti PMN-MDSC (slika A i B) i M-MDSC (slika C i D) u odnosu na dužinu preživljavanja osoba koje nisu bile izložene hemio i radioterapiji tokom lečenja CRC

4.18. Korelacija između OS i drugih parametara (NLR; LMR; Neu/PMN-MDSC; M/M-MDSC)

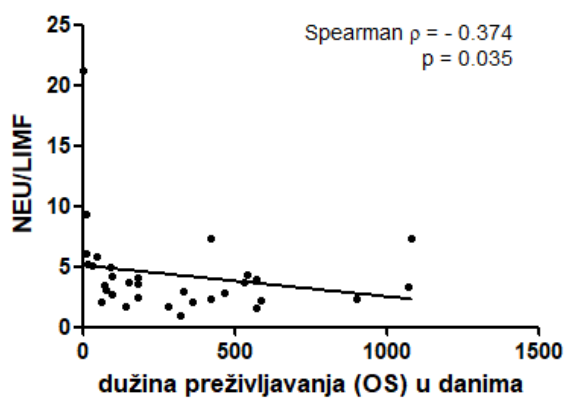
Ispitanici su praćeni tokom 36 meseci od dana uzimanja prvog uzorka krvi. Da bismo utvrdili da li postoji određena veza između dužine preživljavanja i odnosa Neu/Limf (NLR), Limf/Mono (LMR), Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC računali smo Spearmanove koeficijente korelacije i testirali njihovu značajnost. Utvrđena je umereno pozitivna korelacija između dužine preživljavanja i Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC odnosa, što ukazuje da što je veća vrednost ovog odnosa, produžava se i dužina života pacijenta. Postoji umereno negativna korelacija između dužine života i Neu/Limf odnosa, odnosno povećanjem vrednosti NLR se smanjuje

dužina života. Nije utvrđena korelacija između LMR i dužine preživljavanja (tabela 4.18.1. i slika 4.18.1.).

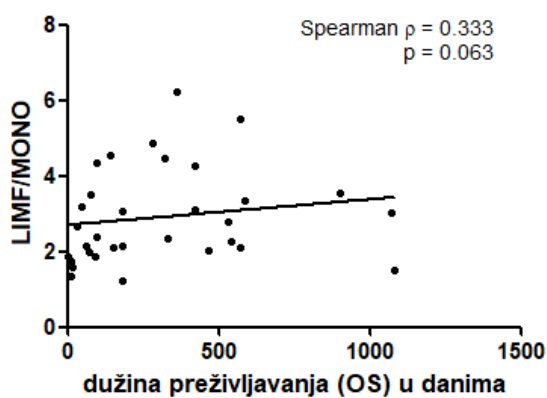
	OS (dani) i Neu/Limf	OS (dani) i Limf/Mono	OS (dani) i Neu/PMN-MDSC	OS (dani) i M/M-MDSC
Spearmanov koeficijent	-0.374	0.333	0.456	0.427
P vrednost	0.035	0.063	0.009	0.015

Tabela 4.18.1. Spearmanov koeficijent korelacije između OS i različitih markera preživljavanja

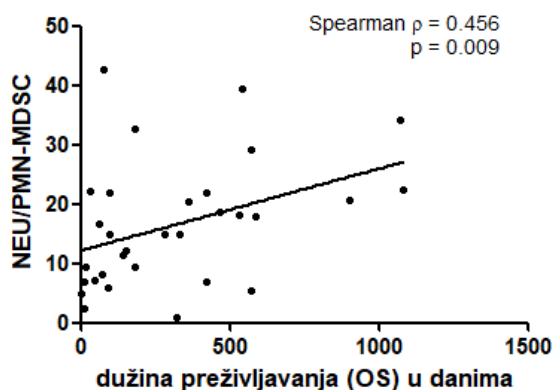
A



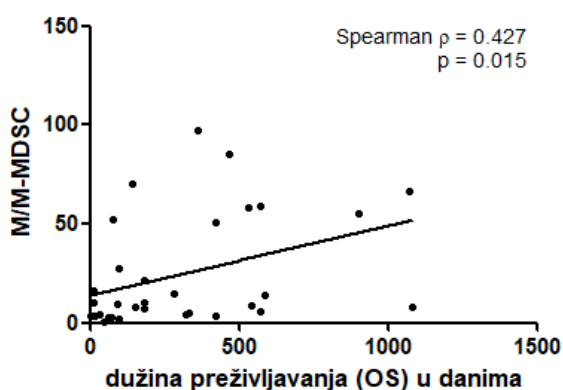
B



C



D

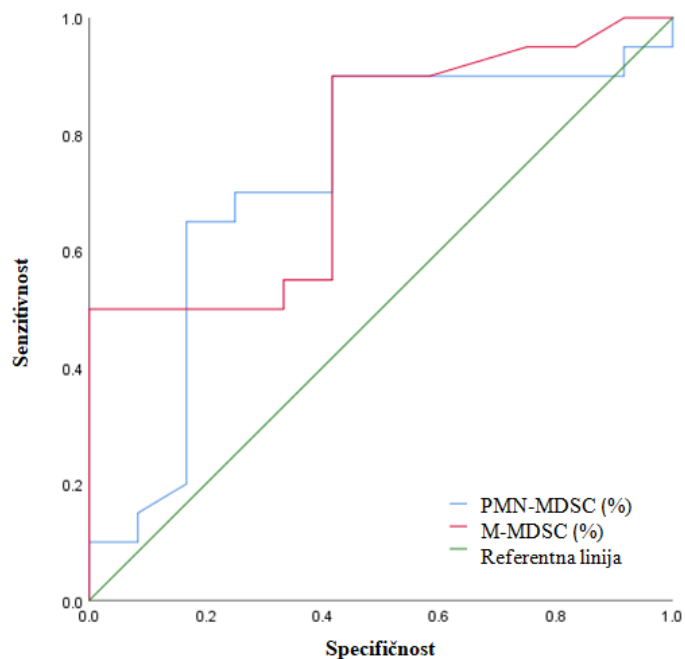


Slika 4.18.1. Grafički prikaz korelacije OS i (A) NLR, (B) LMR, (C) Neu/PMN odnosa i (D) M/M-MDSC odnosa

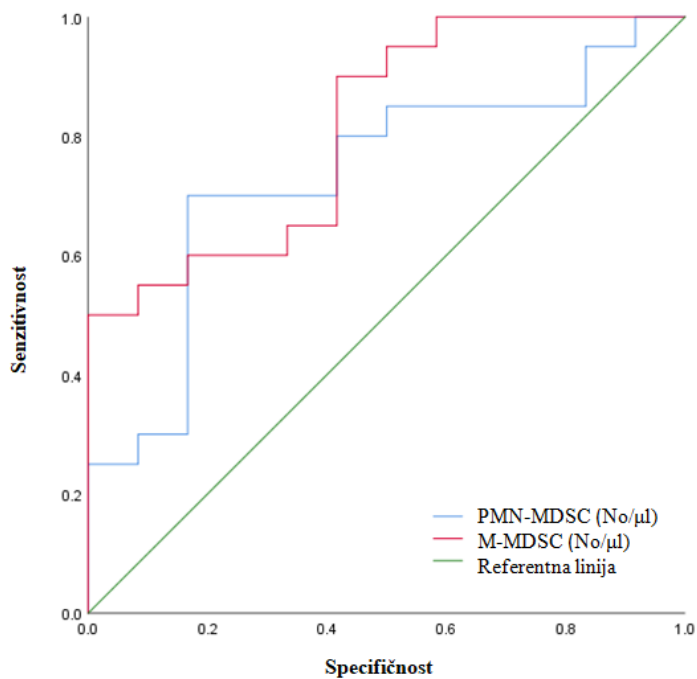
4.19. Klinička tačnost broja i procentualne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC i odnosa NLR, LMR, Neu/ PMN-MDSC i M/ M-MDSC u predviđanju ishoda bolesti

Rezultati korelacione analize koji su predstavljeni u odeljcima 4.17 i 4.18 sugerišu da postoji statistički značajna veza između apsolutnog broja i procentualne zastupljenosti PMN-MDSC, M-MDSC i nekoliko drugih parametara (NLR, Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC) i vremena preživljavanja pacijenata kod kojih je utvđena bolest u III i IV stadijumu prema AJCC klasifikaciji. Oslanjajući se na te rezultate, u sledećem koraku ispitivana je klinička tačnost ovih parametara u predviđanju ishoda bolesti ocenjivanjem ROC kriva i Cox-ovog regresionog modela. Uzorkom je obuhvaćeno 32 pacijenta koji su za potrebe izvođenja analize preživljavanja podeljeni u dve grupe: u prvoj se nalazilo 20 pacijenata kod kojih je smrtni ishod nastupio tokom 12 meseci od prvog uzimanja uzorka krvi, dok je u drugoj grupi bilo 12 pacijenata čije je vreme preživljavanja bilo duže od godinu dana. Za proveru robustnosti dobijenih ocena razmatran je i šestomesečni referentni period (tokom kojeg je preminulo 14 pacijanata, dok je za 18 vreme preživljavanja bilo duže od 6 meseci) i dobijeni rezultati bili su statistički konzistentni, osim u slučaju prognostičke moći parametra NLR.

Diskriminativna moć broja i procentualne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC u predviđanju smrtnog ishoda bolesti pokazala se kao statistički značajna u oba slučaja. ROC krive prikazane su na slikama 4.19.1. i 4.19.2., a sumarni rezultati statističke analize u tabeli 4.19.1. Ocenjena ROC kriva za apsolutni broj PMN-MDSC i M-MDSC sugeriše da je njihova moć predviđanja 73% i 81% respektivno (površina ispod ROC krive, *AUC*) i statistički je značajna ($p < 0,05$). Izračunate vrednosti Youden-ovog indeksa takođe su zadovoljavajuće i na osnovu njih su ocenjene granične vrednosti (*cut-off*) ovih parametara. ROC kriva za procentualnu zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC ukazuje na dobru i statistički značajnu prognostičku moć ovih parametara – 72% i 76% respektivno. Vrednosti Youden-ovog indeksa su i u ovom slučaju na nivou od oko 0,5 pa su izračunate njihove odgovarajuće granične vrednosti (tabela 4.19.1).



Slika: 4.19.1. ROC kriva za procentualnu zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC

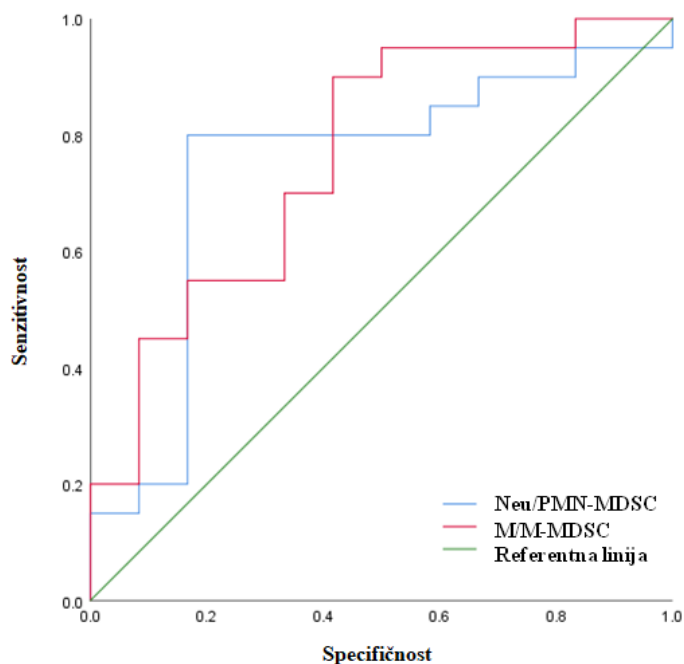


Slika 4.19.2. ROC kriva za apsolutni broj PMN-MDSC i M-MDSC

Parametar	AUC	p-vrednost	95% interval poverenja		Granična vrednost (<i>cut-off</i>)	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youden-ov indeks
			Donja granica	Gornja granica				
Broj PMN-MDSC	0.7333	0.0293	0.55	0.91	0.3543	70.0	83.3	0.53
Broj M-MDSC	0.8125	0.0035	0.66	0.96	0.0718	50.0	100.0	0.50
% PMN-MDSC	0.7229	0.0373	0.53	0.92	3.2350	90.0	58.3	0.48
% M-MDSC	0.7604	0.0150	0.59	0.93	1.1300	50	100	0.50

Tabela 4.19.1. Klinička tačnost apsolutnog broja i procentalnog učešća PMN-MDSC i M-MDSC u predviđanju ishoda bolesti

Klinička tačnost odnosa Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC u predviđanju ishoda bolesti je takođe zadovoljavajuća i statistički značajna. Analizom ROC kriva (Slika 4.19.3.) utvrđeno je da moć predviđanja ovih parametara iznosi 74% odnosno 76%, i u oba slučaja je statistički značajna ($p < 0,05$). Ovu ocenu potvrđuju relativno visoke vrednosti Youden-ovog indeksa, na osnovu kojeg su izračunate granične vrednosti za ove parametra (tabela 4.19.2.).

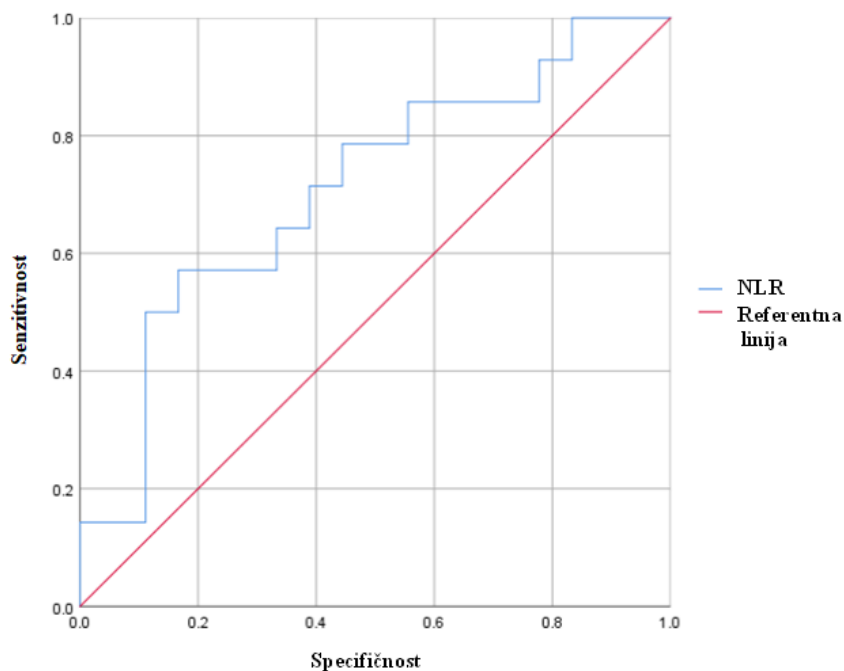


Slika 4.19.3. ROC kriva za odnos Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC

Parametar	AUC	p-vrednost	95% interval poverenja		Granična vrednost (cut-off)	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov indeks
			Donja granica	Gornja granica				
Neu/PMN-MDSC	0.7417	0.0240	0.55	0.93	17.3200	80.00	83.3	0.63
M/M-MDSC	0.7625	0.0142	0.59	0.94	38.9950	90.0	58.3	0.48

Tabela 4.19.2. Klinička tačnost odnosa Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC u predviđanju ishoda bolesti

Budući da je korelaciona analiza pokazala da postoji pozitivna veza između dužine preživljavanja pacijenata i odnosa Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC, dok je u slučaju NLR utvrđena negativna korelacija, ROC kriva za ovaj parametar je zasebno ocenjena (Slika 4.19.4.). Za razliku od prethodno analiziranih parametara kod kojih su dobijeni statistički konzistentni rezultati za oba referentna perioda, klinička tačnost odnosa NLR u predviđanju ishoda bolesti bila je zadovoljavajuća samo za kraći period i iznosi 71% ($p < 0,05$). U periodu posmatranja od godinu dana moć predviđanja opala je na 58% i nije bila statistički značajna (tabela 4.19.3.). Drugim rečima, vrednosti parametra NLR su se pokazale kao informativne u predviđanju ishoda bolesti tokom prvih šest meseci praćenja, ali klinička tačnost i pouzdanost predviđanja opada s produžavanjem perioda praćenja preživljavanja pacijenata.



Slika 4.19.4. ROC kriva za odnos NLR (referentni period 6 meseci)

Parametar	AUC	p-vrednost	95% interval poverenja		Granična vrednost (<i>cut-off</i>)	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov indeks
			Donja granica	Gornja granica				
NLR (6 meseci)	0.7103	0.0441	0.53	0.89	4.1750	57.1	83.3	0.40
NLR (12 meseci)	0.5792	0.4596	0.37	0.79	2.3650	80.0	58.3	0.22

Tabela 4.19.3. Klinička tačnost odnosa NLR u predviđanju ishoda bolesti u prvih 6/12 meseci

Proverena je i klinička tačnost odnosa LMR u predviđanju ishoda bolesti, ali dobijeni rezultati nisu bili statistički značajni. Ovaj rezultat je bio očekivan budući da ni korelaciona analiza nije pokazala da postoji statistički značajna veza između vrednosti ovog parametra i vremena preživljavanja pacijenata.

Dosadašnji rezultati sugerišu da su veze između procentualne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC, odnosno Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC, i vremena preživljavanja pacijenata statistički najrobustnije, zbog čega su detaljnije analizirane ocenjivanjem Cox-ovog regresionog modela. Obe regresije bile su statistički značajne ($\chi^2(2)=20,502$ i $p=0,000$; $\chi^2(2)=9,562$ i $p=0,008$), a ocenjeni koeficijenti i racio rizika (*Hazard ratio*) prikazani su u tabelama 4.19.4. i 4.19.5.

	Koeficijent (B)	p-vrednost	Racio rizika	95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
% PMN-MDSC	0.167	0.000	1.181	1.080	1.292
% M-MDSC	0.661	0.003	1.937	1.248	3.006

Tabela 4.19.4. Cox regresiona analiza za procentualnu zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC

U slučaju procentualne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC ocenjeni regresioni koeficijenti (B) su statistički značajni ($p<0,05$) i očekivano imaju pozitivan predznak. Naime, s rastom vrednosti ovih parametara povećava se verovatnoća smrtnog ishoda bolesti, odnosno kraći je očekivani period preživljavanja. To potvrđuju vrednosti racija rizika iznad 1. Konkretno, dobijeno

je da rast procentualne zastupljenosti PMN-MDSC za jednu jedinicu povećava verovatnoću smrtnog ishoda za 18,1%, dok se s povećanjem procentualne zastupljenosti M-MDSC za jednu jedinicu verovatnoća smrtnog ishoda povećava za čak 93,7%.

U drugoj regresiji ocenjeni koeficijent uz M/M-MDSC je statistički značajan ($p < 0,05$), dok bi koeficijent uz Neu/PMN-MDSC bio značajan tek na nivou statističke značajnosti $\alpha = 0,10$ ($p = 0,098$) (Tabela 4.19.5). Ocenjeni model stoga nije sasvim zadovoljavajuć iz statističkog ugla i dobijene rezultate je neophodno oprezno tumačiti. Međutim, može da posluži kao indikativna potvrda prethodnih zaključaka u ovom istraživanju, jer je čitava regresija statistički značajna i regresioni koeficijenti imaju dobar predznak. Naime, negativna vrednost regresionih koeficijenata uz ove parametre potvrđuje ranije iznet zaključak da su vrednosti Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC negativno korelisani s verovatnoćom pojave smrtnog ishoda (odnosno pozitivno s vremenom preživljavanja pacijenata). Ocenjene vrednosti odnosa rizika sugerišu da povećanje odnosa Neu/PMN-MDSC za jednu jedinicu smanjuje verovatnoću smrtnog ishoda za 4%, dok rast odnosa M/M-MDSC za jednu jedinicu umanjuje verovatnoću smrtnog ishoda za oko 2,5%.

	Koeficijent (B)	p-vrednost	Racio rizika	95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
Neu/PMN-MDSC	-0.041	0.098	0.960	0.915	1.008
M/M-MDSC	-0.026	0.038	0.974	0.951	0.999

Tabela 4.19.5. Cox regresiona analiza za odnose Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC

5. DISKUSIJA

Najraniji opis karcinoma potiče iz oko 1600 g. p.n.e. iz starog Egipta (Edwin Smith papirus), a prvi uočeni karcinomi su viđeni na ostacima mumija u vidu osteosarkoma (124). Smatra se da je karcinom tada bio jedan od ređih razloga letalnog ishoda. Danas karcinom predstavlja vodeći uzrok smrti savremenog čoveka, zbog čega mnogi istraživači pokušavaju da pomere granice njegovog lečenja. Trenutni naponi su usmereni na više polja sa zajedničkim ciljem da se CRC što bolje upozna kao i da se osmisli terapija koja bi ga efikasnije lečila. I ako predmet našeg israživanja nije bila primena terapije na bazi antitela koja modifikuju imuni odgovor (imunoterapija) i njen efekat na MDSC, sve je veći broj studija koje pokušavaju da uz pomoć MDSC utiču na ishod lečenja karcinoma. Tako ove ćelije postaju jedna od meta za efektivno terapijsko delovanje. Imunoterapija je danas najperspektivnija farmakoterapija u lečenju karcinoma, a ciljano MDSC imunoterapija pruža mogućnost da se nađe potencijalna slaba karika u složenom procesu nastanka, održanja i širenja karcinoma.

Jedan od mogućih razloga nedovoljne efikasnosti dosadašnje terapije je svakako mehanizam imunosupresije kome doprinose MDSC i Treg. MDSC predstavljaju heterogenu populaciju nezrelih ćelija imunog sistema nastalih od hematopoetskih stem ćelija čijom daljom evolucijom dolazi do razvoja zajedničkih mijeloidnih progenitorskih ćelija, a potom nezrelih mijeloidnih ćelija (IMC). Krajnjom diferencijacijom iz ovih ćelija u normalnim okolnostima nastaju granulociti, dendritske ćelije i monociti/makrofagi čija je uloga u zaštiti organizma od različitih patogena. Međutim, u slučaju prisustva karcinoma ili upale dolazi do pojačane proizvodnje i prekida sazrevanja IMC te povećanog stvaranja ćelija sa izraženim imunosupresivnim dejstvom – MDSC. Osim mijelopojeze koja se odvija u kostnoj srži, pojačana je i ekstramedularna hematopojeza, odnosno hematopojeza van kostne srži (125). Nakon „poziva“ od strane tumora, nezrele ćelije iz kostne srži mogu doći do periferije i aktivacijom ekstramedularno preći u MDSC. One nemaju mogućnost efikasnog obavljanja normalnih funkcija mijeloidnih ćelija. Smatra se da MDSC mogu nastati i kao posledica reprogramiranja već diferenciranih ćelija poput polimorfonuklearnih ćelija i monocita. Svi ovi mehanizmi dovode do povećanja broja MDSC, a mnogobrojni signali iz okruženja stimulišu njihovo stvaranje kao i prekid njihove dalje diferencijacije te njihovo održavanje u cirkulaciji i tkivu. Stimulacijom MDSC tumor pokušava da se zaštiti od imunog sistema domaćina. Preživljavanje MDSC u cirkulaciji i u TME je obično

1-2 dana, ali se ono može produžiti u uslovima teže inflamacije (126). Dosadašnja ispitivanja ovih ćelija kod CRC ukazala su na povećanje MDSC kako u cirkulaciji, tako i u samom tumorskom tkivu (127). Ipak, treba naglasiti su cirkulišuće MDSC indirektni pokazatelji koji ne moraju uvek u potpunosti da oslikavaju stanje u tumorskom mikrokruženju. U studiji Beaury-a i saradnika uočeno je da postoji homeostatska regulacija MDSC, te ako se dužina života ovih ćelija u cirkulaciji ili TME smanji kompenzatorno se povećava produkcija ovih ćelija u kostnoj srži (128). Iz praktičnih razloga ispitivanje MDSC u našem radu je učinjeno iz uzoraka periferne krvi. Izolacija MDSC iz tumorskog tkiva je dosta složeniji proces koji može doprineti još većoj heterogenosti prilikom određivanja ovih ćelija. Takođe, naša ideja je bila i da vrednosti MDSC prikažemo pre i posle operacije, kao i da procenimo njihov eventualni prognostički značaj, pa je logičnije bilo da se uzorak sa ovim ćelijama uzme i odredi na isti način. Pacijenti sa udaljenim metastazama nisu zahtevali hirurško lečenje, te je za njih komforniji način uzimanja uzoraka bio iz periferne krvi. S obzirom da su MDSC osetljive na spoljne agense kao što su zamrzavanje i odmrzavanje te duže stajanje uzoraka što za posledicu može imati gubitak ćelija (naročito PMN-MDSC), analize su vršene na svežim uzorcima lizirane, pune krvi (129, 139). Pre imunofenotipizacije kao i u većini drugih studija koje su proučavale MDSC najpre je učinjeno centrifugiranje uzorka krvi na gradijentu gustine, jer je pokazano da se ove ćelije zadržavaju u sloju mononuklearnih ćelija periferne krvi na gradijentu gustine (131). PMN-MDSC i M-MDSC su pokazale nisku gustinu tokom izdvajanja ćelija na gradijentu gustine za razliku od zrelih neutrofila i monocita. Međutim, i ova metoda ima izvesna ograničenja jer manji broj ćelija na niskom gradijentu može predstavljati i aktivirane neutrofile, a neke PMN-MDSC mogu se uočiti u grupaciji velike gustine (132).

Naša studija je obuhvatila 83 bolesnika sa CRC i 12 zdravih osoba koje su činile kontrolnu grupu. Da bi se ispitivanje započelo najpre je neophodno detektovati subtipove ovih ćelija.

5.1. Detekcija MDSC podgrupa

MDSC je heterogena populacija koja sadrži obeležja ćelija mijeloidnog porekla kojim nedostaju neki od markera zrelih ćelija. Najčešće govorimo o njihove dve podgrupe PMN-MDSC i M-MDSC. PMN-MDSC dele neke od fenotipskih i morfoloških osobina neutrofila, a M-MDSC monocita. Kod većine karcinoma prilikom određivanja ćelija dominiraju PMN-MDSC (80 %

MDSC čine PMN-MDSC) (50). Diferencijacija i fenotipska tipizacija MDSC kod miševa je lakša zahvaljujući postojanju Gr1 antigena, te su PMN-MDSC kod miševa okarakterisane kao CD11b+Gr-1^{high}, a M-MDSC kao CD11b+Gr-1^{int/low}. Kod ljudi je njihova diferencijacija otežana jer pokazuju različite fenotipske karakteristike. Zbog toga je od velikog značaja precizno identifikovati ove 2 subpopulacije ćelija. Identifikacija se vrši u više koraka na osnovu prisustva ili odsustva odgovarajućih CD molekula koje se nalaze na površini ćelija imunskog sistema. U našem radu, određivanjem ćelija koje su CD45⁺ izdvojili smo najpre ćelije hematopoeznog sistema. Potom su selektovane ćelije sa karakterističnom ekspresijom HLA-DR i CD11b molekula (HLA-DR^{-/low} CD11b⁺). Sledeći korak bio je razdvajanje od ćelija koje eksprimiraju karakteristične linijske markere, odnosno CD3 (marker prisutan na T ćelijama), CD19 (marker B ćelija) i CD56 (marker NK i NKT ćelija). Potom je učinjena selekcija na osnovu prisustva CD10 markera koji je važan za diferencijaciju između zrelih i nezrelih granulocita, a može se videti i kod nezrelih i zrelih B ćelija i limfoidnih progenitora. Selekcija je nastavljena na osnovu prisustva ekspresije CD16 molekula na površini ćelija koji je svojstven neutrofilima, NK ćelijama i makrofagima (17). A da bi razlikovali PMN-MDSC od M-MDSC korišćeni su CD14 (prisutni na M-MDSC) i CD15 (prisutni na PMN-MDSC) markeri. Tako su MDSC određene kao Lin⁻ (CD3⁻/CD19⁻/CD56⁻)/HLA-DR^{-/low} CD11b⁺ ćelije. PMN-MDSC populacija je na osnovu učinjenih ispitivanja određena kao HLA-DR^{-/low}CD10⁻CD11b⁺CD14⁻CD15⁺CD16^{low/int}CD33^{low}CD45^{low}Lin⁻(CD3⁻CD19⁻CD56⁻), a M-MDSC kao HLA-DR^{-/low}CD11b⁺CD14⁺CD15⁻CD16^{-/low}CD33^{low}CD45^{low}Lin⁻(CD3⁻CD19⁻CD56⁻). PMN-MDSC imaju neke zajedničke karakteristike sa neutrofilima, ali su fenotipski i funkcionalno različiti od njih. Fenotipska razlika između PMN-MDSC, neutrofila kao i eozinofila bazira se na osnovu ekspresije molekula CD16, CD11b, kao i CD10 na površini ćelija. CD10 marker se eksprimira samo na zrelim ćelijama neutrofila, a ostali prethodno navedeni markeri su kod PMN-MDSC imali nižu ekspresiju (133, 134). M-MDSC za razliku od monocita nemaju ili imaju blagu ekspresiju HLA-DR.

Postavlja se pitanje kako PMN-MDSC razlikovati od TAN kao i M-MDSC od TAM. Fenotipsko razlikovanje može biti samo donekle rešeno dodatnim bojenjem nekim od antitela. Ni funkcionalna ispitivanja nisu mogla u potpunosti definisati ove ćelije. Postoje i mišljenja da su TAN N2 ćelije koje imaju imunosupresivno i tumor promovišuće dejstvo u stvari PMN-MDSC (49). Nedavno je uočeno i postojanje jedne manje populacije ćelija sličnih MDSC (MDSC-LC)

koje nemaju supresivnu aktivnost i koje su nešto češće uočene u ranim stadijumima tumora ili hronične upale (135). Sve ovo govori u prilog složenosti jasnog definisanja MDSC kod ljudi, naročito ako ne postoji mogućnost korišćenja funkcionalnih testova. Zbog toga precizna identifikacija specifičnih markera za MDSC i dalje predstavlja izazov za istraživače.

Prilikom našeg istraživanja pažnja je bila prvenstveno usmerena na kvantifikaciji MDSC kod CRC na osnovu fenotipskih odrednica. Za definisanje ćelija korišćena je protočna citofluorimetrija. Rezultati Stanojevića i saradnika su ukazali na značajno nižu pozicioniranost PMN-MDSC u odnosu na zrele granulocite na bočnom detektoru (SS, enl. Side Scatter) uz pretpostavku da je to posledica hipogranuliranosti ili manje lobuliranosti jedara MDSC (136). Kod svih učesnika naše studije detektovane su obe MDSC subpopulacije, sa izuzetkom jedne pacijentkinje u IIIB stadijumu bolesti po AJCC klasifikaciji kod koje M-MDSC nisu identifikovane.

5.2. Poređenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja MDSC kod pacijenata sa CRC i zdravih osoba

MDSC populacija je prisutna u perifernoj krvi zdravih osoba, kao i kod osoba sa karcinomom. Na osnovu dosadašnjih učinjenih ispitivanja kod karcinoma dojke (137), pluća (138), cerviksa (139), melanoma (140), ali i kod mnogih drugih bolesti maligne prirode uočen je porast zastupljenosti ovih ćelija. Ni karcinomi gastrointestinalnog trakta ne odudaraju od ovog trenda. U studiji Jiao i saradnika utvrđeno je 15 puta veće prisustvo MDSC kod bolesnika sa karcinomom jednjaka u odnosu na zdravu populaciju (141), a u studiji Lia i saradnika dokazano je četverostruko povećanje MDSC kod pacijenata sa karcinomom želuca (142). Visoka zastupljenost MDSC uočena je i kod karcinoma žučnih puteva i pankreasa (143), hepatocelularnog karcinoma (HCC), ali i u ascitnoj tečnosti bolesnika sa cirozom jetre koji su/nisu imali HCC (144). Na osnovu pozitivnih LOX 1 receptora je uočeno da PMN-MDSC čine 4-15% svih neutrofila u krvi pacijenata sa karcinomom, a čak i do 40% neutrofila u uzorku tkiva tumora. Kod zdravih osoba ove ćelije predstavljaju <1 % neutrofila (46). Komparacijom MDSC između zdravih i osoba sa CRC takođe je uočena povišena vrednost ovih ćelija kod obolelih (127).

U našoj studiji koja je poredila procentualnu i apsolutnu vrednost cirkulišućih PMN-MDSC i M-MDSC kod bolesnika sa CRC i kontrolne grupe koju su činile zdrave osobe uočen je porast apsolutnog i procentualnog broja PMN-MDSC subpopulacije u odnosu na kontrolnu grupu.

Takođe, procentualne vrednosti PMN-MDSC nisu se razlikovale od prosečnih, standardnih vrednosti u drugim studijama kod osoba sa CRC. Povišen nivo MDSC je prezentovan i u radu Toor-a i saradnika (145). U istraživanju Hossaina i saradnika, kao i kod nas, uočeno je da su kod pacijenata sa CRC najveći deo MDSC u perifernoj krvi činile PMN-MDSC (146). Za M-MDSC, koje su činile manji deo ukupne populacije MDSC nije uočena statistička značajnost. Međutim, ima studija koje su ukazale da postoji porast kod obe vrste MDSC kod CRC (147).

Nedavno objavljena kohortna studija Ma i saradnika koja se između ostalog bavila i ispitivanjem MDSC i premalignih polipa kolona, kao i premalignih tumora pankreasa (intraduktalna papilarna mucinozna neoplazma - IPMN), potvrdila je postojanje veće zastupljenosti MDSC kod ovakvih osoba u odnosu na zdrave (148). Ista studija je potom poredila nivo MDSC u pomenutim premalignim stanjima u odnosu na CRC i karcinom pankreasa prilikom čega je uočen viši nivo ovih ćelija pri verifikovanom karcinomu. Hipoteza o eventualnoj razlici u sastavu i imunosupresivnoj funkciji MDSC subpopulacija u ovim stanjima zbog različite dužine trajanja bolesti i drugačijeg mikrokruženja nije potvrđena. Iz ovoga se može zaključiti da se ekspanzija i mobilizacija MDSC dešava još u premalignim stanjima, a da vremenom dolazi do veće akumulacije ovih ćelija zbog čega nastaje samo kvantitativna, a ne i kvalitativna razlika. Na osnovu rezultata ove studije u perspektivi bi se mogla razmatrati mogućnost primene terapije koja bi još u premalignim oboljenjima inhibirala ekspanziju, širenje ili imunosupresivnu funkciju MDSC ili bi takva terapija eventualno dovela do iscrpljivanja MDSC u prekanceroznim lezijama. S obzirom da se zna kakvu imunosupresivnu funkciju MDSC ostvaruju pomoću T ćelija, u navedenoj studiji je dokazano da kada se ukloni uticaj MDSC na T ćelije u premalignoj fazi bolesti kod pacijenata kod kojih je procenat MDSC bio povišen, T ćelije imaju mogućnost da „vrate“ svoju normalnu proliferaciju i proizvodnju IFN- γ što nije moguće kod pacijenata kod kojih je već došlo do razvoja karcinoma. To bi potencijalno moglo da dovede do smanjenja progresije premaligne promene u karcinom. Rezultati Ma-ove studije će sigurno biti temelji nekih novih istraživanja.

5.3. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema TNM/AJCC klasifikaciji

I ako danas postoji veliki broj staging sistema za CRC koji su se godinama usavršavali, upotreba TNM/AJCC klasifikacije je najrasprostranjenija u svetu i preporučuje se u rutinskoj praksi.

Koristi se za procenu težine maligne bolesti, načina lečenja, kao i procenu preživljavanja bolesnika.

Prema navodima studije OuYang-a i saradnika povećanje broja MDSC ćelija u perifernoj krvi kod bolesnika sa CRC je bilo udruženo sa težim kliničkim stadijumom bolesti, kao i metastazama u limfnim žlezdama (53). U radu Federove i saradnika uočeno je da se napredovanje CRC nije odrazilo na broj M-MDSC, ali jeste na PMN-MDSC kod osoba sa CRC (149). Zapažanja vezana za povećanje broja MDSC u perifernoj krvi sa težim stadijumom bolesti nisu specifična samo za ovu vrstu karcinoma, već su uočena i kod drugih maligniteta, kao npr. kod melanoma (140).

Analizom u našoj studiji utvrđeno je da su pacijenti sa CRC klasifikovani na osnovu TNM/AJCC klasifikacije većinom imali veći procenat i apsolutni broj obe subpopulacije ćelija sa progresijom bolesti. S obzirom da se u IIIa i IIIc stadijumu bolesti nalazio samo po jedan pacijent te je uzorak bio nedovoljan za adekvatnu statističku analizu, ovi pacijenti su pripojeni najbližoj grupi po AJCC klasifikaciji, odnosno bolesnicima u IIIb stadijumu bolesti.

Upoređivanjem između grupa uočena je statistička značajnost između kontrolne grupe i ispitanika u IIIA/B/C, IVA i IVC stadijumu bolesti za oba subtipa PMN-MDSC. Takođe, značajnost je uočena i prilikom komparacije ispitanika u I i IVc stadijumu, IIA i IVC stadijumu CRC. Ispitivanjem M-MDSC zapažena je statistička značajnost između bolesnika koji su klasifikovani u IIA i IVB grupu. Najveća razlika je očekivano postojala između I i IVc stadijuma bolesti, a najveća izmerena procentualna vrednost PMN-MDSC u cirkulaciji je bila 30,14 % kod bolesnika u IVc stadijumu bolesti sa prisutnom slabošću i drugih organa zahvaćenih sekundarnim promenama u sklopu diseminacije CRC.

Kao što možemo zaključiti iz navedenog ispitivanja, postoji uzajamna „saradnja” između ekspanzije MDSC i napredovanja karcinoma. Ta komunikacija je dvosmerna. Faktori koje izlučuje tumor (različiti solubilni medijatori ali i ekstracelularne vezikule - egzozomi) stimulišu ekspanziju i aktivaciju MDSC, a MDSC pomoću različitih imunosupresivnih mehanizama na terenu u kome postoji hipoksija i nizak PH promoviše opstanak i širenje tumora (127,150).

5.4. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različitog kliničkog stadijuma prema Dukes i Astler-Coller klasifikaciji

Britanski patolog Cuthber Dukes je još 1932.g. osmislio klasifikaciju za CRC. Klasifikacija je vremenom više puta modifikovana i koristi se od strane patologa kod bolesnika koji su operisani zbog CRC. U našoj studiji rezultati ispitivanja su ukazali na činjenicu da postoji statistička značajnost između kontrolne grupe i svih stadijuma prema Dukes klasifikaciji kada su u pitanju PMN-MDSC. Kada posmatramo M-MDSC rezultat takvog poređenja je prisutan samo između kontrolne grupe i obolelih koji su pripadali poslednjem, D stadijumu. Najviše vrednosti obe subpopulacije MDSC kod osoba kod kojih je prisutna invazija kompletnog zida creva sa infiltracijom malignih ćelija u limfne žlezde i sa prisutnim udaljenim metastazama, odnosno u D stadijumu bolesti.

U radu Huanga i saradnika dokazano je povezanost između MDSC i S100A9 proteina značajnog za ekspanziju MDSC, ali i za njihova funkcionalna ispitivanja, sa Dukes klasifikacijom i metastaziranjem tumora u limfne žlezde. Kombinacija ova dva parametra predložen je za staging CRC. Inače, pojačana ekspresija S100A9 povezana je ne samo sa napredovanjem bolesti kod CRC, već i sa invazijom i metastaziranjem i kod drugih karcinoma (151).

Astler i Coller su 1954.g. prilagodili originalnu Dukes klasifikaciju sa ciljem da se dobiju što detaljnije informacije koje su od koristi za lečenje pacijenata i njihovu prognozu. Slično Dukes klasifikaciji, i prilikom ovog istraživanja u sprovedenoj studiji je uočena značajna statistička povezanost između procentualne i apsolutne zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC. Poređenja između relativnih i apsolutnih vrednosti PMN-MDSC zdravih osoba i pripadnika B2, C i D grupe obolelih prema Astler Coller klasifikaciji su bila statistički značajna. Takođe, postoji značajna razlika i između bolesnika B1 i D, B2 i C, kao i B2 i D stadijuma bolesti. Između B1 i C stadijuma postoji samo statistička značajna razlika kada su u pitanju apsolutne vrednosti, a ne i procentualne. Kao i kod Dukes klasifikacije, i ovde je kada su u pitanju M-MDSC, razlika uočena samo između kontrolne grupe koju su sačinjavale zdrave osobe i poslednjeg D stadijuma ove klasifikacije za obe vrste vrednosti. Najviše vrednosti PMN-MDSC i M-MDSC su uočene u D stadijumu bolesti.

5.5. Korelacija zastupljenosti MDSC sa metastatskim širenjem bolesti

U najvećem broju slučajeva metastaze primarnog tumora predstavljaju glavni razlog umiranja od karcinoma. Kao što smo mogli videti njihovo nastajanje nije slučajno, već uigran, timski proces koji se dešava u više faza i u kome važnu ulogu imaju MDSC. U tom projektu je stvaranje premetastatskih niša najvažniji korak (152). A njihovo uklanjanje u cilju sprečavanja metastaziranja se čini interesantnim pristupom u lečenju. Ono što je mana savremene medicine jeste nemogućnost otkrivanja premetastatskih niša sadašnjom dostupnom dijagnostikom te to i dalje ostaje izazov. Međutim, nova terapijska strategija u cilju eventualnog prekida razvoja metastaza u budućnosti bi mogla biti usmerena na MDSC.

I ako je poslednja AJCC klasifikacija podelila bolesnike u četvrtom stadijumu bolesti, pokušali smo da dodatnom podelom pacijenata u više grupa dovedemo u vezu apsolutni i relativni broj MDSC sa brojem sekundarno zahvaćenih organa. Podaci o rasejanju bolesti su dobijeni na osnovu MSCT pregleda, MR pregleda i/ili intraoperativnog nalaza. Bolesnici su bili podeljeni u grupe kod kojih je registrovana metastatska bolest u jednom, dva, tri i više organa. Korelacija je bila pozitivna za oba podtipa MDSC, te je zaključeno da što je veći broj organa bio zahvaćen širenjem bolesti, veće su bile apsolutne i relativne vrednosti obe subpopulacije MDSC. Dobijeni rezultati jasno ukazuju na značajnu vezu između akumulacije MDSC sa jedne strane i tumorskog opterećenja i širinja bolesti sa druge strane.

5.6. Odnos MDSC i stepena diferencijacije tumora

U studiji Toora i Elkorda objavljenoj 2017.g. svi bolesnici su bili podeljeni u 2 grupe, prvu koju su činile osobe koje su imale dobro i umereno diferentovan karcinom kolona, a drugu osobe sa slabo diferentovanim i nediferentovanim tumorom. Uočena je da su osobe sa slabo diferentovanim tumorom (gradus III) imale značajno veći procenat PMN-MDSC u odnosu na one sa dobro ili umereno diferentovanim tumorskim ćelijama (153). U skladu sa tim, nakon stepenovanja CRC na osnovu njegove diferencijacije i u našoj studiji koja je obuhvatila 80 bolesnika (kod 3 bolesnika nije bio određen stepen diferencijacije) je uočeno da su najviše vrednosti PMN-MDSC (procentualno i apsolutno) u perifernoj krvi bile prisutne kod slabo diferentovanog tumora (gradus III). Samo jedan pacijent je imao nediferentovan tumor. Međutim, statističkom analizom nije uočena veza između stepena diferencijacije i PMN-MDSC i M-

MDSC. Ni u radu OuYanga i saradnika objavljenog 2015.g. nije uočena značajna statistička povezanost između ova dva parametra (53). Objašnjenje verovatno leži u činjenici da dosta patologa zbog nemogućnosti tačnog određivanja stepena diferencijacije vrlo često tumore klasifikuje kao kombinaciju 2 nivoa (npr. gradus 1-2 ili 2-3) te je samim tim i njihovo definitivno rangiranje i poređenje otežano.

5.7. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na limfoidnu, vensku i perineuralnu invaziju

Veoma često zaboravljamo da osim limfoidne invazije koja se koristi i u TNM klasifikaciji i dokazane lošije prognoze kod pacijenata sa CRC u slučaju da je ona prisutna, postoji invazija drugih organa venskim putem, kao i perineuralno. Važnost venske invazije je prvi put prepoznata 30-tih godina prošlog veka, ali i pored toga se dugo vremena zanemarivala. Danas se smatra da je ona nezavisan prediktor hematogene diseminacije i smrtnog ishoda kod osoba sa CRC (154). Venska invazija može biti ekstra i intramuralna. Ekstramuralna venska invazija je povezana sa nepovoljnijim ishodom bolesti, dok su podaci vezani za intramuralnu invaziju još uvek nejasni (155). Takođe, podatak o zahvatanju venskih krvnih sudova kod CRC može biti dragocen za bolesnike u II stadijumu bolesti radi odluke o primeni adjuvantne hemioterapije (HT). S obzirom da je bila velika neuravnoteženost u prijavljivanju incidence venske invazije (9-90 %), bilo je više pokušaja standardizacije kriterijuma, ali na žalost jasan konsenzus i dalje ne postoji (156, 157). To je možda i razlog što je u našem slučaju ispitivanjem limfoidne, venske i perineuralne invazije i zastupljenosti MDSC kod operisanih bolesnika sa CRC uočeno da povezanost postoji samo kada je u pitanju limfoidna invazija i PMN-MDSC i ako je i perineuralna invazija povezana sa lošijom prognozom.

5.8. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na veličinu i lokalizaciju tumora

U studiji Zhanga i saradnika nije uočena statistički značajna povezanost između populacija MDSC i veličine i lokalizacije tumora (127). Ni studija Suna nije primetila povezanost između veličine tumora i MDSC (158). I ako je u radu OuYanga potvrđeno povećano prisustvo MDSC u samom tumoru u odnosu na prisutan procenat ovih ćelija u cirkulaciji, procenat MDSC u krvi ispitanika nije bio u korelaciji sa veličinom tumora (53). Na osnovu naših rezultata takođe nije zapažena linearna povezanost između veličine tumora i oba subseta MDSC. Čak i kada su, da bi

smanjili mogućnost uticaja eventualne nepreciznosti merenja, tumori podeljeni u dve grupe (tumori čiji je najveći dijametar veći ili manji/jednaki 5 cm) nije uočena značajnost ove veze.

Sličan rezultat je dobijen i poređenjem lokalizacije tumora i relativnog i apsolutnog broja PMN-MDSC i M-MDSC. Tokom ispitivanja svi tumori debelog creva su podeljeni u 6 grupa u zavisnosti od mesta na kome su uočeni (cecum, ascendentni kolon, transversum, descendentni kolon, sigma i rektum). Potom je učinjena i podela u dve grupe – desni i levi kolon. Ova klasifikacija na osnovu lokalizacije je često prisutna u literaturi i kliničkoj praksi jer postoje evidentne razlike u osnovnim karakteristikama tumora. CRC desnog kolona se za razliku od levog kolona javlja kod nešto starijih osoba, češće u ženskoj populaciji sa slikom kojom najčešće dominira anemija i više uznapredovala bolest u momentu postavljanja dijagnoze uz veći promer tumora koji obično ne daje sliku opstrukcije. Razlika postoji i u embrionalnom poreklu (desni kolon nastaje iz srednjeg creva - midgut, a levi kolon iz zadnjeg creva - hindgut), histološkim karakteristikama (češće je prisutan slabo diferentovan tumor kod CRC desnog kolona) i imunološkoj prirodi i mutacijama tumora što dovodi i do evidentnih razlika u terapijskom pristupu (često neosetljivi na anti-EGFR terapiju) (159). Primetna je i razlika u preživljavanju – bolesnici sa tumorom levog kolona imaju bolje preživljavanje u odnosu na tumore desnog kolona nakon operacije što naročito dolazi do izražaja u III stadijumu bolesti po AJCC klasifikaciji (160). Na osnovu svega navedenog, pokušali smo da utvrdimo prisustvo korelacije između lokalizacije CRC i PMN-MDSC i M-MDSC. Međutim, ni precizna lokalizacija tumora ni podela bolesnika sa CRC na bolest levog i desnog kolona nisu doveli do detektovanja značajnije statističke povezanosti sa obe subpopulacije MDSC. Iz svega navedenog se može zaključiti da za sam porast vrednosti MDSC nije bitna lokacija promene već samo prisustvo karcinoma i proširenost bolesti. Slične apsolutne i procentualne vrednosti obe vrste MDSC uočavaju se i kod malignih bolesti drugih organa (glave i vrata, želuca, jednjaka) i nisu specifične samo za CRC.

5.9. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC pre i posle hirurškog lečenja pacijenata

Najvažnija terapijska opcija lečenja CRC je hirurška resekcija. S obzirom da operativno lečenje predstavlja stres i traumu za organizam a nekada i izvor infekcije, neposredno posle operacije solidnih tumora uočene su povišene vrednosti MDSC (161, 162). Kao posledica traume oslobađaju se proinflamatorni citokini (kao što su npr. IL-6, CCL2), faktori rasta (G-CSF, GM-CSF) i hemokini koji pojačano aktiviraju i regrutuju MDSC, odnosno dolazi do otpuštanja

brojnih unutrašnjih signala (DAMP) te su MDSC povišene već par sati nakon operacije (163). Uočeno je čak i da neki lekovi (npr. anestetik deksmedetomidin) mogu dovesti do neposrednog postoperativnog porasta M-MDSC kod pacijenata sa karcinomom pluća, a na modelu sa miševima osim porasta M-MDSC, registruje se i porast nastanka metastaza pomoću pojačanog stvaranja VEGF (164). U studiji Yuana kod pacijenata sa karcinomom rektuma koji su podvrgnuti hirurškom lečenju merene su vrednosti MDSC neposredno pre operacije, potom 7., 14. i 21. dana od operacije. Sedmog dana od intervencije je uočen dramatičan skok vrednosti MDSC, da bi se potom 14. i 21. dana registrovao pad zastupljenosti MDSC u cirkulaciji (165). Studija kod pacijenata koji su operisani od hepatocelularnog karcinoma objavljena 2018.g. je ukazala da je kod 10 od 19 operisanih bolesnika registrovano statistički značajno sniženje vrednosti MDSC mesec dana nakon intervencije, ali se ista nije bavila eventualnim kasnijim uočavanjem recidiva (166). Istraživanje koje je pratilo MDSC, ali i Treg, NK ćelija i CTL ukazalo je da postoperativno nakon resekcije tumora postoji procentualno smanjenje MDSC, ali i Treg uz nepromenjene vrednosti NK ćelija i CTL, što posredno ukazuje na smanjenje imunosupresije nakon uklanjanja karcinoma (53).

Da bi isključili neposredni uticaj psihološkog i fizičkog stresa kao i posledice traume, u našoj studiji kontrolne vrednosti cirkulišućih MDSC su određivane 4-6 nedelja nakon hirurškog lečenja kod pacijenata koji nisu imali kliničke znake infekcije. U ispitivanju je učestvovalo 25 bolesnika u različitim stadijumima bolesti koji su po protokolu za CRC zahtevali hirurško lečenje. Analizom je potvrđeno statistički značajno smanjenje procentualne zastupljenosti i apsolutnog broja PMN-MDSC, ali ne i M-MDSC.

5.10. Zastupljenost PMN-MDSC i M-MDSC kod zdravih osoba i pacijenata sa CRC nakon učinjenog hirurškog lečenja

Nakon što je registrovano statistički signifikantno smanjenje procentualne i apsolutne vrednosti PMN-MDSC po učinjenom hirurškom uklanjanju CRC, logično se nametalo pitanje da li se vrednost MDSC 4-6 nedelja posle operacije vratila na nivo zastupljenosti koji je bio prisutan kod zdravih osoba koje su činile kontrolnu grupu. U slučaju da postoji značajna razlika između ove dve grupe, postavlja se pitanje da li onda takvi pacijenti imaju veću verovatnoću za pojavu recidiva bolesti ili razvoja metastaza. Poznato je da i ako resekcija tumora smanjuje vrednosti cirkulišućih MDSC, MDSC se ne iscrpljuju u potpunosti. Učesnici u našoj studiji su bili

podeljeni u dve grupe, prvu koju su činilo 12 zdravih ispitanika i drugu koja je obuhvatila 25 operisanih bolesnika. Ispitivanjem nije uočena statistički značajna razlika u apsolutom i procentualnom broju kako PMN-MDSC tako i M-MDSC između zdravih i operisanih 4-6 nedelja po učinjenoj intervenciji.

5.11. Poređenje PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata različite starosne dobi, pola i BMI

Za nastanak sporadičnog CRC najvažniji rizik predstavljaju godine. Njegova učestalost se značajno povećava posle 50.g. života, što je i razlog da se skrining tada i otpočne kod asimptomatskih pacijenata. Poslednjih godina uočena je nešto češća pojava karcinoma kod osoba u dobi između 40 i 49 g. zbog čega je American Cancer Society 2018.g. predložio „ograničenu“ preporuku za pomeranje granice za skrining na 45.g., a „čvrstu“ preporuku za osobe sa 50 i više godina (167). Gojaznost, hiperlipidemija, fizička neaktivnost, nepravilna ishrana, zloupotreba alkohola, pušenje su samo neki od razloga zašto se granice za nastanak sporadičnog CRC pomeraju ka mlađim starosnim grupama. U Srbiji stope incidence za CRC rastu sa godinama života i prema poslednjim objavljenim podacima Instituta za javno zdravlje Srbije, najviše obolelih kod oba pola ima u starosnoj grupi preko 75 godina (168).

Sa druge strane, nedovoljno je relevantnih podataka koji povezuju starenje i vrednost MDSC. Sa godinama dolazi do remodelovanja manje urođenog i više stečenog imunog sistema (imunosenescencija), češće pojave infekcija, karcinoma, autoimunih bolesti. Starenje se može shvatiti kao blago, hronično inflamatorno stanje u kome dolazi do porasta citokina u cirkulaciji (IL-1 β , IFN- γ), GM-CSF, što sve može povećati produkciju MDSC (169). U studiji Verschoor-a i saradnika uočeno je da se procenat MDSC, naročito PMN-MDSC povećava sa godinama, posebno kod osoba sa ranijom anamnezom maligne bolesti (170). U studiji Apodaca i saradnika ovakva povezanost kod zdravih osoba nije nađena, kao i kod nekih studija koje su upoređivale prisustvo MDSC kod bolesnika sa CRC u odnosu na starosnu dob (130,158,53). Prilikom našeg istraživanja prosečna starost obolelih od CRC je bila 63,57 g. Najmlađa obolela osoba je imala 29 g. i bila je u IIIb stadijumu bolesti, a najstarija 86 g. u IVa stadijumu bolesti prema TNM/AJCC klasifikaciji CRC. Ispitivanje je učinjeno kod svih učesnika studije sa CRC. Ispitanike smo podelili u dve grupe, mlađe i starije od 65. Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na ove dve grupe.

CRC se češće javlja kod muškaraca u odnosu na žene. Na osnovu statističkih podataka iz Instituta za javno zdravlje Batut, u Srbiji posmatrajući podatke obolelih od karcinoma tokom 2020.g., 13,7 % svih karcinoma čine CRC kod muškaraca (na drugom mestu, posle karcinoma pluća (21,4%)), a 10,5 % kod žena (na trećem mestu posle karcinoma dojke (22,6 %) i karcinoma pluća (11,3 %)) (168). U našoj studiji većinu obolelih su činili muškarci (65,06 %), a procenat obolelih žene je bio manji i iznosio je 34,94 %. Ispitivanje je obuhvatilo sve bolesnike sa CRC u različitim stadijumima bolesti sa ciljem da se utvrdi da li postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na pol. Nije nađena signifikantna pozitivna korelacija između obe podgrupe MDSC i polne pripadnosti. U studiji Bayik-a i saradnika na modelu sa miševima obolelim od glioblastoma, zapaženo je da su M-MDSC više prisutne u tumorskom tkivu kod mužjaka miševa, a dvostruki porast PMN-MDSC je registrovan u cirkulaciji kod ženki koje su imale i duže preživljavanje. Nije bilo polne razlike u prisustvu makrofaga, dendritskih ćelija, NK i T ćelija. Iscrpljivanjem PMN-MDSC pomoću neutrališućih antitela anti-Gr1 i anti-Ly6G je omogućilo duže preživljavanje kod ženki za razliku od mužjaka kod kojih su M-MDSC više infiltrisale sam tumor i nisu mogle biti u toj meri iscrpljene. Anti-Ly6C nije dovelo do značajnijih promena u preživljavanju kod oba pola. I ako je ovo prvi rad u kome je uočena polna razlika u prisustvu različitih subtipova MDSC i preživljavanja, postavlja se pitanje da li takva razlika postoji i kod drugih tumora i da li različiti pristupi lečenja mogu da dovedu do boljeg preživljavanja. S obzirom da je ovo prva studija koja je ukazala na potencijalnu razliku u načinu lečenja u odnosu na polnu pripadnost neophodna su buduća istraživanja (171).

Gojaznost može povećati vrednosti MDSC zbog prisutne hronične upale niskog intenziteta koja se registruje i kod starijih osoba. Poznato je da gojaznost povećava incidencu nastanka i progresije karcinoma i da važnu ulogu u gojaznosti igra leptin, hormon koga otpuštaju adipociti, a koji ima uticaja na regulaciju telesne mase i apetita. U studiji Clementsa i saradnika uočeno je da je ishrana bogata mastima i posledična gojaznost dovela do nakupljanja CD11b+Gr1+ nezrelih mijeloidnih ćelija (i monocitnih i polimorfonuklearnih MDSC) u cirkulaciji kod miševa. Otkriveno je da je blokiranje leptinskog receptora dovelo do smanjenja akumulacije MDSC. Nakupljanje MDSC dovelo je vremenom kod gojaznih miševa do bržeg rasta tumora i razvoja metastaza (172). Bao i saradnici su poredili MDSC kod gojaznih i zdravih osoba i uočili da je procenat M-MDSC značajno povećan kod gojaznih ispitanika u poređenju sa kontrolom grupom koju su činile mršave osobe, kao i da je nivo M-MDSC pozitivno korelirao sa nivoom enzima

jetre u krvi (173). I studija Friedrich i saradnika je potvrdila povećanje procentualne i apsolutne vrednosti M-MDSC kod gojaznijih osoba (174).

S obzirom da danas gojaznost ima razmere pandemije, u našem ispitivanju najpre su upoređene vrednosti oba podtipa MDSC sa BMI kod svih ispitanika, bez obzira da li imaju CRC ili čine kontrolnu grupu. Potom se izdvojeni samo bolesnici sa CRC. U oba ispitivanja nije uočena značajna statistička veza između broja PMN-MDSC i M-MDSC sa BMI. Jedan od razloga što korelacija nije uočena kod bolesnika sa CRC može biti i činjenica da se radi o digestivnom malignitetu koji se često klinički manifestuje višemesečnim gubitkom apetita, a nekada i pojavom bolova pri unosu hrane što sve dovodi do gubitka telesna mase, a samim tim i BMI kod ovih bolesnika.

5.12. Korelacija zastupljenosti MDSC sa faktorima upale i tumorskim markerima

Posmatrajući radove autora koji su se bavili zapaljenskim bolestima i njihovim odnosom prema MDSC i faktorima upale, jasno se uočavala korelacija između ovih parametara. Kod ankilozirajućeg spondilitisa M-MDSC su bile u pozitivnoj korelaciji sa indeksom aktivnosti bolesti, ali i sedimentacijom eritrocita i CRP (175). S obzirom da CRC možemo posmatrati kao stanje hronične inflamacije, postavlja se pitanje da li postoji eventualna povezanost podtipova MDSC sa faktorima upale koji se koriste u standardnoj kliničkoj obradi pacijenta. Učinjeno je poređenje ovih ćelija sa sedimentacijom (SE), C-reaktivnim proteinom (CRP) i fibrinogenom. Statistički, postojala je umerena pozitivna korelacija između ovih parametara u našoj studiji. Retke su studije koje su se bavile ovom problematikom kod karcinoma. Ispitivanje Trellakis-a i saradnika je obuhvatilo bolesnike sa karcinomom glave i vrata. Između ostalog poredila se i vrednosti CRP sa MDSC. Istraživanjem je uočena povezanost CRP sa višim stadijumima tumora, ali ne i sa PMN-MDSC (176).

Biomarker koji se preporučuje pri postavljanju dijagnoze i praćenju bolesnika sa CRC je karcinoembrionalni antigen (CEA). Na žalost, ovaj marker nije specifičan samo za CRC već se njegove povišene vrednosti mogu uočiti i kod drugih karcinoma (želudac, pluća, dojka, pankreas) ali i kod nekih nemalighnih stanja (npr. pušenje, hronična upala creva, bubrežna slabost). Takođe, oko trećine CRC ne proizvodi povišene vrednosti CEA čak i ako je u pitanju metastatska bolest. Ipak, povišene vrednosti CEA u serumu nakon operacije CRC nam mogu ukazati na recidiv

bolesti ili metastaza nakon njihovog uklanjanja (177, 178). To je i razlog zašto je ovaj marker sastavni deo redovnog praćenja bolesnika od CRC.

Karbohidratni antigen (Ca 19.9) stvaraju duktalne ćelije pankreasa, bilijarnog trakta, kao i epitelne ćelije želuca, kolona, endometrijuma, pljuvačnih žlezda te shodno tome može biti povišen kod karcinoma ovih organa, ali i kod njihove inflamacije. Njegova senzitivnost kao markera za praćenje recidiva CRC je niža u odnosu na CEA, ali se smatra dovoljno dobrim prognostičkim markerom (179).

Ispitivanjem korelacije između MDSC i tumorskih markera za CRC (CEA i Ca 19.9) u našoj studiji, uočena je umerena pozitivna korelacija osim za povezanost M-MDSC i Ca 19.9. Povezanost MDSC i ovih markera je još uvek predmet istraživanja. U studijama OuYanga i Lin-a nije uočena korelacija između MDSC i tumorskog markera CEA kod bolesnika sa CRC (53, 180).

5.13. Korelacija između PMN-MDSC, M-MDSC i preživljavanja (Overall survivor - OS)

Preživljavanje bolesnika sa CRC zavisi od lokalizacije tumora, stadijuma bolesti, patohistološkog nalaza (vrste i stepena diferentovanosti tumora), prisutnih mutacija (npr. MSI, KRAS, BRAF), ali i mnogih drugih faktora (npr. starosne dobi i propratnog komorbiditeta, socio-ekonomskog statusa i mogućnosti adekvatne zdravstvene nege).

Prilikom prethodnih statističkih ispitivanja u našoj studiji smo ukazali na prisutnu povezanost između procentualnog i apsolutnog broja MDSC i stadijuma bolesti. Sada smo pokušali otići korak dalje istražujući mogućnost ovih ćelija kao potencijalnih markera preživljavanja. Ispitivanje je inicijalno izvršeno kod bolesnika III i IV stadijuma bolesti na osnovu AJCC klasifikacije. Vreme njihovog praćenja je bilo 3 godine. Validni podaci su dobijeni za 32 bolesnika. Na osnovu statističkih podataka zaključeno je da su pacijenti sa kraćim preživljavanjem imali veći procentualni i apsolutni broj PMN-MDSC u cirkulaciji, kao i veći apsolutni broj M-MDSC. Ova negativna korelacija se verovatno može objasniti imunosupresivnim efektom MDSC. Do istog nalaza smo došli i posmatrajući samo pacijente u IV stadijumu bolesti, kao i izdvajajući grupu od 22 pacijenta koja nisu primala hemio ili radioterapiju. Ovo poslednje odvajanje je učinjeno da bi se izbegao uticaj na imunološki status pacijenata (citotoksični efekat terapije, komplikacije hemio i radio terapije,...). Studija Tada i saradnika učinjena kod bolesnika sa neresektabilnim metastatskim CRC je pokazala da periferni

imuni status pre tretmana (pre prve linije hemioterapije) korelira sa ishodom pacijenata. Kod pacijenata sa lošijim preživljavanjem identifikovane su visoke vrednosti M-MDSC, kao i niske vrednosti CD_4^+ i CD_8^+ efektorskih memorijskih T ćelija pre započinjanja terapije. Kombinacija ova tri parametra imala je veću tačnost predviđanja ishoda. (181).

Ai i saradnici su objavili meta analizu 16 studija sa ukupno 1864 bolesnika. Studije su se bavile prognostičkom ulogom MDSC kod bolesnika sa mikrocelularnim karcinomom pluća, hepatocelularnim karcinomom, karcinomom dojke, gastrointestinalnog trakta, kože, mokraćne bešike, kao i limfomima. Zaključeno je da visoka učestalost MDSC može biti povezana sa kraćim preživljavanjem bolesnika (182). Još više bolesnika je obuhvatila meta analiza Wang i saradnika (40 studija sa 2721 bolesnikom). Zaključeno je da je visok nivo MDSC (i PMN-MDSC i M-MDSC) u cirkulaciji kod bolesnika sa solidnim tumorima pre započinjanja terapije bio značajno povezan sa lošijim preživljavanjem kod većine karcinoma. Pri tome je najveća negativna korelacija postojala između nivoa MDSC i karcinoma dojke (183). Rad Langa kod pacijenata sa karcinomom glave i vrata se bavio odnosom tri subpopulacije MDSC, stepena supresije i preživljavanja. Pacijenti sa visokom učestalošću PMN-MDSC su imali statistički značajno smanjenje preživljavanja. I visoke vrednosti M-MDSC su bile povezane sa lošijom prognozom, ali nisu dostigli statističku značajnost. Korelacija između učestalosti e-MDSC i preživljavanja nije uočena. PMN-MDSC su imale najsnažniju imunosupresivnu aktivnost prema T ćelijama i najveći klinički značaj (184). Studija koja je obuhvatila 64 bolesnika sa karcinomom rektuma je merila preoperativne i postoperativne vrednosti MDSC i upoređivala ih sa pojavom recidiva bolesti. Kod pacijenata kod kojih je preoperativno kao i 21. dana od intervencije registrovana veća procentualna zastupljenost MDSC tokom praćenja je uočena češća pojava lokalnog recidiva bolesti (165).

5.14. Korelacija između OS i drugih parametara (NLR; LMR; Neu/PMN-MDSC; M/M-MDSC)

Inicijalno se NLR (odnos apsolutnog broja neutrofila i limfocita) koristio kao prognostički parametar u jedinicama intenzivne nege kod inflamatornih stanja. Još 1974.g. Kim i Papatestas su objavili rad o povezanosti smanjenog broja limfocita u cirkulaciji sa odmaklim stadijumom karcinoma kolona (185). Povezanost inflamacije i maligniteta navelo je naučnike da istraže odnos markera sistemske upale i prognoze kod bolesnika sa karcinomom. Hiroshi Sato i saradnici su

2012.g. dokazali da se preterapijski NLR može koristiti i kao prediktor patološkog odgovora na primenjenu neadjuvantnu hemioterapiju kod bolesnika sa karcinomom jednjaka (186). Danas je ovaj jednostavan i široko dostupan parametar opšteprihvaćen kao prognostički faktor u rutinskoj praksi kod bolesnika obolelih od karcinoma. U radu Songa i saradnika NLR je bio superioran prognostički marker u odnosu na količnik trombocita i limfocita (PLR) i prognostički nutritivni indeks (PNI) kod bolesnika sa resektabilnim CRC (187). Porast NLR kod CRC kao loš faktor preživljavanja je prikazan i u drugim studijama (188, 189). Međutim, treba naglasiti da NLR ima i svoja ograničenja, jer je uočeno da su njegove vrednosti povišene i kod prisutne opstrukcije creva, febrilnih stanja različite etiologije, pa čak i kod pacijenata sa značajnom koronarnom bolešću i srčanom slabošću što je važno s obzirom da se tumor najčešće javlja u starijoj populaciji koja može imati dosta komorbiditeta (190).

U našem radu, određivali smo korelaciju između preoperativnih vrednosti NLR i dužine preživljavanja. Bolesnici su praćeni tokom 3 godine od hirurške intervencije. Rezultat je ukazao na umereno negativnu korelaciju između ova dva parametra, odnosno utvrđeno je da su više vrednosti ovog odnosa ukazivale na kraće preživljavanje bolesnika.

Kao što znamo, tumori produkuju faktor stimulacije rasta granulocita, kao i TNF- α , različite proinflamatorne citokine (npr. IL-1, IL-6) koji mogu dovesti do porasta broja neutrofila kako u cirkulaciji tako i u mikrokruženju tumora. Sa druge strane neutrofili mogu doprineti napredovanju tumora oslobađanjem ROS, NO, arginaze i suzbijanjem T ćelijskog odgovora, kao i sprečavanjem aktivnosti limfocita što sve dovodi do lošije odbrane organizma i kraćeg preživljavanja (191, 192). Ovo su neki od najznačajnijih mehanizama porasta NLR kod bolesnika sa karcinomom.

U poslednje vreme se sve češće pominje još jedan sistemski marker upale kao parametar preživljavanja a to je LMR. Rad Chana i saradnika je ukazao da se preoperativna vrednost LMR pokazala kao nezavisan i superioran marker preživljavanja kod bolesnika sa CRC (193). Pozitivna korelacija između LMR i preživljavanja kod CRC je dokazana i u drugim studijama. Tako su Tan i saradnici koji su obradili podatke iz 14 kohortnih studija koje su obuhvatile preko 11 700 bolesnika došli do zaključka da je porast LMR u CRC udružen sa boljim ukupnim preživljavanjem, preživljavanjem povezanim sa karcinomom kao i preživljavanjem bez bolesti (194). Studija koju je obavio Shimura sa svojim saradnicima je ukazala na lošiju prognozu

bolesnika sa CRC u slučaju kada oni imaju niže vrednost LMR. Takođe lošiji ishod je bio udružen sa višim vrednostima cirkulišućih MDSC (195).

Iz svega navedenog sledi da bi niža vrednost LMR ukazivala na kraće preživljavanje bolesnika sa karcinomom. Stanja sistemske upale kao što je karcinom smanjuju celularni imunitet, smanjuje se ukupni broj limfocita u cirkulaciji, kao i broj CD4⁺T helper limfocita, a povećava broj CD8⁺T supresorskih limfocita. Takođe znamo da limfociti infiltrišu TME postajuću TIL koji imaju antitumorski efekat. Na žalost, ćelije karcinoma se trude da inaktivišu ove limfocite i obezbede svoje preživljavanje. To sve čini povoljne uslove za napredovanje karcinoma i lošiju prognozu (196). Nasuprot tome, u cirkulaciji se mogu registrovati povišeni monociti koji su izvor citokina koji doprinose upali. Povišen nivo monocita dovodi i do povećanja broja TAM u TME koje su ujedno tu i najviše prisutne ćelije. TAM su značajne u procesu proliferacije tumora, angiogeneze i metastaziranja te je njihov povećan broj povezan sa lošijom prognozom kod pacijenata sa karcinomom. Smatra se da povišen nivo monocita u cirkulaciji može održavati povišene vrednosti TAM-a i dovesti do lošije prognoze (197). U našoj studiji gde su bolesnici praćeni tokom 36 meseci od operacije nije uočena statistički značajna korelacija između preoperativnih vrednosti LMR i preživljavanja.

Treba naglasiti da se NLR i LMR izračunavaju jednostavno i brzo što je svakako prednost u svakodnevnoj praksi. Međutim, proces određivanja ovih ćelija se odvija na automatizovanim brojačima krvi koji nisu u mogućnosti da prepoznaju diskretne razlike između pojedinačnih ćelija unutar fenotipski određenih srodnih populacija. Poznato je da kod pacijenata koji boluju od karcinoma, sastav neutrofila i njihova funkcija mogu biti različiti. Neki od njih pripadaju grupi neutrofila visoke gustine (HDN) za koje se smatra da odgovaraju N1 neutrofilima u mikrokruženju tumora i imaju antitumorski efekat, dok drugi mogu pripadati neutrofilima niske gustine (LDN) koji su okarakterisani kao N2 neutrofili sa protumorskim dejstvom (198). Poput neutrofila, ni monociti nisu uniformni, jer postoje najmanje 3 podgrupe ovih ćelija koje mogu biti fenotipski identifikovane među monocitima i ako njihova uloga može biti različita u toku razvoja i progresije karcinoma. To su klasični (CD14^{high}CD16⁻), neklasični (CD14⁺CD16⁺) i intermedijarni podtip (CD14^{low}CD16⁺) (199).

Na osnovu prethodnih istraživanja dokazali smo da su pacijenti sa kraćim preživljavanjem imali veći procentualni i apsolutni broj PMN-MDSC u cirkulaciji, kao i veći apsolutni broj M-MDSC.

Potom smo želeli da proverimo kakav je odnos između povezanih populacija ćelija, zrelih neutrofila i PMN-MDSC, kao i zrelih monocita i M-MDSC i da li postoji korelacija između tog odnosa i preživljavanja kod bolesnika sa CRC. S obzirom da su neutrofilni ključni u inflamatornom odgovoru, a MDSC ćelije sa izraženim imunosupresivnim dejstvom u određenom miljeu (mikrookruženje ima mogućnost njihovog usmeravanja), pretpostavili smo da ovaj odnos može imati pozitivnu korelaciju sa preživljavanjem što je u našoj studiji i dokazano i kod PMN-MDSC i kod M-MDSC (93). Detaljnijim uvidom može se zaključiti da je Neu/PMN-MDSC pokazao bolji Spearmanov koeficijent ranga u poređenju sa NLR. Za razliku od M/M-MDSC odnosa koji je takođe imao pozitivnu korelaciju u odnosu na OS, statistička značajnost nije uočena kod LMR. ROC krivom je potvrđena senzitivnost i specifičnost ovih metoda. Slično ispitivanje je učinjeno i u radu Udovičića kod pacijenata sa sepsom kada je uočeno da je smanjenje odnosa Neu/PMN-MDSC ispod graničnih vrednosti bilo udruženo sa lošim ishodom i 1. i 5. dana kod kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom (200).

Za korelaciju koju smo dobili u našoj studiji evidentno je da mora da postoji značajno povećanje učestalosti oba subtipa MDSC u cirkulaciji koji se sigurno jednim delom dešava i na „štetu“ zrelih ćelija. Smatra se da važnu ulogu u povećanju broja MDSC u stanjima kada postoji hronična inflamacija, što je evidentno kod prisustva karcinoma, imaju ranije opisana urgentna i ekstramedularna hematopoeza, kao i plastičnost ovih ćelija odnosno sposobnost izmene fenotipa i funkcionalnih osobenosti koja se može desiti na putu od kostne srži do perifernog tkiva. Ali plastičnost je odlika i zrelih neutrofila i monocita koji u cirkulaciji i tkivu žive zajedno sa MDSC. Ovo navodi na razmišljanje da verovatno i deo zrelih monocita i neutrofila može preći u MDSC i povećati njihovu učestalost. U studiji koja je učinjena 2015.g. kod bolesnika sa karcinomom dojke pokazano je da su M-MDSC mogle nastati iz monocita, ali i da praćenje nivoa M-MDSC kod ovih pacijenata može predstavljati jednostavan biomarker za procenu napredovanja bolesti (201). Takođe, M-MDSC u uslovima hipoksije pod dejstvom HIF-1 α mogu diferencirati u TAM (94). To je još jedan dokaz da plastičnost MDSC zavisi od mikrookruženja. Sa druge strane, dokazano je da i MDSC mogu daljom diferencijacijom preći u makrofage i dendritske ćelije, ali i u zrele neutrofile.

Kao što se može videti, povećanje broja MDSC u cirkulaciji i tkivima kod karcinoma nije jednosmeran proces urgentne i ekstramedularne mijelopoeze, već kompleksan proces u kome su

ove ćelije u neprestanom dinamičnom odnosu sa okolinom i drugim ćelijama. Njihova plastičnost im poput kameleona omogućava preživljavanje u nepovoljnim uslovima, a imunosupresivna funkcija potpomaže opstanak karcinoma.

6. ZAKLJUČAK

Karcinomi su jedan od važnih uzroka smrtnosti savremenog čoveka. Svaki napredak koji se istraživanjem učini pomaže u dešifrovanju složenih odnosa koji vladaju u organizmu obolele osobe. MDSC su važan fragment te slagalice. Radom smo pokušali da približimo značaj MDSC u CRC i njihovu uzajamnu interreakciju. Uočili smo da je akumulacija PMN-MDSC veća kod osoba sa CRC u odnosu na zdrave osobe, da postoji statistički značajna razlika između kontrolne grupe bolesnika kao i bolesnika u III i IV stadijumu bolesti, kao i između pojedinih stadijuma bolesti (I i IV; II i IV). Posmatranjem M-MDSC signifikantna razlika je uočena samo između II i IV stadijuma. Registrovane vrednosti i PMN-MDSC i M-MDSC su bile najviše kod bolesnika u IV stadijumu bolesti. Uočena je pozitivna korelacija između zastupljenosti oba subtipa MDSC i broja organa koji su bili zahvaćeni metastatskim promenama. Primenom Dukes klasifikacije značajna razlika je uočena u zastupljenosti PMN-MDSC između zdravih osoba i osoba u B, C i D stadijumu bolesti, kao i između kontrolne grupe i D stadijuma kada su u pitanju M-MDSC. Modifikovanom Astler Coller klasifikacijom zapažena je statistički značajna razlika vrednosti PMN-MDSC između zdravih osoba i B2, C i D stadijuma bolesti, kao i između B1 i C, B1 i D, B2 i C, kao i B2 i D stadijuma bolesti. Kao i kod Dukes klasifikacije i ovde je uočena značajna razlika za M-MDSC samo kada smo poredili osobe u kontrolnoj grupi sa poslednjem stadijumu bolesti. Posmatrajući perienuralnu, limfoidnu i vensku invaziju tumora, uočena je razlika samo kod pacijenata koji imaju limfoidnu invaziju u odnosu na one kod kojih ona nije prisutna. Povezanost između MDSC i stepena diferencijacije CRC nije uočena. Takođe nije uočena ni povezanost sa starosnom dobi, polom, BMI, veličinom i lokalizacijom tumora. Pacijenti su nakon hirurškog uklanjanja tumora imali statistički značajno smanjenu zastupljenost oba subtipa MDSC koja se nije značajnije razlikovala u odnosu na zdrave osoba koji su predstavljale kontrolnu grupu. Pozitivna korelacija je bila prisutna između oba subtipa MDSC i faktora upale (SE, CRP, fibrinogen), kao i tumorskih markera (CEA i Ca 19.9), a izuzetak je činio odnos između MDSC i Ca 19.9 gde nije uočena povezanost. Veći apsolutni i relativni broj PMN-MDSC u III i IV stadijumu bolesti korelira sa kraćim preživljavanjem, a kada su u pitanju M-MDSC ova

korelacija je primećena samo kod apsolutnog broja M-MDSC. Primećena je pozitivna veza između dužine preživljavanja i Neu/PMN-MDSC i M/M-MDSC odnosa. Postoji umereno negativna korelacija između dužine života i Neu/Limf odnosa, odnosno povećanjem vrednosti NLR se smanjuje dužina života. Nije utvrđena korelacija između LMR i dužine preživljavanja. Ipak, da bi se MDSC smatrale pouzdanim markerom prognoze bolesti neophodne su multicentrične studije sa većim brojem učesnika.

7. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-249.
2. World Health Organization. The Global Cancer Observatory. March 2021. www.gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf.
3. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 2012; 118:3636.
4. Klabunde CN, Cronin KA, Breen N, et al. Trends in colorectal cancer test use among vulnerable populations in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20:1611.
5. American Cancer Society. Colorectal Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging. 2022. www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8606.00.pdf.
6. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer.* 2004;108-33.
7. Holtedah K, Borgquist L, Donker G et al. Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. *BMC Fam Pract.* 2021;22:148. <https://doi.org/10.1186/s12875-021-01452-6>.
8. Fabregas JC, Ramnarain B, George TJ. Clinical updates for Colon cancer care in 2022. *Clinical*

- Colorectal Cancer. 2022. 21;3:198-203.
9. Pino MS , Chung DC . The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* . 2010;138:2059–2072 .
 10. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361: 2449-2460 .
 11. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*.2018;16:9-18.
 12. De Palma FDE, D Argenio V, Pol J et al. The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. *Cancers* 2019;11:1017.
 13. De la Chapelle A , Hampel H . Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*.2010;28:3380–3387.
 14. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK and Slattery ML. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005; 129: 837-845.
 15. Lao VV and Grady WM: Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol.Hepatol*. 8: 2011; 686-700.
 16. Gupta R., Sinha S, Paul RN. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 2018;1–12.
 17. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Inc.6th Edition, 2019; 19-46.
 18. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes and development*. 2020. 32:1267-1284.
 19. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes. *Lab. Invest*. 2006; 86:231-45.
 20. Bregenzler M, Horst E, Mehta P. Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. *Plos One*. 2019; 1-40.
 21. Templeton AJ, McNamara MG, Seruga B et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio

- in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014. 106(6):1-16.
22. Fridlender ZG, Sun J, Kim S et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N" TAN. *Cancer Cell.* 2009; 16:183-194.
 23. Geukes Fropen MH, Donia M, Svane IM et al. Tumor-infiltrating lymphocytes or the treatment of metastatic cancer. *Mol.Oncol.* 2015;9(10):1918-1935.
 24. Prevede N, Staiano RI, Granata F et al. Expression and function of angiopoietins and their tie receptors in human basophils and mast cells. *J Biol Homeostat Agents.* 2013; 27:827-839.
 25. Galdiero MR, Varricchi G, Loffredo S et al. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *J Leukoc Biol.* 2018; 203:457-464.
 26. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:388-400.
 27. Wei Y, Zhang X, Wang G. The impacts of pretreatment circulating eosinophils and basophils on prognosis of stage colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018;14:243-251.
 28. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:298-306.
 29. Curiel TJ, Coukos G, Zou I. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine.* 2004;10:942-949.
 30. Bochet L, Lehouder C, Dauvillier S et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013; 73:5657-5668.
 31. Avery D, Govindaraju P, Jacob M et al. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biol.* 2018; 67: 90-106.
 32. Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2: 187-193.
 33. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Cancer.* 2020;20: 174-186.
 34. Syed A. New concepts of tumor microenvironment. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.* 2019; 5(6): 14-

- 22.
35. Quail D, Joice J. Molecular pathways: Deciphering mechanism of resistance to macrophage-targeted therapies. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(4): 876–884.
 36. Chen Y, Song Y, Du W. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science.* 2019. 26:78: 1-13.
 37. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014;41:49–61.
 38. Xu X, Ye J, Huang C et al. M2 macrophage-derived IL6 mediates resistance of breast cancer cells to hedgehog inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 364:77-82.
 39. Yin Y, Yao S, Hu Y, et al. The immune-microenvironment confers Chemoresistance of colorectal Cancer through macrophage-derived IL6. *Clin Cancer Res.* 2017;23:7375–87.
 40. Shiao SL, Ruffell B, DeNardo DG, et al. TH2-polarized CD4(+) T cells and macrophages limit efficacy of radiotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2015;3:518–25.
 41. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J Immunol.* 2009; 182:4499-4506.
 42. Manjili MH. Phenotypic Plasticity of MDSC in Cancers. *Immunological Investigations.* 2012; 41(6–7):711–21.
 43. Duwe A, Singhal S. The immunoregulatory role of bone marrow: I. Suppression of the induction of antibody responses to T-dependent and T-independent antigens by cells in the bone marrow. *Cellular Immunology.* 1979; 43(2):362-371.
 44. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer.* 2013;(3):739-52.
 45. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007; (67):425-426.
 46. Condamine T, Dominguez G, Youn J et al. Lectin-type oxidized LDL receptor 1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol.* 2016;1:1-15.

47. Bronte V, Brandau S, Chen SH et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 2016;7, 1-10.
48. Ma P, Beatty PL, McKolanis J. et al. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics With MDSC in Cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10, 1-8.
49. Gabrilovich D, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74.
50. Gabrilovich D. Myeloid Derived Suppressor Cells. 2017; *Cancer Immunol Res*; 5(1):1-7.
51. Serafini P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Res.* 2013;57:172–84.
52. Sica A, Porta C, Morlacchi S, Banfi S, Strauss L, Rimoldi M, Totaro MG, Riboldi E. Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs). *Cancer Microenvironment.* 2012;5:133–49.
53. OuYang LY, Wu XJ, Ye SB, Zhang RX, Li ZL, Liao W, Pan ZZ, Zheng LM, Zhang XS, Wang Z, Li Q, Ma G, Li J. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine.* 2015; 13(47):1-12.
54. Wesolowski R, Markowitz J, Carson WE. Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2013; 1:10.
55. Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G. Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Current Opinion in Immunology.* 2014;(30):24–31.
56. Boros P, Ochando J, Zeher M. Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum Immunol.* 2016; 77:631-6.
57. Wang Y, Ding Y, Deng Y et al. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis associated cancer. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000609.
58. Hock BD, McKenzie JL, Cross NB et al. Dynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: a prospective study. *Transpl Immunol.* 2015;32:164-71.

59. Moris D, Lu L, Qian S Mechanisms of liver-induced tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22:71-8.
60. Luan Y, Mosheir E, Menon MC et al. Monocit myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patient and mediate CD4⁺ Foxp3⁺ Treg expansion. *Am J Transplant*. 2013; 13:3123-31.
61. Nair RR, Sinha P, Khanna A et al. Reduced Myeloid-derived suppressor cells in the blood and endometrium is associated with early miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2015; 73:479-86.
62. Font-Burgada J, Sun B, Karim M. Obesity and cancer: the oil that feeds the flame. *Cell. Metab*. 2016; 23:48-62.
63. Alves AS, Ishimura ME, Duarte YAO et al. Parameters of the immune system and vitamin D levels in old individuals. *Front Immunol*. 2018;9:1122.
64. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*. 2015;98:913-922.
65. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. *Nat Rev Immunol*. 2012;(12):253-268.
66. Tu S, Bhagat G, Cui S et al. Overexpression of interleukin-1 α induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*. 2008;14: 408-419.
67. Lutz MB, Suri MB, Niimi M et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*. 2000;30(7): 1813-1822.
68. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res*. 2015;128:95-139.
69. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. 1996;2:1096-1103.
70. Trikha P, Carson WE. Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(1):55–65.

71. Zhang HF, Lai RS. STAT 3 in cancer-friend or foe? *Cancers*. 2014; 6:1408-1440.
72. Avalle, L.; Poli, V. Nucleus, mitochondrion, or reticulum? STAT3 a La Carte. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19, 2820.
73. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:593-605.
74. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:503-529.
75. Rebe C, Ghiringhelli F. STAT 3, a master regulator of anti-tumor immune response. *Cancers*. 2019;11: 1280.
76. Cheng P, Corzo CA, Luetke N. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med.* 2008;205(19): 2235-49.
77. Waight JD, Netherby C, Hensen ML. Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT3/IRF-8 axis. *J. Clin. Invest.* 2013;123(10):4464-78.
78. Marckert J, Qu P, Min Z. Dual negative roles of C/EBP β in expansion and pro-tumor functions of MDSCs. *Sci Rep.* 2017;7:14048.
79. Su Y, Qiu Y, Qiu Z. MicroRNA networks regulate the differentiation, expansion and suppression function of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment. *J Cancer*. 2019;10(18): 4350–4356.
80. Hinz M, Sheidereit C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO.Rep.* 2014;15(1):46-61.
81. Mao Y, Sarhan D, Steven A. Inhibition of tumor-derived prostaglandin-E2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. *Clin. Cancer. Res.* 2014;20:4096-4106.
82. Zhao Q, Guo J, Wang G, Chu Y, Hu X. Suppression of immune regulatory cells with combined therapy of celecoxib and sunitinib in renal cell carcinoma, *Oncotarget*. 2017. 8(1): 1668–1677.
83. Condamine T, Kumor I, Ramachandran R et al. ER stress regulates myeloid-derived suppressor

- cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis. *J.Clin.Invest.*2014; 124(6):2626-39.
84. Lu LC, Chang CJ, Shu CH. Targeting myeloid-derived suppressor cells in the treatment of hepatocellular carcinoma: current state and future perspectives. *Journal of Hepatocellular Carcinoma.* 2019;6:71–84.
 85. Consonni F, Porta C, Marino A. Myeloid-derived suppressor cells: Ductile targets in disease. *Front Immunol.* 2019;10:949:1-15.
 86. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(10):1590-1600.
 87. Raber PL, Thevenot P, Sierra R. Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *Int J Cancer.* 2014;134:2853-2864.
 88. Dysthe M, Parihar R. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Tumor Microenvironment. Advances in experimental medicine.* 2020;117-140.
 89. Lee CR, Kwak Z, Yang T et al. Myeloid-derived suppressor cells are controlled by regulatory T cells via TGF- β during murine colitis. *Cell Rep.*2016;17:3219-3232.
 90. Mantovani A, Sozzani S, Locati M et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23:549-555.
 91. Beury D, Parker K, Nyandio M et al. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 96(6):1109-1118.
 92. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury D. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in cancer biology.* 2012;22:275-281.
 93. Ouzounova M, Lee E, Piranlioglu R et al.: Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat Commun.* 2017;8:14979.
 94. Parker KH, Beury DW, ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells

- driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv. Cancer Res.* 2015; 128:95-139.
95. Charles JF, Hsu LY, Niemi EC, Weiss A, Aliprantis AO, Nakamura MC: Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clin Invest.* 2012;122:4592-4605.
96. Karakasheva TA, Waldron TJ, Eruslanov E et al. CD38-expressing myeloid-derived suppressor cells promote tumor growth in a murine model of esophageal cancer. *Cancer Res.* 2015;75(19):4074-85.
97. Milrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cell. *Oncotarget.* 2017;8 (2):3649-3665.
98. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:563–84.
99. Yang J, Yan J, Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. *Front. Immunol.* 2018;9:978:1-9.
100. Horikawa N, Abiko K, Matsumura N. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Clin. Cancer. Res.* 2017; 23:587-599.
101. Binsfeld M, Muller J, Lamour V. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016;7:37931–37943.
102. Burke M, Choksawangkam W, Edwards N et al. Exosomes from myeloid-derived suppressor cells carry biologically active proteins. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 836–843.
103. Clark CE, Hingorani SR, Mick R. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer res.* 2007;67:9518-9527.
104. Condamine T, Ramachandran I, Zoun JI et al. Regulation of Tumor Metastasis by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Annu Rev Med.* 2015; 8:29.
105. Qian B, Deng Y, Im JH et al. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS ONE.* 2009;4:e6562.

106. Heeke S, Mograbi B, Alix-Panabieres C, Hofman P. Never travel alone: the crosstalk of circulating tumor cells and the blood microenvironment. *Cells*. (2019) 8:1–12.
107. Sprouse M, Welte T, Boral D et al. PMN-MDSCs Enhance CTC Metastatic Properties through Reciprocal Interactions via ROS/Notch/Nodal Signaling. *Int J Mol Sci*. (2019) 20:1–20.
108. Albregues J, Shields MA, Ng D et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*. (2018) 361:eaa04227.
109. Wang Y, Ding Y, Guo N. MDSCs: key criminals of tumor pre-metastatic niche formation. *Front Immunol*. 2019;10:172.
110. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. (2005) 438:820–7.
111. Shi H, Zhang J, Han X, Li H, Xie M, Sun Y, et al. Recruited monocytic myeloid-derived suppressor cells promote the arrest of tumor cells in the premetastatic niche through an IL-1beta-mediated increase in E-selectin expression. *Int J Cancer*. (2017) 140:1370–83.
112. Shojaei F, Wu X, Qu X, Kowanz M, Yu L, Tan M, et al. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:6742–7.
113. Gao D, Joshi N, Choi H, Ryu S, Hahn M, Catena R, et al. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Res*. (2012) 72:1384–94.
114. Trovato R, Cane S, Petrova V et al. The Engagement Between MDSCs and Metastases: Partners in Crime. *Frontiers in Oncology*. 2020;10 (165): 1-16.
115. Xin H, Zhang C, Herrmann A et al. Sunitinib inhibition of STAT3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res*. 2009; 69: 2506-2513.
116. Guislan A, Gadiot J, Kaiser A et al. Sunitinib pretreatment improves tumor-infiltrating lymphocyte expansion by reduction in intratumoral content of myeloid-derived suppressor cells in human renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother*. 2015;64:1241-1250.
117. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M et al. Accumulation of MDSC and Th17 cells in

- patient with metastatic colorectal cancer predicts the efficacy of a FOLFOX-bevacizumab drug treatment regimen. *Cancer Res.* 2016;76:5241-5252.
118. Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W et al. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2011;71:2664-2674.
119. Bauer R, Udonta F, Wroblewski M et al. Blockade of myeloid-derived suppressor cells expansion with all trans retinoic acid increases the efficacy of antiangiogenic therapy. *Cancer Res.* 2018; 78: 3220-3232.
120. Walsh JE, Clark AM, Day TA et al. Use of alpha 25-dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma. *Hum. Immunol.* 2010; 71(7):659-65.
121. Lin S, Wang J, Wang L et al. Phosphodiesterase-5 inhibition suppresses colonic inflammation-induced tumorigenesis via blocking the recruitment of MDSC. *American Journal of Cancer Research.* 2017; 7(1):41-52.
122. Califano J, Khan Z, Noonan K et al. Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21(1):30-8.
123. Tavazioie MF, Pollack I, Tanqueco R et al. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer. *Cell.* 2018;(172):825-840.
124. Faguet GB. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *IJC.* 2015;136(9):2022-36.
125. Kim C. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* 2010; 1:13-19.
126. Bunt SK, Yang L, Sinha P et al. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 2007; 67:10019–10026.
127. Zhang B, Wang Z, Wu L et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8: e57114.
128. Beury DW, Carter KA, Nelson C et al. Myeloid-Derived suppressor cell survival and

- function regulated by the transcription factor Nrf2. *J Immunol.* 2016;196(8):3470-8.
129. Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B et al. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods.* 2012;381(1-2):14-22.
 130. Apodaca M, Wright A, Riggins A et al. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2019; (7):230: 1-11.
 131. Pinton L, Solito S, Masetto E. Immunosuppressive activity of tumor-infiltrating myeloid cells in patients with meningioma. *Oncoimmunology.* 2017; 7(7): e1440931.
 132. Zhou J, Nefedova Y, Lei A et al. Neutrophils and PMN-MDSCs: their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol.* 2018;35: 19–28.
 133. Mishalian I, Granot Z, Fridlener ZG. The diversity of circulating neutrophils in Cancer. *Immunobiology.* 2016; S0171–2985, 30017–1.
 134. Dumitru CA, Moses K, Rellakis S et al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61:1155-67.
 135. Elghetany MT. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review. *Blood Cells, Mol Dis.* 2002;28(2):260-274.
 136. Stanojević I, Đukić M, Vojvodić D. Granulocytes myeloid-derived suppressor cells in peropheal blood of patients with cutaneous melanoma. *Int. Immunol.* 2016; 28(2):99.
 137. Safarzadeh E, Hashemzadeh S, Duijf P et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells: An independent prognostic factor in patients with breast cancer. *J Cell Physiol.* 2018;1–11.
 138. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C et al. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non–Small Cell Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2018;198(6):777-787.
 139. Liang Y, Lü B, Peng Zhao. Increased circulating GrMyeloid-derived suppressor cells correlated with tumor burden and survival in locally advanced cervical cancer patient. *Journal of*

- Cancer. 2019;10:1341-1348.
140. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L et al. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *International Immunology*. 2015; 28(2):87–97.
 141. Jiao ZJ, Gao JJ, Hua SH et al. Correlation between circulating myeloid-derived suppressor cells and Th17 cells in esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 5454-5461.
 142. Li N, Han D, Sun J et al. Subtypes of MDSCs in mechanisms and prognosis of gastric cancer and are inhibited by epirubicin and paclitaxel. *Discov Med*. 2018; 25: 99-112.
 143. Xu XD, Hu J, Wang M et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2016;15(1):99-105.
 144. Apodaca MC, Wright AE, Riggins AM et al. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019; 7:230.
 145. Toor S, Khaya AS, Salhat HE et al. Increased levels of of Circulating and Tumor-Infiltrating Granulocytic Myeloid Cells in Colorectal Cancer Patients. *Front. Immunol*. 2016; 7: 1-10.
 146. Hossain F, Al-Khami AA, Wyczechowska D et al. Inhibition of fatty acid oxidation modulates immunosuppressive functions of myeloid-derived suppressor cells and enhances cancer therapies. *Cancer Immunol*. 2015; 3:1236–47.
 147. Karakasheva TA, Dominguez GA, Hashimoto A et al. CD38+ M-MDSC expansion characterizes a subset of advanced colorectal cancer patients. *JCI Insight*. 2018;3:e97022
 148. Ma P, Beatty P, McKolanis J. Circulating Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) That Accumulate in Premalignancy Share Phenotypic and Functional Characteristics With MDSC in Cancer. *Front. Immunol*. 2019;10:1401.
 149. Federova L, Pilatova K, Selingerova I et al. Circulating myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with colorectal cancer – Exploratory analysis of their biomarker potential. *Klin. Onkol*. 2018; 31(2):2S88-2S92.

150. Chouaib S, Umansky V, Kieda C. The role of hypoxia in shaping the recruitment of proangiogenic and immunosuppressive cells in the tumor microenvironment. *Contemp Oncol.* 2018;22:7–13.
151. Zhonghua L, Wenlin L, Xichao W. S100A9 promotes prostate cancer cell invasion by activating TLR4/NF- κ B/integrin β 1/FAK signaling. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 6443–6452.
152. Peinado H, Zhang H, Matei IR et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17:302–17. doi: 10.1038/nrc.2017.6.
153. Toora S, Elkord D. Comparison of Myeloid Cells in Circulation and in the Tumor Microenvironment of Patients with Colorectal and Breast Cancers. *Journal of Immunology Research.* 2017; 1-9.
154. Messenger DE, Driman DK, Kirsch R. Developments in the assessment of venous invasion in colorectal cancer: implications for future practice and patient outcome. *Hum Pathol.* 2012; 43:965–73.
155. Maughan NJ, Morris E, Forman D et al. The validity of the Royal College of Pathologists' minimum dataset for colorectal cancer within a population. *Br J Cancer.* 2007;97:1393-8.
156. Sato T, Ueno H, Mochizuki H, et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2010;34: 454-62.
157. Watanabe T, Muro K, Ajioka Y et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2018; 23(1): 1–34.
158. Sun HL, Zhou X, Xue YF. Increased frequency and clinical significance of myeloid derived suppressor cells in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012 July 7; 18(25): 3303-3309.
159. Lim DR, Kuk JK, Kim T et al. Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection. Which side is better outcome? Lim et al. *Medicine.* 2017; 96:42.
160. Lee JM, Han YD, Cho MS et al. Impact of tumor sidedness on survival and recurrence

- patterns in colon cancer patients. *Ann Surg Treat Res.* 2019; 96. 296-304.
161. Mundy-Bosse BL, Thornton LM, Yang HC, Andersen BL, Carson WE. Psychological stress is associated with altered levels of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer patients. *Cell Immunol.* 2011;270(1):80–7.
 162. Xu J, Peng Y, Yang M, et al. Increased levels of myeloid-derived suppressor cells in esophageal cancer patients is associated with the complication of sepsis. *Biomed Pharmacother.* 2020;125:109864.
 163. Tang F, Tie Y, MD, Hong W et al. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells for Premetastatic Niche Disruption After Tumor Resection. *Ann Surg Oncol.* 2020; 1-19.
 164. Su X, Fan Y, Yang L, et al. Dexmedetomidine expands monocytic myeloid-derived suppressor cells and promotes tumour metastasis after lung cancer surgery. *J Translational Med.* 2018;16(1):347.
 165. Yuan L, Xu B, Fan H et al. Pre- and post-operative evaluation: percentages of circulating myeloid-derived suppressor cells in rectal cancer patients. *Neoplasma.* 2015; 62(2):239-249.
 166. Lee WC, Wang YC, Cheng CH et al. Myeloid-derived suppressor cells in the patients with liver resection for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports.* 2019; 9: 2269:1-9.
 167. Wolf A, Fonham E, Church T et al. Colorectal Cancer Screening for Average-Risk Adults: 2018 Guideline Update From the American Cancer Society. *Cancer J Clin.* 2018; 1-32.
 168. Institute of public health of Serbia „Dr Milan Jovanović Batut”. Malignant tumors in Republic of Serbia 2020. Serbian Cancer registry. 2022; Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/malignitumoriuRepubliciSrbiji2020.pdf>.
 169. Browdish D. Myeloid-derived suppressor cells, age and cancer. *OncoImmunology* 2:7, e24754;
 170. Verschoor CP, Johnstone J, Millar J et al. Blood CD33⁺HLA-DR⁺ myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *J Leukoc Biol.* 2013;93:633–637.
 171. Bayik D, Zhou Y, Park C et al. Myeloid-derived suppressor cell subsets drive

- glioblastoma growth in a sex-specific manner. American Association for Cancer Research. 2020;10(8):1210-1225.
172. Clements VK, Long T, Long R et al. High fat diet and leptin promote tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 2018;1–13.
173. Bao Y, Mo J, Ruan L. Increased monocytic CD14⁺HLADR^{low}/- myeloid-derived suppressor cells in obesity. *Mol Med Rep.* 2015; 11(3):2322-8.
174. Friedrich K, Sommer M, Strober S et al. Perturbation of the Monocyte Compartment in Human Obesity. *Front. Immunol.* 2019; 10:1874; 1-10.
175. Liu YF, Zhuang KH, Chen B et al. Expansion and activation of monocytic-myeloid-derived suppressor cell via STAT3/arginase-I signaling in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Research and Therapy.* 2018; 20(168):1-13.
176. Trellakis S, Bruderek K, Hutte J et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immunity.* 2013;19(3):328–336.
177. Ramphal W, Boeding J, Iwarden M et al. Serum Carcinoembryonic antigen to predict recurrence in the follow-up of patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* 2019;34:60-68.
178. Okazaki, S, Baba H, Iwata N et al. Carcinoembryonic antigen testing after curative liver resection for synchronous liver metastasis of colorectal cancer: a Japanese multicenter analysis. *Surg Today.* 2017; 47, 1223-1229.
179. Okamura R, Hasegawa S, Hida K. et al. The role of periodic serum CA19-9 test in surveillance after colorectal cancer surgery. *Int J Clin Oncol.* 2017; 22: 96-101.
180. Lin Q, Ren L, Jian M et al. The mechanism of the premetastatic niche facilitating colorectal cancer liver metastasis generated from myeloid-derived suppressor cells induced by the S1PR1–STAT3 signaling pathway. *Cell Death and Disease.* 2019;10:693:1-18.
181. Tada K, Kitano S, Shoji H et al. Pretreatment Immune Status Correlates with progression-free Survival in Chemotherapy Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancer Immunol Res;* 2016; 4(7): 592-599.
182. Ai L, Mu S, Wang Y et al. Prognostic roles of myeloid-derived suppressor cells in

- cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2018; 18:1220.
183. Wang PF, Song SY, Wang TJ et al. Prognostic role of pretreatment circulating MDSCs in patients with solid malignancies: A meta-analysis of 40 studies. *Oncoimmunology*. 2018; e1494113-3.
184. Lang S, Bruderek K, Kaspar C. Clinical relevance and suppressive capacity of human MDSC subsets. *Clinical Cancer Research*. 2018; 1-28.
185. Kim. U, Papatestas A. Peripheral lymphocyte counts in colonic disease. *The Lancet*. 1974; 304(7878), 462–463.
186. Sato H, Tsubosa Y, Kawano T. Correlation Between the Pretherapeutic Neutrophil to Lymphocyte Ratio and the Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Advanced Esophageal Cancer. *World Journal of Surgery*. 2012; 36: 617–622.
187. Song Y, Yang Y, Gao P et al. The preoperative neutrophil to lymphocyte ratio is a superior indicator of prognosis compared with other inflammatory biomarkers in resectable colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2017; 17:744:1-8.
188. Zou ZY, Liu HL, Ning N et al. Clinical significance of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio as prognostic factors for patients with colorectal cancer. *Oncology letters*. 2016; 11(3): 2241-8.
189. Kim KH, Gemoets D, Le MN. Utility of neutrophil to lymphocyte ratio in predicting colorectal cancer prognosis at a VA hospital: Do stage and sidedness matter? *Journal of Clinical Oncology*. 2020; 38(15):e16110.
190. Afari M, Bhat T. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and cardiovascular diseases: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14(5):573-7.
191. Lee S, Oh SY, Kim SH et al. Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. *BMC Cancer*. 2013; 13(350):1-11.
192. Chiang SF, Hung HY, Tang R et al. Can neutrophil-to-lymphocyte ratio predict the survival of colorectal cancer patients who have received curative surgery electively? *Int J*

- Colorectal Dis. 2012; 27:1347–1357.
193. Chan J, Chan D, Diacos C. The Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is a Superior Predictor of Overall Survival in Comparison to Established Biomarkers of Resectable Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2017; 265:539–546.
 194. Tan D, Fu Y, Tong W et al. Prognostic significance of lymphocyte to monocyte ratio in colorectal cancer: A meta-analysis. *International Journal of Surgery.* 2018; 55:128-138.
 195. Shimura T, Shibata M, Gonda K et al. Prognostic impact of preoperative lymphocyte to monocyte ratio in patients with colorectal cancer with special reference to myeloid derived suppressor cells. *Fukushima J. Med. Sci.* 2018; 64 (2): 64-72.
 196. Peng JH, Li H, Ou QJ et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio represents a superior predictor compared with neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios for colorectal liver-only metastases survival. *OncoTargets and Therapy.* 2017; 10 3789–3799.
 197. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H et al. Prognostic significance of the preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with colorectal cancer. *Oncology Letters.* 2017; 13(2): 1000-1006.
 198. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S et al. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Reports.* 2015; 10: 562–573.
 199. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol.* 2019;106:309–322.
 200. Udovičić I. Značaj supresorskih ćelija mijeloidnog porekla u sistemskoj cirkulaciji pacijenata sa peritonitisom, pankreatitisom i traumom komplikovanih sepsom. 2018.
 201. Bergenfelz C, Larsson A-M, von Stedingk K, et al. Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127028.