ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του ανοσοκατασταλτικού ρόλου των MDSCs σε ασθενείς με β-λεμφώματα

Ξανθούλλα Γιωργαλλά Α.Μ.:2683

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Χριστίνα Καλπαδάκη

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022-2023

Ευχαριστίες:

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας διήρκησε ένα ακαδημαϊκό εξάμηνο στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Η ολοκλήρωση της θα ήταν αδύνατη χωρίς την βοήθεια της επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου, κ. Χριστίνα Καλπαδάκη, η οποία με δέχτηκε στην ερευνητική της ομάδα και μου πρόσφερε την καθοδήγησής της και τις παρατηρήσεις της.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνυπεύθυνο καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Παυλίδη που μέσω της συζήτησης και τις συμβουλές του με ώθησε να συνεχίσω την πορεία μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Αθηνά Δαμιανάκη και την Αγλαΐα Καβιδοπούλου, για την συνεχή και καθημερινή τους βοήθεια, για την καθοδήγηση τους εντός και εκτός του εργαστηρίου καθώς και για την επίλυση της κάθε απορίας μου. Επίσης, να ευχαριστήσω τον κύριο Αντώνη Διλιντά και τον κύριο Πάνο Βεργίνη που μαζί με το υπόλοιπο προσωπικό του αιματολογικού εργαστηρίου με έκαναν καθημερινά να νιώθω οικεία και άνετα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την πίστη τους σε μένα και την στήριξη που μου πρόσφεραν.

Περίληψη:

Τα λεμφώματα αποτελούν ομάδα κακοηθείων του αιμοποιητικού συστήματος που εμφανίζονται στο λεμφικό ιστό και προκαλούν νοσηρότητα και θνησιμότητα. Χωρίζονται ανάλογα με τα διάφορα μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά ή μοριακά χαρακτηριστικά τους σε Hodgkin και μη Hodgkin.Τα μη Hodgkin λεμφώματα περιλαμβάνουν τα Β λεμφώματα που είναι και τα πιο συνήθη, με ποσοστό εμφάνισης πάνω από 80% των συνολικών λεμφωμάτων. Το Διάχυτο Λέμφωμα από Β μεγάλα κύτταρα (DLBCL) αποτελεί την πιο συχνή ιστολογική κατηγορία των μη Hodgkin λεμφωμάτων.

Τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα, μαζί με τα MDSCs, αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα των καρκινοπαθών, αναιρώντας ενδεχομένως την αποτελεσματικότητα αυτών των νέων θεραπειών. Τα Κατασταλτικά Κύτταρα της Μυελικής Σειράς (MDSCs) χωρίζονται σε M-MDSCs και G-MDSCs και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ειδική και στην μη ειδική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού καταστέλοντάς την. Τα MDSCs υπάρχουν σε υγιή άτομα σε χαμηλά επίπεδα και αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου και άλλων παθολογικών καταστάσεων και μπορούν να καταστείλουν ισχυρά τη λειτουργία των Τ κυττάρων.

Ως ανθρώπινα G-MDSCs θεωρούνται τα $CD11b^{+}CD14^{-}CD15^{+}CD33^{+}$ ή $CD11b^{+}CD14^{-}CD66b^{+}CD33^{+}$ κύτταρα. Τα M-MDSCs, χαρακτηρίζονται από τον φαινότυπο $CD11b^{+}CD14^{+}CD15^{-}CD33^{+}$ HLA-$DR^{-/lo}$.

Μέσω της κυτταρομετρίας ροής έγινε χαρακτηρισμός και ανάλυση των πληθυσμών κυττάρων σε ασθενείς με β λεμφώματα αλλά και σε υγιείς άτομα για σύγκριση. Η έρευνα εστίασε στο Διάχυτο Λέμφωμα από Β μεγάλα κύτταρα (DLBCL). Μέσω των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε ότι τα MDSCs και συγκεκριμένα τα M-MDSCs ήταν αυξημένο συγκριτικά με τους υγιείς.

Περιεχόμενα:

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 5
ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ 5
ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 8
MYELOID-DERIVEDSUPPRESSORCELLS (MDSCs) 8
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ – GATING STRATEGY 12

RNA SEQUENCING 14
ΜΕΘΟΔΟΙ..... 15

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΜΦΟΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ Η/ΚΑΙ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ…….15

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MDSCs 18

GATING STRATEGY 18

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΑΓΩΜΑΤΟΣ 21
SORTING 21
RNA EXTRACTION 22

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 23

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 32

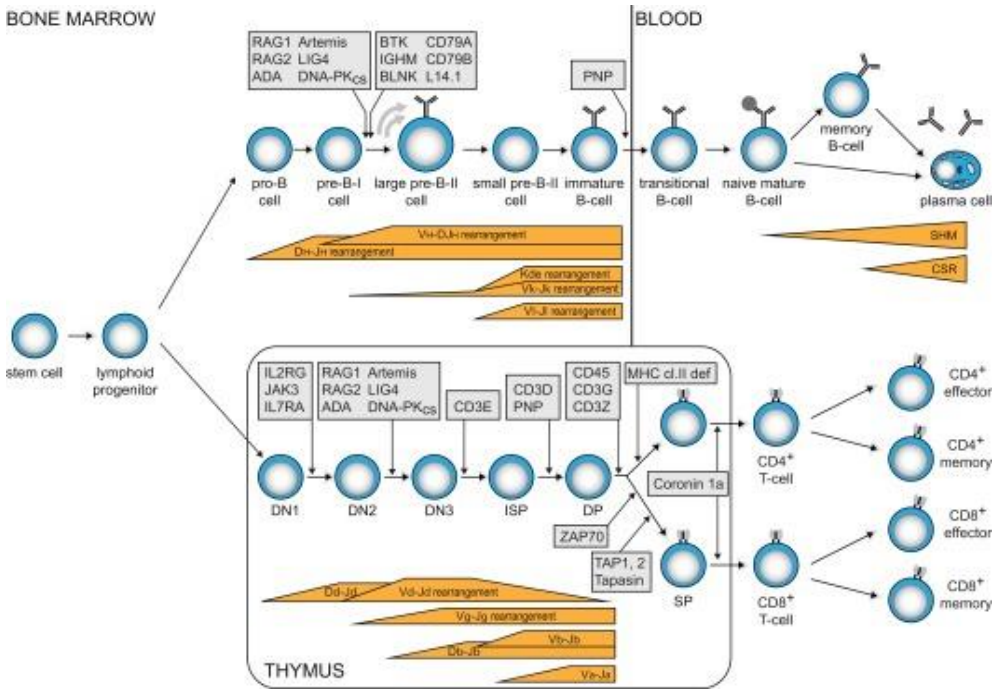
Θεωρητικό Μέρος:

Λεμφώματα:

Ως λεμφώματα χαρακτηρίζονται τα κακοήθη νεοπλάσματα στα οποία πραγματοποιείται ανεξέλεγκτος κλωνικός πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων, σε διαφορετικά στάδια της ωρίμανσης τους συνοδευόμενο από διηθήσεις λεμφαδενικών ή εξωλεμφαδενικών οργάνων. Αποτελούν δηλαδή μια ομάδα κακοηθείων του αιμοποιητικού συστήματος που εμφανίζονται στο λεμφικό ιστό και προκαλούν νοσηρότητα και θνησιμότητα. Ανάλογα με τον υποτύπο και το στάδιο της νόσου, επιλέγονται οι καλύτερες θεραπευτικές επιλογές, αλλά κυρίως περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία, μονοκλωνικά αντισώματα, αυτόλογη και αλλογενής μεταμόσχευση και ακτινοθεραπεία. [8]

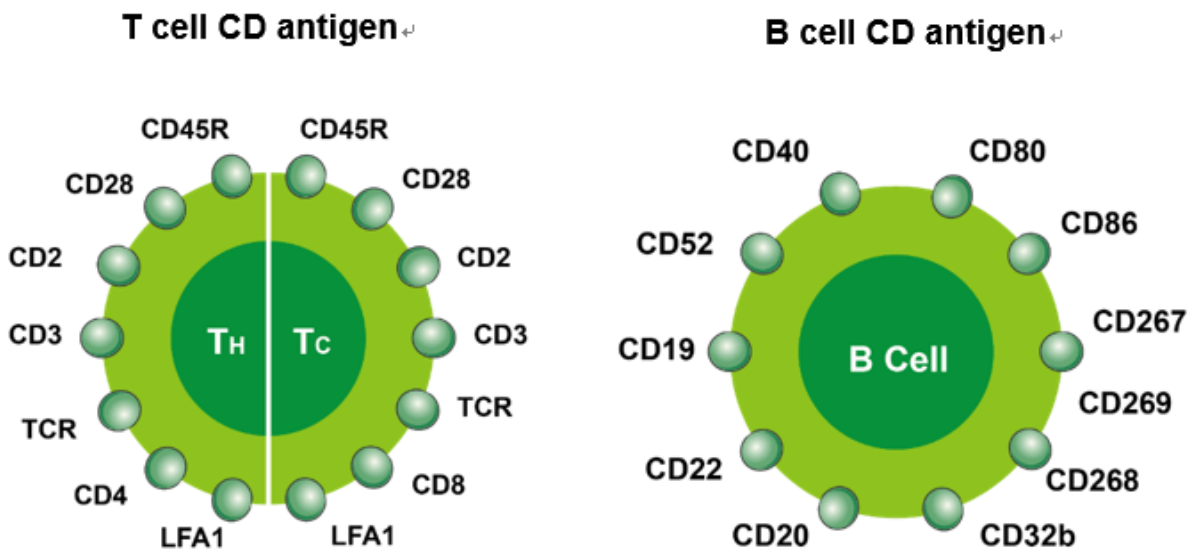
Τα λεμφώματα χωρίζονται ανάλογα με τα διάφορα μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά ή μοριακά χαρακτηριστικά τους σε Hodgkin και μη Hodgkin. Τα μη Hodgkin λεμφώματα χωρίζονται περαιτέρω ανάλογα με το από πού προέρχονται τα παθολογικά λεμφοκύτταρα, δηλαδή Β,Τ και ΝΚ.

Τα μη Hodgkin λεμφώματα χωρίζονται ανάλογα με τον βαθμό κακοήθειας σε επιθετικά και χαμηλής κακοήθειας. Τα Β λεμφώματα είναι και τα πιο συνήθη, με ποσοστό εμφάνισης πάνω από 80% των συνολικών λεμφωμάτων. Παρακάτω παρουσιάζεται η διαφοροποίηση των Τ και Β λεμφοκυττάρων. [6][7][9][21]



Εικόνα 1: *Ανθρώπινα στάδια διαφοροποίησης Β και Τ κυττάρων (Dik et al., 2005; van Zelm et al., 2005)* [22]

Χαρακτηριστικοί δείκτες κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένου του συστήματος αντιγόνου CD (cluster designation), καθορίζουν τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων και βοηθούν στη διάγνωση. Οι δείκτες CD, οι οποίοι είναι δείκτες πρωτεϊνών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της προέλευσης, της διαφοροποίησης, της ωρίμανσης και της ενεργοποίησης των υπό μελέτη κυττάρων, επειδή παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση ανάλογα με τα στάδια ωρίμανσης και ενεργοποίησης των κυττάρων.



Εικόνα 2: *Δείκτες διαφοροποίησης (δείκτες CD)* [25]

Το Διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα Λέμφωμα (DLBCL) αποτελεί την πιο συχνή ιστολογική κατηγορία των μη Hodgkin λεμφωμάτων (NHL). Εμφανίζεται de novo ή μέσω μετασχηματισμού από διάφορους τύπους λεμφωμάτων Β-κυττάρων χαμηλού βαθμού, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Παρατεταμένη ύφεση επιτυγχάνεται σε σχεδόν 60-70% των ασθενών με τυπική ανοσοχημειοθεραπεία. Ωστόσο, η πρόγνωση των ασθενών με υποτροπιάζουσα νόσο μετά από θεραπεία πρώτης γραμμής είναι κακή, με ποσοστό 5ετούς επιβίωσης μόνο 20% παρά τη θεραπεία δεύτερης γραμμής. Οι προγνωστικές διαφορές στην ανταπόκριση και την επιβίωση αντικατοπτρίζουν την ετερογένεια στη μορφολογία και τα γενετικά χαρακτηριστικά σε διαφορετικές υποομάδες DLBCL. Το οικογενειακό ιστορικό λεμφώματος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η λοίμωξη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), η οροθετικότητα από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) και άλλα αποτελούν παράγοντες κινδύνου του DLBCL. [10][17][18][19]

Ανοσοκατασταλτικά κύτταρα

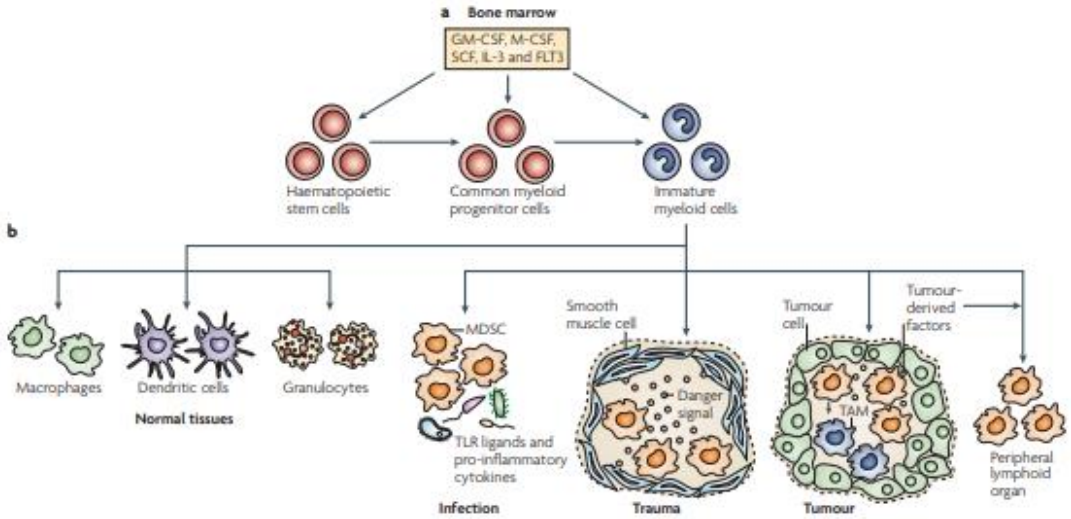
Παρά τις αποδεδειγμένες αποτελεσματικές θεραπευτικές στρατηγικές απέναντι στα λεμφώματα, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών υποτροπιάζει. Έτσι, διερευνώνται νέες θεραπευτικές τεχνικές που στοχεύουν στο ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των MDSC που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα των καρκινοπαθών, αναιρώντας ενδεχομένως την αποτελεσματικότητα αυτών των νέων θεραπειών. [4]

MYELOID - DERIVED SUPPRESSOR CELLS (MDSCs):

Τα Κατασταλτικά Κύτταρα της Μυελικής Σειράς (MDSCs) είναι της μυελικής σειράς με μονοκυτταρική (Mono-MDSCs) ή κοκκιώδη (Gran-MDSCs) προέλευση τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ειδική και στην μη ειδική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού καταστέλοντάς την.[2]

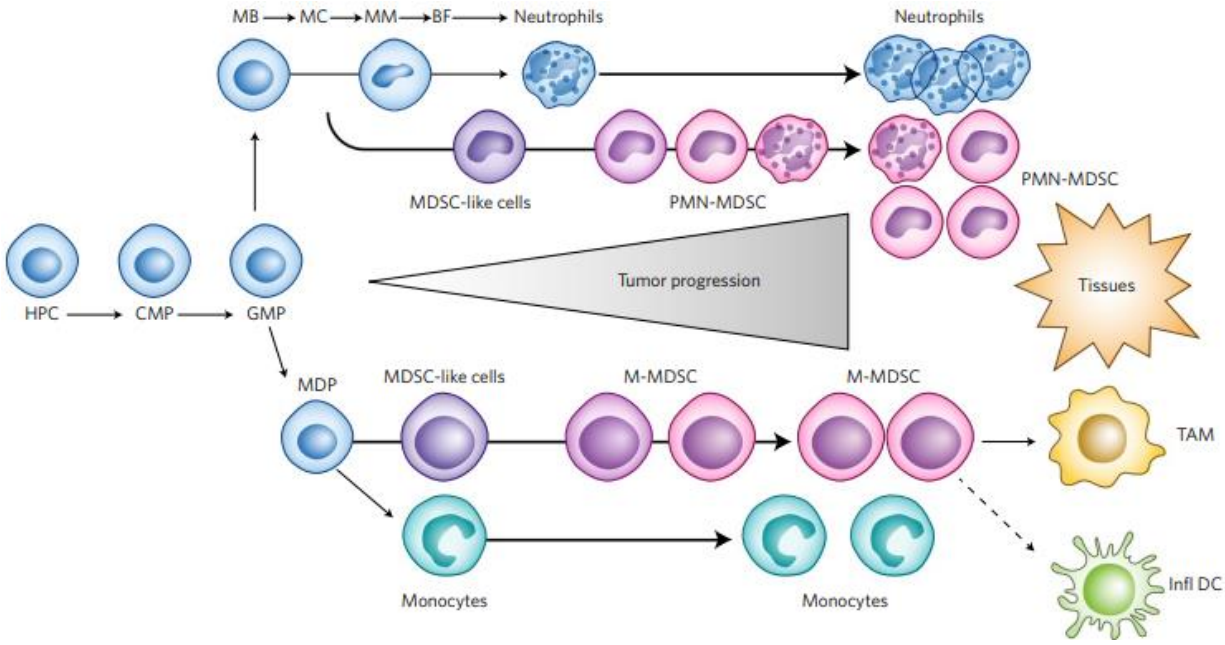
Τα MDSCs έχουν την ικανότητα να καταστείλουν τα T, B και NK κύτταρα. Στον καρκίνο, τα MDSCs έχουν συγκεκριμένο ρόλο στους συμπαγείς όγκους. Αντιθέτως, η συμβολή τους στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος στην περίπτωση αιματολογικών κακοηθειών και κυρίως στα λεμφώματα παραμένει ασαφής. [11]

Τα MDSCs υπάρχουν σε υγιή άτομα σε χαμηλά επίπεδα και αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, της αυτοανοσίας, της χρόνιας λοίμωξης και άλλων παθολογικών καταστάσεων και μπορούν να καταστείλουν ισχυρά τη λειτουργία των T κυττάρων.



Εικόνα 3: *Προέλευση MDSCs* [27]

Τα MDSCs χωρίζονται σε M-MDSCs, G-MDSCs και e-MDSCs . Τα ουδετερόφιλα έχουν αρκετές ομοιότητες με τα G-MDSCs και τα μονοκύτταρα με τα M-MDSCs. Παρ'όλα αυτά, διαφέρουν από τα τελικώς διαφοροποιημένα ώριμα μυελικά κύτταρα, λόγω της ισχυρής ανοσοκατασταλτικής δράσης τους και του μεταβολικού και μεταγραφικού προφίλ τους. Σχετίζονται με την παθογένεια του καρκίνου, την ανάπτυξη και τη μετάσταση , αλλά και σε διάφορους τομείς της ανοσολογικής ρύθμισης, όπως η χρόνια φλεγμονή, μολυσματικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα κ.ο.κ.. Παρακάτω φαίνεται η διαφοροποίηση και συσσώρευση των MDSCs. [13]



Εικόνα 4: *Διαφοροποίηση και συσσώρευση MDSCs* [24]

Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των MDSCs:

Λόγω της φαινοτυπικής και μορφολογικής ετερογένειας των MDSCs, ο ακριβής προσδιορισμός τους γίνεται δύσκολα. Στα ποντίκια, όπου ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των MDSCs έχει εδραιωθεί, έχει βρεθεί ότι υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες που ονομάζονται μονοκυτταρικά-MDSCs (M-MDSCs), τα οποία μοιάζουν με μονοκύτταρα και εκφράζουν το Ly-6C ($CD11b^{+}Ly\text{-}6G^{-}Ly\text{-}6C^{hi}$) στα ποντίκια, και τα κοκκιοκυτταρικά ή πολυμορφοπύρηνα MDSCs (PMN/G-MDSCs), τα οποία εκφράζουν Ly-6G MDSCs ($CD11b^{+}Ly\text{-}6G^{+}Ly\text{-}6C^{low}$) στα ποντίκια.[24]

Αντίθετα, τα ανθρώπινα MDSCs δεν έχουν πλήρως καθοριστεί λόγω της κυτταρικής τους φύσης σε πρώιμο στάδιο και της δυσκολίας τους να καθοριστούν φαινοτυπικά και μηχανιστικά. Έτσι, ως ανθρώπινα G-MDSCs θεωρούνται τα $CD11b^{+}CD14^{-}CD15^{+}CD33^{+}$ ή $CD11b^{+}CD14^{-}CD66b^{+}CD33^{+}$ κύτταρα. Τα M-MDSCs, χαρακτηρίζονται από τον φαινότυπο $CD11b^{+}CD14^{+}CD15^{-}CD33^{+}$ $HLA\text{-}DR^{-/lo}$. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί τα "MDSC πρώιμου σταδίου" (eMDSCs), που αποτελούν ανώριμο πληθυσμό MDSC και χαρακτηρίζονται ως Lin-$HLADR^{-}CD33^{+}$ κύτταρα, όπου το Lin περιλαμβάνει τα CD3, CD14, CD15, CD19 και CD56. [2]

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των MDSC είναι το CD11b και το CD33. Το HLADR, συχνά μαζί με το CD14, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μονοκυτταρικών MDSCs, ενώ το CD15 ως δείκτης για τα κοκκιοκυτταρικά MDSC. Το HLA-DR διακρίνει τα M-MDSCs από τα ώριμα μονοκύτταρα. Άλλοι δείκτες που επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ανοσοφαινότυπο των MDSC περιλαμβάνουν τα CD66b, CD16, CD83, DC-SIGN, IL4-υποδοχέας άλφα (IL4Ra), VEGFR και CD34. [5]

Όμως, υπάρχουν κάποια τεχνικά ζητήματα σχετικά με την ταυτοποίηση των MDSC σε δείγματα αίματος. Τα G-MDSC σε ολικό αίμα (WB) έχουν τον ίδιο ανοσολογικό φαινότυπο με τα κύτταρα PMN. Αυτό μπορεί να ξεπεραστεί εν μέρει με τη χρήση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC), τα οποία απομονώνονται μετά από επιστοίβαση με φικόλη.

MDSCs στις αιματολογικές κακοήθειες:

Μέσω πολλών ερευνών τεκμηριώθηκε ο ρόλος των MDSCs σε διάφορες αιματολογικές κακοήθειες, όπως το πολλαπλό μυέλωμα (MM), η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Β-κυττάρων (B-ALL), η οξεία μυελοειδής λευχαιμία (AML) και η χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (CML). Κάτι που είναι κοινό σε αυτές τις νόσους είναι ότι η εμφάνιση των MDSCs είναι σημαντικά αυξημένη στο αίμα, στο μυελό των οστών, σε περιοχές όγκου και συχνά σχετίζονται με υψηλό φορτίο όγκου, δυσμενή κλινικά χαρακτηριστικά και έκβαση. [2]

MDSCs στα Β-λεμφώματα:

Η εκτίμηση των MDSCs σε λεμφώματα δεν έχει ακόμη καλά μελετηθεί. Η περιορισμένη αξιολόγηση που έγινε βασίζεται κυρίως στο λέμφωμα DLBCL και στα Hodgkin λεμφώματα. Το Διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα λέμφωμα (DLBCL) είναι ο συχνότερος τύπος του NHL και η πιο καλά μελετημένη κατηγορία λεμφώματος, αντιπροσωπεύοντας το 30-40% των περιπτώσεων. Αυτό συμβαίνει γιατί στις άλλες κατηγορίες τα δεδομένα που υπάρχουν είναι ελλειπή. Από όσα είναι γνωστά μέχρι στιγμής, τα M-MDSCs συνδέονται με επιβλαβέστερη έκβαση και πιο προχωρημένο στάδιο νόσου, σε αντίθεση με τα G-MDSCs. [26]

Ανάπτυξη και ενεργοποίηση των MDSCs:

Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για τη δημιουργία, την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση των MDSC δεν είναι ακόμη σαφώς καθορισμένοι. Τα MDSCs και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες στον μυελό των οστών (BM) ή στο σπλήνα πριν μεταφερθούν στην περιφέρεια. Παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF), ο παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF) , ο παράγοντας βλαστοκυττάρων (SCF), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), οι αλαρμίνες S100A9 και S100A8 και η προσταγλανδίνη E2 (PGE2), περιλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Η επαγωγή της κατασταλτικής δραστηριότητας των MDSCs, απαιτεί επίσης σήματα για την ενεργοποίησή τους, συμπεριλαμβανομένων των ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), IL-1β, IL-4, IL-6, IL-13, του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), των -Toll υποδοχέων (TLRs) και του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-β (TGFβ). Η αύξηση και η συγκέντρωση των MDSCs στο μικροπεριβάλλον του όγκου διέπεται από αρκετούς παράγοντες. Οι χημειοκίνες είναι οι κύριοι διαλυτοί μεσολαβητές που έχουν ρόλο εδώ, συμπεριλαμβανομένων των CCL7, CCL15, CCL26, CXCL8 (επίσης γνωστή ως IL-8) και CXCL12, οι οποίες βοηθούν στην κινητοποίηση των MDSCs στο μικροπεριβάλλον του όγκου. [(2)]

Μέσω πολλών μελέτων αποδεικνύεται ότι τα M-MDSCs πιθανό να επάγονται από τον επαναπρογραμματισμό των μονοκυττάρων. Από την άλλη, τα G-MDSCs μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα στάδιο ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων που παράγονται από ενεργοποιημένα ανώριμα ή ώριμα κοκκιοκύτταρα. [(2)]

Μηχανισμοί Λειτουργίας:

Διάφοροι μηχανισμοί χρησιμοποιούνται από τα MDSCs , όπως υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια και απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων, για να κατασταλθούν ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα M-MDSCs αποτελούν ισχυρότερη κατασταλτική ομάδα σε σύγκριση με τα G-MDSCs, που έχουν μέτρια κατασταλτική δράση. Οι κύριοι μηχανισμοί όπου τα MDSCs ασκούν την ανοσοκατασταλτική τους λειτουργία περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

Μείωση απαραίτητων αμινοξέων:

Ένας από τους μηχανισμούς της ανοσοκατασταλτικής δράσης των MDSCs αποτελεί ο μεταβολισμός της L-αργινίνης. Η αργινάση 1 και η συνθετάση νιτρικού οξειδίου (iNOS), οι οποίες παράγονται αυξημένα από τα MDSCs, είναι υπεύθυνες για την διάσπαση της L-αργινίνης. Στέρηση της L-αργινίνης έχει ως αποτέλεσμα την μη σωστή λειτουργία των T-κυττάρων, όντας απαραίτητο ένζυμο. Η παραγωγή iNOS από τα MDSCs παράγει μονοξείδιο

του αζώτου (NO), που συσχετίζεται με την εξασθένιση της έκφρασης του MHC II στα μακροφάγα και στην απόπτωση των Τ-κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται κυρίως σε συμπαγείς όγκους και σε αιματολογικές κακοήθειες. Συνοπτικά, τα MDSCs σε ασθενείς με λέμφωμα και πολλαπλό μυέλωμα σχετίζονται με αυξημένη γονιδιακή έκφραση των ARG-1 και iNOS και συσχετίστηκαν με έκβαση της νόσου και αντίσταση στη θεραπεία. Επιπλέον, ο ανταγωνισμός για την εξωκυττάρια κυστεΐνη μεταξύ των APCs και των MDSCs οδηγεί σε στέρηση της κυστεΐνης και συνεπώς την αναστολή της ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων. Επιπλέον, ο εξαρτώμενος από την ινδολαμίνη 2,3-δεοξυγενάση (IDO) καταβολισμός της τρυπτοφάνης θεωρείται ένας μηχανισμός στην καταστολή με τη μεσολάβηση των MDSC. [(2)(14)]

Επαγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτταρικών πληθυσμών και ανέργια των κυττάρων NK:

Τα MDSCs ωθούν τη παραγωγή Treg με έκκριση TGF-β και IL-10 σε μοντέλα ποντικών με συμπαγείς όγκους. Τα MDSC μπορούν επίσης να αυξάνουν κάποια χαρακτηριστικά των μακροφάγων που μοιάζουν με τα M2, που έχουν ανοσοκατασταλτική δράση. Τα MDSCs μέσω του TGF-β κατέστειλαν τη λειτουργία των NK μέσω της αναστολής της παραγωγής IFN-γ. [(2)(23)]

Παρεμπόδιση της μετανάστευσης των λεμφοκυττάρων:

Τα MDSCs υπορυθμίζουν την έκφραση της L-σελεκτίνης (CD62 ligand), ενός βασικού υποδοχέα προσέλκυσης στα Τ-κύτταρα.Το γεγονός ότι η L-σελεκτίνη έχει μειωμένη έκφραση αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με την έκφραση της ADAM17 (αποδιαρθρωτική και μεταλλοπρωτεϊνάση 17) στα MDSCs. [(2)(15)]

Παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS):

Στην ανοσοκατασταλτική δράση των MDSCs βοηθούν επίσης η παραγωγή ROS και υπεροξυνιτρωδών (PNT). Μετά από μελέτες σε ανθρώπους με καρκίνο αλλά και ποντίκια με όγκο, σημειώθηκε αυξημένη έκφραση ROS σε MDSCs . Αυτή η αύξηση προκλήθηκε από αυξημένη λειτουργία οξειδάσης NADPH (NOX2). Η παραγωγή ROS και PNT κατηγορείται για το ότι τα Τ-κύτταρα δεν ανταποκρίνονται και δεν έχουν ανοχή, άρα η στόχευση παραγωγής τους είναι μια αρκετά υποσχόμενη θεραπευτική παρέμβαση, που θα ενίσχυε τα αποτελέσματα των ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων. [(2)(3)(27)]

Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεσολαβούμενη από τα G-MDSCs ανοσοκαταστολή απαιτεί συχνά ARG-1, ROS και PNT, ενώ τα M-MDSCs καταστέλλουν τις αντικαρκινικές αποκρίσεις μέσω του NO, της έκκρισης των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών IL-10 και TGF-β και της έκφρασης ανασταλτικών μορίων επιφάνειας, όπως το PDL-1.Συμπερασματικά, αυτοί οι μηχανισμοί ανοσοκαταστολής δεν δρουν ταυτόχρονα. Λόγω αυτής τους της ετερογένειας , η στόχευση αποτελεί δύσκολη υπόθεση. [(2)]

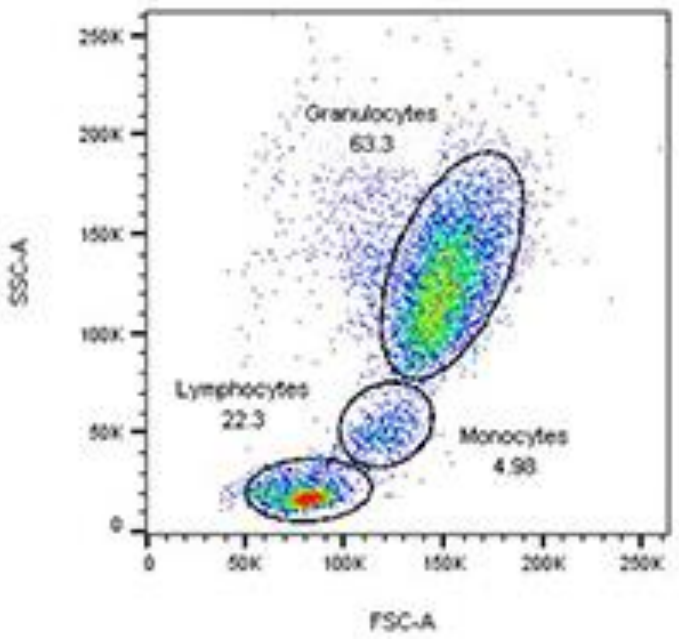
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ – GATING STRATEGY:

Εικόνα 5: *Κυτταρομετρητής ροής Navios EX Flow Cytometer,Beckman Coulter*

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική για ταχεία πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων σε διάλυμα. Για την ανάλυση μέσω της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FC) χρησιμοποιείται μια μονοχρωματική ακτινοβολία λέιζερ η οποία προσπίπτει στα κύτταρα κατά την διέλευσή τους ένα-ένα σε μια ροή που ονομάζεται νηματική ροή. Αυτή δημιουργείται λόγω της ροής ισότονου ρευστού (Sheath) γύρω απο αυτά σε έναν σωλήνα αναρρόφησης μικρής διαμέτρου. Κύρια λειτουργία του αποτελεί η απεικόνιση διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών από ένα ετερογενές εναιώρημα κυττάρων, αξιοποιώντας την τεχνική του ανοσοφθορισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθοριοχρώματα που προσδένονται σε ειδικούς αντιγονικούς επίτοπους των κυττάρων. [(16)(28)]

Όταν το εστιασμένο φως του λέιζερ έρθει σε επαφή με ένα κύτταρο/σωματίδιο, η ένταση της περίθλασης είναι ανάλογη του μεγέθους του σωματιδίου. Τα κυτταρόμετρα ροής περιλαμβάνουν φωτοδιόδους που συλλέγουν το φως που σκεδάζεται από το κύτταρο υπό δύο γωνιές: το Forward Scatter (FSC) και Side Scatter (SSC). Το FSC είναι ανάλογο με το μέγεθος του κυττάρου και μετράει την ακτινοβολία προς την ίδια ευθεία με εκείνη της δέσμης του laser, ενώ το SSC είναι ανάλογο με την κοκκίωση του κυττάρου και μετράει την ακτινοβολία σε γωνία 90° περίπου από την δέσμη του laser. [(12)(28)]

Αν γίνει συνδυασμός των παραμέτρων αυτών, διαχωρίζονται οι πληθυσμοί των μονοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων ανάλογα και με το ποσοστό του κάθε πληθυσμού και ως αποτέλεσμα θα παρθεί ένα διάγραμμα όπως το παρακάτω.

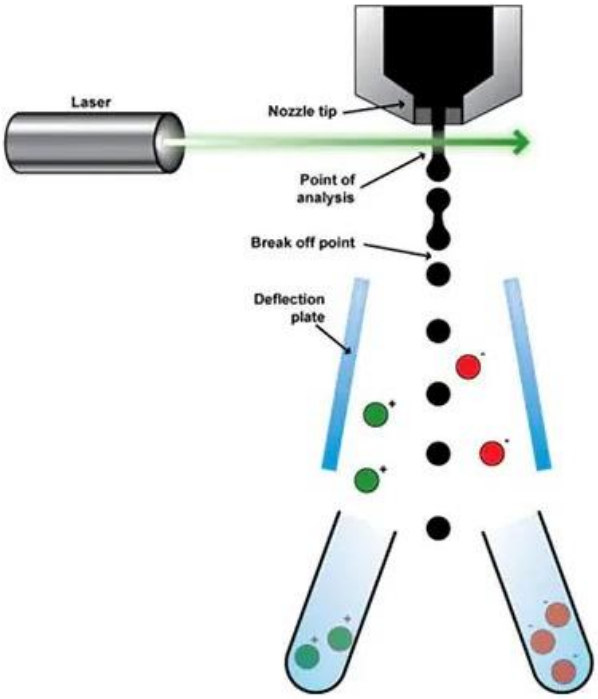


Εικόνα 6: *Διαχωρισμός διάφορων πληθυσμών μέσω κυτταρομετρίας ροής.* [29]

Κυτταρομετρητής (FACS):

Με τον κυτταρομετρητή, μπορεί να γίνει διαχωρισμός κυττάρων μέσω του φθορισμού κυττάρων από ένα ετερογενές δείγμα. Μετά από τοποθέτηση των συζευγμένων με αντίσωμα φθοριοχρωμάτων, το δείγμα περνά από στενό σωλήνα ταχείας ροής. Ακολούθως, περνά μέσα από τον μετρητή φθορισμού, όπου και γίνεται μέτρηση του φθορισμού του κάθε κυττάρου. Το δείγμα, αφού σπάσει σε μικρά σταγονίδια από δονούμενο μηχανισμό, αργότερα φορτίζεται από ηλεκτρικό φορτιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα φορτισμένα σταγονίδια να διαχωριστούν με βάση το φορτίο τους από το σύστημα ηλεκτροστατικής εκτροπής. [31]

Εικόνα 7: *Κυτταρομετρητής Sorter,BD Becton Dickinson FACS Aria III*

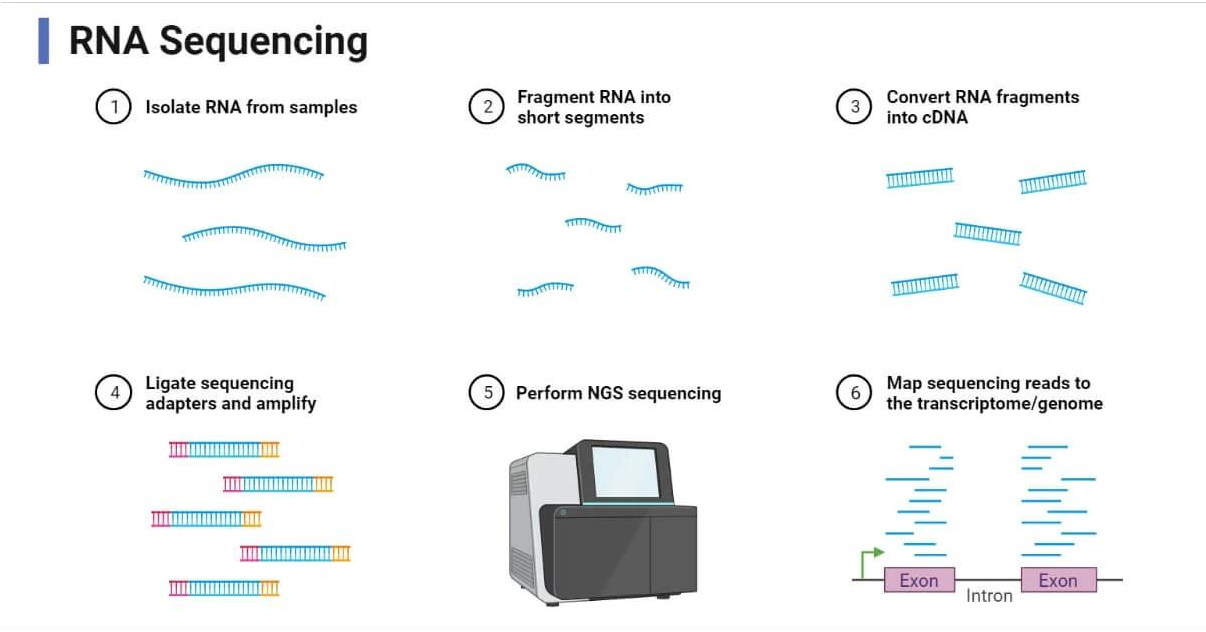


Εικόνα 8: *Διαχωρισμός μέσω sorting* [32]

RNA Sequencing:

Η RNA-Seq είναι τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση του μεταγραφώματος ενός κυττάρου ή ιστού. Περιλαμβάνει την αλληλούχιση μορίων RNA υψηλής απόδοσης για τη μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης και την ανακάλυψη νέων μεταγράφων. Μπορεί να εφαρμοστεί σε ολικό RNA ή σε συγκεκριμένα υποσύνολα RNA, όπως mRNA (mRNA-Seq), μικρά RNA (small RNA-Seq) ή RNA που έχει απομειωθεί από ριβοσωμικό RNA (total RNA-Seq). [33] [34]

Η αλληλούχιση RNA (RNA-Seq) των MDSCs είναι μια ισχυρή προσέγγιση που χρησιμοποιείται για την κατανόηση των προφίλ γονιδιακής έκφρασης, των ρυθμιστικών μονοπατιών και των λειτουργικών χαρακτηριστικών αυτών των ανοσοποιητικών κυττάρων.



Εικόνα 9: *RNA Sequencing* [35]

<u>ΜΕΘΟΔΟΙ:</u>

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΜΦΟΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ Η/ΚΑΙ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Για να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός γίνεται χρήση φικόλης, όπου αποτελεί ουδέτερο πολυσακχαρίτη μεγάλου μοριακού βάρους που διαλύεται εύκολα σε υδατικά διαλύματα.

- Σε ένα σωληνάριο Falcon 50ml προστίθεται το δείγμα (ολικό αίμα ή αφιλτράριστος μυελός οστών).
- Πραγματοποιείται αραίωση σε αναλογία 1:1 αίμα και 1:3 για μυελό με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. (Το succinate polybutylene (PBS) αποτελεί κατηγορία

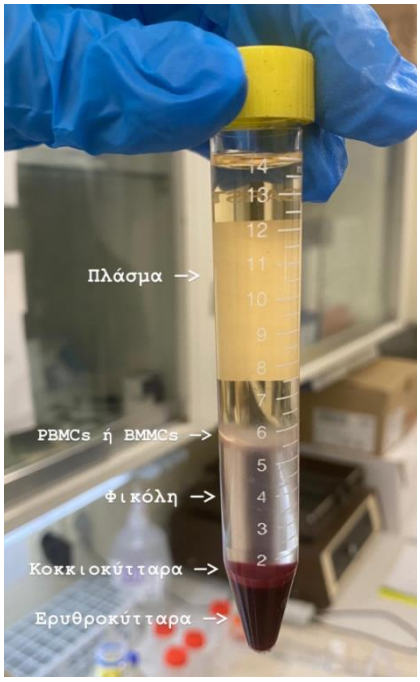
βιοδιασπώμενων αλειφατικών πολυεστέρων που προκύπτουν από το succinic acid και την 1,4 butanediol. Το PBS είναι από τα πιο χρησιμοποιούμενα πολυμερή λόγω του καλού συμβιβασμού της μηχανικής αντοχής, της σκληρότητας και της αντοχής στην κρούση. Χαρακτηρίζεται επίσης από αξιοσημείωτη θερμική αντοχή με θερμοκρασία θερμικής εκτροπής (HDT) άνω των 90 °C.) [30]

- Σε ένα σωληνάριο Falcon 15ml προστίθενται 5ml φικόλης και με πιπέτα των 10ml πραγματοποιείται επιστοίβαση του δείγματος μέχρι τα 15ml. Απαιτείται μεγάλη προσοχή αφού η επιστοίβαση πρέπει να γίνεται με αργό και σταθερό ρυθμό πάνω από τη φικόλη με νηματική ροή και να μην γίνει ανάμιξη των δύο φάσεων μεταξύ τους, αλλιώς τα συστατικά του αίματος/μυελού δεν θα διαχωριστούν επιτυχώς.

Εικόνα 10: *Μετά την επιστοίβαση. Πάνω παρατηρείται το αίμα/μυελός, και κάτω η φικόλη.*

- Ακολούθως, γίνεται φυγοκέντριση του δείγματος στα 1800rpm για 30 λεπτά χωρίς φρένα.

- Αφού η κλασματοποίηση έγινε με βάση την πυκνότητα, στο πάνω μέρος του σωληναρίου βρίσκεται το πλάσμα, μετά τα PBMCs ή τα BMMCs (Bone Marrow Mononuclear Cells), η φικόλη, τα κοκκιοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα.



Εικόνα 11: *Μετά την φυγοκέντριση*

- Απομόνωση του κλάσματος των PBMCs ή των BMMCs. Με μια πιπέτα Pasteur απομακρύνεται ένα μέρος του όγκου του πλάσματος και με μία πιπέτα Gilson 200-1000μl γίνεται διείσδυση στη φάση με τα PBMCsή τα BMMCs και με κυκλικές κινήσεις συλλέγονται τα κύτταρα τα οποία τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο Falcon των 50ml. Αποφεύγεται η επαφή κατά τη συλλογή των PBMCs ή των BMMCs με τη φάση της φικόλης ώστε να μη συλλεχθούν και άλλα κύτταρα που θα αποτελέσουν εμπόδιο στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.
- Γίνεται αραίωση του δείγματος με PBS μέχρι τα 20ml και γίνεται φυγοκέντριση στα 1600rpm για 10 λεπτά σε RT.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και εισάγονται 5ml PBS στο ίζημα. Σε σωληνάκι eppendorf μεταφέρονται 300-400μL από το δείγμα και στον αναλυτή αίματος Unicel DxH 800 της Beckman Coulter γίνεται καταμέτρηση των λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν. Μέσω της μέτρησης αυτής μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του δείγματος στην οποία εμπεριέχονται $1*10^6$ κύτταρα. Σε αυτόν τον αριθμό κυττάρων θα αναζητηθούν αργότερα οι συχνότητες των υποπληθυσμών των MDSCs.
- Το σωληνάριο Falcon των 50ml τοποθετείται στο ψυγείο για να μην χαλάσει.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MDSCs

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγεται η υπολογιζόμενη ποσότητα δείγματος, όπου εμπεριέχονται $1*10^6$PBMCs,καθώς και τα εξής μονοκλωνικά αντισώματα:

- CD33-PC7, Beckman Coulter (5μl)
- HLA-DR-ECD, Beckman Coulter (5μl)
- CD14-APC, Beckman Coulter (5μl)
- CD11b-FITC, Beckman Coulter (10μl)
- CD15-PE, Beckman Coulter (10μl)

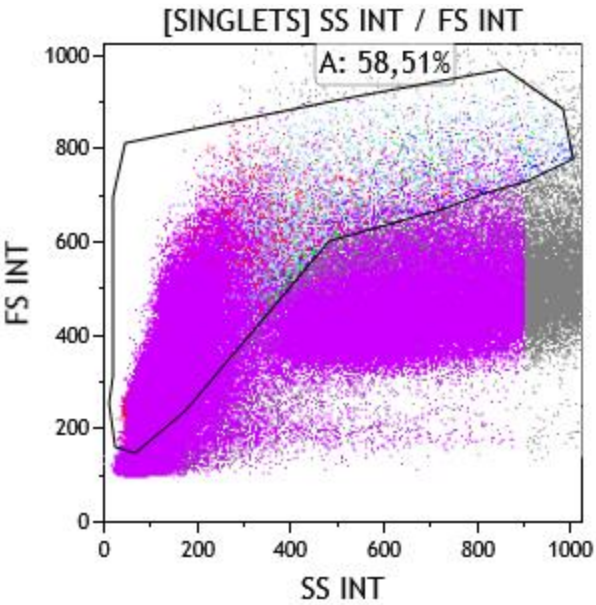
Γίνεται vortex και επώαση στο ψυγείο (4^oC) για 30 λεπτά. Μετά τα 30 λεπτά, γίνεται πλύσιμο των κυττάρων με PBS. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 1200rpm για 5 λεπτά σε RT. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, και στην πελέτα τοποθετούνται 350-400μl PBS. Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το δείγμα μεταφέρεται στον κυτταρομετρητή για ανάλυση.

<u>Gating Strategy:</u>

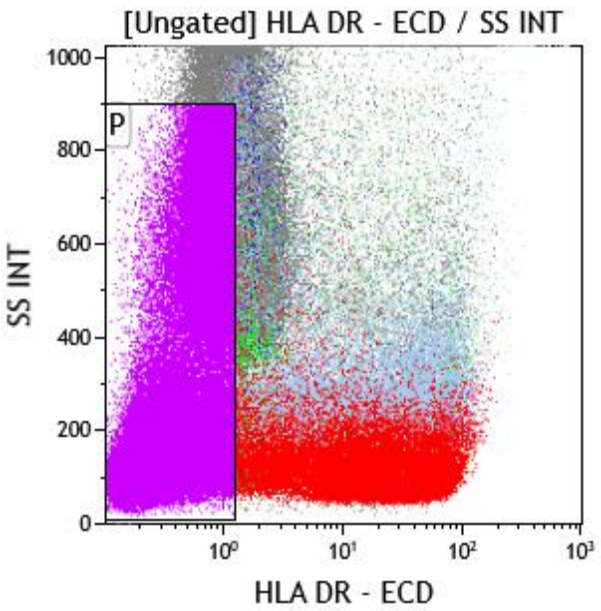
Όπως προαναφέρθηκε, τα MDSCs χαρακτηρίζονται ως HLA-DR ($^-$), CD11b($^+$), CD33$^+$, και μπορούν να διαχωριστούν μετέπειτα σε M-MDSCs (CD14$^+$) και G-MDSCs (CD15$^+$).

Για τον χαρακτηρισμό των MDSCs χρησιμοποιείται gating strategy. Παρακάτω ακολουθεί ένα παράδειγμα χρήσης του gating strategy.

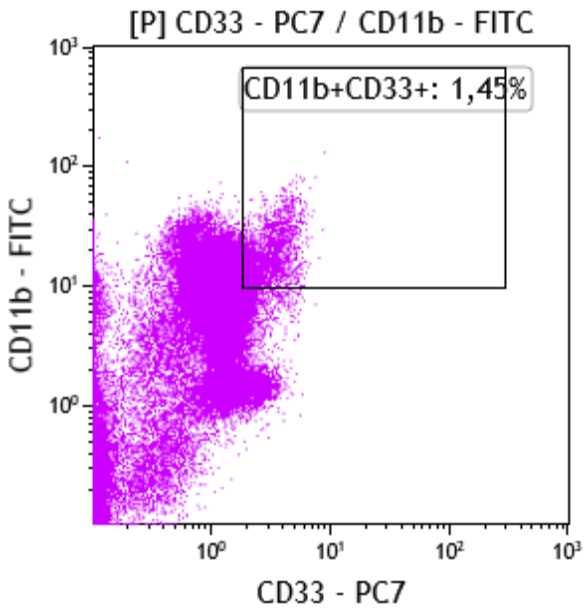
Αρχικά, εντοπίζονται τα MDSCs μέσω του πληθυσμού PBMCs υγιούς ατόμου.



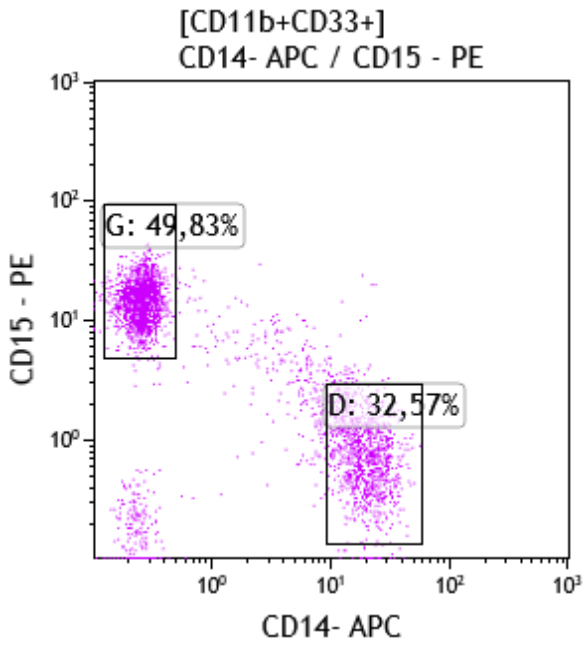
Plot 1: Σε συνάρτηση του μεγέθους (FSC) και της κοκκίωσης (SSC), γίνεται κατανομή των PBMCs που απομονώθηκαν από το αίμα. Αυτό αποτελεί το Gate A.



Plot 2: Εστιάζοντας στο Gate A, και σε συνάρτηση το HLA-DR ECD και το SSC, εντοπίζονται τα HLA-DR(-) κύτταρα.



Plot 3: Επιλέγεται ο πληθυσμός όπου τα κύτταρα είναι HLA-DR(-) και CD11b+CD33+ (πλυθησμός MDSCs)



Plot 4: Από το προηγούμενο gate διαχωρίζονται τα CD14+CD15- (M-MDSCs) και τα CD14-CD15+ (G-MDSCs). Άρα D: M-MDSCs και G: G-MDSCs.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΑΓΩΜΑΤΟΣ

- Παρασκευή freezing medium, 10% DMSO σε FBS και φυλάσσεται σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.
- Στο σωληνάριο Falcon των 50ml από το ψυγείο προσθέτουμε PBS εως τα 20ml και φυγοκέντριση στα 1600rpm για 10 λεπτά σε RT.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Επαναδιάλυση κάθε δείγματος το λιγότερο σε 2ml freezing medium και μεταφορά σε vials όπου αποθηκεύονται στους -80°C. Ο όγκος των vials είναι 1-1.5ml και ο αριθμός κυττάρων 5-10*10^{6} κύτταρα.

SORTING:

- Ξεπαγώνουμε το δείγμα με τοποθέτησή του στο υδατόλουτρο στους 37^{0}C.
- Πλύσιμο με buffer 10% FBS + PBS 50 ml.
- Φυγοκέντριση 10ml του μίγματος στα 1700rpm για 7 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση με 1ml buffer.
- Τοποθέτηση μονοκλωνικών αντισωμάτων των MDSCs, Vortex
    - CD33-PC7, Beckman Coulter (5μl)
    - HLA-DR-ECD , Beckman Coulter (5μl)
    - CD14-APC, Beckman Coulter (5μl)
    - CD11b-FITC, Beckman Coulter (10μl)
    - CD15-PE, Beckman Coulter (10μl)
- Επώαση στο ψυγείο για 30 λεπτά.
- Ξεπλένουμε μέχρι 20ml με το buffer.
- Φυγοκέντριση 1700rpm για 7 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Προσθήκη 1ml buffer.
- Αραίωση 1:1 με δείγμα – buffer για την διαδικασία του sorting και προσθήκη EDTA.
- Μετά την διαδικασία του sorting, γίνεται φυγοκέντριση των δειγμάτων σε 1700rpm για 10 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη buffer, όπου το buffer περιέχει 100μl RA1 και 2μl μερκαπτοαιθανόλη.
- Ψύξη δειγμάτων.

RNA EXTRACTION

- Ξεπαγώνουμε τα vials

- Ρύθμιση κατάστασης δέσμευσης RNA: προσθήκη 100μL αιθανόλης (70%) στο ομογενοποιημένο λύμα και ανάμιξη με χρήση πιπέτας και vortex
- Δέσμευση RNA: Για κάθε προετοιμασία παίρνουμε ένα NucleoSpin RNA XS Column που είναι τοποθετημένο σε στήλη συλλογής. Φόρτωση του λύματος στη στήλη και φυγοκένρτηση για 30seconds στα 11,000xg. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής (2ml). Η μέγιστη χωρητικότητα φόρτωσης του NucleoSpin RNA XS Column είναι τα 600μL. Αν ο όγκος είναι μεγαλύτερος από αυτόν γίνεται επανάληψη της διαδικασίας.
- Αφαλάτωση μεμβράνης σίλικα: Προσθήκη 100μL MDB (Membrane Desalting Buffer) και φυγοκέντριση για 30seconds στα 11,000xg για να στεγνώσει η μεμβράνη. Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί καινούργιος σωλήνας συλλογής μετα από αυτό το στάδιο.
- Γίνεται προετοιμασία του rDNase reaction mixture σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Για κάθε απομόνωση γίνεται προσθήκη 3μL ανασυγκροτημένου rDNase σε 27μL reaction buffer για rDNase. Γίνεται ανάμιξη με τίναγμα του σωληναρίου. Προσθήκη 25μL rDNase reaction mixture απευθείας στο κέντρο της σίλικα μεμβράνης της στήλης. Κλείσιμο του καπακιού, και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί καινούργιος σωλήνας συλλογής μετα από το στάδιο της επώασης.
- Πλύση και στέγνωμα σίλικα μεμβράνης – 1^{η} πλύση: Προσθήκη 100μL Buffer RA2 στο NucleoSpin RNA XS Column. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντριση για 30seconds στα 11,000xg. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής(2mL). Το Buffer RA2 θα απενεργοποιήσει την rDNase.
- Πλύση και στέγνωμα σίλικα μεμβράνης – 2^{η} πλύση: Προσθήκη 400μL Buffer RA3 στο NucleoSpin RNA XS Column. Φυγοκέντριση για 30seconds στα 11,000xg. Απόρριψη του υγρού και ξαναχρησιμοποιούμε το ίδιο σωληνάκι για την τρίτη πλύση.
- Πλύση και στέγνωμα σίλικα μεμβράνης – 3^{η} πλύση: Προσθήκη 200μL Buffer RA3 στο NucleoSpin RNA XS Column. Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στα 11,000xg για στέγνωμα της μεμβράνης. Τοποθέτηση της κολώνας σε nuclease-free σωλήνα συλλογής. Πετάμε το σωληνάκι και βάζουμε τη στήλη σε eppendorf.
- Έκλουση υψηλής καθαρότητας RNA: Έκλουση του RNA σε 10μL RNase-free H_2O. Φυγοκέντριση για 30seconds στα 11,000xg.
- Μεταφορά σε πάγο
- Πάγωμα στους -80°C.

Αποτελέσματα:

Έγινε έρευνα σε ασθενείς της αιματολογικής κλινικής του ΠΑΓΝΗ με διάγνωση DLBCL προ έναρξης θεραπείας, αλλά και σε υγιείς μάρτυρες.

Όπως έχουμε προαναφέρει, υψηλά επίπεδα MDSCs σχετίζονται με περιπτώσεις που παρατηρείται χρόνια φλεγμονή, όπως σε καρκίνους και λεμφώματα.

Οι υγιείς άνθρωποι έχουν χαμηλά επίπεδα MDSCs, επειδή το ανοσοποιητικό τους σύστημα λειτουργεί κανονικά και δεν έχουν να έρθουν αντιμέτωποι με φλεγμονή ή καρκινογένεση. Σε ασθενείς με λεμφώματα, υπάρχει αυξημένο ποσοστό MDSCs, λόγω του ότι ο καρκίνος προκαλεί διάφορες αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτά τα κύτταρα παρεμποδίζουν την σωστή λειτουργία των Τ-κυττάρων και των φαγοκυττάρων, που είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση του καρκίνου.

					BM			PB		
ΑΣΘΕΝΗΣ	ΗΜ.ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	IPI	ΣΤΑΔΙΟ ΝΟΣΟΥ	total MDSCs %	CD14+CD15- %	CD14-CD15+ %	total MDSCs %	CD14+CD15- %	CD14-CD15+ %
1	1990	33	0	IA	0.18	40.6	12.41	0.31	3.3	2.4
2	1959	64	1	II	1.97	88.65	2.46	0.35	89.08	2.29
3	1956	67	3	IIIA	5.73	82.65	2.71	12.71	94.51	1.09
4	1940	83	3	II	2.76	80.59	8.66	3.79	83.9	8.8
5	1953	70	1	II	0.16	14.95	15.49	3.85	95.96	2.24
6	1960	63	1	III	5.24	73.72	1.09	10.44	95.5	1.54
7	1942	81	3	IIB				0.16	5.51	87.5
8	1955	68	1	IA				0.87	68.22	29.67
9	1948	75	4	IIIB				5.45	83.45	12.32
10	1936	87	1	IA				1.52	42.57	42.61
11	1957	66	3	IIIB				1.8	52.92	41.82

Πίνακας 1: *Στατιστικά αποτελέσματα των συνολικών MDSCs, M-MDSCs και G-MDSCs για BM και PB κάθε ασθενούς, καθώς και χαρακτηριστικά τους (ημερομηνία γέννησης, ηλικία, IPI, στάδιο νόσου).*

NORMAL	PB		
	total MDSCs %	**CD14+CD15- %**	**CD14- CD15+ %**
1	0.04	63.95%	0.00
2	0.02	92.45	5.66
3	0.01	100.00	0.00
4	0.04	96.55	0.00
5	0.01	94.64	1.79
6	0.01	100.00	0.00
7	0.06	93.83	0.00
8	0.03	93.26	2.59
9	0.05	60.47	0.00
10	0.02	100	0.00
11	0.02	80.95	0.00
12	0.01	72.73	9.09

Πίνακας 2: *Στατιστικά αποτελέσματα για normal ασθενείς για σύγκριση με παθόντες. Παρατηρούνται τα total MDSCs, M-MDSCs και G-MDSCs από PB.*

Πράγματι, και από τα στατιστικά αποτελέσματα, φαίνεται ότι οι υγιείς μάρτυρες έχουν σχεδόν μηδενικές συγκεντρώσεις MDSCs, σε αντίθεση με τους ασθενείς, που κυμαίνονται από 0.16 - 5.73 στον μυελό των οστών (BM) και 0.16 – 12.71 στο περιφερικό αίμα (PB).

Συμπεραίνοντας, η αυξημένη συγκέντρωση MDSCs σε ασθενείς με λεμφώματα πιθανώς να συσχετίζεται με την ανοσοκαταστολή που αφήνει τον καρκίνο να αναπτυχθεί χωρίς παρεμβολεές από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Στο μυελό των οστών (BM), από εκεί που προέρχονται δηλαδή, τα MDSCs είναι περισσότερο διασκορπισμένα και λιγότερο προσιτά σε σχέση με το αίμα (PB) . Ως αποτέλεσμα, η αύξηση των MDSCs στο αίμα είναι πιο ευδιάκριτη και εύκολα μετρήσιμη σε σχέση με το μυελό των οστών. Επιπλέον, αυτή η αύξηση μπορεί και να οφείλεται στην μετακίνησή τους από το μυελό των οστών στο αίμα, όπου εκεί ασκούν τον ρόλο τους στην ανοσοκαταστολή.

Αυτό εξακριβώνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα, αφού υπάρχει μια αύξηση στο PB σε σύγκριση με το BM (0.16 – 12.71 και 0.16 - 5.73).

Γενικά, η παρατήρηση αυξημένων επιπέδων MDSCs στο αίμα σε σχέση με το μυελό των οστών μπορεί να οφείλεται στην ανοσοκαταστολή και τον ρόλο τους στην παθολογία που σχετίζεται με τον καρκίνο και άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Η επίσης παρατηρούμενη αύξηση των M-MDSCs σε σχέση με τα G-MDSCs μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες και μηχανισμούς:

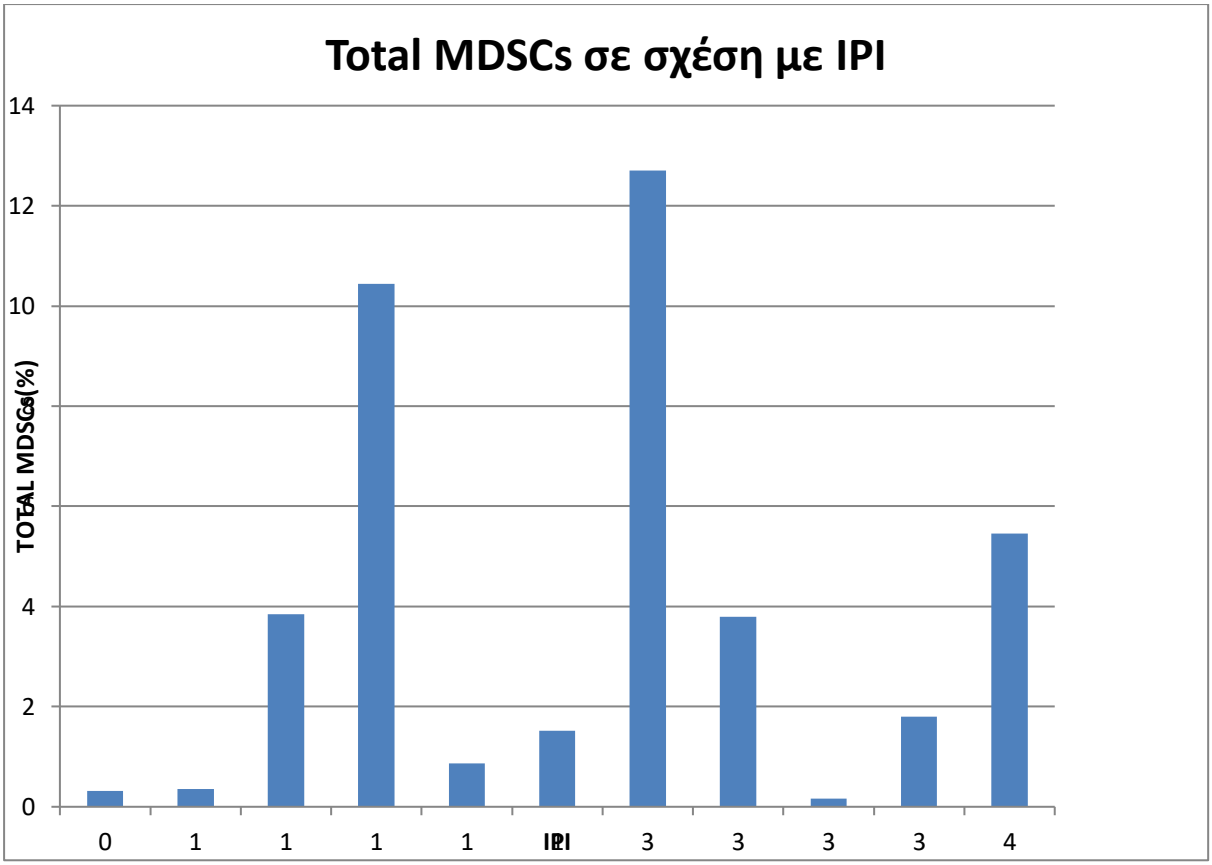
1. Διαφορετική προέλευση: Τα M-MDSCs προέρχονται κυρίως από μονοκύτταρα προγεννητικά κύτταρα και τείνουν προς την κατεύθυνση των μονοκυττάρων, ενώ τα G-MDSCs προέρχονται από προγεννητικά κύτταρα νευροφίλων και είναι περισσότερο γρανουλοκυτταρικής κατεύθυνσης.

2. Διαφορετικές λειτουργίες: Μπορεί να συμβάλλουν διαφορετικά στην ανοσοκαταστολή. Για παράδειγμα, τα M-MDSCs μπορεί να επηρεάζουν τις λειτουργίες των Τ-κυττάρων και να εμποδίζουν την ανοσιακή απόκριση, ενώ τα G-MDSCs ενδέχεται να έχουν άλλους τρόπους ανοσοκαταστολής.

3. Παθολογικές καταστάσεις: Η αύξηση αυτή μπορεί να παρατηρείται σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως ορισμένοι τύποι καρκίνου. Τα M-MDSCs ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτές τις καταστάσεις.

Συνοψίζοντας, η αύξηση των M-MDSCs σε σχέση με τα G-MDSCs μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες και να σχετίζεται με τη παθολογία και την φυσιολογία των MDSCs σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις.

Στη συνέχεια, έγινε συσχέτιση του συνολικού αριθμού MDSCs με διάφορους παράγοντες.



Διάγραμμα 1: *Σύγκριση Total MDSCs σε σχέση με IPI*

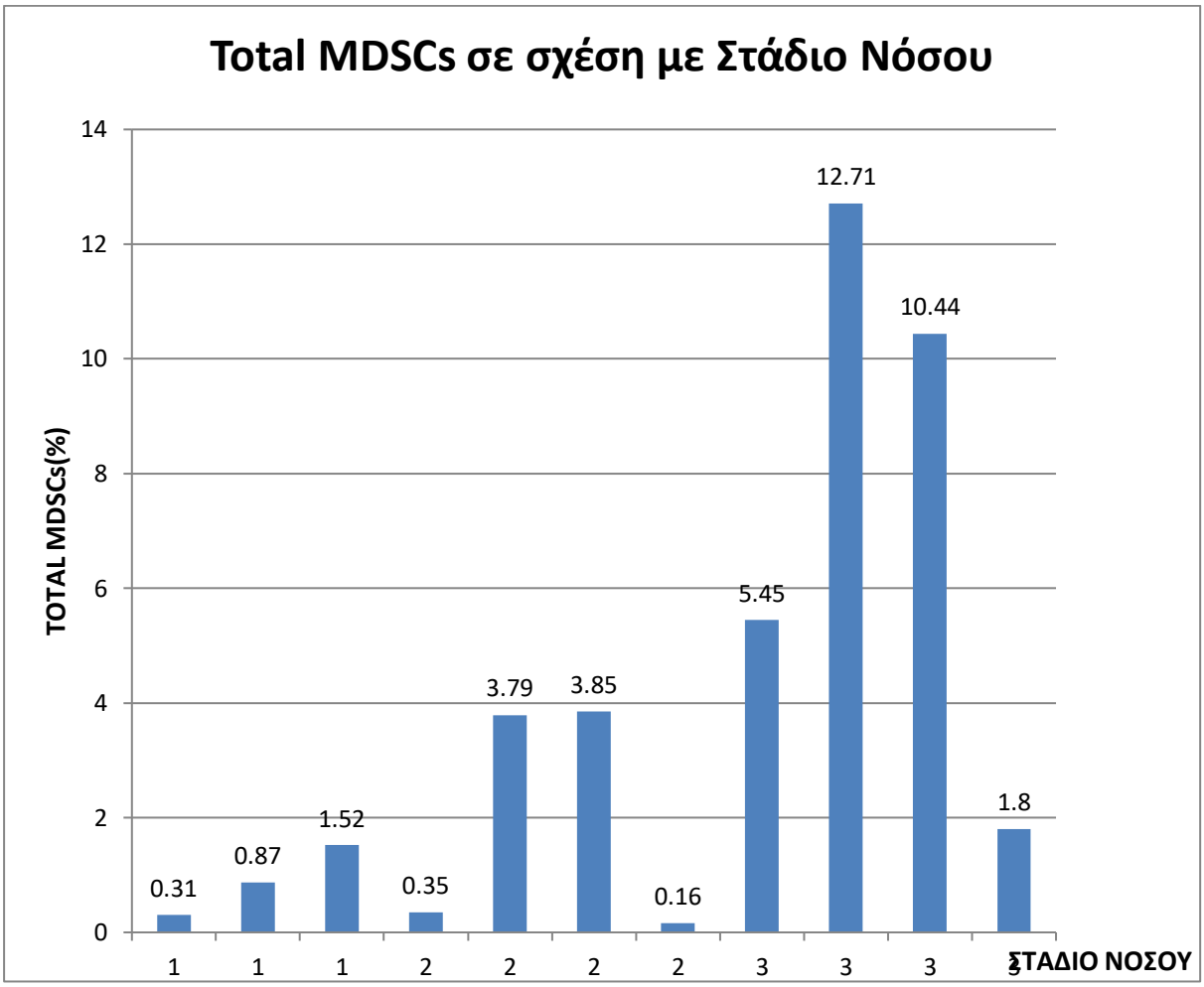
Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, δεν φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη σχέση μεταξύ τον συνολικό αριθμό MDSCs σε σχέση με το IPI. Παρόλα αυτά, σε μεγαλύτερο IPI παρατηρείται αυξημένος αριθμός MDSCs.

Το IPI "International Prognostic Index" ή "Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης", είναι δείκτης που χρησιμοποιείται στην ογκολογία για να προβλέψει την πρόγνωση ασθενών με κακοήθεις όγκους, κυρίως σε λεμφώματα. Ο IPI αξιολογεί κάποιες παραμέτρους του ασθενούς, όπως η ηλικία, το στάδιο της νόσου, τη γενική κατάσταση του ασθενούς, τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων, και την τιμή της LDH, για να κατατάξει τον ασθενή σε μια από τις τέσσερις κατηγορίες ρίσκου. Ο IPI βοηθά τους ιατρούς να αποφασίσουν τον καλύτερο τρόπο αντιμετώπισης του λεμφώματος για την πρόγνωση του ασθενούς. [36]

Στα λεμφώματα, οι ασθενείς με υψηλό IPI έχουν χειρότερη πρόγνωση και υψηλότερο βαθμό κακοήθειας. Με λίγα λόγια, η νόσος τους είναι πιο επιθετική και μπορεί να συνοδεύεται από αυξημένη φλεγμονή και ανοσοκαταστολή.

Η αύξηση των MDSCs, και πιο συγκεκριμένα των M-MDSCs σε ασθενείς με υψηλό IPI μπορεί να είναι αποτέλεσμα της παθολογίας της νόσου και της ανοσοκαταστολής που το συνοδεύει, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις. Τα MDSCs αυξάνονται σε περιπτώσεις

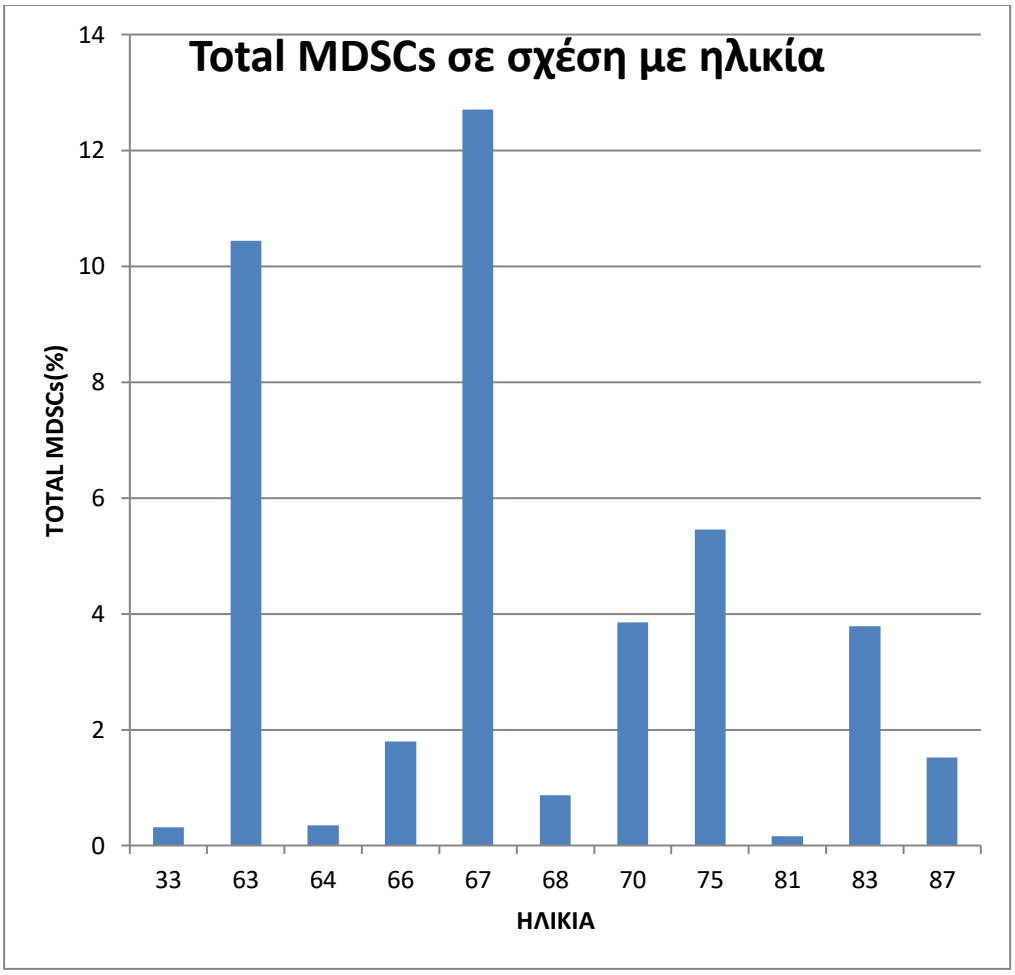
φλεγμονής και καρκίνου, και αυτή η αύξηση πιθανόν να είναι έντονη σε περιπτώσεις υψηλού IPI, δείχνοντας έτσι τη σχέση μεταξύ της ανοσοκαταστολής και της σοβαρότητας της νόσου.



Διάγραμμα 2: *Σύγκριση Total MDSCs σε σχέση με Στάδιο Νόσου*

Όπως προαναφέρθηκε, το υψηλότερο IPI συνδέεται συχνά με χειρότερη πρόγνωση και πιο προχωρημένα στάδια νόσου του λεμφώματος, και αυξημένη συγκέντρωση MDSCs μπορεί να συνοδεύει την χειρότερη πρόγνωση.

Πράγματι, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, σε αυξημένο στάδιο νόσου υπάρχει και αύξηση της συγκέντρωσης των MDSCs.

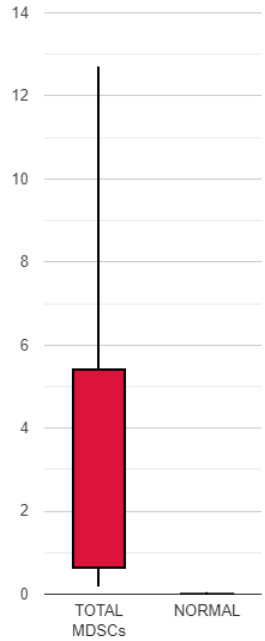


Διάγραμμα 3: *Σύγκριση Total MDSCs σε σχέση με ηλικία*

Στα λεμφώματα, ο IPI συμπεριλαμβάνει την ηλικία του ασθενούς ως έναν από τους παράγοντες πρόγνωσης. Συνήθως, οι ηλικιωμένοι ασθενείς έχουν υψηλότερο IPI, που μπορεί να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, και άρα αυξημένο αριθμό MDSCs. Αυτό όμως δεν παρατηρείται πάντα.

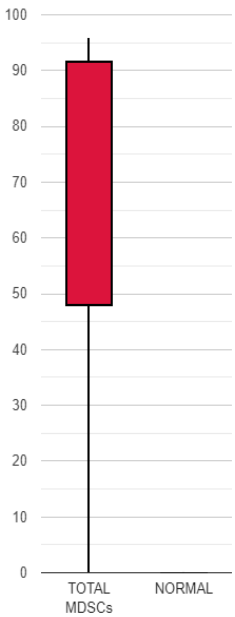
Σε γενικές γραμμές, η ηλικία μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των MDSCs σε ασθενείς, αλλά όπως και πολλοί άλλοι παράγοντες. Ο αριθμός των MDSCs μπορεί να είναι διαφορετικός ακόμα και μεταξύ ατόμων της ίδιας ηλικίας, ανάλογα με την υγεία του ατόμου, τον τύπο της νόσου που αντιμετωπίζει και την φλεγμονώδη κατάσταση του οργανισμού.

Τέλος, έγινε σύγκριση των παθόντων και υγειών μάρτυρων στον συνολικό αριθμό των MDSCs, M-MDSCs και G-MDSCs, με τη χρήση της μεθόδου TTEST και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

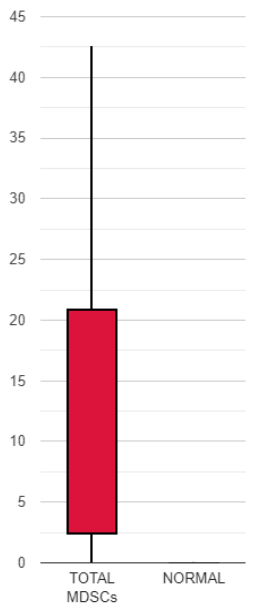


Συσχέτιση Total MDSCs με normal MDSCs

(0.015815207)



Συσχέτιση M-MDSCs με normal MDSCs (0.000100253)



Συσχέτιση G-MDSCs με normal MDSCs (0.028211809)

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι οι διαφορές στις τιμές των πληθυσμών αυτών σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες είναι στατιστικώς σημαντικά και συνεπώς ο συνολικός αριθμός των MDSCs καθώς και των υποπληθυσμών αυτών φαίνεται να αυξάνεται με την παρουσία της νόσου.

RNA Sequencing:

Πραγματοποιήθηκε RNA Sequencing έπειτα από το RNA extraction, τα αποτελέσματα του οποίου δεν είναι έτοιμα λόγω μεγάλου φόρτου εργασίας του συνεργαζόμενου εργαστηρίου. Για τον λόγο αυτό και δεν θα συμπεριληφθούν στην παρούσα πτυχιακή εργασία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Αποδείχθηκε ότι οι ασθενείς με DLBCL λέμφωμα είχαν αυξημένη συγκέντρωση MDSCs σε σχέση με τους υγιείς, καθώς και ότι τα M-MDSCs είχαν επίσης αυξημένη συγκένρωση σε σχέση με τα G-MDSCs.Επιπλέον, τα MDSCs ήταν πιο αυξημένα στο αίμα από ότι στον μυελό των οστών. Έγινε σύγκριση του αριθμού MDSCs με την ηλικία, το IPI και το στάδιο νόσου και βρέθηκε πως με αύξηση των τριών αυτών παραμέτρων, δεν παρατηρήθηκε μια επίσης αύξηση στον συνολικό αριθμό MDSCs σε όλες τις περιπτώσεις.

Τα MDSCs αποτελούν ρυθμιστές ,οι οποίοι παρεμποδίζουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή κατά του όγκου μέσω της αναστολής πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων, της έκκρισης κυτταροκινών και της στρατολόγησης των ρυθμιστικών Τ κυττάρων στις αιματολογικές κακοήθειες, παρόμοια με τις δράσεις τους στους συμπαγείς όγκους. Αυτός είναι και ένας από τους βασικότερους στόχους στη χημειοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία. Όμως, ο βιολογικός τους ρόλος μπορεί να επιβεβαιωθεί όταν γίνει ανάπτυξη μεθόδων για την συγκεκριμένη στόχευση αυτών των κυττάρων. Αυτό προϋποθέτει την ταυτοποίηση ειδικών δεικτών των κυττάρων αυτών, κάτι που θα ήταν δυνατό αν χαρακτηρίζονταν καλύτερα οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών. Η περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων κυττάρων μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση των λεμφωμάτων.

Βιβλιογραφία

1. Betsch, A., Rutgeerts, O., Fevery, S., Sprangers, B., Verhoef, G., Dierickx, D., & Beckers, M. (2018). Myeloid-derived suppressor cells in lymphoma: The good, the bad and the ugly. *Blood Reviews*, *32*(6), 490–498. https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.04.006
2. Papafragkos, I., Markaki, E., Kalpadakis, C., & Verginis, P. (2021). Decoding the Myeloid-Derived suppressor cells in lymphoid malignancies. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(16), 3462. https://doi.org/10.3390/jcm10163462
3. Condamine, T., & Gabrilovich, D. I. (2011). Molecular mechanisms regulating 0myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in Immunology, 32(1), 19–25.* doi:10.1016/j.it.2010.10.002
4. Coupland, S. E. (2011). The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology*, *58*(1), 69–80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03706.x
5. Dumitru, C. A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S., & Brandau, S. (2012). Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(8), 1155–1167. https://doi.org/10.1007/s00262-012-1294-5
6. Gray, D. H., Vaux, D. L., & Strasser, A. (2019). The 2019 Lasker Award: T cells and B cells, whose life and death are essential for function of the immune system. *Cell Death & Differentiation*, *26*(12), 2513–2515. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0432-4
7. Khalifa, K. A., Badawy, H., Radwan, W. M., Shehata, M., & Bassuoni, M. a. E. (2014). $CD14^{+}$HLA-DR low/$^{-}$monocytes as indicator of disease aggressiveness in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Laboratory Hematology*, *36*(6), 650–655. https://doi.org/10.1111/ijlh.12203

8. Urquhart, A. C., & Berg, R. L. (2001). Hodgkin???s and Non-Hodgkin???s Lymphoma of the Head and Neck. *Laryngoscope*, *111*(9), 1565–1569. https://doi.org/10.1097/00005537-200109000-00013
9. Lin, Y., Gustafson, M. P., Bulur, P. A., Gastineau, D. A., Witzig, T. E., & Dietz, A. B. (2011). Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/− monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, *117*(3), 872–881. https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283820
10. Liu, Y., Zhou, X., & Wang, X. (2021). Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma: challenges and opportunities. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s13045-021-01134-x
11. Lv, M., Wang, K., & Huang, X. (2019). Myeloid-derived suppressor cells in hematological malignancies: friends or foes. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s13045-019-0797-3
12. Lacombe F., Bene MC. Flow Cytometry in Clinical Haematopathology: Basic 53 Principles and Data Analysis of Multiparameter Data Sets. In: Porwit A, Béné MC, editors. Multiparameter Flow cytometry in the diagnosis of hematologic malignancies. Cambridge University Press, 2018. p. 1-13.
13. Mandruzzato, S., Brandau, S., Britten, C. M., Bronte, V., Damuzzo, V., Gouttefangeas, C., Maurer, D., Ottensmeier, C., Van Der Burg, S. H., Welters, M. J., & Walter, S. (2016). Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *65*(2), 161–169. https://doi.org/10.1007/s00262-015-1782-5
14. Gabrilovich, D. I. (2017). Myeloid-Derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research*, *5*(1), 3–8. https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0297

15. Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2018). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer*, *120*(1), 16–25. https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1
16. Martínez, A., Aymerich, M., Castillo, M., Colomer, D., Bellosillo, B., Campo, E., & Villamor, N. (2003). Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies. *Cytometry Part B-clinical Cytometry*, *56B*(1), 8–15. https://doi.org/10.1002/cyto.b.10044
17. Decruyenaere, P., Offner, F., & Vandesompele, J. (2021). Circulating RNA biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Experimental Hematology & Oncology*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/s40164-021-00208-3
18. Tilly, H., Da Silva, M. G., Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., López-Guillermo, A., Walewski, J., Andre, M., Johnson, P., Pfreundschuh, M., & Ladetto, M. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *26*, v116–v125. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv304
19. Verma, A., Jiang, Y., Du, W., Fairchild, L., Melnick, A., & Elemento, O. (2015). Transcriptome sequencing reveals thousands of novel long non-coding RNAs in B cell lymphoma. *Genome Medicine*, *7*(1). https://doi.org/10.1186/s13073-015-0230-7
20. Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2010). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, *12*(2), 87–98. https://doi.org/10.1038/nrg2934
21. Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, *380*(9844), 848–857. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60605-9

22. Van Zelm, M. C., Van Der Burg, M., Langerak, A. W., & Van Dongen, J. J. M. (2011). PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*, *2*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00012
23. Banchereau, J., Brière, F., Liu, Y. J., & Rousset, F. (1994). Molecular control of B Lymphocyte growth and differentiation. *Stem Cells*, *12*(3), 278–288. https://doi.org/10.1002/stem.5530120304
24. Veglia, F., Perego, M., & Gabrilovich, D. I. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, *19*(2), 108–119. https://doi.org/10.1038/s41590-017-0022-x
25. Epomedicine. (2021, February 20). *Cluster of Differentiation (CD markers) mnemonics*. https://epomedicine.com/medical-students/cluster-differentiation-cd-markers-mnemonics/
26. Armitage, J. O. (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, *89*(11), 3909–3918. https://doi.org/10.1182/blood.v89.11.3909
27. Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *9*(3), 162–174. https://doi.org/10.1038/nri2506
28. McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. Current Protocols in Immunology, 120, 5.1.1–5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40
29. *Flow Cytometry Core*. (n.d.). The University of Arizona College of Medicine – Phoenix. https://phoenixmed.arizona.edu/flow-cytometry
30. Barletta, M., Aversa, C., Ayyoob, M., Gisario, A., Hamad, K., Mehrpouya, M., & Vahabi, H. (2022). Poly(butylene succinate) (PBS): Materials, processing, and

industrial applications. *Progress in Polymer Science*, *132*, 101579. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2022.101579

31. Herzenberg, L. A., Parks, D. R., Sahaf, B., Perez, O. D., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry*, *48*(10), 1819–1827. https://doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1819
32. *Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of live cells | abcam*. (2023, September 29). https://www.abcam.com/protocols/fluorescence-activated-cell-sorting-of-live-cells
33. Mortazavi, A., Williams, B., McCue, K. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods 5, 621–628 (2008). https://doi.org/10.1038/nmeth.1226
34. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, *28*(5), 511–515. https://doi.org/10.1038/nbt.1621
35. Dahal, P. (2023). RNA sequencing- Definition, Principle, Steps, Types, uses. *Microbe Notes*. https://microbenotes.com/rna-sequencing-principle-steps-types-uses/
36. Wight, J., Chong, G., Grigg, A., & Hawkes, E. A. (2018). Prognostication of diffuse large B-cell lymphoma in the molecular era: moving beyond the IPI. *Blood Reviews*, *32*(5), 400–415. https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.03.005