



**МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ  
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ  
ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**Др Јелена Вуковић**

**Значај одређивања броја супресорских ћелија  
мијелоидног порекла у крви и микроциркулацији  
тумора код болесника са карциномом плућа**

**Докторска дисертација**

**Ментор: Пк доц. др сци. мед. Слободан Аћимовић**

**Београд, 2020. год.**

## **Захвалница**

## Садржај

1. УВОД.....	4
1.1. Иmunска основа тумора.....	8
1.2. Супресорске ћелије мијелоидног порекла.....	12
1.3. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома.....	20
1.4. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома плућа.....	26
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ.....	36
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	38
А. ВРСТА СТУДИЈЕ.....	38
Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ.....	38
В. УЗОРКОВАЊЕ.....	39
Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ.....	42
Д. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	44
4. РЕЗУЛТАТИ.....	45
4.1. Заступљеност <i>MDSC</i> у различитим узорцима контролне групе и оболелих пацијената.....	46
4.2. Патохистолошки тип тумора и <i>MDSC</i> .....	51
4.3. Величина тумора и <i>MDSC</i> .....	61
4.4. Нодални статус и <i>MDSC</i> .....	71
4.5. Постојање метастаза и <i>MDSC</i> .....	80
4.6. Клинички стадијум и <i>MDSC</i> .....	89
5. ДИСКУСИЈА.....	98
6. ЗАКЉУЧАК.....	111
7. ЛИТЕРАТУРА.....	113

## 1. Увод

Карцином плућа је на основу најновијег извештаја Светске здравствене организације најчешћи малигни тумор (1). Он је био узрок смрти код 18,4% пацијената са малигнитетима у 2018. години, а 1.761.007 пацијената је умрло током 2019. године од карцинома плућа широм света (укупан број умрлих од малигнитета је био 9.555.027 пацијената). Такође, у 2018. години, регистровано је укупно 2.093.876 нових случајева карцинома плућа широм света или 11,6% од свих новооболелих пацијената са неким малигнитетом (укупан број новооболелих од малигнитета је био 18.078.957 пацијената).

У односу на пол, карцином плућа је најчешћи новодијагностиковани малигнитет, али и најчешћи узрок смрти код мушкараца, док је код жена на другом месту после карцинома дојке, како по броју новооболелих тако и по броју умрлих од малигнитета (2).

Око 85% свих карцинома плућа чини неситноћелијски карцином плућа (енг. *Non-Small Cell Lung Cancer- NSCLC*), а свега 15% ситноћелијски карцином плућа (енг. *Small Cell Lung Cancer- SCLC*) (3, 4, 5). Карцином плућа је веома агресиван тумор и око 65% пацијената са *NSCLC* у тренутку постављања дијагнозе већ има локалне или пак удаљене метастазе (3, 6). Најчешћи патохистолошки типови *NSCLC* су сквамозелуларни, адено и крупноћелијски карцином плућа (7).

Просечно петогодишње преживљавање пацијената са *NSCLC* креће се у распону од 75% до мање од 5% у Сједињеним Америчким Државама у зависности од клиничког стадијума болести али и од извора података (8,9). На основу најновијих процена стопа петогодишњег преживљавања од тренутка постављања дијагнозе код

локализоване болести је 57,4%, код регионално узнатредовале болести 30,8%, док је код постојања удаљених метастаза 5,2% (8).

Са друге стране, општа стопа петогодишњег преживљавања за особе са *SCLC* износи око 6% (5,10). Важно је напоменути да стопа преживљавања и код ових пацијената зависи од више фактора, укључујући пре свега стадијум болести. За болеснике са локализованом формом *SCLC*, односно обликом болести где се рак није проширио изван плућа, укупна стопа петогодишњег преживљавања износи 27%. За регионално узнатредовали облик *SCLC*, стопа петогодишњег преживљавања је 16%, док је за пацијенте који имају удаљене метастазе петогодишње преживљавање свега 3%.

Према подацима Националног института за рак (Сједињене Америчке Државе (САД)), клинички стадијум рака у ком се постави дијагноза одређује могућности лечења, а самим тим има велики утицај на дужину преживљавања пацијената (9). Генерално, ако је карцином локализован, каквих је око 17% дијагностикованих са карциномом плућа, стопа петогодишњег преживљавања је висока, 59%. Код пацијената са регионалним проширењем тумора (22% од свих дијагностикованих са карциномом плућа) преживљавање је 31,7%, док је код пацијената са удаљеним метастазама 5,8% (више од пола дијагностикованих, односно 57% од свих новодијагностикованих са карциномом плућа). Иако су ови подаци веома забрињавајући, у САД је показано да последњих десет година постоји тренд смањења броја новодијагностикованих пацијената са карциномом плућа, али и броја умрлих, тако да се петогодишња стопа преживљавања поправља последњих година, захваљујући ранијем постављању дијагнозе и све бољој и савременијој терапији, али је смртност и даље висока. Такође је показано да се највећи број новооболелих од карцинома плућа дијагностикује након 45 године старости, а

највећи пик је у распону од 65-74 године, чак 34,1% од свих новооболелих (9). Стопе истог тренда су и за број умрлих од карцинома плућа, тако да је 32,2% умрлих такође из исте добне групе, од 65-74 године старости.

Епидемиолошки подаци за карцином плућа указују да се ради о веома агресивном малигнитету. Карцином плућа има значајан утицај и на квалитет живота и на радну способност оболелих (11). Због тога захтева брзо постављање дијагнозе, како би овакви пацијенти одмах започели са адекватном терапијом што зависи од фазе болести, хистопатолошког типа тумора, налаза *imaging* метода и туморских маркера, генских анализа и имунских тестова. На основу свега прописује се адекватна терапија која представља комбинацију хируршког лечења, зрачне терапије и/или хемиотерапије, биолошке и циљане терапије у зависности од клиничког стадијума болести (11) и општег стања пацијента (енг. *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)* статус пацијента) (12,13).

Стадијум болести одређује се према *TNM* класификацији (енг. *T-primary tumor, N-regional lymph nodes, M-distant metastasis- TNM*) (11). Око 25-40% карцинома плућа су ресектабилни у тренутку постављања дијагнозе, а свега 20% од њих има ограничену болест у време када се подвргавају хируршком лечењу. Зато је важно да се дијагноза постави док је карцином плућа још увек ограничен на једно плуће, како би се могао хируршки лечити. Када настану метастазе, регионалне или удаљене, лечење је далеко теже, неизвесније и најчешће са лошом прогнозом.

Генерално код пацијената са карциномом плућа јављају се најпре локалне манифестације болести у зависности од локализације тумора, или су повезане са регионалним или удаљеним метастазама (14). Може се јавити и паранеоплазматски синдром са кардиоваскуларним, неуромускуларним, гастроинтестиналним, хематолошким, дерматолошким и метаболичким манифестацијама, нефритичким

синдромом, грозницом и хипертрофичном пулмоналном остеоартропатијом. Симптоми болести зависе од локализације, величине тумора, постојања метастаза и системских манифестација због паранеоплазматског синдрома. Код централно локализованих тумора јављају се најчешће диспнеја, кашаљ и отежано дисање опструктивног типа, хемоптизије, визинг или стридор, бол у грудима, као и фебрилност код постопструктивног пнеумонитиса. Код тумора периферне локализације најчешће се јавља кашаљ, диспнеја рестрикцијског типа, болови, хемоптизије, плеурални излив и стварање туморских каверни услед некрозе. Код интраторакалног екстензивног раста тумора јављају се *Pancoast* тумор или *superior sulcus* тумор, синдром опструкције горње шупље вене, парализа рекурентног нерва, захватање плућне марамице и дијафрагме, зида грудног коша, перикарда и срца и једњака. Што се тиче паранеоплазматских синдрома, они настају као последица стварања полипептидних хормона, цитокина, амина, хормонима сличних супстанци, имунокомплекса, антитела и других имуномодулатора од стране карцинома плућа, па се испољавају у облику ендокринолошких, неуролошких, кожних, хематолошких и бубрежних манифестација (14,15,16).

Код онколошких пацијената данас се примењује концепт персонализоване медицине у терапији (17). Терапијска опција лечења пацијената са карциномом зависи пре свега од клиничког стадијума болести (18), која се темељи на патохистолошком типу тумора, анатомској проширености и општем клиничком стању пацијената. Уз хируршку терапију, у лечењу пацијената са карциномом плућа у I, II и III клиничком стадијуму болести, користи се и допунска зрачна и цитостатска терапија (11, 19). У крајњим стадијумима болести када је тумор нересектибилан (IIIb и IV TNM стадијуми), пацијентима се може дати индукциона хемиотерапија како би се евентуално, ако је тумор сензитиван на примењену

терапију, смањила туморска маса и пацијент превео у нижи стадијум болести у коме би се могло применити хируршко лечење (20). Тумори у лумену ваздушних путева моги бити третирани фотодинамичком терапијом. У новије време лечење се све више фокусира на примену биолошке и циљане терапије (21).

### **1.1. Иmunска основа тумора**

Активна интеракција тумора и имунског окружења домаћина је веома значајна за објашњење имунских основа тумора и раста тумора (22). Током развоја тумор стиче различите генетске промене и последичну експресију продуката својих гена. Ови производи су специфични протеини и потенцијални су туморски антигени које имунски систем домаћина треба да препозна као стране антигене. Због тога је једно од кључних питања како имунски систем препознаје ове антигене: специјално, тако да га они активирају, или постаје толерантан према њима као према антигенима властитог ткива. Већина тумора покреће слабу или никакву реакцију одбацавања код људи (већина је слабо имуногена). Као потврда значаја имунског надзора за обуздавање тумора јесте велика учесталост тумора код имunosупримираних/имунодефицичних особа (23). Да би тумори преживели у домаћину, они морају развити активне механизме који им омогућавају инвазију ткива без активације имунских одговора који би разорили туморско ткиво (22). Стога је прекид имунске толеранције централни циљ активне имунолошке терапије тумора.

Иако тумори настају од нормалног ткива, а самим тим и задржавају његове основне морфолошке и функционалне карактеристике, они се значајно разликују од својих нормалних претеча у биолошком понашању. Основне одлике малигних



тумора су: неконтролисани раст и размножавање ћелија, изостанак одговора на регулаторне сигнале одговорне за нормалан раст и опоравак оштећења ткива, инвазиван раст и прелазак баријера нормалних ткива, а самим тим и метастазирање путем лимфе и крвотока у удаљене органе (22). Чињеница која је одговорна за овакво понашање јесте генетска нестабилност туморских ћелија, током туморогенезе дешавају се непрекидно мутације, синтеза нових молекула и концентрација мутираних протеина се стално повећава (22).

При малигној трансформацији настају промене генетског састава туморских ћелија настанком нових гена типичних за одређени тумор, тј. онкогена (22). Новонастали протеински молекули у туморској ћелији, када су лоцирани на површини ћелијске мембране, представљају тумор специфичне антигене јер могу индуцирати хуморални или целуларни имунски одговор. Ови протеини лоцирани на ћелијској мембрани, представљају специфичне рецепторе за факторе раста и прогресије тумора, који, када се вежу за ове факторе (нпр. фактор епителног раста-*EGF*), покрећу интрацелуларне механизме тј. репликацију ћелијског генома, односно раст и прогресију тумора.

Као што смо већ написали, основна молекуларна одлика карцинома је генетска нестабилност, па се у тумору са његовим растом и прогресијом болести стално генеришу нови антигени и мења се антигени профил туморских ћелија (22). Друга биолошка особина туморских ћелија је што она прелази баријере нормалних ткива и метастазира, а самим тим и мења архитектуру ткива. На ћелијском нивоу, нормална ћелијско-ћелијска адхезија и интеракција ћелије и ткивног матрикса се кида, што даје проинфламаторне сигнале у форми цитокина и хемокина, који су кључни иницијатори имунског одговора. За разлику од нормалних ткива, карциноми су током инвазије и метастазирања стално конфронтирани са инфламаторним

одговором. Како тумори модулирају тај одговор, зависи од њиховог међуделовања са домаћинским имунским системом. За успешан развој тумора потребно је да тумори развију механизме којим ће избећи имунски надзор домаћина. Механизам туморске резистенције је један од видова избегавања имунског система домаћина, али није потврђено да промене у процесуирању нових гена туморске ћелије или експресија инхибиторних молекула имунског система, представљају одговор тумора на активирани антитуморски имунитет. Други важан механизам за претпостављену имунску резистенцију тумора је експресија молекула на површини туморске ћелије, које инхибирају ефекторе имунског одговора. И даље се не зна пуно о туморским механизмима избегавања имунског система домаћина. Стога се сматра да клинички узнатредовали тумори вероватно имају развијене активне механизме који резултују толеранцијом.

Антитуморски имунски одговор је често неефикасан јер тумори расту веома брзо и због тога раст тумора једноставно надмаши имунски одговор. Имуни одговор против тумора може бити слаб јер су многи туморски антигени веома слабо имуногени, због тога што се врло мало разликују од сопствених антигена.

Избегавање је могуће зато што неки тумори престају да експримирају антигене који су мета напада имунског система (24). Уколико изгубљени антиген није укључен у одржавању малигних особина тумора, такви типови туморских ћелија настављају да расту и да се шире. Други тумори пак престају да исказују *MHCI* молекуле па не могу да приказују антигене *CD8+* Т ћелијама. Пошто *NK* ћелије препознају ћелије којима недостају *MHCI* молекули, они могу да убију само оне туморе који не експримирају ове молекуле. Сами тумори такође могу да производе молекуле који супримирају имунски одговор (нпр. фактор трансформације раста бета  $TGF-\beta$ ).

Промене у онкогенима и тумор супресорским генима и/или епигенетске промене доводе до прогресије тумора и локалне инвазије ткива која узрокује перзистентну инфламаторну ћелијску туморску инфилтрацију (25). Тумор узрокује да ћелијски инфилтрата одржавају на тај начин поремећену регулацију инфламације, која имунолошки не реагује на туморско ткиво. Анализа и идентификација интеракција између инфилтрата и тумора може помоћи у дизајнирању специфичних персонализованих антитуморских третмана репрограмирањем туморске микрооколине.

Значајан удео инфламаторног целуларног туморског инфилтрата су супресорске ћелије мијелоидног порекла (енг. *myeloid-derived suppressor cells-MDSC*), које одржавају имуносупресивно окружење, подржавајући ширење тумора у околно ткиво и на удаљена места преко олакшане ангиогенезе и метастазирања (25). Интеракција између туморских ћелија и имунорегулаторних ћелија домаћина у стварању микроокружења које поспешује прогресију тумора налази се у жижи бројних истраживања последњих година (26). Супресорске ћелије мијелоидног порекла представљају хетерогену популацију незрелих дендритичних ћелија, макрофага и гранулоцита. Код болесника са тумором ове ћелије акумулирају се у туморском микроокружењу, дренажним лимфним чворовима, периферној крви и јетри и њихов број корелира са стадијумом болести и метастатском болешћу (26).

Управо, карцином плућа избегава надзор имунског система домаћина посредством ремећења процеса инфламације, односно дисрегулацијом инфламације (25). У избегавању имунске деструкције туморских ћелија, развој периферне толеранције вероватно игра кључну улогу (27). Активација и регулација специфичних Т лимфоцита је под контролом антиген презентујућих ћелија (*APC*) и регулаторних Т лимфоцита (*Treg*), а улога регулаторних Т лимфоцита у супресији

антитуморског имунског одговора одавно је позната. Међутим, поред регулаторних Т лимфоцита, сматра се да су *MDSC* ћелије важан фактор имуносупресије у многим туморима (27).

У костној сржи од нормалних хематопоеетских стем ћелија настају дендритичне ћелије, макрофаги и гранулоцити услед мијелоидне активације као одговор на вирусе и бактерије, а ове новоформиране ћелије доводе до фагоцитозе, респираторне експлозије и ослобађања проинфламаторних цитокина (28). Са друге стране, развој *MDSC* стоји под контролом сложеног система сигнала подељених у две групе: сигнали који промовишу акумулацију незрелих мијелоидних ћелија и сигнали који промовишу патолошку активацију ових ћелија. Патолошка активација је резултат трајне стимулације мијелоидног одељка сигнаlima релативно слабог интензитета пореклом од тумора. Активирани *MDSC* се карактеришу релативно лошом фагоцитном активношћу и континуираном производњом реактивних кисеоничних врста, азот-оксида и антиинфламаторних цитокина.

## 1.2. Супресорске ћелије мијелоидног порекла

*MDSC* су хетерогена популација незрелих мијелоидних ћелија које се састоје од мијелоидних прогенитора и прекурсора дендритичних ћелија (*DC*), макрофага и гранулоцита. Ове ћелије настају у костној сржи од заједничких мијелоидних прогениторских ћелија (28). Имају способност да инхибирају различите функције Т лимфоцита (29). Код мишева су идентификоване помоћу *CD11b+*, *IL-4Ra+* и *Gr1+* експресије (25, 26). Међутим, ова ћелијска популација је слабије дефинисана код људи, али генерално су *MDSC* мијелоидног порекла (*CD33+*), *CD11b+*, супримирајуће и са слабом антиген презентујућом функцијом (*HLA-DR-/lo*) (26).

Код здравих људи ове ћелије су ретке или одсутне у потпуности, али под неким околностима (какве су нпр. траума, сепса) могу се нагомилати у циљу ублажавања имунског одговора.

Код пацијената са карциномима њихов број је у корелацији са стадијумом болести и метастатском болешћу (30). Утицај *MDSC* на антитуморски имунски одговор је значајан, стога су ове ћелије одлична мета за антитуморско дејство стимулацијом диференцијације *MDSC* у зрели несупресивни фенотип, смањењем броја *MDSC* и инхибицијом супресије антитуморске имуности (31,32,33).

Сматра се такође да *MDSC* имају значајну улогу не само у избегавању имунског одговора већ и у туморској прогресији и метастазирању кроз утицај на туморску микрооколину (34) и кроз генерисање реактивних кисеоничних врста (*ROS*), удружених са слободним радикалима и имунорегулаторним цитокинима који супримирају *CD4+* и *CD8+* Т ћелијске одговоре (35,36).

На основу морфологије и испољавања специфичних мембранских маркера (*Ly6C* и *Ly6G* унутар *Grl* ћелија) *MDSC* се уопштено деле у два подтипа, гранулоцитне и моноцитне *MDSC* (37). Ћелије *CD11b+* *Ly6G+* *Ly6Clo* са мултилобулираним једрима и морфологијом сличном гранулоцитима се називају гранулоцитним *MDSC*, а ћелије *CD11b+* *Ly6G-* *Ly6Chi* називају се моноцитним *MDSC* (38). Код људи, *MDSC* су идентификоване преко површинске експресије *CD33+* и недостатка експресије маркера зрелих мијелоидних и лимфоидних ћелија. Оне су типично *CD11b+*, *CD33+*, *CD34+* и *CD14-* и варирају у експресији *CD15*, *CD124*, *CD66* и експресији главног комплекса хистокомпатибилности класе II (*MHC II*) (39). *MDSC CD11b+*, *CD14-*, *CD15+* и *CD33+* фенотипа су описане код пацијената са узнапредовалим неситноћелијским карциномом плућа (40,41). Будући

да експресија гена *MDSC* варира у различитим врстама тумора, идентификација јединственог скупа маркера за хумани *MDSC* је и даље веома изазовна.

Нагомилавање, експанзија и активација *MDSC* у тумору зависе од тумор или строма-зависних фактора раста, цитокина и хемокина (42,43). Ови укључују простагландин *E2 (PGE2)*, матрикс металопроотеиназе, трансформишући фактор раста бета (*TGF-β*), интерлеукин 10 (*IL-10*), васкуларни ендотелијални фактор раста (*VEGF*), интерлеукин-1 бета (*IL-1β*), *IL-4*, гранулоцитно-макрофагни фактор стимулисања колоније (*GM-CSF*), *IL-6*, *IL-13*, *S100A8/A9*, стем ћелијски фактор, *CCL2*, *CXCL5*, *CXCL12*, агонисте *toll-like* рецептора, и *HSP72* (Heat Shock Protein 72) кога ствара тумор. *GM-CSF* подржава преживљавање и експанзију *MDSC* у туморској микросредини. Извори *GM-CSF* укључују туморе и активирани имунске ефекторе као што су Т ћелије, ћелије „природне убице“ (*Natural killer* или *NK* ћелије) и дендритичне ћелије (42,43).

*MDSC* показују контролу одговора Т лимфоцита путем два ензима, аргиназе 1 (*ARG 1*) која смањује *L*-аргинин и индуцибилне азот оксид синтазе 2 (*iNOS*) која ствара азот оксид (44). Активност *ARG 1* у *MDSC* код пацијената са карциномом је регулисана преко *STAT3* путање (45). *TGF-β* и *IL-10* индукују *MDSC ARG1*, која сузбија *CD4* и *CD8* Т-ћелијску активацију. Интерферон гама (*IFN-γ*) и фактор некрозе тумора-алфа (*TNF-α*) делују на *MDSC iNOS*, која ослобађа азот оксид и изазива апоптозу Т ћелија (46). *MDSC* такође смањују ниво цистеина, есенцијалне аминокиселине важне за активацију Т ћелија (47).

Ослобађање реактивних кисеоничких врста и пероксинитрита из *MDSC* инхибира функције *CD8+* ћелије катализом нитрације рецептора, спречавајући интеракције Т-ћелијски-рецептор пептид-*MHC* (48). *MDSC* такође снижавају ниво зета ланца повезаног са Т-ћелијским рецептором (49). *MDSC* директно индукују

настанак Т регулаторних ћелија путем производње *IL-10*, *TGF-β*, или *ARG1*, које активно снижавају активацију и експанзију антитумор реактивних Т (50) и *NK* ћелија (51). *MDSC* поларизују Т ћелије према фенотипу типа 2 (*Th2*) и делују имуносупресивно синтезом *IL-10* и снижавањем макрофагне продукције *IL-12* (52).

Показано је да специфични Т лимфоцити не реагују на туморске антигене, што чини рани догађај у прогресији тумора (53). Диференцијација мијелоидних прекурсора у гранулоците, макрофаге и дендритичне ћелије често је нарушена у тумору (54), што доводи до акумулације *MDSC*. Незреле дендритичне ћелије имају слабу или немају уопште експресију костимулаторних молекула (*CD80*, *CD86* и *CD40*) и измењену продукцију *IL-12*. *MDSC* такође негативно регулишу функције *NK* ћелија спречавањем њиховог цитотоксичног дејства и производње *IFNγ* (55).

Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу међајући инфламаторне одговоре, дозвољавајући имунодеструкцију тумора и стварање имунске меморије. *MDSC* смањење је доводи до повећања интерферона  $\gamma$  (*IFN \gamma*) у тумору, стимулације активације Т и *NK* ћелија и ангиостазе међајући баланс про- и анти-ангиогенских хемокина. Ово указује да смањење *MDSC* не само да утиче на антиген презентујуће ћелије, *NK* и Т-ћелијске имунске активности, већ стимулацијом ангиостазе доводи до ефикасније контроле раста тумора.

Ретки подаци који говоре о *MDSC* у болесника са карциномом плућа односе се на вредности ове популације у системској циркулацији. Истраживања карактеристика у микроциркулацији тумора плућа требало би да дају прецизније податке о улози *MDSC* у микроколини самог тумора, односно, о њиховом могућем утицају на локални имунски одговор.

У *MDSC* спада мала група мијелоидних прогенитора (*Lin-HLA-DR-CD33+* ћелије), незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне

моноцитима (*CD14+ HLA-DR-lo* ћелије) и незрели полиморфонуклеари морфолошки и фенотипски слични неутрофилима (*CD14+ CD15+* или *CD66b+* ћелије) (28). Карактеристике ових ћелија су експресија велике количине *NADPH*-оксидазе, што резултира повећаном продукцијом реактивних метаболита кисеоника у форми супероксид анјона, хидроген пероксида и пероксинитрита, затим повећана експресија гена за аргиназу 1 и азот оксид синтетазу, што доводи до повећане производње аргиназе 1 и азот оксида, затим повећана експресија транскрипционих регулатора *EBPb* и *STAT3*. Такође настаје и смањена експресија *IRF8* и повећана продукција *SI00A8/9* протеина. Због свега тога као резултат настаје смањена способност диференцијације у зреле мијелоидне ћелије.

Имуносупресивна улога *MDSC* је веома компликована и главни фактори у овом процесу су експресија аргиназе 1, индуцибилне азот оксид синтетазе, *TGF-b*, *IL-10* и *COX2*, секвестрација цистеина, смањена експресија *L*-селектина Т ћелија и индукција Т регулаторних ћелија (28). Поремећај посредован *MDSC* у Т ћелијама јесте нисходна регулација *CD247*, присутног и у *NK* ћелијама у условима хроничне инфламације и у присуству тумора, јер смањена вредност *CD247* указује на нефункционалност Т ћелијског рецептора (56). *MDSC* посредована деплеција *L*-аргинина активношћу аргиназе-1 и депривација *L*-цистеина путем његове секвестрације су такође веома битни. Такође се јавља интерференција са сигнализацијом преко *IL-2* рецептора. *MDSC* ћелије могу угрозити и миграцију ефекторских *CD8+* Т ћелија на место тумора. Тумор инфилтришуће дендритске ћелије су такође погођене због незрелог фенотипа и толеранције према туморским антигенима. *MDSC* продукују *VEGF* и *IL-10*, доводе до активације *STAT3* у дендритичним ћелијама и супресије имунског одговора. *MDSC* активирају регулаторне Т ћелије. Реактивне кисеоничне врсте и азот-оксид доводе до геномске



нестабилности и соматских мутација, а такође долази и до модулације експресије информационе РНК и индукције епигенетских промена. *MDSC* секретују и факторе који индиректно/директно подржавају иницијацију и раст тумора. Тумори који су у развоју секретују факторе који обезбеђују експресију *MDSC* и њихову супресивну активност. Као што се види из свега набројаног, *MDSC* користе различите механизме имунске супресије. Незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне моноцитима супримирају и антиген-специфични и неспецифични Т ћелијски одговор преко механизма повезаних са азот-оксидом и цитокинима, док незрели полиморфонуклеари морфолошки и фенотипски слични неутрофилима супримирају само антиген-специфичан начин преко механизма повезаних са производњом кисеоничних слободних радикала. Ове ћелије директно инхибирају Т ћелије нитрирањем Т ћелијског рецептора и смањује се њихов одговор након препознавања комплекса антиген-*MHC*. Нитрирање смањује везивање антигених пептида за *MHC* на туморским ћелијама и блокира се миграција Т ћелија нитрирањем Т ћелијски специфичних хемокина. Високи нивои реактивних врста кисеоника утичу на Т-ћелије преко нисходне регулације Т-ћелијског површинског гликопротеина *CD3* ζ ланца и смањења секреције цитокина (57).

Улога *MDSC* у регулацији развоја и прогресије тумора је велика (28). Оне штите туморске ћелије од цитотоксичног одговора, доводе до ремоделовања туморског микроокружења преко протеолитичких ензима (нпр. матриксне металопроотеиназе) и неопходних медијатора неоангиогенезе и туморске инвазије (*VEGF*, *bFGF*, *VEGL* аналога *BV8* и матрикс металопроотеиназе 9) и стварају преметастатско окружење стварањем карактеристичних матичних ћелија у туморском ткиву, доводећи до пораста степена метастазирања *in vivo*, као и индукције епително-мезенхималне транзиције (*EMT*). Кад у оваквом окружењу

настану типичне *MDSC* као одговор на стимулусе инфламације, оне не поседују имуносупресивну активност већ доприносе туморогенези регрутовањем проинфламаторних *CD4+* Т ћелија које подстичу пролиферацију епителних ћелија. Управо развој тумора је повезан са експанзијом ћелија које поседују имуносупресивну активност (*MDSC*). Ове ћелије подстичу инвазију туморских ћелија и ангиогенезу и неутрализују туморско старење. У метастатским туморима *MDSC* поред подстицања инвазије и ангиогенезе, подстичу још и епително мезенхималну транзицију (*EMT*) и диференцијацију остеокласта што доводи до ресорпције костију.

Утицај локализације на функцију *MDSC* је такође показан (28). Инхибиција Т ћелија од стране ових ћелија у периферним лимфоидним органима захтева блиски контакт између ћелија. *MDSC* у тумору имају потентнију супресорску активност. Процент незрелих мононуклеарних ћелија морфолошки и фенотипски сличних моноцитима је знатно већи у ћелијама добијеним од тумора, док је удео незрелих полиморфонуклеара морфолошки и фенотипски сличних неутрофилима у периферним лимфоидним органима већи од 70% у односу на укупан број свих ћелија у њима.

Ове ћелије се повезују са резистенцијом на антитуморску терапију (28). Показано је да је клинички одговор на бројне хемиотерапеутике у негативној корелацији са бројем *MDSC* ћелија.

Биомаркери који би могли да дају податке о имунском систему јесу следећи: *MDSC* нивои у односу на фенотип *CD11b+ CD33+ HLA-DR low/- CD14+* за незреле мононуклеарне ћелије морфолошки и фенотипски сличне моноцитима и *CD11b+ CD33+ HLA-DR low/- CD15+* за незреле полиморфонуклеаре морфолошки и фенотипски сличне неутрофилима (28). Производњу азот-оксида и кисеоничних

слободних радикала можемо мерити у својству маркера њихове супресивне функције. Ниво експресије *CD247* у Т ћелијама такође је битно одређивати. Према нивоима ових маркера пацијенти се деле у две групе. Они који имају смањен број *MDSC* ћелија и низак ниво азот-оксида и слободних кисеоничних радикала што је одлика нормалног имунског статуса без присуства хроничне инфламације, и ови пацијенти су добри кандидати за имунолошку терапију. Друга група су они који имају повећан број *MDSC* ћелија и висок ниво азот-оксида и слободних кисеоничних радикала, као и смањен *CD247*, па је код њих претретман неопходан да супримира имуносупресију што је могуће уз помоћ неутрализације хроничне инфламације или директним утицајем на *MDSC*, а након тога се примењује антитуморска терапија.

Имуносупресија која настаје услед хроничне инфламације током туморског развоја је озбиљна препрека ефикасној терапији (28). При одабиру адекватне терапије неопходно је узети у обзир не само туморске параметре, врсту тумора и његов стадијум, већ и имунски статус пацијента. На основу биомаркера пацијенти се деле у две групе. Пацијенти који показују очувану функционалност имунског система и могу се лечити комбинацијом хемиотерапије и имунолошке терапије. Друга група су пацијенти који показују карактеристике супримираног имунског одговора и код њих је циљ смањење постојеће инфламације и имуносупресије пре започињања терапије. Сви пацијенти морају бити праћени током и након терапије како би се пратили туморски и имунски параметри. Ако ове контроле укажу на оштећење имунског одговора, упркос постигнутој регресији болести, ово би могло да сугерише релапс болести. Откривањем све више биомаркера који указују на стање имунског система пацијената може се развити низ сензора који би у комбинацији са генетским и биолошким параметрима тумора могли допринети стварању оптималне персонализоване терапије.

### 1.3. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома

У експерименталним студијама, код мишева са тумором, идентификоване су имуносупресивне гранулоцитне и моноцитне *MDSC* (58). Показано је да тумори имају способност да модулирају и мењају диференцијацију мијелоидних ћелија. Један од механизма како тумор модификује домаћинов антитуморски имунитет јесте преко нарушене диференцијације дендритских ћелија уз присуство незрелих мијелоидних ћелија и *CD34+* прогениторских ћелија (59,60). Акумулација и отпорност дуговечних незрелих гранулоцита *MDSC* са Т-ћелијски супресивном функцијом и оштећеним миграторним особинама у периферној крви пацијената са карциномима показана је у недавној студији (58). Такође је показано да хуманим неутрофилним *MDSC* недостаје експресија важних рецептора хемокина која одговара инфламаторним хемокинима. Последично ово би могло драматично да наруши њихову способност да мигрирају у малигном ткиву. Уместо тога *MDSC* би остали у периферној крви, највероватније у продуженом временском периоду у поређењу са конвенционалним полиморфонуклеарима, услед њихове смањене способности апоптозе. Насупрот мишевима, Т ћелијски-супресивна способност хуманих *MDSC* не може да се тестира *in vivo*. Иако су *MDSC* код мишева са тумором релативно добро дефинисани (61,62), ћелијска активност и функција хуманих *MDSC* је слабо дефинисана. Често коришћена комбинација маркера за хумане *MDSC* укључује *CD33+/CD11b+/HLA-DR-* и *CD14+/HLA-DR<sup>low</sup>* да би се дефинисали моноцитни *MDSC* који обично не показују *CD 14* (63,64,65,66). У другим студијама је коришћен *CD66b+/CD15+/CD11b+/CD14-* за идентификацију гранулоцитних *MDSC* (67).

Прогресија тумора се често повезује са хроничном инфламацијом у микроокружењу тумора, посредованом бројним цитокинима, хемокинима и факторима раста које производе карциномске и ћелије строме (68). Сви ови посредници подстичу развој тумора и имуносупресију аутокриним и/или паракриним путевима. Међу строма ћелијама које се инфилтрирају у туморе, *MDSC* представљају једне од најважнијих посредника у имуносупресији. Ове ћелије не само да могу да спрече анти-туморски имунитет, већ директно стимулишу туморогенезу као и раст тумора и његово ширење. Стога је разумевање механизма стварања, миграције до места тумора и активација *MDSC* неопходна за разумевање постојећих и развој нових стратегија имунске терапије тумора.

*MDSC* ћелије су незреле мијелоидне ћелије које не успеју да се диференцирају у гранулоците, макрофаге и дендритске ћелије у хроничним инфламаторним условима и показују имуносупресивне функције вишеструким механизмима (69). Ове ћелије су веома хетерогене и стога су њихове фенотипске карактеристике веома различите. Код хуманих *MDSC*, исти подсетови могу да се разликују као *Lin-HLA-DR-CD33+* или *CD11b+CD14-CD15+* за гранулоцитне и *CD14+HLA-DRneg/lo* или *CD11b+CD14+HLA-DRneg/lo* за моноцитне *MDSC*. *MDSC* настају из претходника хематопоезе костне сржи због мењања мијелопоезе од стране хроничних инфламаторних медијатора (70,71,72) и показују значајне имуносупресивне и туморогене активности (70,66). Ове ћелије, *MDSC*, стварају ангиогене факторе - промоторе неоангиогенезе (73), као и факторе раста, матрикс металопротеиназе и цитокине који стимулишу раст тумора и усмеравају имунске одговоре према Th2 типу и регулаторним Т ћелијама; депривишу аргинин и цистеин који су потребни за функционисање Т ћелија и производе азот оксид и ROS који изазивају нитрацију Т ћелијског рецептора или апоптозу Т ћелија; експримирају мембрански-везан TGF- $\beta$ 1

који доводи до анергије имунских ефекторних ћелија, одговорне су и за нисходну регулацију експресије TCR  $\zeta$ -ланца тако онемогућавајући Т ћелије да преносе активационе сигнале. Узевши све у обзир, *MDSC* се могу сматрати кључним играчима у тумор-посредованој имуносупресији (68).

До сада је показана снажна веза између тумор-посредованог хроничног запаљења и системске експанзије и активације *MDSC* (70). Неутрализација хроничних инфламаторних услова довела је до наглог опадања броја имуносупресивних функција тумор-инфилтрирајућих *MDSC* (74,75). Насупрот томе, ескалација хроничног запаљења изазваног циклофосфамидом проузроковала је додатну експанзију, активацију и акумулацију *MDSC* у лезијама тумора. Познато је да је процес стварања, миграције и активације *MDSC* под контролом различитих посредника хроничног запаљења као што су фактори раста (*GM-CSF*, *G-CSF*, *M-CSF*, *VEGF*, *TGF- $\beta$* ), цитокини (*IL-1 $\beta$* , *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-13*, *TNF- $\alpha$* , и *IFN- $\gamma$* ), хемокини (*CCL2*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL1*, *CXCL8* и *CXCL12*), циклооксигеназа-2 и простагландин *E2* (69, 76, 77). Ефекат свих ових фактора је комбинаторан и завистан од дозе. Они модулирају мијелоидне ћелије у туморској микросредини и пошто се достављају до удаљених хематопоетичких органа уз помоћ туморских егзозома, могу да промене мијелопоезу и окрену нормалну диференцијацију мијелоидних ћелија у корист *MDSC* (69,76,77,78). До сада је пронађено да су *VEGF* и *TGF- $\beta$*  такође укључени у регулацију хематопоезе (79,80). Оба фактора се производе у великим количинама од стране многих тумора и имају снажан утицај на стварање и ширење *MDSC*.

Такође је показано да *MDSC* подржавају неоангиогенезу, раст тумора и метастазирање (70,81,82). За ове ћелије се зна да производе *VEGF*, основни фибробластни фактор раста (*bFGF*), хипоксијом-изазван фактор 1 (*HIF*)-1,

трансформишући фактор раста  $\beta$  ( $TGF-\beta$ ) и матрикс металопротеиназа 9 ( $MMP9$ ) који промовишу неоангиогенезу и стварају преметастатску средину (82, 83). Такође, произведени од стране  $MDSC$ , пронађено је да  $S100A8/A9$  инфламаторни протеини не само да привлаче  $MDSC$  на место тумора и повећавају њихову имуносупресивну активност, већ и да помажу активацију  $MAPK$  и  $NF-\kappa B$  сигнализирајући стазе у туморским ћелијама, стимулишући тиме раст тумора и метастазирање (83, 84). Уз то,  $MDSC$  су способни да снажно утичу на прогресију тумора успостављајући анти-туморске имунске одговоре различитим механизмима (85,86,87). Стога неутрализација  $MDSC$ -изазване супресије представља важну стратегију за развој ефикаснијих туморских имунских терапија.

Уопштено  $MDSC$  ћелије користе одређен број механизма да сузбију и ослабе функцију Т ћелија. То укључује високи ниво активности аргиназе, као и азот оксида ( $NO$ ) и производњу реактивних кисеоник врста ( $ROS$ ) (61,88,89). Ови главни механизми се повезују са различитим подтипovima  $MDSC$ :  $ROS$  са гранулоцитним- $MDSC$ , док аргиназе и  $NO$  са моноцитним- $MDSC$  (91,90). Недавно је указано на неколико других супресивних механизма: секрецију  $TGF \beta$  (92,93), индукцију регулаторних Т ћелија (94,95), смањење цистеина (96), узлазну регулацију циклооксигеназе 2 и простагландина  $E2$  (97). Простагландини, нарочито  $E2$ , широко су укључени у  $MDSC$ -посредовану Т-ћелијску инхибицију. У ранијој студији је пронађено да сигнали путем  $E2$  рецептора Е-простаноида ( $EP$ )4 у  $MDSC$  изазивају аргиназа 1 експресију и активност (97).

Кључно питање је како се регулише акумулација  $MDSC$  ћелија током експанзије тумора. То се објашњава преко неколико сигналних путева. Сигнални трансдуктор и активатор транскрипције 3 ( $Stat 3$ ) игра централну улогу у многим молекуларним догађајима који управљају пролиферацијом тумора, преживљавањем

и инвазијом. У исто време *Stat 3* је укључен у инхибицију антитуморских имунских одговора (98). У мијелоидним ћелијама, *Stat 3* сигнали изазивају експресију *Bcl-xL*, *c-myc*, *ciklin D1*, или *survivin*, који спречава ћелијску апоптозу, подстиче ћелијску пролиферацију и спречава диференцијацију у зреле ћелијске типове (61). Претходне студије су одредиле важну улогу за *Stat 3* приликом експанзије *MDSC* код мишева (99,100) и за допринос *MDSC* ангиогенези (101). Показана је и повезаност између горње регулисане активације *Stat 3* и акумулације *MDSC* код пацијената са меланомом (102). *Stat 3* је такође од кључне важности за супресивну активност *MDSC*. Инхибиција *Stat 3 in vitro* довела је до укидања супресивне активности *MDSC*. Важна улога *Stat 3* у експанзији *MDSC* је даље подржана једном другом студијом која је користила мултитаргетни тирозин киназни инхибитор сунитиниб (103). Сунитиниб је блокирао експанзију *MDSC* код мишева са тумором инхибицијом *Stat 3* сигнала у мијелоидним ћелијама. Мијелоидна ћелијски-специфична превелика експресија инхибитора апоптозе 6 (*API6*) изазвала је активацију *Stat 3* у мијелоидним ћелијама и системску експанзију *MDSC*.

Значајни путеви регулације преко *Stat 3* пута укључују проинфламаторне протеине *S100A9* и *S100A8* (104). Активација *Stat 3* прогениторних ћелија хематопоезе повећава *S100A8* и *S100A9*; а ово потом спречава диференцијацију дендритских ћелија и потпомаже акумулацију *MDSC* (104). У одсуству *S100A9*, акумулација *MDSC* је била спречена код мишева са тумором. Истовремено, превелика експресија *S100A9* резултира акумулацијом *MDSC* код мишева који немају тумор (104). *S100A9* такође игра важну улогу у миграцији *MDSC* на место тумора.

Други значајан пут је *Stat 1*. *Stat 1* је главни фактор транскрипције кога активира *IFN $\gamma$*  или *IL-1 $\beta$*  сигнал и садржан је у регулацији *iNOS* и активности



аргиназе. *MDSC* којима мањка *Stat 1* не могу да спрече активности Т ћелија због немогућности да повећају *iNOS* и активност аргиназе. Блокирањем *IFN $\gamma$*  секреције од стране Т ћелија такође поништава *MDSC*-посредовану супресију углавном путем блокирања *iNOS* узлазне регулације (105,106). *Stat 5* има пак важну улогу у преживљавању *MDSC* ћелија (107). Активација *Stat 6* у *MDSC* се јавља као одговор на везивање *IL-4* или *IL-13* на њихов рецептор *CD124*. Овај рецептор је такође описан као један од *MDSC* маркера и одговоран је за повећање активности аргиназе (108,109) и повећање *TGF $\beta$*  синтезе у *MDSC* (110). Недавно је показана критична улога *Stat 6* у експанзији *MDSC* после трауматског стреса (111). Тако, *Stat2*, *5*, и *6* играју важну улогу у *MDSC* активацији и ови *STAT* путеви посредују имуносупресивну функцију *MDSC*.

Упркос напретку који је учињен у претходним годинама у разумевању молекуларних механизма који управљају *MDSC* акумулацијом, многи специфични детаљи остају нејасни (112). Једно од питања је и да ли акумулација *MDSC* захтева један или два сигнала. „Једносигнални модел“ значи да један фактор може да започне диференцијацију *MDSC* и њихову активацију у имуно супресивне ћелије. Међутим, вероватнији, „двосигнални модел“ указује да експанзија *MDSC* може да се подели у два процеса којима управљају различите сигналне путање. Једна путања је углавном одговорна за експанзију *MDSC*, а друга за управљање активацијом *MDSC*. Први процес је изазван различитим цитокинима и факторима раста које производе тумори или строма костне сржи као одговор на хроничну стимулацију. То укључује такве факторе као што су *GM-CSF*, *M-CSF*, *G-CSF*, *IL-6*, *VEGF*, и даје сигнализација путем *Stat 3* и *Stat 5*. Сигнал спречава диференцијацију *MDSC* и помаже пролиферацију незрелих мијелоидних ћелија. Међутим, овај сигнал сам није довољан да се активира акумулација *MDSC*. *MDSC* захтевају други сигнал

активације, који се манифестује повећањем аргиназе, *NO*, производње имуно супресивних цитокина, итд. Овај тип сигнала је обезбеђен про-инфламаторним молекулима као што су *IFN $\gamma$* , *IL-1  $\beta$* , *IL-13*, *TLR* лигандима и другим. Користи *Stat 1* и *NF-kB* факторе транскрипције, и узлазну регулацију *Cox2*. Овај модел би могао да објасни зашто, активација *STAT3* и *STAT5* у одговору на различите факторе раста који су потребни за нормалну хематопоезу, не резултира акумулацијом *MDSC* у одсуству јаких сигнала про-инфламаторних фактора. Такође може да објасни зашто акутна инфламација, повезана са отпуштањем про-инфламаторних фактора у одсуству непрекидног повећавања фактора раста, такође не резултира акумулацијом *MDSC*. Вероватно је, као што је увек случај код биолошких система, да постоји преклапање ових сигналних путања. . У равнотежном, стабилном стању хематопоезе различити фактори могу да допринесу покретању диференцијације према једном или другом подсету *MDSC*. Такође, фактори транскрипције могу да модулирају активност један другом, као што је показано, на пример *Stat 3* и *NF-kB*. Међутим, овај модел указује да је акумулација *MDSC* могућа само ако су обезбеђена два сигнала.

#### **1.4. Супресорске ћелије мијелоидног порекла код карцинома плућа**

Велики број актуелних студија је фокусиран на фенотипској карактеризацији субпопулација *MDSC* ћелија и њиховом клиничком значају за пацијенте са карциномом плућа типа *NSCLC*. *Huang* и сарадници су идентификовали део *MDSC* које производе слободне кисеоничне радикале (*CD14+ HLA-DR-low*) и повезане су са присуством удаљених метастаза и лошим одговором на хемиотерапију (113). Слично је показала и студија *Feng* и сарадника да моноцитна *MDSC* субпопулација

(*CD11b+* *CD14+* *S100A9+*) има негативан утицај на преживљавање и терапијски одговор пацијената са узнапредовалим *NSCLC* на терапију платином (114). Такође је идентификована једна гранулоцитна (*CD14-* *CD15+* *CD11b+* *CD33+* *HLA-DR-* *Lin-*) и две фенотипски различите моноцитне (*CD14+* *CD15-* *CD11b+* *CD33+* *HLA-DR-* *Lin-* и *CD14+* *CD15+* *CD11b+* *CD33+* *HLA-DR-* *Lin-*) *MDSC* субпопулације које су значајно порасле у периферној крви код хемиотерапијски наивних пацијената са *NSCLC* и биле су у корелацији са клиничким исходом пацијената (115).

Студија која је обухватила 185 пацијената са *NSCLC* показала је да је учесталост *CD16low CD11b+* *CD14-* *HLADR-* *CD15+* *CD33+* у полиморфонуклеарној субпопулацији *MDSC* значајно повећана у поређењу са здравом контролном групом (116). Лиу и сарадници су идентификовали *MDSC* ћелије са *CD11b+* *CD14-* *CD15+* *CD33+* фенотипом код пацијената са узнапредовалим *NSCLC* који још нису били лечени хемиотерапијом (117). Ове ћелије су експримирале *IL-4R*, *IFN-γR*, *Arg-1* и *iNOS* и инхибирале *CD3ζ* експресију у *CD8+* Т лимфоцитима. Поред тога, *CD11b+* *CD14-* *MDSC* број је био смањен код пацијената који су адекватно одговорили на терапију. Такође је показано да високи нивои *CD11b+* *CD14+* *S100A9+* моноцитних *MDSC* су били повезани са лошим одговором на хемиотерапију засновану на цисплатини и ово је било у корелацији са скраћеним преживљавањем без прогресије болести (114).

Хуанг и сарадници су приметили да су и апсолутни број и процентуални удео *CD14+* *HLA-DR-low* ћелија повећан код пацијената са метастаским обликом *NSCLC* (118). И проценат и апсолутни број *CD14+* *HLA-DR-low* ћелија пре терапије негативно су корелирали са клиничким одговором и временом до прогресије болести након хемиотерапије засноване на цисплатини код пацијената са узнапредовалим

*NSCLC*, што сугерише да су повећани нивои имуносупресивних *CD14+ HLA-DR-low* ћелија могу бити повезани са лошом прогнозом у пацијената са *NSCLC*.

Слично је показано и код пацијената са ситноћелијским карциномом плућа да је учесталост *CD14+ HLA-DR-low MDSC* негативно корелирала са клиничким исходима (119). Такође је идентификована нова субпопулација *MDSC* у микроокружењу тумора пацијената са *NSCLC, B7-H3 CD14 HLA-DR-low (B7-H3 MDSC)* (120). Повишена учесталост ове нове субпопулације корелира са лошијим *TNM* стадијумом и метастазама тумора и може бити предиктор лошијег преживљавања, краћег времена до прогресије болести и релапса болести у пацијената са *NSCLC*. Истраживања су показала да *B7-H3 MDSC* подстичу прогресију тумора производећи *IL-10* који индукује Т регулаторне ћелије у микроокружењу тумора.

Новије студије говоре о значају и утицају *MDSC* ћелија на терапију код пацијената са карциномима плућа (121), у смислу најбољег одабира хемиотерапије за ове пацијенте и раном предвиђању могућег лошег одговора на одређену врсту терапијске линије. Али потребна су даља истраживања у овом правцу и како су многе информације добијене у експреименталним моделима, потребне су шире клиничке студије.

*B7H4* припада *B7* суперфамилији чланова костимулаторних молекула који имају улогу модулятора инхибиторних одговора Т ћелија. На тај начин ови молекули учествују у имунској толеранцији туморских ћелија, пошто равнотежа између костимулишућих и коинхибиторских сигнала утиче на ниво активирања антитуморског одговора (122). *B7H4* дели око 25% хомологије аминокиселина са осталим члановима породице *B7* (123,124). *B7H4* може деловати као коинхибитор одговора Т-ћелија и урођеног имунитета (125, 126). Пошто је *B7H4* изразито експримиран у свим ћелијским линијама карцинома дебелог црева, простате, плућа,

желуца, фибросаркома и меланома (127,128,129,130,131), може се претпоставити да је експресија *B7H4* механизам смањене регулације антитуморског имунитета, нарочито Т-ћелијског одговора на нивоу ћелије ефектора (128). Такође, солубилни *B7H4* идентификован је у узорцима крви пацијената са карциномом јајника, дебелог црева, бубрега, дојке, плућа, карцинома простате (131, 132, 133, 134,135,136,137). Ова испитивања показују да серумски *B7H4* може бити користан дијагностички и прогностички маркер.

Сложеност сигнализације посредоване *toll-like* рецептором додатно се повећава преко његових корецептора (нпр. *CD14*, *CD36*) (138). *CD14* је мембрански гликопротеин потребан за *toll-like* рецептор 4 сигнализацију у одговору на липополисахарид (*LPS*) и грам-негативне бактеријске делове ћелијског зида (139). Супротно томе, *toll-like* рецептор 2 одговоран је за одговоре на грам-позитивне бактерије и захтева *CD14* само за одабране лиганде (140). *CD14* је веома важан у процесу инвазије микрооколине карцинома и проинфламаторној реакцији (140). Пошто је инфламација зависна од присуства *CD14* у макрофагима (141), *CD14* би могао да игра кључну улогу у покретању хроничне инфламаторне реакције и значајно да допринесе прогресији тумора. Производња *Biglycan/CD14* од стране хемокина *CCL2* и *CCL5* може бити разлог за инфилтрацију макрофага и Т-ћелија на место тумора (141). Хемокини *CCL2* и *CCL5* су изгледа критични регулатори инфилтрације тумор повезаних макрофага (енг. *tumor associated macrophages- TAM*) и промовишу екстравазацију и метастазирање карцинома (142,143).

*CD23* антиген је такође мембрански протеин који има значаја у канцерогенези и инфламацији повезаној са туморима (144). Штавише, још давно је уочено да ниво позитивности на *CD23* има прогностичку вредност код неких врста малигнитета (145). У неким извештајима ниво експресије *CD23* је био повезан са добром

прогнозом (145), док су други истраживачи *CD23* експресију повезивали са агресивнијим током (146). Пошто је *CD23* активациони маркер, многи цитокини могу модулирати његову експресију на ћелијској мембрани (144). *CD23* је рецептор ниског афинитета за имуноглобулин Е (*IgE*) и учествује у регулаторним процесима било као мембрански везани гликопротеин, било као слободно растворљиви протеин (147). Молекуларна испитивања и испитивања мутагенезе дефинисала су улогу овог молекула у обављању многих биолошких функција. Повишен *CD23*, било на површинама неопластичних ћелија или као растворљив облик, представља користан показатељ у у дијагнози и у прогнози болести. Тако ћелије добијене од различитих врста хематолошких тумора имале су повишен ниво *CD23* (147). У једној од студија показано је након анализе експресије три различита маркера *ADAM8* (енг. *disintegrin and metalloproteinase domain-8*), *CD23* и *CHL1* (енг. *neural-cell adhesion molecule-homologue of L1*) у ћелијским линијама рака плућа и ткивима карцинома плућа да у већини ћелијских линија карцинома плућа експресија *CD23* није била откривена (148). Стога, информације о улози овог молекула код карцинома плућа и даље су недовољне.

Карцином плућа индукује локалну и системску имуносупресију. Један од механизма имуносупресије је и повећана експресија лиганда програмиране смрти 1 (*PD-L1*) код мијелоидних ћелија, тумором индукована. Показало се да је учесталост *PD-L1+* мијелоидних ћелија у корелацији са присуством можданих метастаза. *IL-6* добијен из тумора у стању је да индукује *PD-L1+* мијелоидне ћелије *in vitro*, сугеришући тиме да праћење нивоа имуносупресивних фактора у периферној крви може да идентификује нове мете за терапијску интервенцију код одабраних пацијената.

Мета-анализа студија различитих пацијената са солидним туморима показала је да су *MDSC* ћелије значајно повезане са укупним преживљавањем и временом без прогресије болести (енг. *progression-free survival PFS*) (149). *MDSC* ћелије су повезане са антитуморским лековима (114,150,151,152). У регулацију *MDSC* ћелија укључени су различити сигнални путеви и цитокини (121). Интеракција ових различитих фактора представља веома сложен систем контроле мреже која регулише стварање и функцију *MDSC*. Да би се успешно применио третман против карцинома плућа, *MDSC* ћелије, главна имunosупресивна популација ћелија у туморима, морају се блокирати.

*MDSC* су важни регулатори имунског одговора (153). Ове ћелије сузбијају цитотоксичне активности ћелија природних убица (*NK natural killer*) и Т-ћелијских ефектора и помажу раст тумора. Показано је да смањивање *MDSC* побољшава терапијске одговоре на вакцину на мишијим моделима плућног карцинома. Овај приступ се може показати корисним код тумора код којих *MDSC* испољавају важне имunosупресивне ефекте. Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу мењајући инфламацијске одговоре, па се тиме омогућава антитуморски имунски одговор као и стварање имунске меморије. Деловањем одговарајућим агенсима на мењање функције *MDSC* би омогућило контролу раста тумора. Такође је неопходно испитати ефикасност у комбинацији са другим имуномодулаторним стратегијама. Комбиновани приступи који смањују сигналне путеве регулисане *MDSC*-ћелијама, обнављају активност антиген презентујућих ћелија и доводе до експанзије тумор-реактивних Т ћелија, могу бити од користи у побољшању ефикасности имуномодулаторне терапије плућног карцинома.

Евалуацијом генетских секвенци тумора који одржавају раст тумора путем модулације имунске активности, аутори су показали да конститутивна прекомерна

експресија туморске циклооксигеназе 2 доводи до имуносупресије карцинома плућа (25). Прекомерна експресија циклооксигеназе 2 је повезивана са смањеним имунитетом домаћина и метастазирањем. Показано је да циклооксигеназа 2 модулира активност *MDSC* код карцинома плућа повећаном синтезом *ARG1*, који блокира функцију Т ћелија преко простагландин-изазване имунске дисфункције и чиме је објашњен антитуморски бенефит циклооксигеназа 2 инхибитора. С друге стране, сложене интеракције између *MDSC* и *Treg* ћелија тек треба да буду дефинисане; међутим, евидентно је да *MDSC* помажу развој *Treg* ћелија *in vivo*. Тумор-реактивне Т ћелије су пронађене у ткиву плућног карцинома, али не одговарају на тумор због *CD4+CD25+ Treg* ћелија. *CD4+CD25+ Treg* ћелије играју важну улогу у одржавању имунске само-толеранције и сузбијању антитуморских имунских одговора посредованих путем само-реактивних лимфоцита. Смањивање броја *Treg* ћелија или укидање њихове активности у оквиру туморске микрооколине могло би да побољша ефективни антитуморски одговор код домаћина који иначе не одговарају активирањем тумор-специфичних као и неспецифичних ефекторских ћелија.

Иако имунолошка терапија за карцином плућа има потенцијал, нема доказа који указују на документоване бенефите када је у питању преживљавање (25). Тумором изазвана имуносупресија путем *MDSC* би могла бити доприносила фактор ограниченој ефикасности ових приступа. У једној недавној студији, аутори су тестирали хипотезу да активирање имунских ћелија путем терапијске вакцине и прекида *MDSC*-посредоване имуносупресије побољшава антитуморску активност код мишијих модела плућног карцинома. Да се покрену антиген-специфични одговори коришћена је ћелијска вакцина, која се састоји од адхерентних ћелија костне сржи повезаних са антигеном овалбумина (*OVA*) продукованог од стране



генетски модификованих 3LL ћелија. Адхерентне ћелије костне сржи повезане су са *OVA* антигеном како би се омогућила њихова антигенска презентација. Потом су оне убризгане субкутано у мишеве на контралатералној страни насталог тумора да би се покренули антиген-специфични антитуморски имунски одговори. Да би се осујетила *MDSC*-посредована имunosупресија, популација *MDSC* је смањена моноклонским антителима (*anti Gr1* или *anti-Ly6G*).

Велико смањење *MDSC* популације антителима на *Gr1* или *Ly6G* довело је до смањења *MDSC* у тумору и системски у крви, слезини и коштаном сржи (25). Активност антиген презентујућих ћелија (*APC*) у тумору је смањена са прогресијом тумора; међутим, смањење *MDSC* доводи до повећане учесталости и активности *APC*, *NK* ћелија и Т-ћелијских ефектора. Заједно са повећаним *NK* и Т-ћелијским активностима, било је повећања учесталости апоптозе туморских ћелија и истовременог смањења туморског терета и миграције туморских ћелија са места примарног тумора до плућа. Редукција раста тумора и смањење миграције туморских ћелија може бити објашњено повећањем учесталости активираних Т и/или *NK* ефектор-посредоване тумор апоптозе и/или *NK IFN- $\gamma$* -посредоване ангиогенезе. Пратећи смањење *MDSC*, антиангиогенски хемокини *CXCL9* и *CXCL10* повећани су и про-ангиогенски цитокини *VEGF-A*, ангиопоетин1, ангиопоетин 2, *CXCL2* и *CXCL5* значајно су смањени. Пратећи овај профил, ендотелни маркери у тумору МЕСА-32 су смањени, али је било повећања *CXCR3* експресије. Смањење *MDSC* је водило до прилива *IFN- $\gamma$*  активираних Т и *NK* ћелија које су помогле ангиостазу у тумору мењајући равнотежу про- и антиангиогенских хемокина. Ово указује да смањење *MDSC* не само да побољшава *APC*, *NK* ћелије и Т-ћелијске имуно активности већ помаже блокаду ангиогенезе што доводи до ефикасније контроле тумора. Смањење *MDSC* репрограмира туморску нишу мењајући инфламаторне

одговоре, дозвољавајући имунску деструкцију тумора и стварање имунолошке меморије. Регулација *MDSC* регрутовања, диференцијације и експанзије, и инхибиција *MDSC* супресивне функције је занимљив терапијски модел у контроли раста и прогресије тумора. Фармаколошки агенси који регулишу *MDSC* могу бити ефикаснији у комбинацији са имунотерапијом. Оптимизација комбинованих приступа који симултано блокирају *MDSC* супресорске путање, обнављају *APC* имуно-стимулативну активност, и повећавају тумор-реактивне Т ћелије била би корисна за унапређење терапије.

Неколико терапија овог типа је тренутно у фази испитивања и они могу бити подељени на основу њихове способности да контролишу следеће (154):

- диференцијацију *MDSC* у зреле *DC* и макрофаге способне за активност *APC* (све-транс ретиноичне киселине (*ATRA*) и витамин *D3*);
- сазревање *MDSC* из прекурсора (*STAT 3* инхибитори, бевацизумаб, анти-*BV8* моноклонска антитела, амино-бифосфонати и *MMP9* инхибитори);
- пролиферацију *MDSC* (инхибитори тирозин киназе (*TKI*), сунитиниб и сорефниб);
- акумулацију *MDSC* (*CXCR2* и *CXCR4* антагонисти);
- цитотоксичност *MDSC* (гемцитабин, 5-флуоро-урацил);
- функцију/активацију *MDSC* (*ROS* чистачи) и *ARG* и *NOX* инхибитори, нпр., нитро-аспирин, *PDE-5*, *COX-2* инхибитори и цитокини).

Један приступ терапијског циљања *MDSC* је и коришћење агенаса да се помогне диференцијација мијелоидних ћелија. *Gabrilovich* и сарадници су показали да диференцијацијом *MDSC* у *DC* и макрофаге коришћењем *ATRA* (*all-trans retinoic acid*) смањује број *MDSC* и повећава одговоре на вакцине против карцинома (155). *ATRA* изазива диференцијацију *MDSC* пре свега путем неутрализације високе

продукције ROS у овим ћелијама. Механизам укључује усходну регулацију глутатион синтазе и акумулацију глутатиона у *MDSC* и могао би да се користи у развоју и праћењу терапијске апликације *ATRA*. Због тога модулација развоја *MDSC* може бити есенцијална за унапређење имунске терапије против унапредовалих тумора (156).

*N-acetil cistein (NAC)* је предложен као антитуморски агенс због своје способности да смањи оксидативни стрес који помаже генетску нестабилност. *NAC* третман мишева са прогресивно растућим туморима показао је терапијску ефикасност (157). *NAC* може да има додатни бенефит у омогућавању активације Т ћелија повећавањем екстрацелуларних базена цистеина у присуству високог нивоа *MDSC* код пацијената са карциномом. Иако *NAC* циља цистеинску путању *MDSC*-посредоване супресије Т ћелија, *MDSC* производња аргиназе и *NO* и даље може да задржи супресивне ефекте *MDSC*. Међутим, примена *NAC* у комбинацији са другим агенсима који блокирају додатне *MDSC* супресивне путање (*ARG1* и *NO*), може бити ефикаснија у блокирању *MDSC*.

На основу свега наведеног може се закључити да је значај *MDSC* ћелија евидентан, али да је супресија имунског одговора домаћина на туморско ткиво посредством ових ћелија још увек недовољно истражена, па су у овој докторској дисертацији постављене следеће хипотезе и циљеви истраживања:

## **2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

### **А. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ**

1. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима системске циркулације пацијената са тумором плућа је већа у односу на процентуалну заступљеносту *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.
2. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора је већа у односу на процентуалну заступљеносту *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.
3. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора плућа значајно се разликује од процентуалне заступљености *MDSC* у системској циркулацији болесника са карциномом плућа.
4. Процентуална заступљеност *MDSC* у узорцима системске циркулације и у узорцима микроциркулације тумора плућа корелира са патохистолошким карактеристикама и клиничким стадијумом карцинома плућа.

### **Б. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

1. Испитати процентуалну заступљеносту *MDSC* у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа.
2. Испитати процентуалну заступљеносту *MDSC* у узорцима микроциркулације тумора.

3. Испитати процентуалну заступљеносту *MDSC* у узорцима периферне крви здравих (контролних) особа.
4. Утврдити корелацију процентуалне заступљености *MDSC* у периферној крви пацијената оболелих од карцинома плућа са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.
5. Утврдити корелацију процентуалне заступљености *MDSC* у узорцима микроцирулације тумора са патохистолошким типом тумора, величином тумора, нодалним статусом, присуством метастаза и клиничким стадијумом.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Истраживање је урађено након добијања сагласности Етичког одбора Војномедицинске академије у Београду. Учествовање у студији је подразумевало потписан Образац информисаног пристанка пацијента, односно његовог овлашћеног лица.

#### **A. ВРСТА СТУДИЈЕ**

Студија је урађено као клиничка опсервациона студија пресека.

#### **Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ**

Истраживање је спроведено у Клиници за пулмологију, Институту за патологију и судску медицину и Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

У студију је укључено 54 пацијената у старосној доби од 18 до 75 година, код којих је због утврђеног постојања инфилтративне промене у плућима (радиографским методама) урађена дијагностичка бронхоскопија и код којих је патохистолошким прегледом утврђено постојање карцинома плућа.

Контролну групу чинило је 10 здравих особа које обављају редован систематски преглед у ВМА и које претходно нису боловале од малигних болести.

Узорци крви и узорци микроциркулације тумора плућа за одређивање броја и карактеристика *MDSC* узимани су током извођења дијагностичке бронхоскопије.

## **V. УЗОРКОВАЊЕ**

Критеријуми регрутовања болесника у групу испитаника

Критеријум за укључење у студију су били патохистолошки дијагностикован карцином плућа код пацијената, а пре започињања онколошког лечења.

Критеријуми за искључивање из студије су били: присуство других малигних обољења, присуство аутоимунских обољења, трудноћа и употреба лекова који утичу на хематопоезу (*GM-CSF*) или саме *MDSC* (паклитаксел, синденафил).

Сви испитаници укључени у студију потписали су Образац информисаног пристанка пацијента, одобрен од стране Етичког одбора Војномедицинске академије у коме је детаљно објашњена врста процедуре.

Узимање узорака периферне крви

Од свих испитаника (оболелих и здравих контрола) узимано је 3ml венске крви. Узорци периферне крви су узети у вакумске епрувете запремине 3ml са *Na-EDTA* као антикоагулантним средством.

Узимање узорака микроциркулације тумора

Узорци микроциркулације крви тумора плућа добијени су приликом дијагностичке бронхоскопије код оних тумора којима је могло да се приступи бронхоскопом и који су на својој површини имали јасно испољене патолошке крвне

судове. Аспирација узорка вршена је иглом за аспирацију кроз систем бронхоскопа у епрувету за крвну слику (са фабрички додатим антикоагулансом- натријум цитратом). Након аспирације око 3 ml узорка, одређивања броја вијабилних ћелија у коморици (искључивањем броја мртвих ћелија бојењем трипан плавим) и потврдног бојења на аутоматском крвном бројачу (*ACT diff Beckman Coulter, USA*) ћелије су биле даље обрађиване поступцима хипотоног лизирања и неопходних испирања фосфатним пуфером са натријум хлоридом (*PBS*). По завршетку процедура ћелије су опет избројане на наведени начин, одређен броја вијабилних ћелија и на основу броја вијабилних ћелија је био подешен број на  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Таква ћелијска популација је обележавана моноклонским антителима како је наведено у поступку одређивања фенотипске карактеризације ћелијске популације. У узорцима микроциркулације тумора није било проверавано присуство контаминирајућих ћелија. Такође, анализа и/или уклањање апоптотских ћелија није било предвиђено у обради наведених узорака.

#### Постављање патохистолошке дијагнозе карцинома плућа

Узорци тумора добијени у току дијагностичке бронхоскопије су били фиксирани у 5% пуферисаном неутралном формалину, дехидрисани серијом етанола растуће концентрације (75% до апсолутног), просветљени ксилолом и прожети парафином у V.I.P. Сакура апарату за аутоматску фиксацију, дехидратацију и прожимање ткива па затим укалупљени у парафинске блокове. Парафински блокови су били исечени на микротомому на резове дебљине 3-5 $\mu\text{m}$ , затим обојени стандардним хематоксилин-еозином бојењем (*Hematoxylin & Eosin*) и анализирани



светлосним микроскопом према *TNM* критеријумима. Имунохистохемијским и хистохемијским методама је био одређен тип тумора.

#### Одређивање клиничког стадијума болести

Локализација, величина и распрострањеност тумора утврђена је радиолошким методама (нативна рентгенграфија плућа и срца, компјутеризована томографија грудног коша, абдомена и главе).

Клинички стадијум болести одређен је према 8. едицији *TNM* класификације.

#### Фенотипска карактеризација *MDSC* ћелија из периферне крви

Фенотипска карактеризација жељене ћелијске популације је била одређивана коришћењем различитих комбинација моноклонских антитела специфичних за антигене на хуманим ћелијама. Ћелије су биле истовремено обележаване са пет различитих антитела. Коришћена су следећа моноклонска антитела (анти): *CD15-FITC* и *CD15-PECy7*, *CD33-PE* *CD33-PECy7*, *CD45-ECD* и *CD45-PECy7*, *HLA-DR PE/Cy5*, *CD14-FITC*, *CD16-PE*, *CD11b-PE*, *CD10-PECy7*, *CD3-FITC*, *CD19-FITC* и *CD56-FITC* (*Biolegend, USA*).

*MDSC* ћелије су идентификоване имунофенотипски. Укупна *MDSC* популација је била иницијално идентификована на основу испољавања *CD11b* и *HLA-DR* антигена на двоструком тзв. „*dot blot*“ хистограму (хистограму начињеном на основу тачкастог приказа догађаја анализираних протоком кроз проточну комору цитометра у дефинисаним регионима). Укупна *MDSC* популација је анализирана према испољавању тзв. линијских маркера (*CD3*, *CD19* и *CD56*), као и испољавању

*CD10*, *CD14*, *CD15*, *CD16* и *CD45* антигена. Даља подела *MDSC* популације на *MDSC* налик гранулоцитима (*GrMDSC*) и налик моноцитима (*MoMDSC*) је учињена на основу *CD15* и *CD14* антигена. Популација *GrMDSC* у односу на популацију зрелих гранулоцита је даље анализирана на основу испољавања *CD10* антигена као и на основу анализе маркера *CD11b*, *CD15*, *CD16*, *CD33* и *CD45*. Популација *MoMDSC* у односу на популацију зрелих моноцита је даље анализирана на основу испољавања *CD14* и *HLA-DR*, као и на основу анализе маркера *CD11b*, *CD16* и *CD45*. Процент, релативни број *MDSC*, је изражаван као проценат свих нуклеисаних ћелија. Обележавање као и анализа *MDSC* популације истоветна је као приступ наведен у ранијој референци из исте лабораторије у којој је рађена и садашња дијагностика (158).

Фенотипска карактеризација *MDSC* ћелија из микроциркулације тумора

Фенотипска анализа популација ћелија из узорка микроциркулације тумора је била учињена на потпуно исти начин као и из узорка периферне крви.

## **Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ**

Независне варијабле:

Свим пацијентима на почетку испитивања је урађена стандардна постериорна и профилна радиографија плућа и срца, ехотомографија абдомена, компјутеризована томографија грудног коша и абдомена, бронхоскопија, а по потреби и друге дијагностичке процедуре у циљу одређивања стадијума болести

(позитронска емисиона томографија, сцинтиграфија костију, компјутеризована томографија или магнетна резонанца главе, плеурална пункција, пункција перикарда са цитолошким прегледом узетог материјала) у складу са Националним водичем добре клиничке праксе за карцином плућа.

Патохистолошком анализом тумора праћени су: хистолошки тип, величина тумора, хистолошки градус, присуство лимфоваскуларне и/или перинеуралне туморске инвазије, патолошки *TNM* стадијум.

Хистолошка верификација анализе туморског ткива обухватила је стандардну методу бојења препарата хематоксилин-еозин бојењем као и хистохемијска и имунохистохемијска бојења која су важан елемент одређивања хистолошког типа и градуса болести.

Зависне варијабле:

Процентуална заступљеност MDSC унутар леукоцита: MDSC је одређивана коришћењем моноклонских антитела за имунофенотипизацију, специфичних према ћелијским површинским маркерима *CD3*, *CD10*, *CD11b*, *CD14*, *CD15*, *CD16*, *CD19*, *CD33*, *CD66*, *CD4* и *HLA-DR*, у различитим комбинацијама за мултиколорну анализу. Обојене ћелије су анализирани на *Beckman Coulter FC 500* проточном цитометру помоћу *CXP analysis* програма. Процентуална заступљеност MDSC је изражена као проценат од укупних леукоцита.

Степен испољености *CD16* на MDSC и зрелих гранулоцитима: На MDSC и популацији зрелих гранулоцита процењена је експресија *CD16* молекула, као и средња вредности интензитета флуоресценце (*MFI, mean fluorescence intensity*) *CD16* молекула на испитиваним ћелијама.

Добијени резултати одређивања зависних варијабли поређени су према хистолошком типу тумора, према раширености болести и према клиничким стадијуму болести.

#### Д. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Сви статистички прорачуни су урађени коришћењем *GraphPad Prism 5 version 5.01* софтвера. Независни узорци су поређени између група коришћењем Студентовог *t*-теста и *Mann-Whitney* теста. За зависне узорке са више од две групе коришћен је *One-way ANOVA* тест са накнадним *Bonferroni* тестом. За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима коришћени су *Pearson*-ов и *Spearman*-ов тест корелације. Разлике су сматране статистички значајним уколико је *p* мање или једнако 0,05, високо значајним уколико је *p* мање или једнако 0,001 и веома високо статистички значајним уколико је *p* мање или једнако 0,0001, док статистичке разлике које нису биле значајне означене као *ns (not significant)*. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација ( $X \pm SD$ ), али и као минимална и максимална вредност (*Min-Max*), медијана (*Med*) и стандардна грешка (*SE*).

#### 4. РЕЗУЛТАТИ

Студија је урађена у узорку од укупно 64 испитаника, односно 54 пацијента са дијагностикованим тумором плућа и 10 здравих особа (контролна група). Код пацијената је праћен патохистолошки тип тумора плућа, *T* стадијум, *N* стадијум болести, присуство метастаза и клинички стадијум болести. У зависности од ових параметара урађена је анализа вредности праћених маркера код пацијената са тумором плућа према месту узимања узорка крви: из системске циркулације или микроциркулације тумора (Табела 1).

Табела 1. Основне клиничке карактеристике пацијената

	Број пацијената	Укупно
<b>Патохистолошки тип</b>		
<i>SCLC</i>	10	
<i>Ad</i>	10	44
<i>Sq</i>	18	
<i>LC</i>	6	
<b><i>T</i> стадијум</b>		
<i>T1</i>	11	
<i>T2</i>	14	48
<i>T3</i>	14	
<i>T4</i>	9	
<b><i>N</i> стадијум</b>		
<i>N0</i>	11	
<i>N1</i>	10	44
<i>N2</i>	13	
<i>N3</i>	10	
<b>Присуство метастаза</b>		
<i>M0</i>	27	44
<i>M1</i>	17	
<b>Клинички стадијум</b>		
<b>III</b>	27	43
<b>IV</b>	16	

#### 4.1. Заступљеност *MDSC* у различитим узорцима контролне групе и оболелих пацијената

##### Вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

Анализа *CD14<sup>+</sup> MDSC* маркера показала је да су највеће просечне вредности овог маркера детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $26,02 \pm 15,96\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $15,46 \pm 8,24\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $3,20 \pm 1,32\%$ ) биле мање (Табела 2).

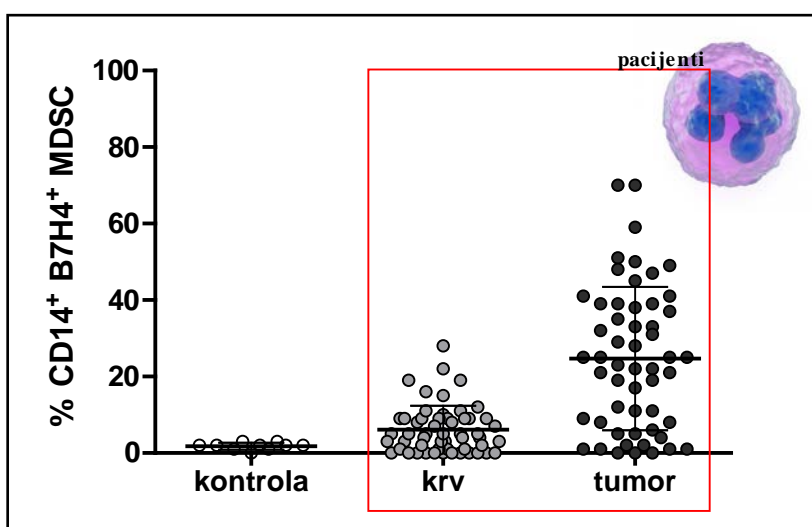
Табела 2. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	3,00	3,00
<i>Max</i>	5,00	41,00	84,00
<i>Med</i>	3,00	13,50	25,50
<i>SE</i>	0,42	1,12	2,17
<i>x</i>	3,20	15,46	26,02
<i>SD</i>	1,32	8,24	15,96

Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* маркера су биле статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ) (График 1). Такође, статистички значајно виша вредност овог маркера је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу

(*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ). Ако се узорци из системске циркулације и узорци из микроциркулације тумора истих пацијената упаре и анализирају статистичким тестом за везане узорке, онда се такође добије статистички значајна разлика (*Wilcoxon test*;  $p = 0,0003$ ).

График 1. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора



### Вредности $CD14^+B7H4^+ MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

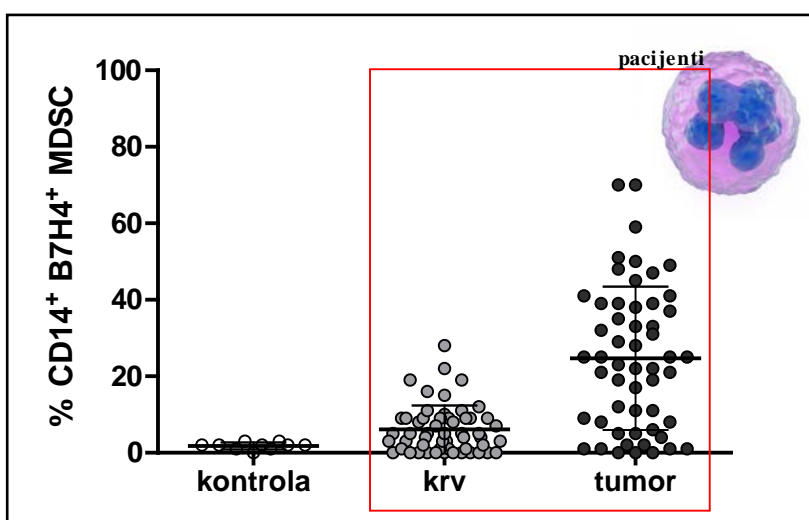
Анализа  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера показала је да су највеће просечне вредности овог маркера детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $24,72 \pm 18,77\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $6,11 \pm 6,25\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $1,80 \pm 0,92\%$ ) биле мање (Табела 3).

Табела 3. Просечне вредности  $CD14+B7H4^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора

$CD14^+ B7H4^+ MDSC$	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	3,00	28,00	70,00
<i>Med</i>	2,00	5,00	24,00
<i>SE</i>	0,29	0,85	2,55
<i>x</i>	1,80	6,11	24,72
<i>SD</i>	0,92	6,25	18,77

Просечне вредности  $CD14+B7H4^+MDSC$  маркера су биле статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test; p = 0,0002*), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test; p = 0,0001*), а слично је добијено и упареном анализом (*Wilcoxon test; p < 0,0001*) (График 2). Такође, статистички значајно виша вредност овог маркера је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test; p = 0,0417*).

График 2. Просечне вредности  $CD14+B7H4L^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора





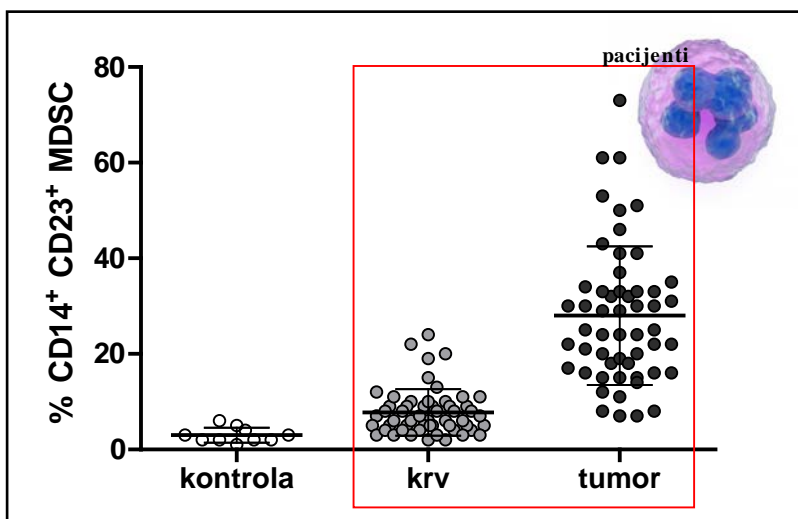
## Вредности $CD14^+CD23^+$ MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора

Анализа  $CD14^+CD23^+$  MDSC маркера показала је да су највеће просечне вредности овог маркера детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $28,00 \pm 14,52\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $7,78 \pm 4,87\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $3,00 \pm 1,56\%$ ) биле мање (Табела 4).

Табела 4. Просечне вредности  $CD14^+ CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора

$CD14^+ CD23^+$ MDSC	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	2,00	7,00
<i>Max</i>	6,00	24,00	73,00
<i>Med</i>	2,50	6,50	25,00
<i>SE</i>	0,49	0,66	1,98
<i>x</i>	3,00	7,78	28,00
<i>SD</i>	1,56	4,87	14,52

График 3. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора



Просечне вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера су биле статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), а слично је добијено и упареном анализом (*Wilcoxon test*;  $p < 0,0001$ ) (График 3). Такође, статистички значајно виша вредност овог маркера је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0002$ ).

#### **Вредности $CD23^+B7H4^+MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора**

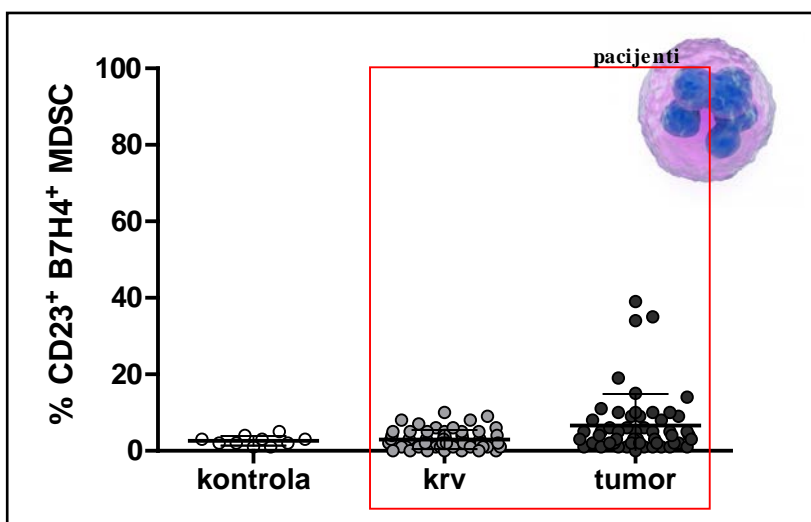
Анализа  $CD23^+B7H4^+MDSC$  маркера показала је да су највеће просечне вредности овог маркера детектоване у узорцима крви из микроциркулације тумора ( $6,67 \pm 8,25\%$ ), док су просечне вредности у узорцима крви пацијената са тумором ( $2,96 \pm 2,50\%$ ), односно у контролној групи здравих испитаника ( $2,60 \pm 1,27\%$ ) биле мање (Табела 5).

Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+MDSC$  маркера су биле статистички значајно више у узорцима крви из микроциркулације тумора у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p < 0,0001$ ), као и у односу на узорке крви истих пацијената из системске циркулације (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0030$ ), а слично је добијено и упареном анализом (*Wilcoxon test*;  $p < 0,0001$ ) (График 4). Такође, статистички значајно виша вредност овог маркера је била у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у односу на контролну групу (*Mann Whitney test*;  $p = 0,0003$ ).

Табела 5. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора

$CD23^+ B7H4^+$ MDSC	Контрола	Пацијенти са тумором плућа	
		Крв	Микроциркулација тумора
<i>N</i>	10	54	54
<i>Min</i>	1,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	5,00	10,00	39,00
<i>Med</i>	2,50	2,00	4,00
<i>SE</i>	0,40	0,34	1,12
<i>x</i>	2,60	2,96	6,67
<i>SD</i>	1,27	2,50	8,25

График 4. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора



#### 4.2. Патохистолошки тип тумора и MDSC

Вредности  $CD14^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора

Анализом  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације у односу на патохистолошки тип тумора (ситноћелијски карцином плућа- *SCLC*; неситноћелијски карцином плућа- *NSCL*: аденокарцином- *Ad*, сквамозни плућни карцином- *Sq* и крупноћелијски карцином плућа- *LC*) показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $24,80 \pm 11,12\%$ ) а најмање у групи са *Sq* тумором (Табела 6; График 5). С друге стране, највеће просечне вредности овог маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $37,22 \pm 13,06\%$ ) а најмање у групи са *Ad* тумором.

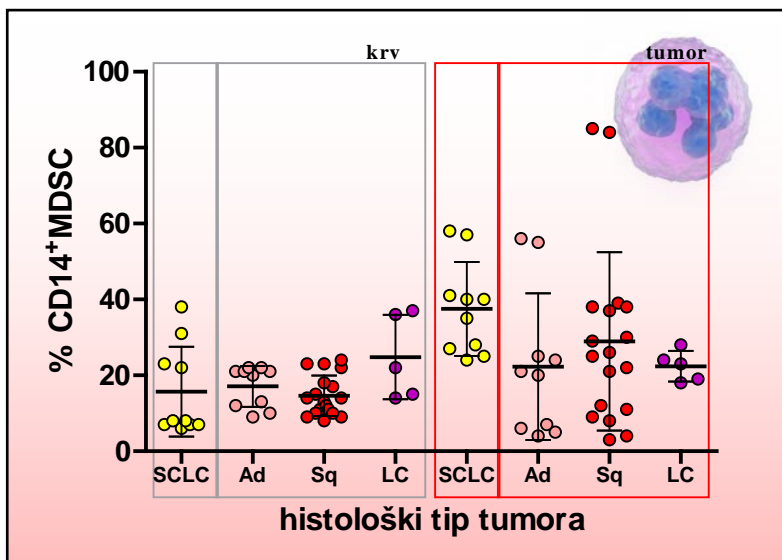
Табела 6. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора

$CD14^+MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	9	10	18	5
<i>Min</i>	6,00	9,00	8,00	14,00	24,00	4,00	3,00	18,00
<i>Max</i>	38,00	22,00	24,00	37,00	58,00	56,00	85,00	28,00
<i>Med</i>	8,00	20,50	13,50	22,00	35,00	20,50	25,50	23,00
<i>SE</i>	3,75	1,70	1,26	4,97	4,35	6,11	5,54	1,81
<i>x</i>	15,70	17,10	14,61	24,80	37,22	22,30	28,94	22,40
<i>SD</i>	11,85	5,38	5,35	11,12	13,06	19,31	23,49	4,04

Ако се упореде вредности  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, једино постоји статистички значајно виша вредност код *LC* у односу на *Sq* ( $24,80 \pm 11,12$ ;  $14,61 \pm 5,35$ , редом; *Mann Whitney test*,  $p = 0,0477$ ) (Табела 7). Ако се упореде вредности  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, нађена је статистички

значајно виша просечна вредност овог маркера код *SCLC* у односу на *Ad* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0171$ ), као и у *SCLC* у односу на *LC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0118$ ).

График 5. Просечне вредности *MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу



Табела 7. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* између група пацијената различитог патохистолошког типа тумора у системској и микроциркулацији тумора плућа

<i>CD14<sup>+</sup>MDSC</i>	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0171$
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0118$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	$p = 0,0477$	<i>ns</i>

Ако се анализирају вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* маркера код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из

микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0022$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0138$ ), као и код *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0496$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0185$ ) (Табела 8).

Табела 8. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0022$	$p = 0,0138$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq</i>	$p = 0,0496$	$p = 0,0185$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора**

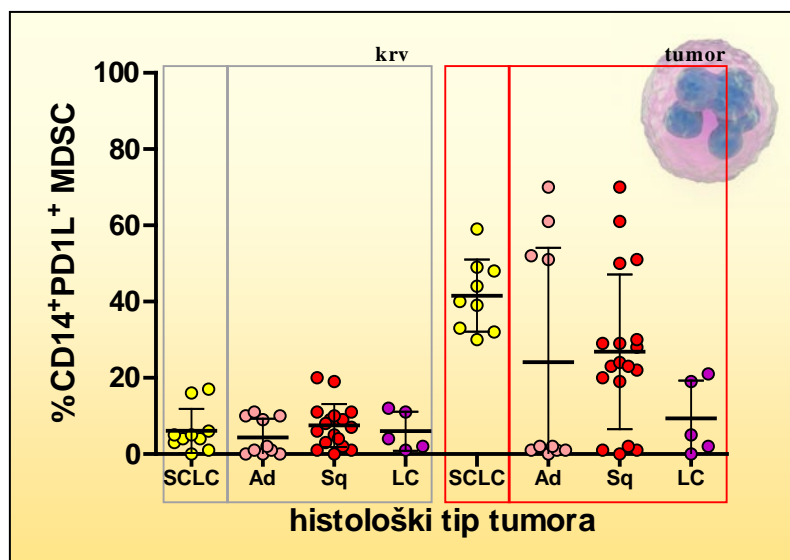
Табела 9. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу

<i>CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	10	10	18	5
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	30,00	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	17,00	11,00	20,00	12,00	59,00	70,00	70,00	21,00
<i>Med</i>	4,50	1,50	7,50	4,00	40,00	2,00	23,50	5,00
<i>SE</i>	1,83	1,54	1,33	2,30	3,15	9,50	4,79	4,41
<i>x</i>	6,10	4,40	7,50	6,00	41,56	24,10	26,83	9,40
<i>SD</i>	5,78	4,88	5,63	5,15	9,45	30,05	20,31	9,86

Анализом *CD14<sup>+</sup> B7H4<sup>+</sup>MDSC* маркера у узорцима крви из системске циркулације у односу на патохистолошки тип тумора показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *Sq* ( $7,50 \pm 5,63\%$ ) а најмање у групи са *Ad* (Табела 9; График 6). С друге стране, највеће просечне вредности овог

маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $41,56 \pm 9,45\%$ ) а најмање у групи са *LC* тумором.

График 6. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу



Ако се упореде вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 10). Али, када се упореде вредности  $CD14^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, нађена је статистички значајно виша просечна вредност овог маркера код *SCLC* у односу на *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0180$ ), као и код *SCLC* у односу на *LC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0010$ ).

Ако се анализирају вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из

микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0003$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0088$ ), код *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0025$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0005$ ), као и код *Ad* (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0213$ ) (Табела 11).

Табела 10. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској и у микроциркулацији тумора

<i>CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0180$
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0010$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 11. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup>B7H4<sup>+</sup>MDSC* према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0003$	$p = 0,0088$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0213$
<i>NSCLC Sq</i>	$p = 0,0025$	$p = 0,0005$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Вредности *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу тумора**

Анализом *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* маркера у узорцима крви из системске циркулације у односу на патохистолошки тип тумора показано је да су највеће



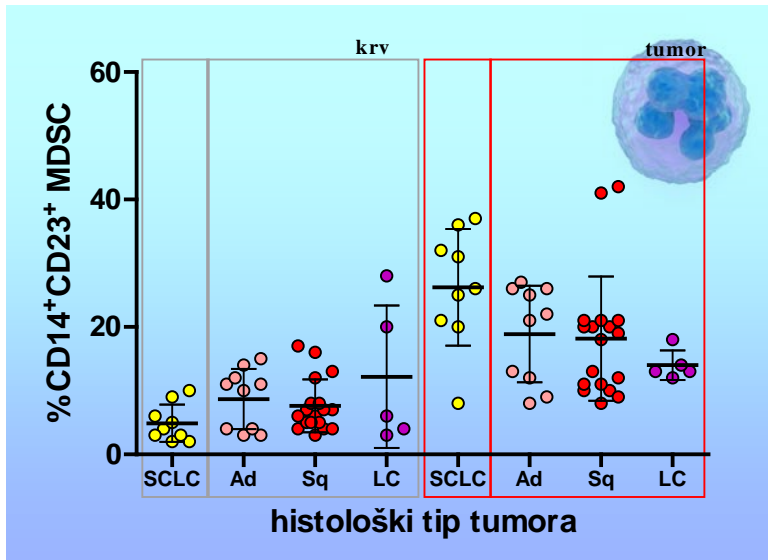
просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $12,20 \pm 11,19\%$ ), а најмање у групи са *SCLC* (Табела 12; График 7). С друге стране, највеће просечне вредности овог маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $26,22 \pm 9,14\%$ ) а најмање у групи са *LC* тумором.

Ако се упореде вредности *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 13). С друге стране, ако се упореде вредности *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора у зависности од патохистолошког типа тумора, нађена је статистички значајно виша просечна вредност овог маркера код *SCLC* у односу на *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0344$ ), као и код *SCLC* у односу на *LC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0190$ ).

Табела 12. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу

<i>CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	5	10	10	18	5
<i>Min</i>	2,00	3,00	3,00	3,00	8,00	8,00	8,00	12,00
<i>Max</i>	10,00	15,00	17,00	28,00	37,00	27,00	42,00	18,00
<i>Med</i>	4,00	10,50	6,50	6,00	26,00	21,50	18,50	13,00
<i>SE</i>	0,98	1,49	0,98	5,00	3,05	2,40	2,30	1,05
<i>x</i>	4,89	8,70	7,61	12,20	26,22	18,90	18,17	14,00
<i>SD</i>	2,93	4,72	4,16	11,19	9,14	7,58	9,74	2,35

График 7. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу



Табела 13. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0344$
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0190$
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 14. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према хистолошком типу тумора између узорак системске циркулације и узорак микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	Mann Whitney test	Wilcoxon test
<i>SCLC</i>	$p = 0,0008$	$p = 0,0139$
<i>NSCLC Ad</i>	$p = 0,0125$	$p = 0,0239$
<i>NSCLC Sq</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0002$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Ако се анализирају вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC маркера код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви,

нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0008$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0139$ ), код *Sq* (*Mann Whitney test*,  $p < 0,0001$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0002$ ), као и код *Ad* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0125$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0239$ ) (Табела 14).

### Вредности $CD23^+ B7H4^+ MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу тумора

Анализом  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације у односу на патохистолошки тип тумора показано је да су највеће просечне вредности детектоване у групи пацијената са *LC* ( $5,83 \pm 3,76\%$ ) а најмање у групи са *SCLC* (Табела 15; График 8). С друге стране, највеће просечне вредности овог маркера у узорцима крви из микроциркулације тумора детектоване су у групи пацијената са *SCLC* ( $8,90 \pm 9,28\%$ ) а најмање у групи са *LC* тумором.

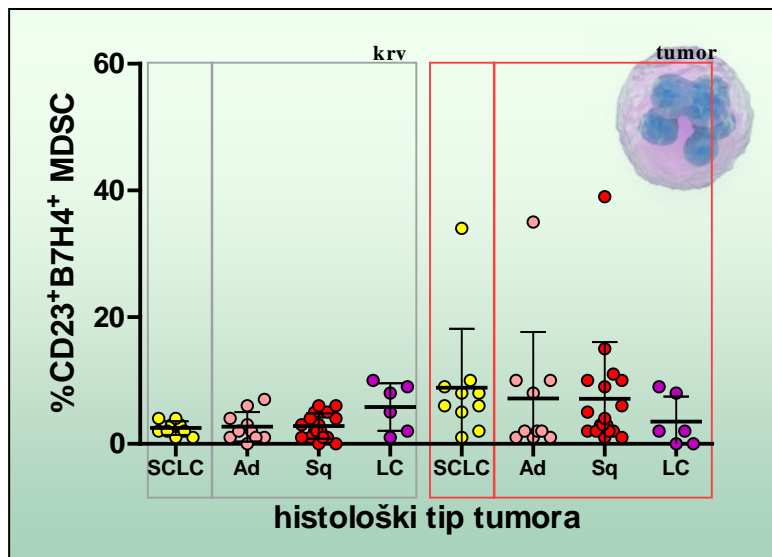
Табела 15. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према патохистолошком типу

$CD23^+ B7H4^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>	<i>SCLC</i>	<i>Ad</i>	<i>Sq</i>	<i>LC</i>
<i>N</i>	10	10	18	6	10	10	18	6
<i>Min</i>	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<i>Max</i>	4,00	7,00	6,00	10,00	34,00	35,00	39,00	9,00
<i>Med</i>	2,50	2,00	2,50	6,50	7,00	2,00	3,50	2,00
<i>SE</i>	0,34	0,73	0,47	1,54	2,93	3,31	2,11	1,63
<i>x</i>	2,50	2,70	2,83	5,83	8,90	7,20	7,11	3,50
<i>SD</i>	1,08	2,31	2,01	3,76	9,28	10,46	8,94	3,99

Ако се упореде вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од

патохистолошког типа тумора, није нађена статистички значајна разлика ни у једном патохистолошком подтипу тумора (Табела 16), а слични резултати су добијени и у узорцима из микроциркулације тумора плућа.

График 8. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према хистолошком типу



Табела 16. Статистичка анализа вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  између група болесника различитог патохистолошког типа тумора у системској и у микроциркулацији тумора

$CD23^+ B7H4^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
<i>SCLC / NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>SCLC / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Ad / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>NSCLC Sq / NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Ако се анализирају вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим патохистолошким типом тумора плућа у односу на врсту узорка крви,

нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *SCLC* (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0096$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0137$ ), код *Sq* (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0081$ ), као и код *Ad* (*Wilcoxon test*,  $p = 0,0355$ ) (Табела 17).

Табела 17. Статистичка анализа вредности *CD23<sup>+</sup> B7H4<sup>+</sup> MDSC* према патохистолошком типу тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>SCLC</i>	$p = 0,0096$	$p = 0,0137$
<i>NSCLC Ad</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0355$
<i>NSCLC Sq</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0081$
<i>NSCLC LC</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

#### 4.3. Величина тумора и *MDSC*

##### Вредности *CD14<sup>+</sup>MDSC* у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора (*T* стадијум)

Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* маркера одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и у узорцима микроциркулације туморског ткива код 10 пацијената са тумором у *T1* стадијуму, 14 са тумором у *T2*, 14 са тумором у *T3* и 8 пацијената са тумором у *T4* стадијуму. У узорцима крви, како из системске циркулације тако и из микроциркулације туморског ткива, оболелих од тумора плућа највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *T4* стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 18, График 9).

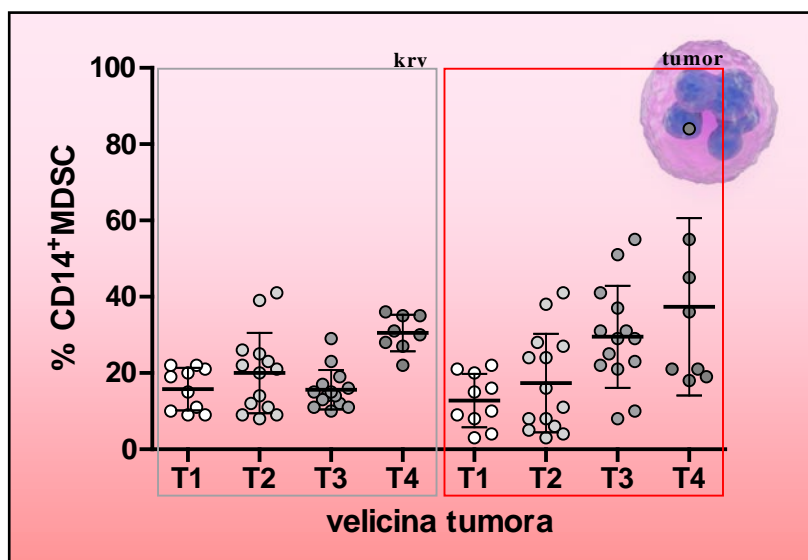
Ако се упореде вредности  $CD14^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $T$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената у  $T4$  стадијуму у односу на остала три стадијума ( $T1-3$ ) (Табела 19). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената у  $T4$  стадијуму у односу на  $T1$  и  $T2$ , као и у  $T3$  у односу на  $T1$  и  $T2$  стадијум.

Табела 18. Просечне вредности  $CD14^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

$CD14^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$
$N$	10	14	14	8	10	14	14	8
$Min$	9,00	8,00	10,00	22,00	3,00	3,00	8,00	18,00
$Max$	22,00	41,00	29,00	36,00	22,00	41,00	55,00	84,00
$Med$	17,00	20,50	14,50	30,50	12,50	13,50	29,00	28,50
$SE$	1,77	2,82	1,38	1,70	2,21	3,45	3,59	8,23
$x$	15,80	20,00	15,64	30,50	12,80	17,36	29,50	37,38
$SD$	5,59	10,54	5,17	4,81	6,97	12,90	13,41	23,28

Ако се анализирају вредности  $CD14^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $T$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са  $T3$  стадијумом (*Mann Whitney test*,  $p = 0,0040$ ; *Wilcoxon test*,  $p = 0,0120$ ) (Табела 20).

График 9. Просечне вредности *MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 19. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* између група болесника различите величине тумора у системској и у микроциркулацији тумора плућа

<i>CD14<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв	Микроциркулација тумора
<i>T1 / T2</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>
<i>T1 / T3</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0014$
<i>T1 / T4</i>	$p = 0,0006$	$p = 0,0066$
<i>T2 / T3</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0273$
<i>T2 / T4</i>	$p = 0,0140$	$p = 0,0440$
<i>T3 / T4</i>	$p = 0,0004$	<i>Ns</i>

Табела 20. Упоредна анализа вредности *CD14<sup>+</sup> MDSC* према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>T1</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T2</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>T3</b>	$p = 0,0040$	$p = 0,0120$
<b>T4</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

## Вредности $CD14^+B7H4^+MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера такође су одређене у узорцима крви из системске и туморске микроциркулације циркулације пацијената са тумором плућа. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у  $T3$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $T1$  стадијуму (Табела 21, График 10). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у  $T3$  и  $T2$  стадијуму, а најмање такође код пацијената у  $T1$  стадијуму.

Ако се упореде вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $T$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената у  $T2-4$  стадијуму у односу на  $T1$ , као и у  $T3$  у односу на  $T4$  (*Mann Whitney test*) (Табела 22). Слично, и у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групама пацијената у  $T2-4$  стадијуму у односу на  $T1$ .

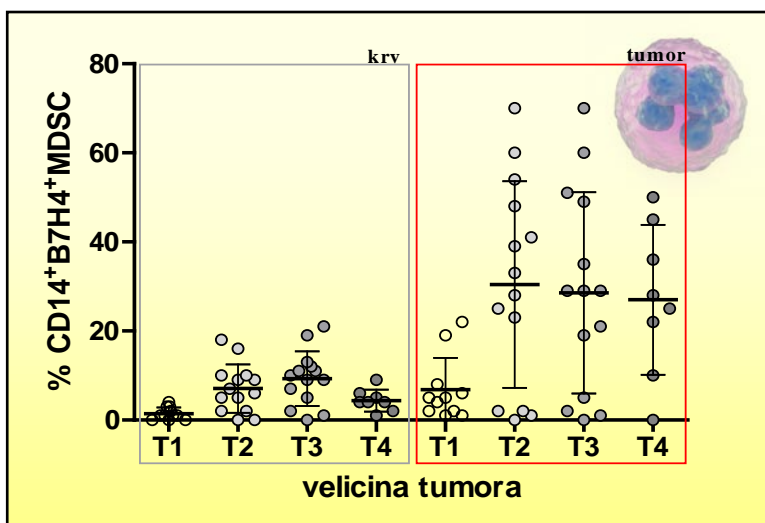
Ако се анализирају вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $T$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим  $T$  стадијумом (Табела 23).



Табела 21. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
<i>N</i>	11	14	14	8	11	14	14	8
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
<i>Max</i>	4,00	18,00	21,00	9,00	22,00	70,00	70,00	50,00
<i>Med</i>	1,00	6,50	9,50	4,00	5,00	30,50	29,00	26,50
<i>SE</i>	0,41	1,45	1,64	0,86	2,15	6,20	6,05	5,95
<i>x</i>	1,46	7,07	9,29	4,38	6,82	30,43	28,57	27,00
<i>SD</i>	1,37	5,44	6,15	2,45	7,14	23,20	22,62	16,83

График 10. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 22. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
T1 / T2	$p = 0,0054$	$p = 0,0301$
T1 / T3	$p = 0,0015$	$p = 0,0281$
T1 / T4	$p = 0,0064$	$p = 0,0131$
T2 / T3	<i>ns</i>	<i>ns</i>
T2 / T4	<i>ns</i>	<i>ns</i>
T3 / T4	$p = 0,0473$	<i>ns</i>

Табела 23. Статистичка анализа вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>T1</i>	$p = 0,0238$	$p = 0,0089$
<i>T2</i>	$p = 0,0011$	$p = 0,0038$
<i>T3</i>	$p = 0,0049$	$p = 0,0037$
<i>T4</i>	$p = 0,0021$	$p = 0,0156$

**Вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора**

Табела 24. Просечне вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

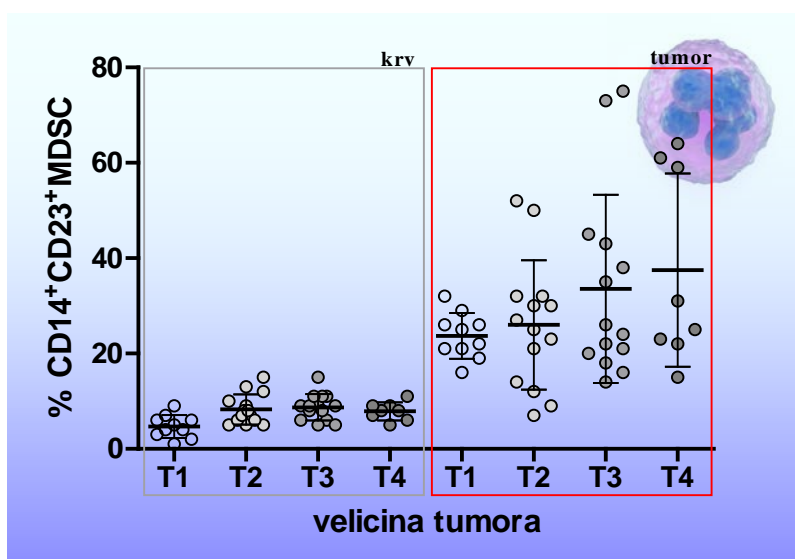
$CD14^+CD23^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>
<i>N</i>	10	14	14	8	10	14	14	8
<i>Min</i>	1,00	5,00	5,00	5,00	16,00	7,00	14,00	15,00
<i>Max</i>	9,00	15,00	15,00	11,00	32,00	52,00	75,00	64,00
<i>Med</i>	4,50	7,50	9,00	8,00	23,50	26,00	25,00	28,00
<i>SE</i>	0,76	0,85	0,74	0,67	1,52	3,62	5,28	7,16
<i>x</i>	4,70	8,29	8,71	7,88	23,70	26,00	33,57	37,50
<i>SD</i>	2,41	3,17	2,76	1,89	4,81	13,54	19,75	20,26

Просечне вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера одређене су и у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *T3* стадијуму ( $8,71 \pm 2,76\%$ ), а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 24, График 11). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *T4* стадијуму ( $37,50 \pm 20,26\%$ ), а најмање такође код пацијената у *T1* стадијуму.

Ако се упореде вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $T$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групама пацијената у  $T2-4$  стадијуму у односу на  $T1$  (*Mann Whitney test*) (Табела 25). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора није нађена статистички значајно већа вредност овог маркера између  $T$  група, иако је највећа вредност била у  $T4$  стадијуму.

Ако се анализирају вредности  $CD14^+CD23^+$ MDSC маркера код пацијената са различитим  $T$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим  $T$  стадијумом (Табела 26).

График 11. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 25. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>T1 / T2</i>	$p = 0,0088$	<i>ns</i>
<i>T1 / T3</i>	$p = 0,0029$	<i>ns</i>
<i>T1 / T4</i>	$p = 0,0140$	<i>ns</i>
<i>T2 / T3</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>T2 / T4</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>T3 / T4</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 26. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>T1</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0058$
<i>T2</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0011$
<i>T3</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0011$
<i>T4</i>	$p = 0,0009$	$p = 0,0140$

**Вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора**

Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC маркера одређене су у узорцима крви из системске и туморске микроциркулације циркулације пацијената са тумором плућа. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *T3* стадијуму ( $4,07 \pm 3,17\%$ ), а најмање код пацијената са тумором у *T1* стадијуму (Табела 27, График 12). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *T4* стадијуму ( $22,11 \pm 12,47\%$ ), а најмање такође код пацијената у *T1* стадијуму.

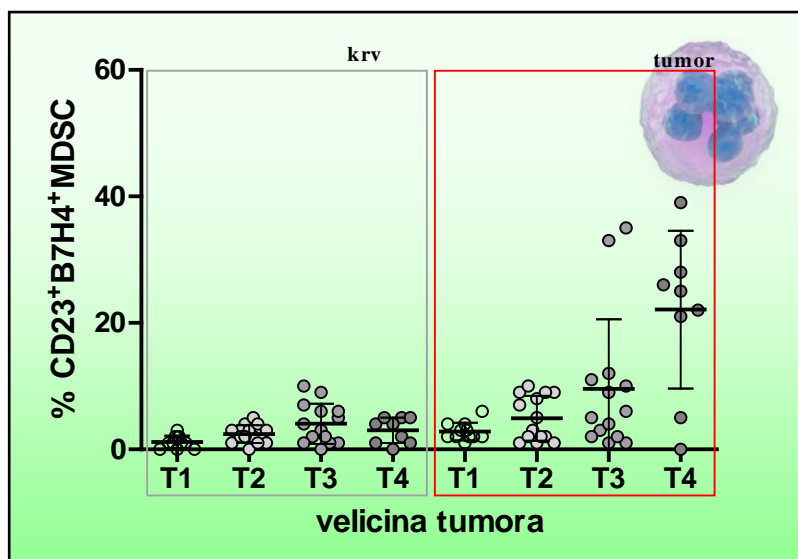
Ако се упореде вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $T$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групама пацијената у  $T2$  и  $T3$  стадијуму у односу на  $T1$  (*Mann Whitney test*) (Табела 28). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената са  $T4$  стадијумом у односу на  $T1$  и  $T2$ .

Ако се анализирају вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $T$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим  $T$  стадијумом (Табела 29).

Табела 27. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора

$CD23^+ B7H4^+ MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$	$T1$	$T2$	$T3$	$T4$
<i>N</i>	11	14	14	9	11	14	14	9
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00
<i>Max</i>	3,00	5,00	10,00	5,00	6,00	10,00	35,00	39,00
<i>Med</i>	1,00	2,50	3,50	4,00	2,00	4,00	5,50	25,00
<i>SE</i>	0,30	0,37	0,85	0,67	0,42	0,95	2,94	4,16
<i>x</i>	1,18	2,43	4,07	3,00	2,82	4,93	9,57	22,11
<i>SD</i>	0,98	1,40	3,17	2,00	1,40	3,56	11,00	12,47

График 12. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према величини тумора



Табела 28. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различите величине тумора у системској и у микроциркулацији тумора

$CD23^+B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
T1 / T2	$p = 0,0268$	<i>ns</i>
T1 / T3	$p = 0,0154$	<i>ns</i>
T1 / T4	<i>ns</i>	$p = 0,0086$
T2 / T3	<i>ns</i>	<i>ns</i>
T2 / T4	<i>ns</i>	$p = 0,0080$
T3 / T4	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 29. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према величини тумора између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
T1	$p = 0,0060$	$p = 0,0215$
T2	<i>ns</i>	$p = 0,0159$
T3	<i>ns</i>	$p = 0,0321$
T4	$p = 0,0077$	$p = 0,0078$

#### 4.4. Нодални статус и MDSC

##### Вредности $CD14^+MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

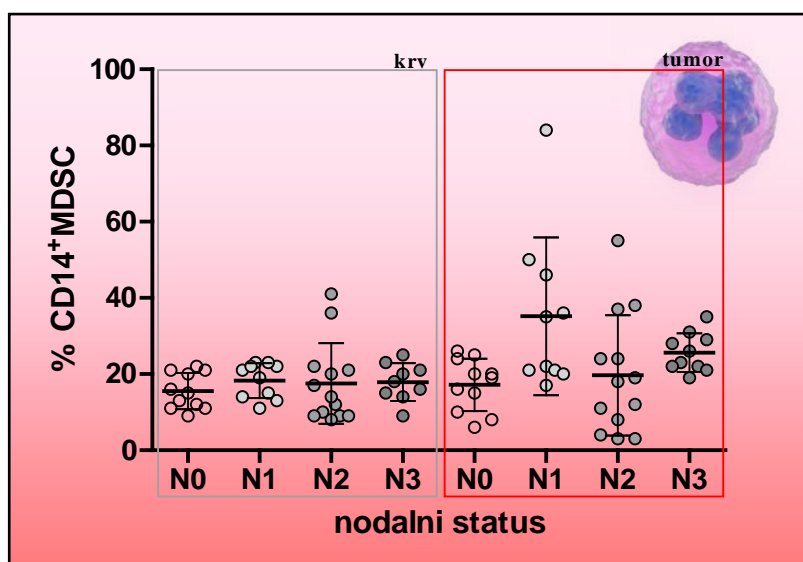
Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  маркера одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализирани у односу на нодални ( $N$ ) стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у  $N1$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $N0$  стадијуму (Табела 30, График 13). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су такође детектоване код пацијената са тумором у  $N1$  стадијуму, а најмање такође код пацијената у  $N0$  стадијуму.

Ако се упореде вредности  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $N$  стадијума тумора, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између различитих  $N$  стадијума пацијената (*Mann Whitney test*) (Табела 31). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената са  $N1$  и  $N3$  стадијумима у односу на  $N0$  стадијум болести.

Табела 30. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD14^+MDSC$	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	9,00	11,00	8,00	9,00	6,00	17,00	3,00	19,00
<i>Max</i>	22,00	23,00	41,00	25,00	26,00	84,00	55,00	35,00
<i>Med</i>	15,00	20,00	14,00	18,00	19,00	28,50	18,00	24,50
<i>SE</i>	1,43	1,45	2,93	1,65	2,07	6,55	4,38	1,61
<i>x</i>	15,55	18,30	17,54	17,89	17,18	35,20	19,69	25,60
<i>SD</i>	4,74	4,60	10,56	4,96	6,87	20,70	15,80	5,08

График 13. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Ако се анализирају вредности  $CD14^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим N стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *N1* и *N3* стадијумима болести (Табела 32).



Табела 31. Упоредна анализа вредности  $CD14^+MDSC$  између група болесника различитог нодалног статуса у системској и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^+MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	$p = 0,0123$
$N0 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N3$	<i>ns</i>	$p = 0,0101$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2 / N3$	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 32. Статистичка анализа вредности  $CD14^+MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$N0$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1$	$p = 0,0444$	$p = 0,0248$
$N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N3$	$p = 0,0079$	$p = 0,0195$

**Вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу**

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера су детектоване код пацијената са тумором у  $N3$  стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у  $N0$  стадијуму (Табела 33, График 14). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су такође детектоване код пацијената са тумором у  $N3$  стадијуму, а најмање такође код пацијената у  $N0$  стадијуму.

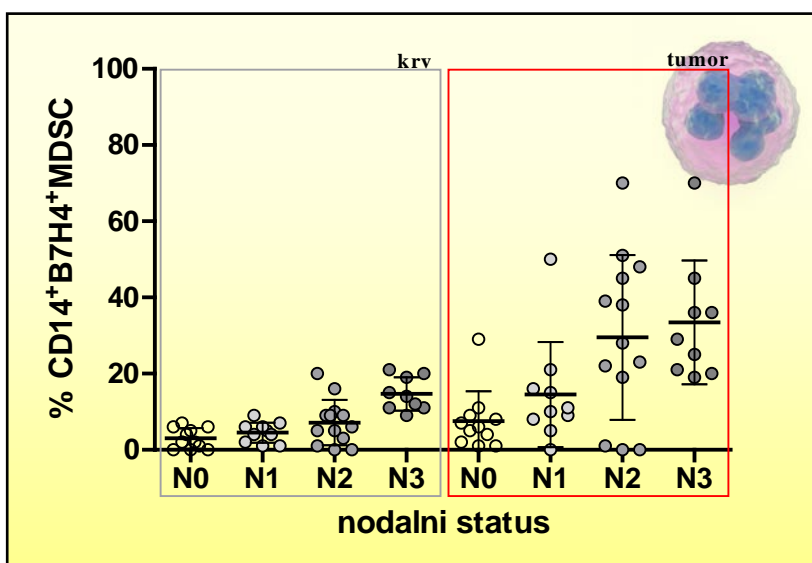
Ако се упореде вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $N$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у  $N3$  стадијуму у

односу на остала три *N* стадијума (*N0-2*) (*Mann Whitney test*) (Табела 34). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената са *N3* стадијумом у односу на *N0* и *N1*, као и у *N2* у односу на *N0* стадијум болести.

Табела 33. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD14^+B7H4^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	0,00	1,00	0,00	9,00	1,00	0,00	0,00	19,00
<i>Max</i>	7,00	9,00	20,00	21,00	29,00	50,00	70,00	70,00
<i>Med</i>	2,00	4,50	6,00	14,00	6,00	10,50	28,00	29,00
<i>SE</i>	0,81	0,83	1,66	1,46	2,36	4,36	6,00	5,42
<i>x</i>	3,00	4,50	7,15	14,67	7,55	14,50	29,54	33,44
<i>SD</i>	2,68	2,64	5,98	4,39	7,83	13,79	21,62	16,27

График 14. Просечне вредности  $CD14+B7H4L^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Ако се анализирају вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим N стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим N стадијумом болести (Табела 35).

Табела 34. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+ MDSC$  између група болесника различитог нодалног статуса у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+B7H4^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N0 / N2$	<i>ns</i>	$p = 0,0424$
$N0 / N3$	$p = 0,0002$	$p = 0,0007$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1 / N3$	$p = 0,0003$	$p = 0,0055$
$N2 / N3$	$p = 0,0049$	<i>ns</i>

Табела 35. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>N0</b>	$p = 0,0362$	<i>ns</i>
<b>N1</b>	$p = 0,0141$	$p = 0,0112$
<b>N2</b>	$p = 0,0037$	$p = 0,0126$
<b>N3</b>	$p = 0,0091$	$p = 0,0017$

**Вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу**

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  маркера су детектоване код пацијената са тумором у N3 стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у N1 стадијуму

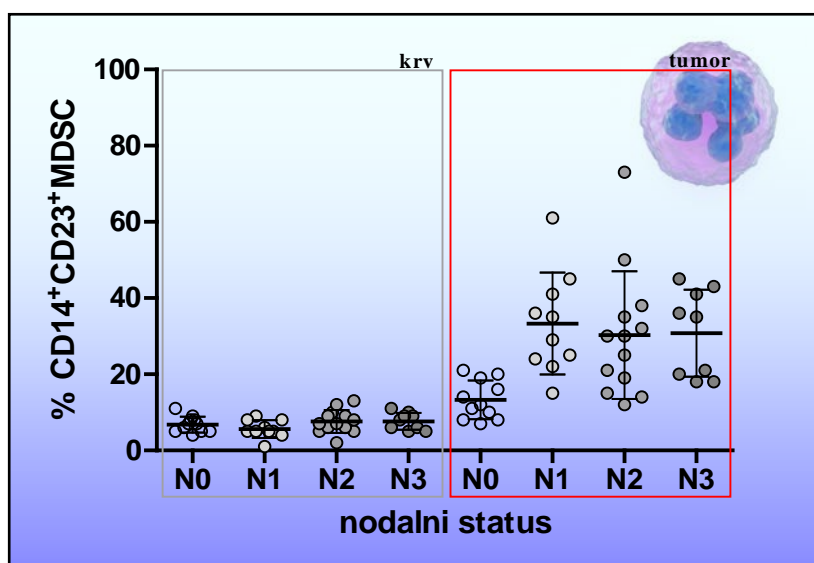
(Табела 36, График 15). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су детектоване код пацијената са тумором у *N1* стадијуму, а најмање такође код пацијената у *N0* стадијуму.

Ако се упореде вредности *CD14<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> MDSC* маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *N* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између вредности овог маркера у различитим *N* стадијумима болести (*Mann Whitney test*) (Табела 37). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групама пацијената са *N1-3* стадијумима у односу на *N0* стадијум болести.

Табела 36. Просечне вредности *CD14<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> MDSC* (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

<i>CD14<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> MDSC</i>	Крв				Микроциркулација тумора			
	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	4,00	1,00	2,00	5,00	7,00	15,00	12,00	18,00
<i>Max</i>	11,00	9,00	13,00	11,00	21,00	61,00	73,00	45,00
<i>Med</i>	7,00	5,00	7,00	8,00	12,00	32,00	30,00	35,00
<i>SE</i>	0,63	0,73	0,84	0,75	1,53	4,23	4,65	3,80
<i>x</i>	6,82	5,60	7,62	7,67	13,27	33,30	30,31	30,78
<i>SD</i>	2,09	2,32	3,02	2,24	5,08	13,38	16,76	11,40

График 15. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Ако се анализирају вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC маркера код пацијената са различитим N стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са било којим N стадијумом болести (Табела 38).

Табела 37. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група

болесника различитог нодалног статуса у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>N0 / N1</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0004$
<i>N0 / N2</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0017$
<i>N0 / N3</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0018$
<i>N1 / N2</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>N1 / N3</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>N2 / N3</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 38. Статистичка анализа вредности  $CD14^+CD23^+ MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>N0</i>	$p = 0,0017$	$p = 0,0086$
<i>N1</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0059$
<i>N2</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0017$
<i>N3</i>	$p = 0,0004$	$p = 0,0039$

**Вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу**

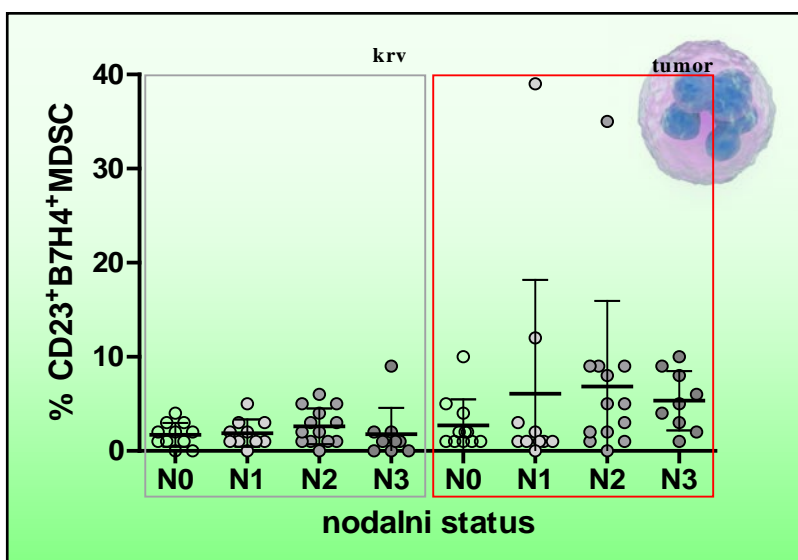
У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа највеће просечне вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  маркера су детектоване код пацијената са тумором у *N2* стадијуму, а најмање код пацијената са тумором у *N0* стадијуму (Табела 39, График 16). У узорцима крви из микроциркулације тумора највеће вредности овог маркера су такође детектоване код пацијената са тумором у *N2* стадијуму, а најмање такође код пацијената у *N0* стадијуму.

Ако се упореде вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *N* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између вредности овог маркера у различитим *N* стадијумима болести (*Mann Whitney test*) (Табела 40). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је једино статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената са *N3* стадијумом у односу на *N0* стадијум болести.

Табела 39. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу

$CD23^+ B7H4^+$ MDSC	Крв				Микроциркулација тумора			
	N0	N1	N2	N3	N0	N1	N2	N3
<i>N</i>	11	10	13	10	11	10	13	10
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	4,00	5,00	6,00	9,00	10,00	39,00	35,00	10,00
<i>Med</i>	2,00	1,50	2,00	1,00	2,00	1,00	5,00	5,00
<i>SE</i>	0,38	0,46	0,53	0,94	0,83	3,82	2,52	1,05
<i>x</i>	1,73	1,90	2,62	1,78	2,73	6,10	6,85	5,33
<i>SD</i>	1,27	1,45	1,90	2,82	2,76	12,07	9,09	3,16

График 16. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према нодалном статусу



Ако се анализирају вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC маркера код пацијената са различитим *N* стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената са *N2* и *N3* стадијумом болести (Табела 41).

Табела 40. Упоредна анализа вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  између група болесника различитог нодалног статуса у системској и у микроциркулацији тумора

$CD23^+ B7H4^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
$N0 / N1$	<i>ns</i>	<i>Ns</i>
$N0 / N2$	<i>ns</i>	<i>Ns</i>
$N0 / N3$	<i>ns</i>	$p = 0,0485$
$N1 / N2$	<i>ns</i>	<i>Ns</i>
$N1 / N3$	<i>ns</i>	<i>Ns</i>
$N2 / N3$	<i>ns</i>	<i>Ns</i>

Табела 41. Упоредна анализа вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  према нодалном статусу између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
$N0$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N1$	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$N2$	<i>ns</i>	$p = 0,0220$
$N3$	$p = 0,0125$	$p = 0,0164$

#### 4.5. Постојање метастаза и $MDSC$

##### Вредности $CD14^+ MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

Просечне вредности  $CD14^+ MDSC$  маркера одређене су у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа и туморске микроциркулације, а затим су анализирани у односу на постојање метастаза-  $M$  стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности овог маркера су детектоване код пацијената без метастаза ( $M0$ ) у односу на пацијенате са метастазама ( $M1$ ) (Табела 42, График 17). У узорцима крви из микроциркулације



тумора такође су веће вредности овог маркера детектоване код пацијената без метастаза.

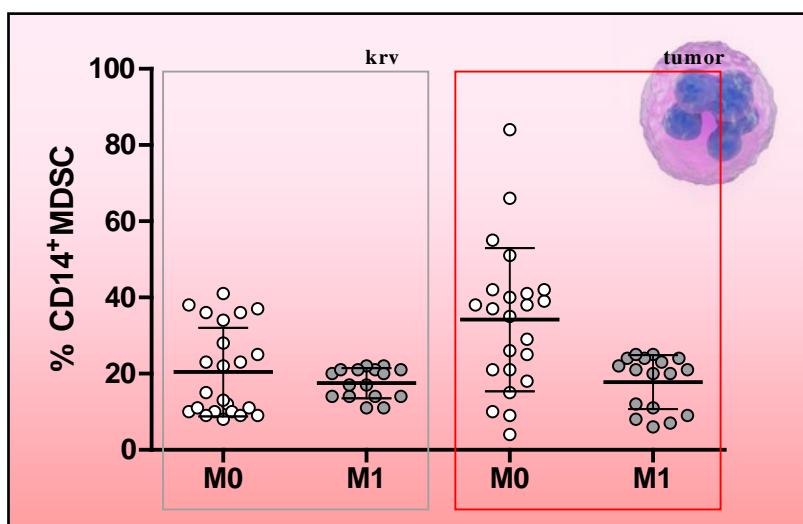
Ако се упореде вредности  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $M$  стадијума тумора, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између  $M0$  и  $M1$  стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 43). С друге стране, у узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи пацијената без метастаза у односу на групу са  $M1$  стадијум болести.

Ако се анализирају вредности  $CD14^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената без метастаза (Табела 44).

Табела 42. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD14^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	$M0$	$M1$	$M0$	$M1$
$N$	27	17	27	17
$Min$	8,00	11,00	4,00	6,00
$Max$	41,00	22,00	84,00	25,00
$Med$	15,00	18,50	37,00	21,00
$SE$	2,43	0,99	3,92	1,72
$x$	20,43	17,50	34,17	17,76
$SD$	11,63	3,97	18,78	7,09

График 17. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Табела 43. Упоредна анализа вредности  $CD14^+MDSC$  између група болесника без и са метастазама у системској и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^+MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
<i>M0 / M1</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0021$

Табела 44. Упоредна анализа вредности  $CD14^+MDSC$  према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<b>M0</b>	$p = 0,0060$	$p = 0,0021$
<b>M1</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза**

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера су детектоване код пацијената без метастаза

(M0) у односу на пацијенате са метастазама (M1) (Табела 45, График 18). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође су веће вредности овог маркера детектоване код пацијената без метастаза.

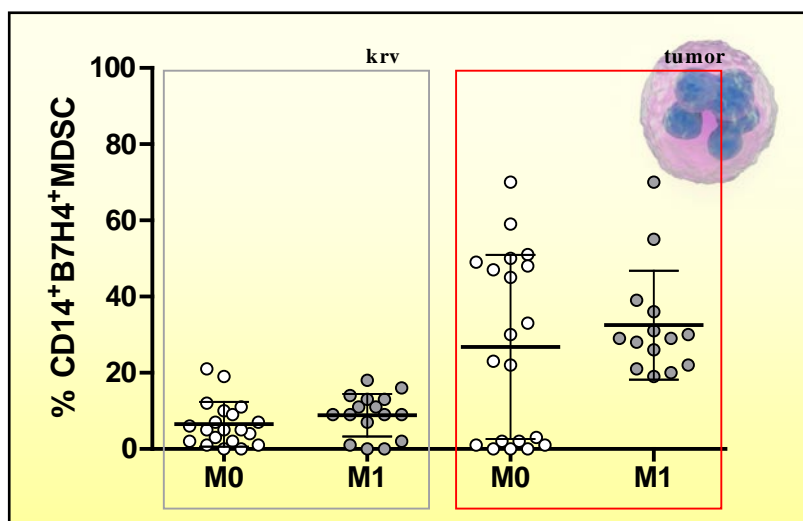
Ако се упореде вредности  $CD14^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $M$  стадијума тумора, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између  $M0$  и  $M1$  стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 46). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између група пацијената без и са метастазама.

Табела 45. Просечне вредности  $CD14^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD14^+ B7H4^+ MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	$M0$	$M1$	$M0$	$M1$
<i>N</i>	26	17	27	17
<i>Min</i>	8,00	11,00	4,00	6,00
<i>Max</i>	41,00	22,00	84,00	25,00
<i>Med</i>	15,00	18,50	37,00	21,00
<i>SE</i>	2,43	0,99	3,92	1,72
<i>x</i>	20,43	17,50	34,17	17,76
<i>SD</i>	11,63	3,97	18,78	7,09

Ако се анализирају вредности  $CD14^+ B7H4^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације и код пацијената без и код пацијената са метастазама (Табела 47).

График 18. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Табела 46. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+ B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>M0 / M1</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>

Табела 47. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>M0</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0028$
<i>M1</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0025$

**Вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза**

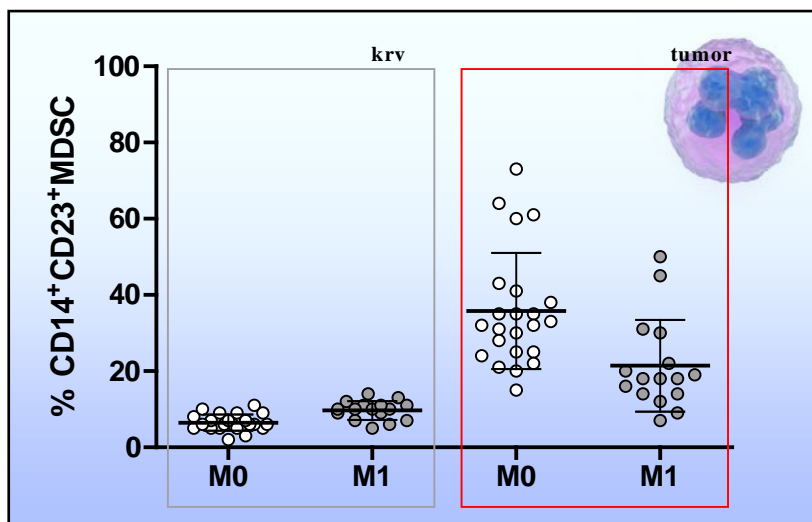
У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера су детектоване код пацијената са метастазама (M1) у односу на пацијенате без метастаза (Табела 48, График 19). У узорцима крви из микроциркулације тумора ситуација је супротна, тако да су веће вредности овог маркера детектоване код пацијената без метастаза у односу на оне са метастазама.

Ако се упореде вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од  $M$  стадијума тумора, нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у  $M1$  стадијуму у односу на  $M0$  стадијум (*Mann Whitney test*) (Табела 49). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера у групи без метастаза у односу на групу са метастазама.

Табела 48. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD14^+CD23^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	M0	M1	M0	M1
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	2,00	5,00	15,00	7,00
<i>Max</i>	11,00	14,00	73,00	50,00
<i>Med</i>	6,00	10,00	32,00	18,00
<i>SE</i>	0,44	0,62	3,18	3,01
<i>x</i>	6,48	9,69	35,78	21,44
<i>SD</i>	2,13	2,47	15,23	12,03

График 19. Просечне вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Ако се анализирају вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC маркера код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације и код пацијената без и код пацијената са метастазама (Табела 50).

Табела 49. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
$M0 / M1$	$p = 0,0004$	$p = 0,0008$

Табела 50. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  према постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>M0</i>	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
<i>M1</i>	$p = 0,0002$	$p = 0,0005$

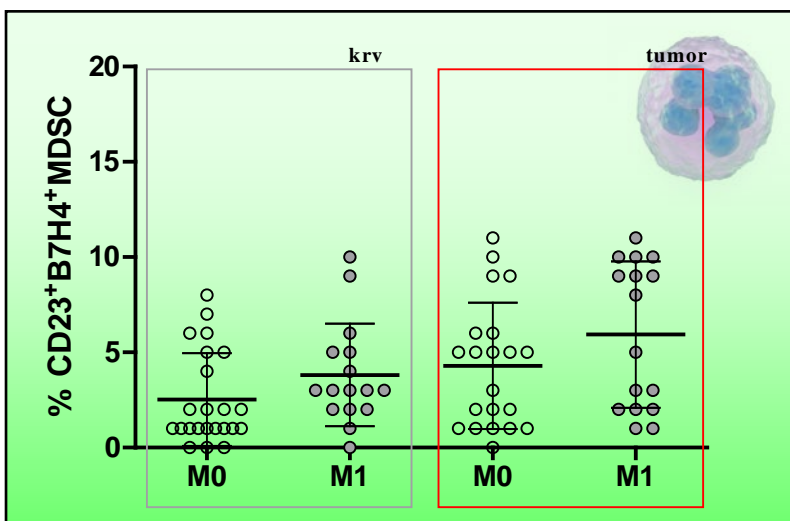
**Вредности  $CD23^+B7H4^+ MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза**

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера су детектоване код пацијената са метастазама (*M1*) у односу на пацијенате без метастаза (Табела 51, График 20). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође су веће вредности овог маркера детектоване код пацијената са метастазама у односу на оне без метастаза.

Табела 51. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза

$CD23^+B7H4^+ MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M0</i>	<i>M1</i>
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	8,00	10,00	11,00	11,00
<i>Med</i>	1,00	3,00	5,00	6,50
<i>SE</i>	0,51	0,67	0,72	0,96
<i>x</i>	2,52	3,81	4,29	5,94
<i>SD</i>	2,43	2,69	3,32	3,84

График 20. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према постојању метастаза



Табела 52. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника са и без метастаза у системској и у микроциркулацији тумора

$CD23^+ B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
<i>M0 / M1</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>

Табела 53. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према нодалном статусу постојању метастаза између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
<i>M0</i>	<i>ns</i>	$p = 0,0014$
<i>M1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Ако се упореде вредности  $CD23^+ B7H4^+$  MDSC маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од *M* стадијума тумора, није нађена статистички значајна разлика између вредности овог маркера у *M1* и у *M0* стадијуму (*Mann Whitney test*) (Табела 52). У узорцима крви из



микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика између вредности овог маркера у групи без и са метастазама.

Ако се анализирају вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим  $M$  стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације код пацијената без метастаза, док таква разлика није показана код пацијената са метастазама (Табела 53).

#### 4.6. Клинички стадијум и $MDSC$

##### Вредности $CD14^+MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  маркера одређене су у узорцима крви из системске и туморске микроциркулације циркулације пацијената са тумором плућа, а затим су анализиране у односу клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности овог маркера су детектоване код пацијената у III стадијуму у односу на IV стадијум болести (Табела 54, График 21). У узорцима крви из микроциркулације тумора вредности су такође биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Ако се упореде вредности  $CD14^+MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 55). У узорцима крви из микроциркулације

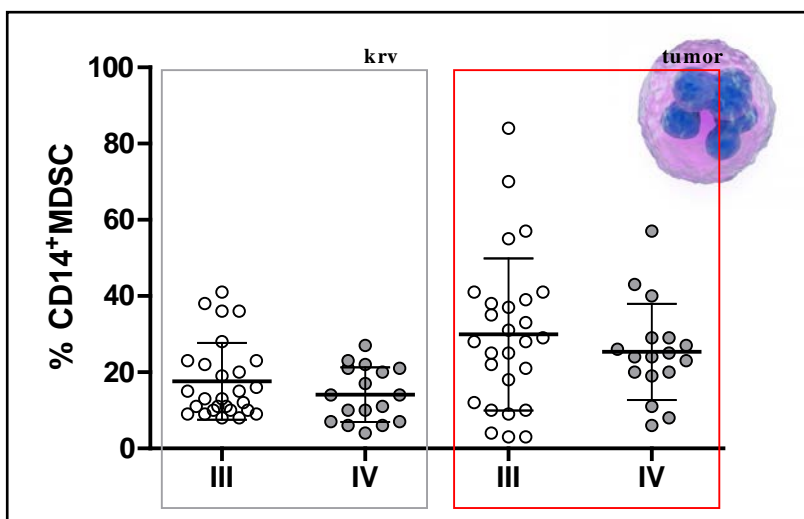
тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између група пацијената у III и IV стадијуму болести.

Табела 54. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
Клинички стадијум				
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	8,00	4,00	3,00	6,00
<i>Max</i>	41,00	27,00	84,00	57,00
<i>Med</i>	13,00	14,00	28,00	24,00
<i>SE</i>	1,94	1,74	3,85	3,06
<i>x</i>	17,63	14,12	29,93	25,35
<i>SD</i>	10,07	7,18	19,99	12,61

Ако се анализирају вредности  $CD14^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 56).

График 21. Просечне вредности  $CD14^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Табела 55. Упоредна анализа вредности  $CD14^+MDSC$  између група болесника различитог клиничког стадијума у системској и у микроциркулацији тумора плућа

$CD14^+MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Табела 56. Упоредна анализа вредности  $CD14^+MDSC$  према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

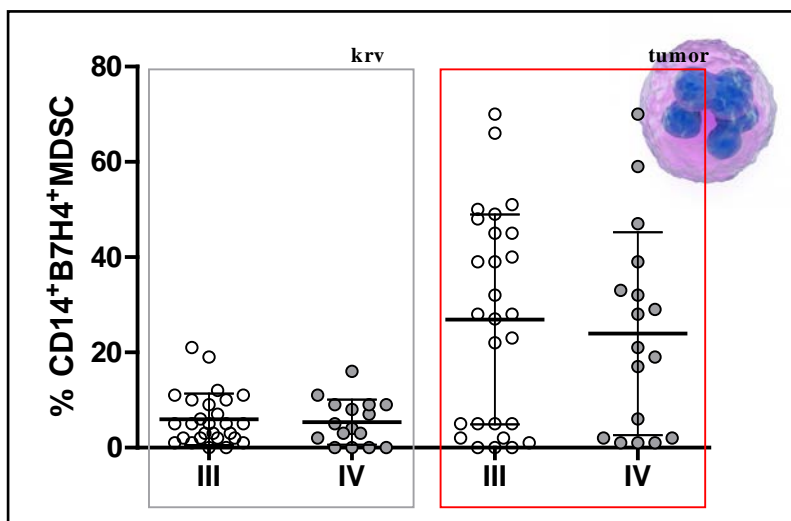
Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0177$	$p = 0,0142$
IV	$p = 0,0036$	$p = 0,0129$

**Вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму**

Табела 57. Просечне вредности  $CD14+B7H4^+MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+B7H4^+MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	26	17	27	17
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	21,00	16,00	70,00	70,00
<i>Med</i>	5,00	4,50	28,00	21,00
<i>SE</i>	1,04	1,18	4,24	5,16
<i>x</i>	5,96	5,38	26,93	23,94
<i>SD</i>	5,42	4,72	22,03	21,28

График 22. Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Просечне вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC маркера одређене су у узорцима крви из системске и туморске микроциркулације циркулације пацијената са тумором плућа, а затим су анализирани у односу клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности овог маркера су детектоване код пацијената у III стадијуму у односу на IV стадијум болести (Табела 57, График 22). У узорцима крви из микроциркулације тумора вредности су такође биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Табела 58. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+ B7H4^+ MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>Ns</i>

Табела 59. Упоредна анализа вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0027$	$p < 0,0001$
IV	$p = 0,0122$	$p = 0,0007$

Ако се упореде вредности  $CD14^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 58). У узорцима крви из микроциркулације тумора такође није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између група пацијената у III и IV стадијуму болести.

Ако се анализирају вредности  $CD14^+B7H4^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 59).

#### Вредности $CD14^+ CD23^+ MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

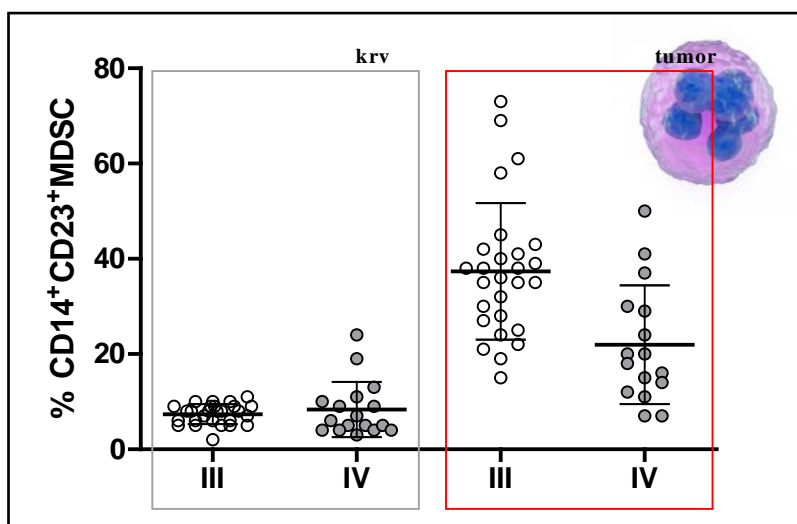
Просечне вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера одређене су у узорцима крви из системске и туморске микроциркулације циркулације пацијената са тумором плућа, а затим су анализирани у односу клинички стадијум. У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности овог маркера су детектоване код пацијената у IV стадијуму у односу на III стадијум болести (Табела

60, График 23), док су у узорцима крви из микроциркулације тумора вредности биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Табела 60. Просечне вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD14^+ CD23^+ MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	2,00	3,00	15,00	7,00
<i>Max</i>	11,00	24,00	73,00	50,00
<i>Med</i>	8,00	6,00	36,00	19,00
<i>SE</i>	0,40	1,40	2,76	3,12
<i>x</i>	7,37	8,35	37,37	21,94
<i>SD</i>	2,10	5,79	14,36	12,47

График 23. Просечне вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Ако се упореде вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера

између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 61). У узорцима крви из микроциркулације тумора нађена је статистички значајно већа вредност овог маркера групи пацијената у III у односу на IV стадијум болести.

Ако се анализирају вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  маркера код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 62).

Табела 61. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  између група болесника различитог клиничког стадијума у системској и у микроциркулацији тумора

$CD14^+CD23^+MDSC$	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	$p = 0,0009$

Табела 62. Упоредна анализа вредности  $CD14^+CD23^+MDSC$  према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
IV	$p = 0,0001$	$p = 0,0005$

#### Вредности $CD23^+B7H4^+MDSC$ у узорцима крви и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

У узорцима крви из системске циркулације оболелих од тумора плућа веће вредности  $CD23^+B7H4^+MDSC$  маркера су детектоване код пацијената у IV стадијуму у односу на III стадијум болести (Табела 63, График 24), док су у

узорцима крви из микроциркулације тумора вредности биле веће код пацијената у III стадијуму болести.

Ако се упореде вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  маркера у узорцима крви из системске циркулације пацијената са тумором плућа у зависности од клиничког стадијума, онда није нађена статистички значајна разлика вредности овог маркера између III и IV стадијума (*Mann Whitney test*) (Табела 64), а слично је и у узорцима крви из микроциркулације тумора.

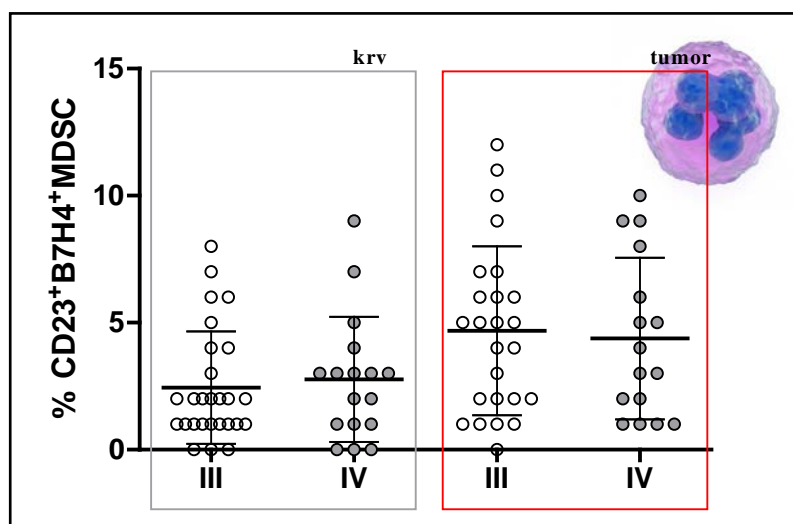
Ако се анализирају вредности  $CD14^+ CD23^+ MDSC$  маркера код пацијената са различитим клиничким стадијумом тумора плућа у односу на врсту узорка крви, нађена је статистички значајно виша вредност овог маркера у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорке из системске циркулације у оба клиничка стадијума (III и IV стадијум) (Табела 65).

Табела 63. Просечне вредности  $CD23^+ B7H4^+ MDSC$  (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму

$CD23^+ B7H4^+ MDSC$	Крв		Микроциркулација тумора	
	III	IV	III	IV
<i>N</i>	27	16	27	16
<i>Min</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Max</i>	8,00	9,00	12,00	10,00
<i>Med</i>	2,00	3,00	5,00	3,50
<i>SE</i>	0,42	0,60	0,67	0,80
<i>x</i>	2,44	2,77	4,68	4,38
<i>SD</i>	2,21	2,46	3,33	3,18



График 24. Просечне вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC (%) у узорцима системске и узорцима микроциркулације тумора према клиничком стадијуму



Табела 64. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC између група болесника различитог клиничког стадијума у системској и у микроциркулацији тумора

$CD23^+ B7H4^+$ MDSC	Крв	Микроциркулација тумора
III / IV	<i>ns</i>	<i>Ns</i>

Табела 65. Упоредна анализа вредности  $CD23^+B7H4^+$  MDSC према клиничком стадијуму између узорака системске циркулације и узорака микроциркулације тумора

Крв/Микроциркулација тумора	<i>Mann Whitney test</i>	<i>Wilcoxon test</i>
III	$p = 0,0104$	$p = 0,0004$
IV	<i>ns</i>	$p = 0,0438$

## 5. ДИСКУСИЈА

У овој студији показано је постојање значајно веће учесталости  $CD14^+ MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија код пацијената са карциномом плућа у поређењу са здравим контролама.

*Chen* и сар. показали су да је инциденца  $CD14^+$  и  $HLA-DR^low$  ћелија у периферној крви пацијената са плућним сквамозелуларним карциномом значајно повећана у односу на здраву контролну групу, те да вредности  $MDSC$  директно корелирају са  $TNM$  стадијумом (159). Повећан број  $MDSC$  такође је био повезан са значајним смањењем броја  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T$  лимфоцита у узорцима крви пацијената, као и поремећајем секреције цитокина у културама  $T$  лимфоцита, што указује на имуносупресивни утицај ових  $MDSC$  (159, 160, 161).

Резултати наших испитивања показали су да се вредности испитиваних популација  $MDSC$  ћелија повећавају у болесника са порастом величине тумора ( $T$  стадијума). Повећање је било присутно и у узорцима крви и у узорцима микроциркулације тумора плућа. Са порастом  $T$  стадијума расла је и учесталост  $CD14^+MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорак из крви истих пацијената.

*Huang* и сар. су показали да су циркулишући  $CD14^+HLA-DR^{low} MDSC$  модулатори антитуморског одговора и да су повезани са метастазирањем тумора и изостанком одговора на терапију код пацијената са  $NSCLC$  (162). Они су анализирали 89 пацијената са узнапредовалим  $NSCLC$ . Вредности  $HLA-DR^{low} CD14^+ MDSC$  (исказане као проценат укупних  $CD14^+$ ) ћелија биле су значајно веће у пацијената са  $NSCLC$  у односу на здраве контроле. Вредности су такође биле пропорционалне клиничком стадијуму болести. Моноцитни  $MDSC$  такође су значајно негативно корелирали са медијаном преживљавања и временом без прогресије болести. Функција  $CD14^+ HLA-DR^{low}$  ћелија у инхибицији  $T$  ћелијске функције пацијената са  $NSCLC$  повезана је са усходном регулацијом експресијом  $gp91phox$ , важном компонентом  $ROS$  генеришућег ензима  $NADPH$  оксидазе. *Tian* и сар. утврдили су да је код пацијената са ситноћелијским карциномом плућа учесталост  $CD14^+HLA-DR^{low} MDSC$  ћелија у негативној корелацији са клиничким исходом (119).

*Feng* и сар. описују карактеристике  $CD11b^+CD14^+S100A9^+M-MDSC$  у периферној крви и њихов клинички значај за пацијенте са узнапредовалим  $NSCLC$ .

Високе вредности  $CD11b^+CD14^+SI00A9^+$  *M-MDSC* удружене су са слабом терапијским одговором на цисплатину и скраћеним интервалом до прогресије болести (PFS) (114).

У студији *Zhang*-а и сар. идентификована је нова субпопулација *MDSC* ћелија у туморској микроколини код пацијената са *NSCLC*,  $B7H3^+CD14^+HLA-DR^{-/low}$  *MDSC* ( $B7H3^+$  *MDSC*). Њихови резултати сугеришу да повећан број ове нове *MDSC* субпопулације корелира са лошијим TNM стадијумом и метастазирањем и може бити предиктор скраћеног времена до појаве релапса код пацијената са *NSCLC*. Друге студије указују да  $B7H3^+$  *MDSC* ћелије узрокују прогресију карцинома кроз лучење IL-10, који индикује регрутацију и /или активност Treg ћелија у туморској микроколини (49).

Експресија имуносупресивног молекула *B7-H4* је раније идентификована у узорцима туморског ткива пацијенткиња са гинеколошким малигнитетима јајника и материце, као и код пацијената са колоректалним карциномом и карциномом панкреаса (134,163). Показано је да је у физиолошком стању, *B7-H4* одсутан са површине нормалних ћелија (146). Поред малигнућих ћелија, *B7-H4* се екстензивно ствара и на површини макрофага који инфилтришу тумор, а до две трећине туморских асцитних  $CD14^+$  макрофага су такође  $B7-H4^+$  (165, 166).

*Iłona Kreyczek* и сар. показали су значај  $B7-H4^+$  макрофага у хуманим оваријалним карциномима (167,168). Испитивали су  $CD14^+$  моноците, *B7-H4* и  $B7-H4^+$  макрофаге као и регулаторне Т лимфоците у узорцима нативног туморског ткива, асцита и крви 103 пацијенткиње са оваријалним карциномом. Иако туморске ћелије експримирају *B7-H4* и интрацелуларно, само тумор инфилтришући макрофаги показују и мембранску експресију *B7-H4*. Експресија  $B7-H4^+$  је индуцибилна јер је могуће трансформисати моноците из периферне крви туморским асцитом или дејством *IL-6* и *IL-10*. Интересантно је да *IL-4* и *GM-CSF* негативно регулишу *ex vivo* и *in vitro*  $B7-H4^+$  експресију на макрофагима. Аутори су иницијално закључили да промена профила локалне секреције, високих вредности *IL-6* и *IL-10*, и ниских вредности *IL-4* и *GM-CSF* резултира трансформацијом тумор асоцираних макрофага према  $B7-H4^+$  ћелијама. Још значајније, *Kreyczek* и сар. даље демонстрирају да  $B7-H4^+$  макрофаги супримирају *in vitro* активност Т лимфоцита специфичних за *HER2/Neu* антиген на начин који је независан од *B7-H1* механизма, аргиназе или активности *iNOS*. Будући да се детектује велики број  $B7-H4^+$  макрофага у туморском асциту, који у великој мери превазилази број регулаторних Т лимфоцита (30% vs.

5%), аутори су закључили да ове ћелије представљају главну имуносупресивну силу која резултује промоцијом туморског раста.

*Matsunaga* и сар. испитивали су везу између  $CD14^+B7-H1^+$  или  $CD14^+B7-H4^+$  ћелија у крви или у тумору са клиничким и туморским карактеристикама код пацијената са карциномом желуца (169). Најпре, су показали да је ниво  $B7-H1^+$  или  $B7-H4^+$  експресије значајно расте на моноцитима пацијената са карциномом желуца у односу на здраве контроле. Даље, утврдили су да моноцити изоловани из тумора експримирају значајно више  $B7-H1^+$  или  $B7-H4^+$  у поређењу са моноцитима из крви истих пацијената. Насупрот овим подацима, у нашој студији експресија  $B7-H4^+$  директно следи ниво *HLA-DR* експресије на  $CD14^+$  ћелијама. Разлике настају услед различитих стратегија селекције популација ћелија будући да је наш циљ био да испитамо *MDSC*, које су *HLA-DR<sup>low</sup>* по дефиницији. У сваком случају, аутори су показали значајан имуносупресиван капацитет  $CD14^+ B7-H4^+$  ћелија *in vitro* (редукцијом секреције *IFN- $\gamma$*  од стране *T Ly*), као и да хируршка ресекција тумора резултира смањењем испољавања  $B7-H4^+$  на циркулишућим  $CD14^+$  ћелијама. Аутори су демонстрирали значајне разлике у различитим узорцима (крв/тумор) по броју  $CD14^+B7-H1^+$  или  $CD14^+B7-H4^+$  у односу на хистолошки тип карцинома желуца, дубину инвазије, величину тумора, број позитивних лимфних чворова, клинички стадијум и ниво лимфоваскуларне инвазије. Њихови резултати су у сагласности са подацима из наше студије и указују да је величина тумора и степен раширености болести директно повезан са бројем супресивних  $CD14^+B7-H4^+$ . Интересантно је да су и њихови пацијенти у раним клиничким фазама болести такође демонстрирали безначајно више вредности броја  $CD14^+B7-H4^+$  у поређењу са каснијим стадијумима болести.

Подаци о улози *MDSC-a* код пацијената са карциномом плућа су још увек недовољни, посебно о  $B7-H4^+ MDSC$ .

*Tan* и *Shen* су радили студију о прогностичком значају вредности  $B7-H4$  код пацијената са *NSCLC* као мета-анализу и уочили значајну повезаност прекомерне експресије  $B7-H4$  са величином тумора, бројем позитивних лимфних чворова и присуством метастаза, али без значајног утицаја на туморску хистологију и друге, епидемиолошке факторе (170). Закључак ове студије је да је експресија  $B7-H4$  негативни прогностички фактор за *NSCLC* пацијенте. Нажалост, њихова студија је садржи и једну велику непрецизност, јер су у критеријуме за избор (критеријум бр. 2) укључили пацијенте са експресијом  $B7-H4$  откривене било којом методом, што

имплицира да не разликују експресију на малигном ткиву или леукоцитном инфилтрату.

Chen и сар. су испитивали учесталост  $CD14^+HLA-DR^{-low}$  *MDSC* у узорцима крви 80 пацијената са сквамозним типом карцинома плућа (*NSC-LC*) (159) у односу на здраве контролне особе. Резултати студије показали су да се број *MDSC* постепено повећава код ових пацијената, те да број директно корелира са повећањем вредности *TNM* стадијума. Аутори су закључили да је значајно смањење броја  $CD4^+$  *T* и  $CD8^+$  *T* у узорцима крви ових болесника, као и измењена продукција цитокина *T* лимфоцита *in vitro* последица утицаја *MDSC*.

Експресија имуносупресивних молекула из ове породице показана је и на антиген презентујућим ћелијама. Дендритичне ћелије (*DC*) изоловане из ресектата тумора *NSCLC* пацијената експримирају друге имуносупресивне молекуле, такође из *B7* фамилије, као што је *B7-H3* (171). Ове дендритичне ћелије показују значајно ослабљену костимулаторну активност према аутологим *T* лимфоцитима, продуктују значајно више *IL-10* и мање *IL-12* него контроле.

*Ex vivo* студије показале су да циркулишуће туморске ћелијске линије пацијената са *SCLC* индукују трансформацију моноцита периферне крви у правцу диференцијације у  $CD14^+CD163^{low}CD68^+B7-H4^+$  тумор асоциране макрофаге (172).

*Feng* и сар. указују на значај *MDSC* код пацијената са плућним аденокарциномом (*Ad NSC-LC*) позитивним на *EGFR* мутације (173). Такође, указују и да је број  $S100A^+CD68^+$  *MDSC* био повећан у крви пацијената у поређењу са здравим контролама. Пацијенти са лошим одговором на терапију као и они са кратким интервалом до прогресије болести имали су повећан број *MDSC* у поређењу са другима. Такође, као и у нашој студији, број *MDSC* је био много виши у туморским узорцима у поређењу са одговарајућим узорцима крви.

Субпопулације *MDSC* у крви *NSCLC* пацијената биле су повећане у поређењу са здравим контролама, али такође су показале повећање броја у подгрупи пацијената са *COPD*, хроничном опструктивном болешћу плућа (енг. *chronic obstructive pulmonary disease*) као секундарним контролама (174). Иста студија је показала да су *MDSC* биле много фреквентније у ткиву ресектованог тумора него у узорцима крви пацијената са *NSCLC*. Подаци из ове студије указују и на разлике између карцинома плућа различитих хистолошких типова. Пацијенти са сквамозним типом карцинома плућа показивали су повећан број гранулоцитима налик *MDSC* ћелија у поређењу са пацијентима са аденокарциномом плућа, али без разлика у

моноцитима налик *MDSC* ћелија. Ово је у сагласности са нашим резултатима будући да смо показали да нема значајне разлике у фреквенцији *CD14<sup>+</sup> MDSC* ћелија између група *NSCLC* пацијената, изузев за пацијенте са ситноћелијским карциномом плућа у односу на остале хистолошке типове. Са друге стране, *Yamauchi* и сар. су показали да група пацијената са аденокарцином плућа има значајно већи број *CD14<sup>+</sup>B7-H1<sup>+</sup> MDSC* и *CD15<sup>+</sup>B7-H1<sup>+</sup> MDSC* ћелија у поређењу са пацијентима са сквамозним карциномом (175).

У предходној студији утврдили смо да се одређени хистолошки типови карцинома плућа карактеришу јединственим профилем цитокина и у узорцима крви и у узорцима туморске микроциркулације (176). Сви наши пацијенти са тумором плућа имали су смањене серумске концентрације *TGF-β1* у поређењу са здравим контролним узорцима. Највеће концентрације *TGF-β1* у туморској микроциркулацији су детектоване код пацијената са сквамозним тумором, који је био значајно повишен у поређењу са осталим групама. Вредности серумског *TGF-β1* корелирале су са величином тумора, а биле су највише у пацијената у Т4 групе, што су и други аутори документовали (177,178). Изненађујуће, пацијенти у подмаклим стадијумима болести, IV клиничком стадијуму или са присутним метастазама (M1), имали су ниже вредности *TGF-β1* (у поређењу са стадијумом III или M0) и у серуму и у туморској микроциркулацији. Претпоставља се да су интеракције имunosупресивних ћелија и ослобађање медијатора много важније у раним стадијумима болести када је неопходно креирање есенцијалних услова за ширење болести.

Анализа цитокина и у серуму и у туморској микроколини узорака болесника са карциномом плућа показала је да у туморској микроциркулацији постоји значајно повећање вредности *IL-10* и *TGF-β1* у односу на серумске вредности истих болесника, као и да постоји значајна корелација између вредности *IL-10* и *TGF-β1* у туморима ових болесника.

Jarnicki и сар. (179) указују на инфилтрацију тумора *CD4<sup>+</sup> T* регулаторним ћелијама. Они су показали да значајна продукција *IL-10* и *TGF-β1* изазвана карциномским ћелијама индукује инфилтрацију растућег тумора *CD4<sup>+</sup>* и *CD8<sup>+</sup> Treg* ћелијама. Такође, деплеција *CD8<sup>+</sup> T* регулаторних ћелија редукује туморску масу, смањујући њихову способност да инхибирају антитуморски одговор. Наведени

citoкени, *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1*, такође су важни у активацији, потенцирању имуносупресорских дејстава и пропагацији *MDSC* ћелија.

Подаци из бројних експерименталних и клиничких студија говоре да је цитокинска мрежа важан фактор који обликује противтуморски одговор. Иако је имунски одговор на тумор веома комплексан и динамичан, који зависи од индивидуалних туморских карактеристика, стадијума болести, карактеристика имунског одговора, преобладајући став је да је *Th1* одговор везан за протективни противтуморски одговор, док *Th2* карактерише про-туморску микрооколину. Такође, аутори бројних студија тврде да постоји доминација *Th2* над *Th1* профилем у узорцима пацијената са карциномом плућа, те да је овакав дисбаланс повезан са имуносупресивним својствима тумора и напредовањем болести.

У биопсијама тумора плућа и плеуралним ефузијама пацијената са *NSCLC* показано је присуство високих концентрација *IL-6*, *IL-10*, *GM-CSF* и *IFN- $\gamma$*  као и ниског нивоа информационе *RNK* за *IL-2* (180), доминација *IL-4 / IL-10* над *IL-2 / IL-12 / IFN- $\gamma$*  у (181,182,183). Такође, показано је постојање доминације *Th2* популације у периферној крви (184) и депресија цитотоксичности паралелно са смањеном *IFN- $\gamma$*  продукцијом у *NK / NKT* ћелијама (185). Показано је да у пацијената са *NSCLC* успешна терапија редукује вредности *Th2* и повећава вредности *Th1* (25,26).

Прве назнаке о биолошком значају доминације *Th2* профила у физиологији карцинома плућа дали су *Zhang* и сар. (186). У узорцима туморског ткива *NSCLC* пацијената, али не и у узорцима бенигнух лезија, они су показали интезивну инфилтрацију макрофагама, при чему је 75% макрофага одговарало *M2* типу, тзв алтернативно активираним, неklasичним макрофагама, који су функционално најближи *MDSC* ћелијама. Даље, присуство великог броја оваквих макрофага било је значајно удружено са високим концентрацијама *IL-4 / IL-10* и ниским *IFN- $\gamma$  / IL-12*, односно доминацијом *Th2 / Th1*.

Две студије *Ito*-а и сар. демонстрирале су комплексност и динамичност промена *Th1/Th2* профила у односу на различиту микрооколину тумора и прогресију болести (187,188). Пре двадесет година, они су показали да су тумор инфилтришући лимфоцити пацијената са *NSCLC* доминантно *Th1* типа, док Т лимфоцити у периферној крви истих пацијената одговарају *Th2* популацији (187). Они су проширили своје истраживање и на цитотоксичну популацију Т лимфоцита (*Tc*) и након 5 година праћења показали су преминацију *Th2/Th1* удружену са *Tc2/Tc1*

(188). Изненађујуће, ови високи *Th2/Th1* и *Tc2/Tc1* односи пронађени у периферној крви били су значајно удружени са бољом прогнозом код *NSCLC* пацијената са одмаклом болешћу (клинички стадијум II и III), али не и код 11 пацијената у раном стадијуму болести (стадијум I). Ове студије су показале да постоји значајна разлика профила цитокинског одговора између различитих тумора плућа у периферној крви као и да постоји важна промена која следи или рефлектује прогресију болести.

*Feng* и сар. показали су значајну улогу *CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>SI00A<sup>+</sup>* супресивних моноцита, изолованих из узорака периферне крви пацијената са *NSCLC* (43). Пацијенти са унапредовалим обликом болести и неуспешним терапијским одговором имали су значајно више ових ћелија у односу на здраве контролне особе. Ова популација моноцита испољавала је супресивне активности *in vitro*, потентно инхибирајући *CD8<sup>+</sup>* Т ћелијску активацију, инхибирајући продукцију *IFN-γ* и секретујући велике количине *iNOS*, аргиназе, *IL-8*, *IL-10*, *TNF-γ*, *HGF* и *IL-13*. Аутори су закључили да *CD14<sup>+</sup>SI00A<sup>+</sup>* инфламаторни моноцити код пацијената са *NSCLC* представљају посебну субпопулацију *MDSC*, способну да супримира Т лимфоците продукцијом *iNOS*, и *IL-13/IL-4Rα*. *TAM* и *MDSC*, или супресивни Мо нису једини извор *IL-13* у туморима плућа, будући да је историјска студија *Huang*-а и сар. показала да су ћелије карцинома плућа потентни извор *IL-13* (189). Значај *IL-13* у регулацији туморске инвазије и ширења је већ описан код оваријалних (190) и карцинома панкреаса (191).

Насупрот другим студијама којима су били обухваћени искључиво *NSCLC* пацијенти, наша студија је обухватала обе групе пацијената, и са *NSCLC* и са *SCLC*. Анализа свих пацијената, без стратификације по било којем параметру, показала је да нема значајних разлика у концентрацијама испитиваних цитокина. Наши подаци говоре пак о значајној разлици у односу *Th1/Th2* цитокина између системског и локалног имунског одговора (тумор/периферна крв). Такође, показали смо да су пацијенти са ситноћелијским хистолошким типом тумора, без метастаза и са најмањим тумором имали највишу локалну продукцију *IL-12 / IL-2*, *IFN-γ* (192). Стратификација према хистолошким групама тумора, обиму болести и величини тумора открила је значајне разлике. Код пацијената са различитим хистолошким типовима карцинома плућа утврдили смо значајне разлике како у серумским тако и у узорцима микроциркулације тумора. Присуство метастаза било је повезано са повећањем *IFN-γ / IL-4* у крви и повећањем концентрације *IL-13* у узорцима



микроциркулације тумора. Узорци микроциркулације код највећих тумора значајно су повезани са повећањем концентрације *Th2* цитокина у односу на мање туморе. Вредности  $CD14^+ B7H4^+$  Мо у узорцима крви значајно су биле повезане са повећањем концентрације *IL-2 / IL-13*. Пацијенти са највећим бројем  $CD14^+ B7H4^+$  Мо у узорцима микроциркулације тумора показали су значајан пораст *IL-4, IL-13, IL-10* и *TGF- $\beta$ 1*. Највеће вредности броја  $CD14^+ B7H4^+$  моноцита значајно су биле повезане са *Th2* цитокинским профилем. Закључак ове студије био је да пацијенти са карциномом плућа показују поларизацију цитокинског одговора повезану са врстом микрооколине, хистолошким типом тумора, величином тумора и проширеношћу болести.

У студији Карличич и сар. показали смо да је концентрација *IL-27* значајно повећана у туморској микрооколини испитиваних пацијената са туморима плућа у поређењу са серумским узорцима (193). Иако су вредности мање у односу на здраве контроле, пацијенти у раним клиничким стадијумима, са мањим туморима и без метастаза, имају значајно мање *IL-27* у оба случаја у односу на пацијенте са великим туморима и раширеном болешћу. Хистолошки тип тумора је значајан не само због различитих биолошких карактеристика, већ и због значајних разлика у продукцији *IL-27*. Значајна удруженост високих концентрација *IL-27* са малим туморима, ранијим клиничким стадијумом и одсуством метастаза указује да *IL-27* има противтуморску функцију код пацијената са карциномом плућа.

У студији са лимитираним бројем *NSCLC* пацијената, *Pogoda* и сар. показали су да  $CD14^+ HLA-DR^{low}$  *MDSC* нису једина популација која учествује у туморски изазваној имуносупресији (194). Поред *MDSC* популације  $CD14^+ HLA-DR^+$  моноцитна популација је значајан извор *IL-10* у узорцима лимфних нодуса, и *IL-1 $\beta$*  и *TNF- $\alpha$*  у периферној крви, лимфним чворовима и туморском ткиву.

*Heuvers* и сар су испитивали фреквенцу *MDSC* у узорцима крви 185 *NSCLC* пацијената и показали повећање њиховог броја, специјално популације налик гранулоцитима код пацијената са карциномом плућа у односу на здраве контроле (116). Они су такође показали да је супресивни капацитет *MDSC* значајно удружен са активношћу аргиназе -1.

Већина објављених радова рефлектује истраживања у популацији *NSCLC* пацијената. У студији која је обухватала 42 *SCLC* пацијента, *Tian* и сар. су показали да су апсолутни број и учесталост крвних  $CD14^+ HLA-DR^{low}$  *MDSC* значајно повећани код ових пацијената у односу на контроле и да учесталост *MDSC* корелира

са туморским стадијумом, нивоом серумског *LDH* и краћим укупним преживљавањем (119). *SCLC* пацијенти из наше студије показали су највеће средње вредности броја  $CD14^+HLA-DR^{low} MDSC$ , али у узорцима из туморске микроциркулације.

*B7H4* има изражен инхибиторни ефекат на развој и функцију Т ћелија (195). Студије такође сугеришу да је *B7H4* прогностички показатељ краћег преживљавања и различитих клиничких патолошких особина код различитих врста карцинома (73, 196,197).

*B7H4 iRNK* је широко присутна у периферним ткивима човека, укључујући плућа, тестисе, панкреас, простату, плаценту, матерницу, кожу, мишиће, желудац, бубреге, јетру, срце, мозак и јајнике (198, 195,127). Присуство *B7H4* такође је уочено код колоректалног карцинома, карцинома простате и плућа и фибросаркома (128,129). Многобројне студије су показале присуство *B7H4 iRNK* у 23 ћелијске линија меланома (129), 5 линија карцинома желуца (130) и 6 линија *NSCLC* (131). Такође, солубилни *B7H4* је идентификован у узорцима крви пацијената са карциномом јајника, дебелог црева, бубрега, дојке, плућа и карцинома простате (131,132,133,134,135,136). Ова испитивања показују да серумски *B7H4* може бити користан маркер за дијагнозу и прогнозу болести.

Присуство *B7H4* у хуманим туморима је највероватније последица неадекватне пост-транскрипционе регулације у туморима, пошто је присуство нормалних протеина ретко на ћелијској површини у нормалним људским ткивима (199). Пошто је *B7H4* значајно експримиран у бројним хуманим карциномима, може се претпоставити да је експресија *B7H4* механизам редукције антитуморске имуности, нарочито Т-ћелијског одговора (128). *B7H4* инхибира функцију Т ћелија (198, 195, 127, 128), па према томе, блокирање раста тумора повезаног са *B7H4* може пружити нову терапијску опцију за побољшање антитуморског имунитета.

*Wang* и сарадници су у студији из 2016. године, предложили различите механизме који објашњавају инхибиторну улогу *B7H4* у имунологији карцинома: инхибиција пролиферације Т-ћелија, индукција апоптозе Т-ћелија, заустављање Т-ћелија у ћелијском циклусу, сузбијање секреције цитокина и цитотоксичност Т-ћелија, промоција пролиферације и развоја *Treg* и инхибиције функције антиген презентујућих ћелија (200).

У метаанализи (170), која је обухватала 1444 пацијента код којих је експресија *B7H4* одређена разним методама, показано је да је повишена експресија *B7H4*

значајно повезана са присуством метастаза у лимфним чворовима, вишим *TNM* стадијумом болести, лошом диференцијацијом и краћим преживљавањем код пацијената са *NSCLC*. Аутори су закључили да је висока *B7H4* експресија неповољан прогностички фактор код *NSCLC*. *MDSC* ћелије су важне у прогресији тумора и избегавању имунског одговора. Оне су врло атрактивна терапијска мета, посебно зато што су присутне у периферној крви пацијената. Боље разумевање улоге *MDSC* у прогресији тумора било би важно за повећање ефикасности терапија заснованих на модулацији имунског одговора.

Пре више од 10 година показан је значај *B7H4*<sup>+</sup> макрофага у карциному јажника код људи (167, 168). Аутори су испитивали *CD14*<sup>+</sup> моноците, *B7H4*<sup>+</sup> и *B7H4*<sup>+</sup> макрофаге, као и регулаторне Т лимфоците изоловане из свежих узорка тумора, асцитеса изазваног тумором и узорака крви пацијента са карциномом јажника. Иако су туморске ћелије такође експримирале унутарћелијску *B7H4*, само тумор инфилтришући макрофаги показали су површинску *B7H4*<sup>+</sup> експресију. Аутори су у почетку закључили да промена концентрације локалних фактора, са високом *IL-6* и *IL-10* и ниским *IL-4* и *GM-CSF* доводи до трансформације макрофага у туморима према *B7H4*<sup>+</sup> ћелијама. Узимајући у обзир велики број *B7H4*<sup>+</sup> макрофага повезаних са тумором откривених у асцитесу, који је у великој мери премашио регулаторне Т лимфоците (30% насупрот 5%), аутори су закључили да ове ћелије могу бити главна имуносупресивна сила, што резултира експанзијом тумора.

Група аутора је показала да се ниво експресије *B7H1*<sup>+</sup> или *B7H4*<sup>+</sup> значајно повећава на моноцитима пацијената са карциномом желуца, у поређењу са здравим контролама (169). Открили су и да моноцити изоловани из тумора изражавају значајно више *B7H1*<sup>+</sup> или *B7H4*<sup>+</sup> у поређењу са моноцитима из крви истог пацијента, и да је експресија ових супресивних молекула директно повезана. Ови аутори су показали значајан имуносупресивни капацитет *CD14*<sup>+</sup> *B7H4*<sup>+</sup> ћелија *in vitro* (смањење секреције *IFN-g* Т лимфоцита), а такође су показали да је хируршко уклањање тумора резултирало смањењем *B7H4*<sup>+</sup> у циркулишућим *CD14*<sup>+</sup> ћелијама. Они су такође показали разлике између крви и тумора у *CD14*<sup>+</sup> *B7H1*<sup>+</sup> или *CD14*<sup>+</sup> *B7H4*<sup>+</sup> ћелијама према хистопатолошком типу карцинома желуца, дубини инвазије, величини тумора, захваћености лимфних чвора, клиничком стадијуму болести и нивоу лимфоваскуларне инвазије. Њихови подаци подударају се са подацима наше студије, који указују да су величина тумора и степен ширења болести директно повезани са бројем супресивног броја *CD14*<sup>+</sup> *B7H4*<sup>+</sup>.

Такође је наглашен значај *MDSC* код пацијената са аденокарциномом плућа који су били позитивни на мутацију *EGFR* (173). Такође су и они показали да је у узорцима крви пацијената повећан број *MDSC* у поређењу са здравим контролама. Пацијенти са лошим одговором на терапију као и пацијенти са кратким периодом без прогресије болести имали су повећан број *MDSC* у поређењу са другима. Као и у нашој студији, број *MDSC* је био много већи у узорцима тумора у поређењу са узорцима крви. Недавна студија *MDSC* субпопулација из крви код *NSCLC* пацијената показала је да је њихов број повећан у поређењу са здравим контролама (174). Иста студија показала је да су *MDSC* ћелије чешће у ресецираном туморском ткиву него у узорцима крви *NSCLC* пацијената. Подаци ове студије показали су разлике између пацијената са карциномом плућа са различитом патохистолошким типом тумора. Пацијенти са сквамозелуларним карциномом плућа показали су повећан број гранулоцита сличних *MDSC* у поређењу са групом аденокарцинома, али без разлике у моноцитима сличним *MDSC*. То је у складу са нашим подацима, јер нисмо показали значајне разлике у фреквенцији *CD14<sup>+</sup> MDSC* између пацијената са *NSCLC*, већ само између ситноћелијских карцинома у односу на остале. Са друге стране, показано је да група аденокарцинома плућа има значајно више *CD14<sup>+</sup>B7H1<sup>+</sup> MDSC* и *CD15<sup>+</sup>B7H1<sup>+</sup> MDSC* у поређењу са сквамозелуларним карциномом плућа. У нашем ранијем истраживању показали смо да је различит хистолошки тип карцинома плућа значајно повезан са одређеним профилом цитокина, и у узорцима крви, и у узорцима микроциркулације тумора (176).

Имуносупресивне ћелије, попут *MDSC*, тумор повезаних макрофага (*TAM*) и регулаторних Т (*Treg*) ћелија, делују као супресивне компоненте за ублажавање имунолошких одговора (201). Међу овим ћелијама, *MDSC* ћелије имају улогу у прогнози, развоју и лечењу карцинома плућа (202,203). *MDSC* су укључени не само у контролу антитуморских имунских одговора, већ и у прогресију тумора кроз стимулацију ангиогенезе тумора, инвазије туморских ћелија и формирање преметастатске нише (204,205). Нивои *MDSC* су уско повезани са исходом болести и терапијским ефектима код пацијената са карциномом плућа (206). Такође, карциноми плућа са високим нивоом *MDSC* су резистентни на хемиотерапију, циљану терапију и имунотерапију и имају генерално лошу прогнозу (207,208).

Мали је број радова који говори о клиничком значају *MDSC* ћелија код пацијената са карциномом плућа. У ревијалном раду из 2020. године о значају *MDSC* ћелија (121), приказани су резултати код пацијената са карциномом плућа. У једној студији је показано да  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  *MDSC* ћелије из периферне крви 60 пацијената са *NSCLC* негативно корелирају са преживљавањем пацијената без прогресије болести (113). У другој студији 42 пацијента са ситноћелијским карциномом плућа је показано да су  $CD14^+HLA-DR^{-/low}$  *MDSC* ћелије из периферне крви независни биомаркер лошије прогнозе болести (119). У узорцима периферне крви  $CD11b^+CD14^+SI00A9^+$  *MDSC* ћелије код 24 пацијената са узнатредовалим *NSCLC* показано је да овај фенотип *MDSC* ћелија корелира са лошијим одговором на хемиотерапију и краћим временом до прогресије болести (114). У другој студији на 111 пацијената са *NSCLC* показано је да  $B7-H3^+CD14^+HLA-DR^{-/low}$  из узорака периферне крви скраћују преживљавање без појаве рецидива болести (120). У студији на 24 *NSCLC* пацијената у узорцима периферне крви показано је да се удео  $lin^-CD14^+CD11b^+CD39^+CD73^+M-MDSC$  значајно смањује са хемиотерапијским циклусима у групи пацијената са стабилном болешћу и парцијалним одговором на терапију, док се број повећава у групи са прогресивном болешћу (151). У студији Vetsika и сар. показано је да су  $Lin^-CD14^+CD15^+CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$  *MDSC* ћелије код 110 пацијената са *NSCLC* независан прогностички маркер скраћења укупног преживљавања и преживљавања без прогресије болести (115). Код 61 пацијента са метастатским обликом *NSCLC* показано је да  $Lin^-CD33^+CD14^+CD15^-HLA-DR^-$  пацијенти имају смањено укупно преживљавање ако су на анти-*PD-1* третману (209). Код 7 пацијената са *NSCLC* показано је да се подтип  $CD33^+CD11b^+CD14^+HLA-DR^{-/low}$  *M-MDSC* смањује након радиотерапије (*stereotactic body radiotherapy*) (210). Код 42 пацијента са ресектабилним *NSCLC* показано је у узорцима периферне крви и у узорцима туморског ткива да постоји значајна корелација нижег броја  $CCR5^+HLA-DR^{-/low}CD11b^+CD14^+CD15^-$  *MMDSC* ћелија и периода без појаве релапса болести (175).

У нашој студији смо показали значајну повезаност броја  $CD14^+B7-H4^+$  *MDSC* и величине тумора као и броја позитивних лимфних чворова. Такође смо показали да се карциноми плућа различитог хистолошког типа драматично разликују по капацитету да индукују повећан број  $CD14^+B7-H4^+MDSC$ , што се може интерпретирати као различит имуносупресивни потенцијал. Утврдили смо да су узорци туморске микроциркулације лако доступни за анализу и да су значајнији од

узорака периферне крви јер нуде сензитивније и информативније податке, прецизније рефлектујући локални баланс између туморског и имунског одговора.

Сматрамо да су неопходна даља истраживања улоге, удела и подтипова *MDSC* ћелија код пацијената са различитим врстама карцинома плућа и да би то могло да допринесе значајно бољој терапији ових пацијената, а самим тим и бољем исходу лечења. Односно, могло би да допринесе значајно бољем укупном преживљавању пацијената, али и преживљавању без прогресије болести, односно без појаве рецидива болести.

## 6. ЗАКЉУЧАК

1. Учесталост  $CD14^+MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија је значајно већа код пацијената са карциномом плућа у поређењу са здравим контролама.

2. Учесталост  $CD14^+MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија значајно је већа у узорцима из микроциркулације тумора у односу на узорак крви истих пацијената.

3. У односу на хистолошки тип тумора, болесници са ситноћелијским карциномом, аденокарциномом и сквамозелуларним карциномом плућа имали су значајно веће вредности свих испитиваних популација  $MDSC$  ћелија из узорка микроциркулације тумора у односу на узорак из крви. Изузетак су болесници са крупноћелијским карциномом, код којих је удео  $CD14^+ MDSC$  ћелија већи у узорку крви у односу на микроциркулацију тумора.

4. У узорцима микроциркулације тумора пацијената са великим туморима детектовали смо значајно већу учесталост  $CD14^+ MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија у односу на њихове узорке крви. Код болесника са малим туморима ( $T1$ ,  $T2$ ) вредности  $CD14^+ MDSC$  ћелија веће су у узорку крви у односу на микроциркулацију тумора.

5. Вредности  $CD14^+ MDSC$ ,  $CD14^+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија биле су значајно веће у узорцима микроциркулације

тумора у односу на узорак крви истих пацијената свих  $N$  стадијума. Са порастом  $N$  стадијума се повећава и удео испитиваних  $MDSC$  ћелија.

6. У обе врсте узорака пацијената без метастатске болести детектовали смо већу учесталост  $CD14^+ MDSC$ ,  $CD14+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$ .

7. Такође, у обе врсте узорака пацијената са III клиничким стадијумом детектовали смо већу учесталост  $CD14^+ MDSC$ ,  $CD14+B7H4^+MDSC$ ,  $CD14^+CD23^+MDSC$  и  $CD23^+B7H4^+MDSC$  ћелија.



## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN 2018. Cancer fact sheets. Доступно на: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58(2):71-96.
4. Rocco G, Morabito A, Leone A, Muto P, Fiore F, Budillon A. Management of non-small cell lung cancer in the era of personalized medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;78:173-9.
5. Cancer.Net. Lung Cancer - Small Cell: Statistics. Доступно на: <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-small-cell/statistics>
6. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J Thorac Oncol*. 2010; 5(1): 29-33.
7. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
8. Tan WW, Huq S. Non-Small Cell Lung Cancer. Доступно на: <http://emedicine.medscape.com/article/279960-overview#a6>

9. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer.  
Доступно на: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>.
10. American Cancer Society. Lung Cancer Survival Rates. Доступно на:  
<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
11. Милашиновић Г, уредник. Национални водич добре клиничке праксе: Карцином плућа. Београд: Републичка стручна комисија за израду и имплементацију водича добре клиничке праксе Министарство здравља Републике Србије; 2012. Доступно на:  
<http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic%20za%20diagnostikovanje%20i%20lecenje%20karcinoma%20pluca.pdf>
12. Gridelli C, Ardizzoni A, Le Chevalier T, Manegold C, Perrone F, Thatcher N, van Zandwijk N, Di Maio M, Martelli O, De Marinis F. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: results of an European Experts Panel. *Ann Oncol.* 2004;15(3):419-26.
13. Carmichael JA, Wing-San Mak D, O'Brien M. A Review of Recent Advances in the Treatment of Elderly and Poor Performance NSCLC. *Cancers (Basel).* 2018;10(7):236.
14. Wozniak AJ, Gadgeel SM. Clinical Presentation of Non-Small Cell Carcinoma of the Lung. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 291-303.
15. Patel AM, Peters SG. Clinical manifestations of lung cancer. *Mayo Clin Proc.* 1993;68(3):273-7.

16. Patel AM, Davila DG, Peters SG. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clin Proc.* 1993;68(3):278-87.
17. Novello S, Asamura H, Bazan J, Carbone D, Goldstraw P, Grunenwald D, Ricardi U, Vansteenkiste J. Early stage lung cancer: progress in the last 40 years [corrected]. *J Thorac Oncol.* 2014;9(10):1434-42.
18. Hanagiri T, Baba T, So T, Yasuda M, Sugaya M, Ono K, So T, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K. Time trends of surgical outcome in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(6):825-9.
19. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. *Lancet.* 1998;352(9124):257-63.
20. Fosella FV. Docetaxel (DOC) for non-small lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer.* 1997;18 (Suppl. 2):62.
21. Park SJ, More S, Murtuza A, Woodward BD, Husain H. New Targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(1):113-29.
22. Selesković H, Ajanović E, Grujić M. *Clinical Immunology.* Sarajevo: Svjetlost; 2007.
23. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu Rev Med.* 1988;39:63-73.
24. Abbas AK, Lichtman AH. *Osnovna imunologija funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema, drugo obnovljeno izdanje.* Beograd: Data Status; 2007.
25. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Huang M, St John M, Lee JM et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells augments antitumor activity against lung cancer. *Immunotargets Ther.* 2012;2012(1):7-12.

26. Stanojević I, Gačević M, Jović M, Mijušković Ž, Zečević R, Zolotarevski L, Jauković L, Rajović M, Novaković M, Miller K, Binić I, Vojvodić D. Sniženje vrednosti supresorskih ćelija mijeloidnog porekla kod bolesnika sa melanomom indukovano interferonom alfa. *Vojnosanit Pregl.* 2015;72(4):342-9.
27. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and molecular immunology* (7<sup>th</sup> ed). Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012;389-405.
28. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3356-64.
29. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74.
30. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010;185(4):2273-84.
31. Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S, Gabrilovich DI. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006;66(18):9299-307.
32. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(22):3584-90.
33. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, Zilio S, Bronte V. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):470-81.

34. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009;182(8):4499-506.
35. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:253-68.
36. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1593-600.
37. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25.
38. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25.
39. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;65(8):3044-8.
40. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, Wu YC, Chu Y, Chung FT, Kuo CH, Lee KY, Lin SM, Lin HC, Wang CH, Yu CT, Kuo HP. Population alterations of L-arginase and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(1):35-45.
41. Srivastava MK, Bosch JJ, Thompson JA, Ksander BR, Edelman MJ, Ostrand-Rosenberg S. Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(10):1493-504.

42. Srivastava MK, Andersson Å, Zhu L, Harris-White M, Lee JM, Dubinett S, Sharma S. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy*. 2012;4(3):291-304.
43. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid derived suppressor cells. *J Clin Invest*. 2010;120 (2):457-71.
44. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5693-701.
45. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, Blosser RL, Tam AJ, Bruno T, Zhang H, Pardoll D, Kim Y. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1580-9.
46. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol*. 2002;168(2):689-95.
47. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*. 2010;70(1):68-77.

48. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8 T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007;13(7): 828-35.
49. Nagaraj S, Collazo M, Corzo CA, Youn JI, Ortiz M, Quiceno D, Gabrilovich DI. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res.* 2009;69(19):7503-6.
50. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101(5):455-8.
51. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4 CD25<sup>+</sup> T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol.* 2006;176(3):1582-7.
52. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007;179(2):977-83.
53. Gabrilovich D, Pisarev V. Tumor escape from immune response:-mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets.* 2003;4(7):525-36.
54. Hammani I, Chen J, Murschel F, Bronte V, De Crescenzo G, Jolicoeur M. Immunosuppressive activity enhances central carbon metabolism and bioenergetics in myeloid-derived suppressor cells in vitro models. *BMC Cell Biol.* 2012;13:18.
55. Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, Zhang HG. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood.* 2007;109(10):4336-42.
56. Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus C, Pasick LJ, Couso J, Mazariegos MS, Alvarez-Prado AF, Blázquez-Moreno A, Cipe FE, Haskologlu S, Dogu F, Morín M, Moreno-Pelayo MA, García-Sánchez F, Gil-

- Herrera J, Fernández-Malavé E, Reyburn HT, Ramiro AR, Ikinciogullari A, Recio MJ, Regueiro JR, Garcillán B. Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic mosaicism in CD247. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):347-9.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.020.
57. Draghiciu O, Lubbers J, Nijman HW, Daemen T. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology*. 2015;4(1):e954829. doi: 10.4161/21624011.2014.954829.
58. Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, Suttman H, Schenck M, Welling J, Zabel P, Lang S. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol*. 2011;89(2):311-7.
59. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(12):941-52.
60. Young MR, Wright MA, Lozano Y, Prechel MM, Benefield J, Leonetti JP, Collins SL, Petruzzelli GJ. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells. *Int J Cancer*. 1997;74(1):69-74.
61. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-74.
62. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181(8):5791-802.
63. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, Greten TF, Korangy F. A new population of myeloid-derived suppressor cells in



- hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. 2008;135(1):234-43.
64. Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kübler H, Yancey D, Dahm P, Vieweg J. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8270-8.
65. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(1):49-59.
66. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*. 2007;25(18):2546-53.
67. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. 2009;69(4):1553-60.
68. Sevko A, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *J Cancer*. 2013;4(1):3-11.
69. Chioda M, Peranzoni E, Desantis G, Papalini F, Falisi E, Solito S, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid cell diversification and complexity: an old concept with new turns in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(1):27-43.

70. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009;182(8):4499-506.
71. Baniyash M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(1):80-8.
72. Wilcox RA. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(7):656-63.
73. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Lacerda K, Karadimou A, Badoual C, Tedgui A, Fridman WH, Oudard S. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(1):83-95.
74. Meyer C, Sevko A, Ramacher M, Bazhin AV, Falk CS, Osen W, Borrello I, Kato M, Schadendorf D, Baniyash M, Umansky V. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(41):17111-6.
75. Haverkamp JM, Crist SA, Elzey BD, Cimen C, Ratliff TL. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):749-59.
76. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25.
77. Chornoguz O, Grmai L, Sinha P, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Proteomic pathway analysis reveals inflammation increases myeloid-derived suppressor cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(3):M110.002980.

78. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):441-54.
79. Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl).* 2003;81(1):20-31.
80. Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1176:55-69.
81. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol.* 2006;176(1):284-90.
82. Ye XZ, Yu SC, Bian XW. Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J Genet Genomics.* 2010;37(7):423-30.
83. Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2006;312(2):184-97.
84. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2008;181(7):4666-75.
85. Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2010;184(6):3106-16.

86. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, Vosshenrich CA. IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol.* 2010;40(12):3347-57.
87. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(10):1593-600.
88. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):641-54.
89. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev.* 2008;222:180-91.
90. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood.* 2008;111(8):4233-44.
91. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008;181(8):5791-802.
92. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 2009;182(1):240-9.
93. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Carbone DP, Matrisian LM, Richmond A, Lin PC, Moses HL. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell.* 2008;13(1):23-35.

94. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66(2):1123-31.
95. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, Divino CM, Chen SH. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010;70(1):99-108.
96. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010;70(1):68-77.
97. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med.* 2005;202(7):931-9.
98. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.
99. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, Jove R, Gabrilovich D. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol.* 2004;172(1):464-74.
100. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sefti SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 2005;65(20):9525-35.

101. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. Version 2. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3367-77.
102. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res.* 2010;70(11):4335-45.
103. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res.* 2009;69(6):2506-13.
104. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):28-37.
105. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, Bronte V. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2777-90.
106. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol.* 2005;174(8):4880-91.
107. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, Rini B, Finke JH, Cohen PA. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res.* 2010;70(9):3526-36.

108. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol.* 2005;174(2):636-45.
109. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11743-51.
110. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003;198(11):1741-52.
111. Munera V, Popovic PJ, Bryk J, Pribis J, Caba D, Matta BM, Zenati M, Ochoa JB. Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin. *Ann Surg.* 2010;251(1):120-6.
112. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25.
113. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(9):1439-51.
114. Feng PH, Lee KY, Chang YL, Chan YF, Kuo LW, Lin TY, Chung FT, Kuo CS, Yu CT, Lin SM, Wang CH, Chou CL, Huang CD, Kuo HP.

- CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(10):1025-36.
115. Vetsika EK, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Kotsakis A. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res.* 2014;2014:659294.
116. Heuvers ME, Muskens F, Bezemer K, Lambers M, Dingemans AM, Groen HJ, Smit EF, Hoogsteden HC, Hegmans JP, Aerts JG. Arginase-1 mRNA expression correlates with myeloid-derived suppressor cell levels in peripheral blood of NSCLC patients. *Lung Cancer.* 2013;81(3):468-74.
117. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, Wu YC, Chu Y, Chung FT, Kuo CH, Lee KY, Lin SM, Lin HC, Wang CH, Yu CT, Kuo HP. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(1):35-45.
118. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(9):1439-51.
119. Tian T, Gu X, Zhang B, Liu Y, Yuan C, Shao L, Guo Y, Fan K. Increased circulating CD14(+)HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells are associated



- with poor prognosis in patients with small-cell lung cancer. *Cancer Biomark.* 2015;15(4):425-32.
120. Zhang G, Huang H, Zhu Y, Yu G, Gao X, Xu Y, Liu C, Hou J, Zhang X. A novel subset of B7-H3+CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells are associated with progression of human NSCLC. *Oncoimmunology.* 2015;4(2):e977164.
121. Yang Z, Guo J, Weng L, Tang W, Jin S, Ma W. Myeloid-derived suppressor cells-new and exciting players in lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):10.
122. Seliger B, Quandt D. The expression, function, and clinical relevance of B7 family members in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1327-41.
123. Leung J, Suh WK. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw.* 2014;14(6):265-76.
124. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2001;2(3):269-74.
125. Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T, Gajewska BU, Deenick E, Dawicki W, Okada H, Wakeham A, Itie A, Watts TH, Ohashi PS, Jordana M, Yoshida H, Mak TW. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2006;26(17):6403-11.
126. Zhu G, Augustine MM, Azuma T, Luo L, Yao S, Anand S, Rietz AC, Huang J, Xu H, Flies AS, Flies SJ, Tamada K, Colonna M, van Deursen JM, Chen L. B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity. *Blood.* 2009;113(8):1759-67.

127. Zang X, Loke P, Kim J, Murphy K, Waitz R, Allison JP. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10388-92.
128. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, Scardino PT, Sharma P, Allison JP. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19458-63.
129. Quandt D, Fiedler E, Boettcher D, Marsch WCh, Seliger B. B7-h4 expression in human melanoma: its association with patients' survival and antitumor immune response. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3100-11.
130. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Hagihara T, Yanagita S, Ishigami S, Natsugoe S. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis. *J Surg Oncol*. 2010;102(7):748-52.
131. Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;53(2):143-51.
132. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD, Bergan L, Thornquist MD, Scholler N, Kim N, O'Briant K, Drescher C, Urban N. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):26-38.
133. Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, Simon I, Wolfert RL, Valik D, Nekulova M, Simickova M, Frkala T, Diamandis EP. Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel. *Br J Cancer*. 2008;99(7):1103-13.

134. Simon I, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Scorilas A, Kim NW, Sarno MJ, Wolfert RL, Diamandis EP. B7-H4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression. *Gynecol Oncol.* 2007;106(2):334-41.
135. Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, McIntosh MW. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2007;106(1):112-8.
136. Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006;66(3):1570-5.
137. Thompson RH, Zang X, Lohse CM, Leibovich BC, Slovin SF, Reuter VE, Cheville JC, Blute ML, Russo P, Kwon ED, Allison JP. Serum-soluble B7x is elevated in renal cell carcinoma patients and is associated with advanced stage. *Cancer Res.* 2008;68(15):6054-8.
138. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem.* 2014;289(51):35237-45.
139. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, Kang JI, Jung HE, Lee D, Lee HK, Lee JO, Park BS, Yoon TY, Kim HM. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity.* 2017;46(1):38-50.
140. Chun KH, Seong SY. CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(1):98-106.
141. Roedig H, Nastase MV, Frey H, Moreth K, Zeng-Brouwers J, Poluzzi C, Hsieh LT, Brandts C, Fulda S, Wygrecka M, Schaefer L. Biglycan is a new high-

- affinity ligand for CD14 in macrophages. *Matrix Biol.* 2019;77:4-22. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.006.
142. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- $\alpha$ . *Eur J Immunol.* 2002;32(2):404-12.
143. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):559-72.
144. DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, Kantarjian H, Lerner S, Giustolisi R, Keating M. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer.* 2002;94(6):1721-30.
145. Dadmarz R, Cawley JC. Heterogeneity of CLL: high CD23 antigen and  $\alpha$ IFN receptor expression are features of favorable disease and of cell activation. *Br J Haematol.* 1998;68(3):279-82.
146. Lavabre-Bertrand T, Exbrayat C, Bourquard P, Lavabre-Bertrand C, Fégueux N, Poncelet P, Rousset T, Taïb J, Emberger JM, Navarro M. CD23 antigen density is related to serum gamma globulin level, bone marrow reticulin pattern, and treatment in B chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1994;13(1-2):89-94.
147. Acharya M, Borland G, Edkins AL, Maclellan LM, Matheson J, Ozanne BW, Cushley W. CD23/Fc $\epsilon$ RII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):12-23.

148. Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8363-70.
149. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164514. doi: 10.1371/journal.pone.0164514.
150. Koinis F, Vetsika EK, Aggouraki D, Skalidaki E, Koutoulaki A, Gkioulmpasani M, Georgoulas V, Kotsakis A. Effect of First-Line Treatment on Myeloid-Derived Suppressor Cells' Subpopulations in the Peripheral Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(8):1263-72.
151. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, Huang L, Yue D, Zhang Z, Wang F, Li F, Yang L, Huang J, Yang S, Li H, Zhao X, Dong W, Yan Y, Zhao S, Huang B, Zhang B, Zhang Y. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF- $\beta$ -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2017;6(6):e1320011. doi: 10.1080/2162402X.2017.1320011.
152. Deng Z, Rong Y, Teng Y, Zhuang X, Samykutty A, Mu J, Zhang L, Cao P, Yan J, Miller D, Zhang HG. Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis. *Oncogene.* 2017;36(5):639-51.
153. Srivastava MK, Dubinett S, Sharma S. Targeting MDSCs enhance therapeutic vaccination responses against lung cancer. *Oncoimmunology.* 2012;1(9):1650-1.
154. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, Zilio S, Bronte V. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):470-81.

155. Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI. Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(22):11021-8.
156. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, Chen SH. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood.* 2008;111(1):219-28.
157. Gao P, Zhang H, Dinavahi R, Li F, Xiang Y, Raman V, Bhujwala ZM, Felsher DW, Cheng L, Pevsner J, Lee LA, Semenza GL, Dang CV. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell.* 2007;12(3):230-8.
158. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L, Mijuskovic Z, Zolotarevski L, Jovic M, Gacevic M, Djukic M, Arsenijevic N, Vojvodic D. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *Int Immunol.* 2016;28(2):87-97.
159. Chen Y, Pan G, Tian D, Zhang Y, Li T. Functional analysis of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in patients with lung squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;14(1):49-354.
160. Liu J, Zhou Y, Huang Q, Qiu L. CD14+HLA-DRlow/- expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1167-72.
161. Shi G, Wang H, Zhuang X. Myeloid-derived suppressor cells enhance the expression of melanoma-associated antigen A4 in a Lewis lung cancer murine model. *Oncol Lett.* 2016;11(1):809-16.
162. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with

- extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(9):1439-51.
163. Qian Y, Shen L, Cheng L, Wu Z, Yao H. B7-H4 expression in various tumors determined using a novel developed monoclonal antibody. *Clin Exp Med.* 2011;11(3):163-70.
164. Choi IH, Zhu G, Sica GL, Strome SE, Cheville JC, Lau JS, Zhu Y, Flies DB, Tamada K, Chen L. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. *J Immunol.* 2003;171(9):4650-4.
165. Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, Joshi S, Cheng Y, Sandaltzopoulos R, Ra HJ, Danet-Desnoyers G, Powell DJ Jr, Scholler N. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses. *Cancer Res.* 2013;73(15):4820-9.
166. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;177(1):40-4.
167. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med.* 2006;203(4):871-81.
168. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, Chen L, Coukos G, Zou W. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67(18):8900-5.
169. Matsunaga T, Saito H, Ikeguchi M. Increased B7-H1 and B7-H4 Expressions on Circulating Monocytes and Tumor-Associated Macrophages are

- Involved in Immune Evasion in Patients with Gastric Cancer. *Yonago Acta Med.* 2011;54(1):1-10.
170. Tan Z, Shen W. Prognostic role of B7-H4 in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(16):27137-44.
171. Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment *J Thorac Oncol.* 2011; 6 (7):1162-8. doi: 10.1097/JTO.0b013e31821c421d.
172. Hamilton G, Rath B, Klameth L, Hochmair MJ. Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *Oncoimmunology.* 2015 Oct 29;5(2016) Mar. doi: 10.1080/2162402X.2015.1093277
173. Feng PH, Yu CT, Chen KY, Luo CS, Wu SM, Liu CY, Kuo LW, Chan YF, Chen TT, Chang CC, Lee CN, Chuang HC, Lin CF, Han CL, Lee WH, Lee KY. S100A9+ MDSC and TAM-mediated EGFR-TKI resistance in lung adenocarcinoma: the role of RELB. *Oncotarget.* 2018;9(7):7631-43.
174. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, Warth A, Eichhorn M, Muley T, Herth FJF, Dienemann H, Platten M, Beckhove P, Utikal J, Hoffmann H, Umansky V. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(6):777-87.
175. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, Rathinasamy A, Umansky L, Juenger S, Warth A, Eichhorn M, Muley T, Herth FJF, Dienemann H, Platten M, Beckhove P, Utikal J, Hoffmann H, Umansky V. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(6):777-87.



176. Karlicic V, Vukovic J, Stanojevic I, Sotirovic J, Peric A, Jovic M, Cvijanovic V, Djukic M, Banovic T, Vojvodic D. Association of locally produced IL10 and TGF $\beta$ 1 with tumor size, histological type and presence of metastases in patients with lung carcinoma. *J BUON*. 2016;21(5):1210-8.
177. González-Santiago AE, Mendoza-Topete LA, Sánchez- Llamas F, Troyo-Sanromán R, Gurrola-Díaz CM. TGF- $\beta$ 1 serum concentration as a complementary diagnostic biomarker of lung cancer: establishment of a cut-point value. *J Clin Lab Anal* 2011;25:238-243.
178. Jakowlew BS. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Lung Cancer, Carcinogenesis, and Metastasis, Chapter 28, pp 633-671. In: Rebecca G. Bagley (Ed): *The Tumor Microenvironment*, Springer, New York, 2010.
179. Jarnicki GA, Lysaght J, Todryk S, Mills HGK. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF-Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4 and CD8 Regulatory T Cells. *J Immunol* 2006;177:896- 904.
180. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*. 1998;77(1):7-12.
181. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, et al. Type Two Cytokines Predominance of Human Lung Cancer and Its Reverse by Traditional Chinese Medicine TTMP. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:63-70.
182. Ghayumi MA, Mojtahedi Z, Fattahi MJ. Th1 and Th2 Cytokine Profiles in Malignant Pleural Effusion. *Iran J Immunol* 2011; 8 (4), 195-200. doi: IJIV8i4A1

183. Li R, Ruttinger D, Li R, Si LS, Wang YL. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2003;388 (6)406–412. doi:10.1007/s00423-003-0416-0.
184. Ma J, Liu H, Wang X. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer. *J Tradit Chin Med* 2014; 34(6): 641-645. doi:10.1016/s0254-6272(15)30076-5.
185. Hodge G, Barnawi J, Jurisevic C, Moffat D, Holmes M, Reynolds PN et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- $\gamma$  by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol.* 2014; 178 (1):79-85. doi: 10.1111/cei.12392.
186. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z, et al. M2-Polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymph angiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics* 2011; 66 (11):1879-1886. doi:10.1590/s1807-59322011001100006
187. Ito N, Nakamura H, Metsugi H and Ohgi S. Dissociation between T helper type 1 / type 2 differentiation and cytokine production of tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer patients. *Surg Today.* 2001; 31(5):390-4. doi:10.1007/s005950170127.
188. Ito N, Suzuki Y, Taniguchi Y, Ishiguro K, Nakamura H, Ohgi S. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2005; 25(3B):2027-31.
189. Huang M, Wang J, Lee P, Stiantila S, Mao JT, Meissner H et al. Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Express a Type 2 Cytokine Pattern. *Cancer Research* 1995; 55: 3847-3853.

190. Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13R $\alpha$ 2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131(2):344-56. doi: 10.1002/ijc.26366.
191. Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. A Novel Role of Interleukin-13 Receptor  $\alpha$ 2 in Pancreatic Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res* 2009; 69(22):8678–85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2100.
192. Vuković J, Nikolić N, Karličić V, Stanojević I, Supić G, Jović M, Stefik D, Abazović Dz, Vojvodić D. High number of CD14+B7H4+ monocytes is significantly associated with increased IL-4, IL-13, IL-10 and TGF-carcinoma. *Vojnosanitetski preglod 2020 OnLine-First Issue 00*, Pages: 43-43 <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.2298/VSP200229043V>
193. Karlicic V, Vukovic J, Stanojević I, Sotirovic J, Peric A, Jović M, et al. IL-27 Concentration in Systemic Circulation and Tumor Micro-Circulation Samples of Sclc and Nsclc Patients; Association with Tumor Size, Histological Type and Presence of Metastases. *Austin J Clin Immunol*. 2016; 3(1):1030.
194. Pogoda K, Pyszniak M, Rybojad P, Tabarkiewicz J. Monocytic myeloid-derived suppressor cells as a potent suppressor of tumor immunity in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2016; 12(6): 4785–94. doi: 10.3892/ol.2016.5273
195. Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*. 2003;18(6):849-61.
196. Shi H, Ji M, Wu J, Zhou Q, Li X, Li Z, Zheng X, Xu B, Zhao W, Wu C, Jiang J. Serum B7-H4 expression is a significant prognostic indicator for patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2014;12:188.

197. Chen Y, Sun J, Zhao H, Zhu D, Zhi Q, Song S, Zhang L, He S, Kuang Y, Zhang Z, Li D. The coexpression and clinical significance of costimulatory molecules B7-H1, B7-H3, and B7-H4 in human pancreatic cancer. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1465-72.
198. Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity.* 2003;18(6):863-73.
199. Yi KH, Chen L. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev.* 2009;229(1):145-51.
200. Wang L, Heng X, Lu Y, Cai Z, Yi Q, Che F. Could B7-H4 serve as a target to activate anti-cancer immunity? *Int Immunopharmacol.* 2016;38:97-103.
201. Milette S, Fiset PO, Walsh LA, Spicer JD, Quail DF. The innate immune architecture of lung tumors and its implication in disease progression. *J Pathol.* 2019;247(5):589-605.
202. Adah D, Hussain M, Qin L, Qin L, Zhang J, Chen X. Implications of MDSCs-targeting in lung cancer chemo-immunotherapeutics. *Pharmacol Res.* 2016;110:25-34.
203. Tavakkoli M, Wilkins CR, Mones JV, Mauro MJ. A Novel Paradigm Between Leukocytosis, G-CSF Secretion, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Myeloid-Derived Suppressor Cells, and Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:295. doi: 10.3389/fonc.2019.00295.
204. Ortiz ML, Lu L, Ramachandran I, Gabilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(1):50-8.

205. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Kar UK, Huang M, Johnson MF, Lee JM, Elashoff D, Strieter R, Dubinett S, et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(7):e40677.
206. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, Maurer D, Ottensmeier C, van der Burg SH, Welters MJ, Walter S. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(2):161-9.
207. Zhou Q, Tang X, Tian X, Tian J, Zhang Y, Ma J, Xu H, Wang S. LncRNA MALAT1 negatively regulates MDSCs in patients with lung cancer. *J Cancer*. 2018;9(14):2436-42.
208. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, Wu YC, Chu Y, Chung FT, Kuo CH, Lee KY, Lin SM, Lin HC, Wang CH, Yu CT, Kuo HP. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(1):35-45.
209. Limagne E, Richard C, Thibaudin M, Fumet JD, Truntzer C, Lagrange A, Favier L, Coudert B, Ghiringhelli F. Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1564505.
210. Navarro-Martin A, Galiana IL, Berenguer Frances MA, Cacicedo J, Canas Cortes R, Comas Anton S, Padrones Sanchez S, Bolivar Cuevas S, Parry R, Guedea Edo F. Preliminary study of the effect of stereotactic body radiotherapy (SBRT) on

the immune system in lung cancer patients unfit for surgery: immunophenotyping analysis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12). doi: [org/10.3390/ijms19123963](https://doi.org/10.3390/ijms19123963).