



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Α.Χ. Λάζαρης Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και
Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»

Διευθυντής ΠΜΣ

Α.Χ. Λάζαρης Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: Ποσοτικός & Ποιοτικός Χαρακτηρισμός των Μυελικών
Κατασταλτικών Κυττάρων (Myeloid-Derived Suppressor Cells – MDSCS)
στο Ομφαλο-Πλακουντιακό Αίμα (Umbilical Cord Blood – UCB)**

Όν/μο: Μαστρογαμβράκη Ναταλία

Αρ. μητρώου: 20190636

Ιδιότητα: Βιολόγος

Επιβλέπων ΜΔΕ: Παπαδάκη Ελένη

Επιβλέπων υποψήφιος διδάκτορας: Μπιζύμη Νικολέτα

1^ο ΦΥΛΛΟ (Εσώφυλλο)

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΑ

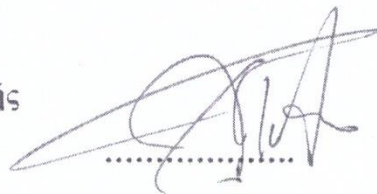
ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Παπαδάκη Ελένη (Επιβλέπων) Καθηγήτρια Αιματολογίας – Δ/ντρια
Αιματολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ

ΕΛΕΝΗ Α. ΠΑΠΑΔΑΚΗ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
Δ/ΝΤΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΓΙΑ Γ.Ν.Π. ΑΜΠΕΛΟΚΗΦΕΩΝ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ
ΑΡΙΘΜΟΣ: 1999603920

Ποντίκογλου Χαράλαμπος

Αναπληρωτής καθηγητής
Αιματολογίας
.....



Βεργίνης Παναγιώτης

Αναπληρωτής καθηγητής
Βιοχημείας
.....

Panagi
otis
Verginis

Digitally signed
by Panagiotis
Verginis
Date:

2021.09.30
12:09:28 +03'00'

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΣΚΟΠΟΣ.....	4
ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	4
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	5
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	6
ΣΚΟΠΟΣ.....	8
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	9
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	9
ΧΩΡΟΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	9
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	9
ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	10
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	18
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	18
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα Μυελικά Κατασταλτικά Κύτταρα (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSCs) είναι ανοσορρυθμιστικά κύτταρα που διακρίνονται στους HLA-DR^{low/-}/CD11b⁺/CD33⁺/CD15⁺ πολυμορφοπυρηνικούς (PMN-MDSCs) και HLA-DR^{low/-}/CD11b⁺/CD33⁺/CD14⁺ μονοκυτταρικούς (M-MDSCs) υπο-πληθυσμούς. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζει ανοσοκατασταλτικά χαρακτηριστικά που προστατεύουν το έμβρυο από τη μητρική απόρριψη. Αναφέρεται ότι τα MDSCs έχουν ρόλο στην ανοσοκατασταλτική αυτή διαδικασία και για τον λόγο αυτό, πιθανότατα, παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα στο αίμα της μητέρας στη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά και στο ομφαλο-πλακουντιακό αίμα.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμηθεί ο αριθμός των MDSCs στο ομφαλικό αίμα (Umbilical Cord Blood, UCB) τελειόμηνων κυήσεων καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητά τους στο UCB. Τα δεδομένα θα συμβάλλουν σε μελέτες ενδεχόμενης χορήγησης MDSCs στα πλαίσια νέων κυτταρικών θεραπειών.

ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκαν 39 μονάδες UCB από τελειόμηνες κυήσεις, καθώς και από το περιφερικό αίμα (ΠΑ) των μητέρων. Οι υπο-πληθυσμοί μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων με το συνδυασμό αντισωμάτων CD33-PC7/CD15-PC5/HLA-DR-ECD/CD14-PE/CD11b-FITC και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Kaluza. Προσδιορίστηκε επίσης ομοίως ο πληθυσμός των UCB-CD34⁺ κυττάρων με το συνδυασμό CD34-PE/CD45-FITC. Καταγράφηκαν επίσης η ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό, το βάρος και το φύλο του νεογνού, το βάρος της μονάδας UCB, και ο χρόνος που πέρασε από τη συλλογή του UCB έως και την επεξεργασία του για την μέτρηση των MDSCs. Η στατιστική

ανάλυση έγινε όσο αφορά τις συσχετίσεις με Spearman correlation αλλά και με τη μη-παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney, με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα PMN-MDSCs του UCB ($1.33\% \pm 4.17$, μέσος όρος \pm σταθερή απόκλιση) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τα UCB-CD34⁺ κύτταρα ($0.40\% \pm 0.33$, $r=0.5444$, $p=0.0006$), τα PMN-MDSCs της μητέρας ($2.48\% \pm 6.92$, $r=0.4678$, $p=0.0031$), και οριακά μη στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό ($r=0.3169$, $p=0.056$). Τα M-MDSCs του UCB ($2.35\% \pm 2.42$) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το βάρος του νεογνού (2420g έως 4070g, $r=0.3369$, $p=0.036$), το βάρος της μονάδας (70gr έως 120gr, $r=0.5501$, $p=0.0003$), και με τα UCB-CD34⁺ κύτταρα ($r=0.3696$, $p=0.0265$), αλλά όχι με τα M-MDSCs της μητέρας ($4.02\% \pm 3.55$). Το φύλο του νεογνού και ο χρόνος από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της δεν επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά τους υπό μελέτη πληθυσμούς.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, οι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των MDSCs στο UCB είναι η εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό, το βάρος της μονάδας και του νεογνού και ο πληθυσμός των UCB-CD34⁺ κυττάρων. Η συσχέτιση των UCB-MDSCs με αυτά της μητέρας πιθανότατα δείχνει ότι ίδιοι παράγοντες επηρεάζουν τον αριθμό τους. Στα επόμενα βήματά μας είναι η μελέτη των λειτουργικών χαρακτηριστικών των UCB-MDSCs και η συσχέτισή τους με τις ανωτέρω παραμέτρους. Οι μονάδες UCB που δεν είναι κατάλληλες για αλλογενή μεταμόσχευση μπορούν να αποτελέσουν πλούσια πηγή MDSCs και η γνώση των παραμέτρων που επηρεάζουν τον αριθμό και την ποιότητα των κυττάρων αυτών είναι σημαντική.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μυελικά κατασταλτικά κύτταρα (Myeloid-Derived Suppressor Cells-**MDSCs**) χαρακτηρίζονται από τη μυελική προέλευσή τους, την ανώριμη κατάστασή τους και την ανοσοκατασταλτική τους δράση. Αρχικά τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως φυσικά κατασταλτικά ή μηδενικά (null) κύτταρα λόγω της απουσίας επιφανειακών δεικτών των T-κυττάρων, B-κυττάρων, φυσικών φονικών κυττάρων (NK) και των μακροφάγων. Αργότερα χαρακτηρίστηκαν ως ανώριμα μυελικά κύτταρα ή μυελικά κατασταλτικά κύτταρα για να δηλώσουν τις κύριες βιολογικές τους ιδιότητες. Το 2007, ο όρος MDSCs εισήχθη ως ο καλύτερος για να αντικατοπτρίζει την προέλευση και το λειτουργικό χαρακτήρα αυτών των κυττάρων παρά την ετερογένεια στα φαινοτυπικά, γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους (Zhao Y. et al., 2016).

Τα MDSCs συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό άλλοτε με αρνητικό και άλλοτε με θετικό ρόλο κατά τη διάρκεια πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως στον καρκίνο, σε άλλες ασθένειες που σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή (π.χ. μολυσματικές ασθένειες, αυτό-άνοσα νοσήματα, βλάβες ιστών κλπ) και στη νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Graft versus Host Disease – GvHD). Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια, έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί ανοσοτροποποιητικοί ρυθμιστές, πιθανοί βιοδείκτες και ακόμη και θεραπευτικοί στόχοι για τις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις. Στους ανθρώπους, τα MDSCs αναγνωρίζονται με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής ως $CD11b^+CD33^+HLA-DR^{-low}$ κύτταρα, και αποτελούν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που περιλαμβάνει τα μονοκυτταρικά MDSCs (Monocytic-MDSCs, **M-MDSCs**), τα οποία εκφράζουν τον CD14 επιφανειακό δείκτη, και τα πολυμορφοπυρηνικά MDSCs (Polymorphonuclear-MDSCs, **PMN-MDSCs**) που εκφράζουν τον CD15 επιφανειακό δείκτη. Τα M-MDSCs είναι μορφολογικά πανομοιότυπα με τα συμβατικά μονοκύτταρα από τα οποία μπορούν να διακριθούν με βάση την έκφραση του HLA-DR. Αντίστοιχα τα PMN-MDSCs μπορούν να διακριθούν από τα συμβατικά PMN με βάση τις ιδιότητες χαμηλής πυκνότητας μετά από φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας καθώς επίσης και από την έκφραση του οξειδωμένου υποδοχέα LDL 1 τύπου λεκτίνης (LOX-1). (Bizymi N. et al., 2019).

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η παραγωγή και η συσσώρευση των MDSCs πραγματοποιείται υπό φλεγμονώδεις καταστάσεις όταν υπάρχει αυξημένη ζήτηση για μυελικά κύτταρα (μυελοποίηση έκτακτης ανάγκης). Στη συνέχεια, επεκτείνονται ως ανώριμα κύτταρα στο μυελό των οστών (Bone Marrow - BM) ή ακόμα και εξωμυελικά (κυρίως στον σπλήνα) και μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα (Peripheral Blood - PB) όπου η τελική τους διαφοροποίηση μπλοκάρεται τελικά και έτσι μετατρέπονται σε λειτουργικά ενεργά MDSCs. Αυτή η υπόθεση υποδεικνύει ότι τα MDSCs διακρίνονται από τα ώριμα και τελικώς διαφοροποιημένα μυελικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα) (Bronte V., et al., 2016). Το σήμα επέκτασης / κινητοποίησης των MDSCs διαμεσολαβείται κυρίως μέσω αυξητικών παραγόντων όπως παραγόντων διέγερσης κοκκιοκυττάρων και κοκκιοκυτταρικών / μονοκυτταρικών αποικιών (G-CSF και GM-CSF, αντίστοιχα), καθώς και από προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Ομοίως, το σήμα ενεργοποίησης των MDSCs διαμεσολαβείται μέσω προφλεγμονωδών ερεθισμάτων όπως λιποπολυσακχαριτών (LPS), PGE2, IL-1 και S100A8 / A9 με αποτέλεσμα την αναπροσαρμογή του παράγοντα NF-κB και συνεπώς την επαγωγή του κατασταλτικού φαινοτύπου των MDSCs κυττάρων (Breut H. et al., 2017).

Το βασικό λειτουργικό χαρακτηριστικό των MDSCs είναι η ικανότητα καταστολής των ανοσοκυττάρων, κυρίως των T-κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό των B-κυττάρων και των NK-κυττάρων. Όμως, εκτός από τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητές τους, τα MDSCs κύτταρα προάγουν την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση, επηρεάζοντας την αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την αγγειογένεση του όγκου μέσω παραγωγής του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF) και της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP9). Επίσης, οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην κατασταλτική λειτουργία των MDSCs κυττάρων περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη STAT3, τον επαγωγίμο από υποξία παράγοντα 1a (HIF-1a) και την CCAAT / ενισχυτική πρωτεΐνη δέσμευσης b (C / EBPb) (Bizymi N. et al., 2019).

Πρόσφατα, οι μελέτες των Schwarz J. et al. (2017) έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζει κυρίως ανοσογόνα χαρακτηριστικά που προστατεύουν το έμβρυο από τη μητρική απόρριψη. Σε μια φυσιολογική εγκυμοσύνη διάφοροι χυμικοί παράγοντες όπως οι ορμόνες του φύλου και οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από έναν αριθμό ανοσοκυττάρων παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική ανοχή και στη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Για το λόγο αυτό, φαίνεται ότι τα MDSCs συμμετέχουν στην εγκυμοσύνη ως σημαντικά ανοσοκατασταλτικά κύτταρα, δηλαδή στην ανοχή μητέρας – εμβρύου. Η αυξημένη συχνότητα των MDSCs σε όλα τα στάδια της εγκυμοσύνης αλλά και στο UCB έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες σε μοντέλα εγκυμοσύνης τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια. Οι πρώτες έρευνες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η συχνότητα των PMN-MDSCs αυξάνεται στο περιφερικό αίμα των υγιών εγκύων γυναικών σε όλες τις φάσεις της κύησης σε σύγκριση με τις γυναίκες που δεν ήταν έγκυες, και ότι η αυξημένη συχνότητά τους στο UCB σχετίζεται με καλή πρόγνωση για το έμβρυο. (Moslem A. Et al., 2019). Όλα τα προαναφερθέντα τονίζουν τη σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και δείχνουν ότι μια επιτυχημένη ανοσοποιητική ανοχή εμβρύου-μητέρας είναι πιο περίπλοκη από όσο θεωρούταν, δηλαδή ότι το έμβρυο προστατεύεται απλώς από φυσικά εμπόδια σύμφωνα με παλαιότερες θεωρίες. Η βαθύτερη κατανόηση των ανοσολογικών διεργασιών και κυρίως των MDSCs σε εμβρυϊκούς και μητρικούς ιστούς κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης θα βοηθήσει στην επίτευξη καλύτερης κατανόησης σχετικά με την παθοφυσιολογία των επιπλοκών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, όπως ο πρόωρος τοκετός, η προεκλαμψία, η υπογονιμότητα κλπ.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, η οποία συμπεριλαμβάνει τόσο βιβλιογραφική ανασκόπηση όσο και εργαστηριακή πειραματική ανάλυση, ήταν να παρατηρηθούν και να καταγραφούν τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των MDSCs κυττάρων στο ομφαλο-πλακουντιακό αίμα (Umbilical Cord Blood – UCB) και να εκτιμηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος και τη βιωσιμότητα των πληθυσμών αυτών. Σκοπός είναι η κατανόηση όλων των παραμέτρων που συμβάλλουν στην αύξησή τους, έτσι ώστε να συνεκτιμηθούν για τον μελλοντικό

σχεδιασμό απομόνωσής τους από UCB και την χορήγησή τους στα πλαίσια νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, λόγω της μεγάλης αξίας που αυτά κατέχουν.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Η ερευνητική προσέγγιση αυτής της εργασίας περιλαμβάνει *in vitro* πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού με κυτταρομετρία ροής των πληθυσμών των MDSCs κυττάρων, χρησιμοποιώντας ομφαλο-πλακουντιακό αίμα (UCB) καθώς και περιφερικό αίμα από υγιείς εγκύους.

ΧΩΡΟΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα *in vitro* πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο Αιματολογίας (5Δ11) που εδρεύει στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την καθοδήγηση του επιβλέποντος καθηγητή και διεξήχθησαν στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα Δεκέμβριος 2020 – Ιούλιος 2021.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μελετήθηκαν 40 μονάδες UCB από φυσιολογικές τελειόμηνες κύησεις (37^η – 40^η εβδομάδα κύησης), καθώς και από το περιφερικό αίμα (ΠΑ) των μητέρων. Επιπρόσθετα, καταγράφηκαν οι εβδομάδες της κύησης κατά τον τοκετό, το βάρος και το φύλο του νεογνού, το βάρος της μονάδας UCB, ο χρόνος που πέρασε από τη συλλογή του UCB έως και την επεξεργασία του για την μέτρηση των MDSCs και άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά των μονάδων όπως η παρουσία πηγμάτων. Στα κριτήρια επιλογής δειγμάτων ήταν οι μονάδες UCB να μην έχουν υπερβεί τις 48 ώρες από την ώρα συλλογής του δείγματος έως και την επεξεργασία του.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

- Απομόνωση των κυττάρων της μεσόφασης από το UCB (UCB Mononuclear Cells – UCB-MCs) και από το περιφερικό αίμα της μητέρας (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMCs)
- ✓ Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε falcon tubes και διαλύθηκαν σε αναλογία 1:1 με καλλιεργητικό μέσο RPMI.
- ✓ Το διαλυμένο δείγμα τοποθετήθηκε σε καινούριο falcon tube πάνω από 4ml φικόλης έτσι ώστε να δημιουργηθούν 2 φάσεις, με την φικόλη στην κάτω φάση.
- ✓ Τα falcon tubes φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 1800 στροφές ανά λεπτό στην μικρότερη επιτάχυνση και χωρίς φρένα.
- ✓ Με την χρήση γυάλινης πιπέτας Παστέρ αφαιρέθηκαν τα κύτταρα της μεσόφασης και τοποθετήθηκαν σε καινούριο falcon tube.
- ✓ Ακολούθως τα tubes συμπληρώθηκαν με PBS (phosphate buffered saline) και φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 στροφές ανά λεπτό με τις ρυθμίσεις επιτάχυνσης και φρένων στο μέγιστο για 5 λεπτά, με σκοπό την πλύση των κυττάρων.
- ✓ Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου το κυτταρικό ίζημα επανα-αραιώθηκε σε 0.5-1.5ml PBS (ανάλογα με την συγκέντρωση των κυττάρων) και τα κύτταρα μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
- ✓ Για την καταμέτρηση, 10μl από το διάλυμα των κυττάρων αναμίχθηκαν με 10μl trypan blue.
- Χρώση των κυττάρων με αντισώματα
- ✓ 10 εκατομμύρια κύτταρα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 5ml.
- ✓ Στις περιπτώσεις που ο όγκος του διαλύματος ξεπέρασε τα 200μl έγινε φυγοκέντρωση και επανα-αραίωση σε μικρότερο όγκο PBS.
- ✓ Προστέθηκαν 40μl γ-HAG και τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι.
- ✓ Ακολούθως προστέθηκαν και τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα ανάλογα με το panel που απαιτείται και επώαστηκαν για 20 λεπτά στους 4°C στο σκοτάδι. Όλα τα αντισώματα προέρχονται από την Beckman Coulter.

- ✓ Προστέθηκε buffer κυτταρομετρίας (2% BSA/PBS) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό, με μέγιστα φρένα και επιτάχυνση ώστε να απορριφθεί το υπερκείμενο και να επανα-αραιωθούν σε 500μl PBS.
- ✓ Τέλος τα δείγματα περάστηκαν σε κυτταρομετρητή ροής Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Brea California, USA).

- Panel Αντισωμάτων

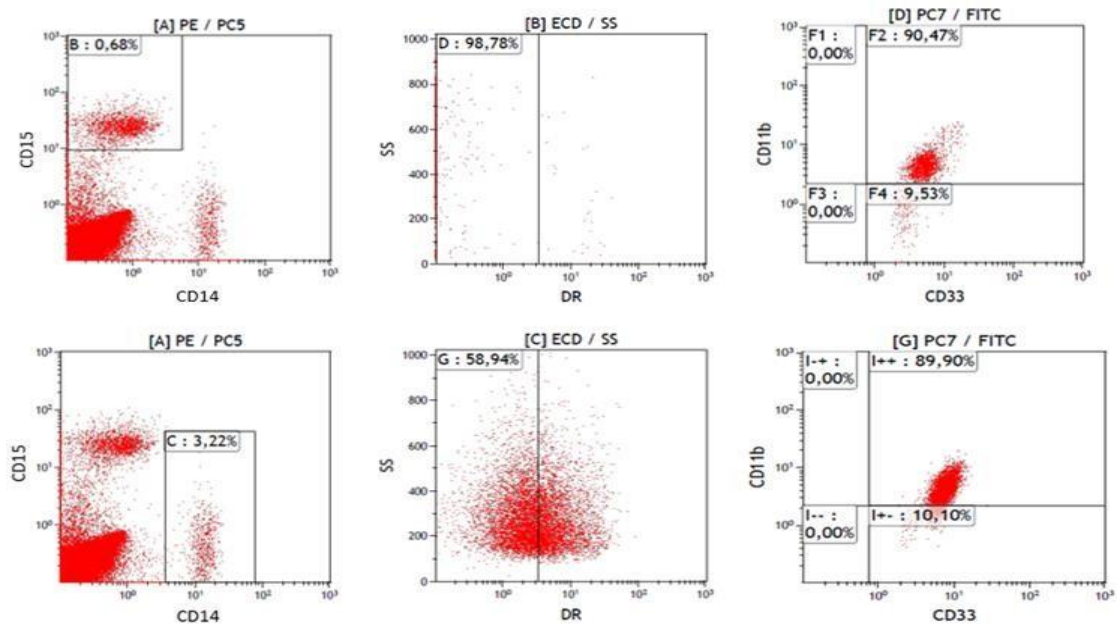
CD33-PC7/CD15-PC5/DR-ECD/CD14-PE/CD11b-FITC

CD34-PE/CD45-FITC

- Ανάλυση Κυτταρομετρίας Ροής

Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Kaluza για την ανάλυση των δειγμάτων. Η ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής έγινε στο κλάσμα των ζωντανών κυττάρων, σύμφωνα με το διάγραμμα πρόσθιας σκέδασης προς πλάγια σκέδασης (FS/SS), τόσο για τον χαρακτηρισμό των M-MDSCs όσο και των PMN-MDSCs. Επομένως, από το κλάσμα των ζωντανών κυττάρων, έγινε επιλογή των κυττάρων που εκφράζουν CD14, για τον πληθυσμό των M-MDSCs, ή CD15 για τη μελέτη των PMN-MDSCs στο διάγραμμα PE/PC5. Από τα κύτταρα αυτά ακολούθως, επιλέχθηκαν όσα θεωρούμαι ότι εκφράζουν χαμηλά επίπεδα HLA-DR από το διάγραμμα ECD/SS. Έπειτα, από αυτά επιλέχθηκαν εκείνα τα οποία φαίνεται να εκφράζουν τους παράγοντες CD33 και CD11b από το διάγραμμα PC7/FITC. Ακολουθεί γράφημα με παράδειγμα της ανάλυσής μας (**Γράφημα 1**).

Τα δεδομένα από τις αναλύσεις στο πρόγραμμα Kaluza συγκεντρώθηκαν σε αρχείο υπολογιστικών φύλλων και συμπεριλήφθηκαν επίσης οι εβδομάδες κύησης, το φύλο και βάρος του νεογνού, το βάρος της μονάδας και ο χρόνος επεξεργασίας από τη στιγμή της συλλογής μέχρι την ώρα της επεξεργασίας (**Πίνακες 1-3**). Το αρχείο αυτό αποτέλεσε και την βάση για την στατιστική ανάλυση που ακολούθησε.



Γράφημα 1: Παράδειγμα της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής των MDSCs.

UCB	TIME BEFORE PROCESSING (H)	CD14+/CD15- /DRneg- /CD11b+/CD33+ %	CD15+/CD14- /DRneg- /CD11b+/CD33+ %	CD45+/CD34+ %
2946	62	0,03422256	0,03236922	
2994	12	0,734228227	0,374767536	
2969	9	4,337058492	25,33490285	
3129	2	1,125485952	0,02353	0,270369
PT00046A	24	0,130138117	0,123071747	0,088825
PT00046B	24	0,026112	0,007030942	0,170172
3099	2	3,298003042	1,085934769	1,264187
3085	36	0,446811914	1,038696036	1,485792
3163	24	0,215032106	0,850580159	0,605484
3133	2	7,807049344	0,124527488	0,74571
3119	40	0,145782525	0,385301146	0,5555
3173	24	0,359422987	0,698423019	0,571408
3177	25	0,465612436	0,063663215	0,4543
3161	26	4,841643701	1,01967301	0,675441
3186	22	7,046967295	4,445539984	0,3836
3175	24	2,19828996	0,774557528	0,187368
3193	30	2,2444944	0,13348	0,33275
3226	3	0,578661634	0,015632438	0,082164
3188	10	0,854035728	0,911331279	0,654728
3222	27	1,170901296	0,018812851	0,166161
3230	8	4,407616008	0,034475198	0,179673
3220	27	1,76885118	0,072065862	0,273429

3232	21	0,956616055	0,025789586	0,278845
3266	27	0,632552553	5,13655868	0,294168
3252	27	2,212748645	1,637336917	0,740328
3251	6	0,577840347	0,010209282	0,309444
3260	27	0,280132992	0,037588459	0,222264
3289	25	1,47709386	5,72225052	0,135184
3217	24	6,303913933	0,124374125	0,179676
3268	32	0,036791012	0,084320694	0,06293
3255	27	1,813424536	0,036531682	0,20528
3296	26	0,217974402	0,040555771	0,067416
3321	32	7,168791868	0,3348644	0,601803
PT00050a	4	8,078959942	0,17580024	0,560367
PT00050b	4	4,875537328	0,161228753	0,490872
3312	33	2,986511182	0,113235841	0,823515
3330	35	4,095452743	0,170014625	0,427846
3318	29	1,769328376	0,207240108	0,638926
3339	24	3,855864137	0,190332899	0,610272

Πίνακας 1: Τα δεδομένα της ανάλυσης των UCB μονάδων.

MOTHER	CD14+/CD15- /DRneg- low/CD11b+/CD33+	CD15+/CD14- /DRneg- low/CD11b+/CD33+
	%	%
2994	1,240755626	16,03355725
2969	0,467493893	1,077778702
3129	3,924250236	0,116432486
PT00046	2,33806959	0,05303883
3099	3,908102506	4,60651776
3085	7,262601984	0,05249475
3163	1,540301517	0,330772436
3133	13,13875981	0,06562611
3119	3,561045408	5,104660142
3173	2,108283325	49,29773694
3177	4,287725963	0,579750955
3161	0,491877876	0,055955099
3186	2,967082442	45,22936354
3175	10,02594641	73,2816231
3193	3,606111555	0,309252137
3226	2,408164454	0,75657582
3188	6,562235056	45,7372922
3222	13,27562723	0,214751072
3230	4,505253677	0,194402437
3220	4,276620724	0,166496447
3232	1,773362725	0,102804486

3266	0,375170656	0,798771725
3252	2,841329	90,54934016
3251	7,093518379	0,656971687
3260	1,499577113	3,479226254
3289	1,537448478	36,08522213
3217	1,956911292	0,610551572
3268	1,759794658	0,622820772
3255	2,961969108	0,334397188
3296	5,810035112	0,269676086
3321	7,682234338	0,30380663
PT00050	12,25651299	0,039969785
3312	0,210610963	0,211643593
3330	0,695702606	1,305434269
3318	2,293651264	1,449049805
3339	2,122602413	0,987746945

Πίνακας 2: Τα δεδομένα της ανάλυσης των μητέρων.

NAME	GENDER	DATE OF BIRTH	DATE OF PROCESSING	TYPE OF BIRTH	PREGNACY	NEWBORN WEIGHT (gr)	UCB WEIGHT (gr)	WEEKS OF PREGNACY
2946	F	8/1/2021	11/1/2021	Caesarean section	Single	2630	92	40(+2)
2994	M	11/1/2021	12/1/2021	Normal birth	Single	3570	95	40
2969	F	18/1/2021	18/1/2021	Caesarean section	Single	3290	77	40(+6)
3129	F	17/3/2021	17/3/2021	Caesarean section	Single	2900	105	38
PT00046a	M	17/3/2021	18/3/2021	Caesarean section	Twin	2570	76	36
PT00046b	M	17/3/2021	18/3/2021	Caesarean section	Twin	2470	90	36
3099	F	22/3/2021	22/3/2021	Normal birth	Single	3180	107	40(+1)
3085	F	27/3/2021	29/3/2021	Caesarean section	Single	3090	108	40(+4)
3163	M	29/3/2021	30/3/2021	Caesarean section	Single	3500	98	37
3133	M	30/3/2021	30/3/2021	Caesarean section	Single	3140	102	37(+6)
3119	M	30/3/2021	1/4/2021	Caesarean section	Single	3420	81	39
3173	F	5/4/2021	6/4/2021	Caesarean section	Single	2550	87	38
3177	M	8/4/2021	9/4/2021	Caesarean section	Single	3400	113	38
3161	F	12/4/2021	13/4/2021	Caesarean section	Single	3400	107	38
3175	M	15/4/2021	16/4/2021	Normal birth	Single	2900	95	39(+2)
3186	F	15/4/2021	16/4/2021	Caesarean	Single	3150	101	39(+3)

section								
3193	M	19/4/2021	20/4/2021	Normal birth	Single	3180	96	39
3226	F	28/4/2021	28/4/2021	Caesarean section	Single	3430	82	39(+2)
3188	M	5/5/2021	5/5/2021	Normal birth	Single	3500	90	40(+4)
3222	M	6/5/2021	7/5/2021	Normal birth	Single	3550	105	39
3230	F	10/5/2021	10/5/2021	Normal birth	Single	3645	94	39
3220	M	10/5/2021	11/5/2021	Caesarean section	Single	3360	108	39(+1)
3232	M	12/5/2021	13/5/2021	Caesarean section	Single	2.980	100	39(+3)
3266	F	20/5/2021	21/5/2021	Caesarean section	Single	3.380	102	38
3252	F	30/5/2021	31/5/2021	Normal birth	Single	3.240	111	40(+3)
3251	M	2/6/2021	2/6/2021	Caesarean section	Single	3.006	77	38
3260	F	3/6/2021	4/6/2021	Caesarean section	Single	3.120	76	39(+2)
3289	F	10/6/2021	11/6/2021	Caesarean section	Single	3.230	107	40(+4)
3217	F	15/6/2021	16/6/2021	Normal birth	Single	4.070	115	40(+1)
3268	F	17/6/2021	18/6/2021	Normal birth	Single	2.420	78	
3255	F	17/6/2021	18/6/2021	Caesarean section	Single	3.840	116	38(+6)
3296	F	24/6/2021	25/6/2021	Normal birth	Single	3.320	70	40
3321	F	28/6/2021	29/6/2021	Caesarean section	Single	3.070	98	39(+4)
PT00050a	F	12/7/2021	12/7/2021	Caesarean section	Twin	3.440	114	38(+1)

PT00050b	F	12/7/2021	12/7/2021	Caesarean section	Twin	3.090	111	38(+1)
3312	F	12/7/2021	13/7/2021	Normal birth	Single	3.455	113	40(+4)
3330	M	12/7/2021	13/7/2021	Normal birth	Single	3.740	118	39(+4)
3318	M	12/7/2021	13/7/2021	Caesarean section	Single	3.520	106	
3339	M	14/7/2021	15/7/2021	Caesarean section	Single	3.600	120	38

Πίνακας 3: Τα χαρακτηριστικά των UCB μονάδων.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Graph Pad Prism. Τα ομαδοποιημένα δεδομένα συγκρίθηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney test, ενώ οι συσχετίσεις έγιναν με το μη-παραμετρικό Spearman's rank correlation coefficient (r_{ho}). Επιλέχθηκαν τα όρια στατιστικής σημαντικότητας P value μικρότερη από 0,05 ($P < 0,05$), ενώ η τιμή μεταξύ 0,3 και 0,7 ως μέτρια συσχέτιση και r value $> 0,7$ ως ισχυρή συσχέτιση. Οι ομαδοποιημένες τιμές εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με βάση την παραπάνω μεθοδολογία παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε (**Πίνακες 4 – 17**), έτσι ώστε να βρεθεί αν υπάρχει συσχέτιση των πληθυσμών των UCB-MDSCs με τις παρακάτω παραμέτρους: (α) βάρος νεογνού, β) βάρος μονάδας, γ) τα CD34⁺ κύτταρα, δ) ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, ε) χρόνος από την συλλογή έως την επεξεργασία του δείγματος, στ) MDSCs της μητέρας, ζ) φύλο νεογνού, που πιθανόν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των MDSCs. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο για τα M-MDSCs, αλλά και για τα PMN-MDSCs. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται με τα παρακάτω γραφήματα (**Γραφήματα 2-15**). Σημειώνεται ότι η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε δεύτερη φορά αφαιρώντας τις ακραίες τιμές (outliers) αλλά επειδή αυτό δεν επέφερε αλλαγές στα αποτελέσματα αυτή η δεύτερη ανάλυση δεν συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραάτω. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graph Pad Prism.

Τα M-MDSCs του UCB παρουσίαζαν μέση τιμή 2.35% \pm 2.42 τυπική απόκλιση, τα M-MDSCs της μητέρας αντίστοιχα 4.02% \pm 3.55, τα PMN-MDSCs του UCB 1.33% \pm 4.17, τα PMN-MDSCs της μητέρας 2.48% \pm 6.92, ενώ τα UCB-CD34⁺ κύτταρα 0.40% \pm 0.33. Το βάρος των νεογνών της μελέτης κυμάνθηκε από 2420g έως 4070g, ενώ το βάρος των μονάδων UCB από 70gr έως 120gr.

Τα M-MDSCs του UCB παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το βάρος του νεογνού ($r=0.3369$, $p=0.036$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 4** και στο **Γράφημα 2**.

Τα M-MDSCs του UCB παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με το βάρος της μονάδας ($r=0.5501$, $p=0.0003$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 5** και στο **Γράφημα 3**.

Τα M-MDSCs του UCB παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τα UCB-CD34⁺ κύτταρα ($r=0.3696$, $p=0.0265$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 6** και στο **Γράφημα 4**.

Τα M-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 7** και στο **Γράφημα 5**.

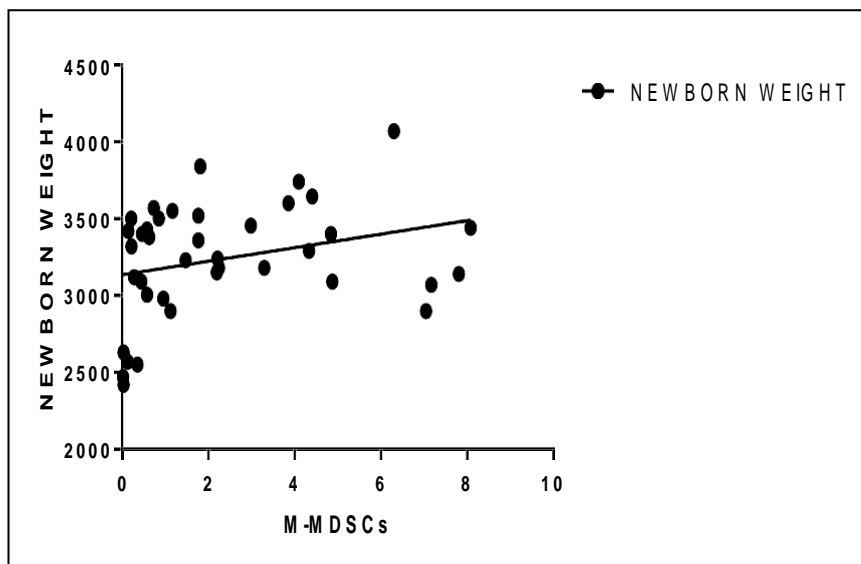
Τα M-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα M-MDSCs της μητέρας και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 8** και στο **Γράφημα 6**.

Τα M-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 9** και στο **Γράφημα 7**.

Τα M-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο του νεογνού και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 10** και στο **Γράφημα 8**.

Spearman r	M-MDSCs vs. NEWBORN WEIGHT
r	
95% confidence interval	0,3369
	0,01422 to 0,5961
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,036
Exact or approximate P value?	*
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	Yes
Number of XY Pairs	
	39

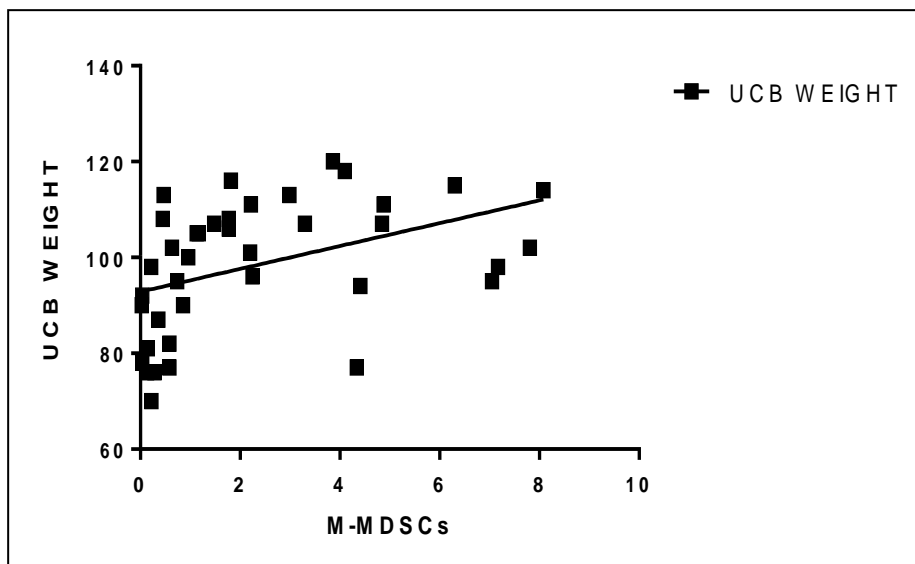
Πίνακας 4: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με το βάρος του νεογνού.



Γράφημα 2: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με το βάρος του νεογνού.

Spearman r	M-MDSCs vs. UCB WEIGHT
r	
95% confidence interval	0,5501
	0,2749 to 0,7420
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,0003
Exact or approximate P value?	***
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	Yes
Number of XY Pairs	
	39

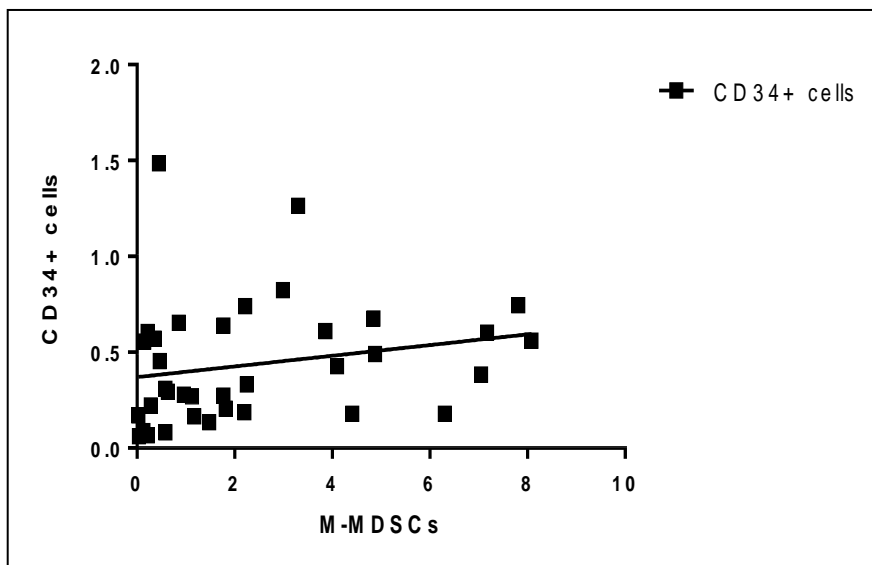
Πίνακας 5: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με το βάρος της μονάδας.



Γράφημα 3: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με το βάρος της μονάδας.

Spearman r	M-MDSCs vs. CD34+ cells
r	
95% confidence interval	0,3696
	0,03661 to 0,6288
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,0265
Exact or approximate P value?	*
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	Yes
Number of XY Pairs	
	36

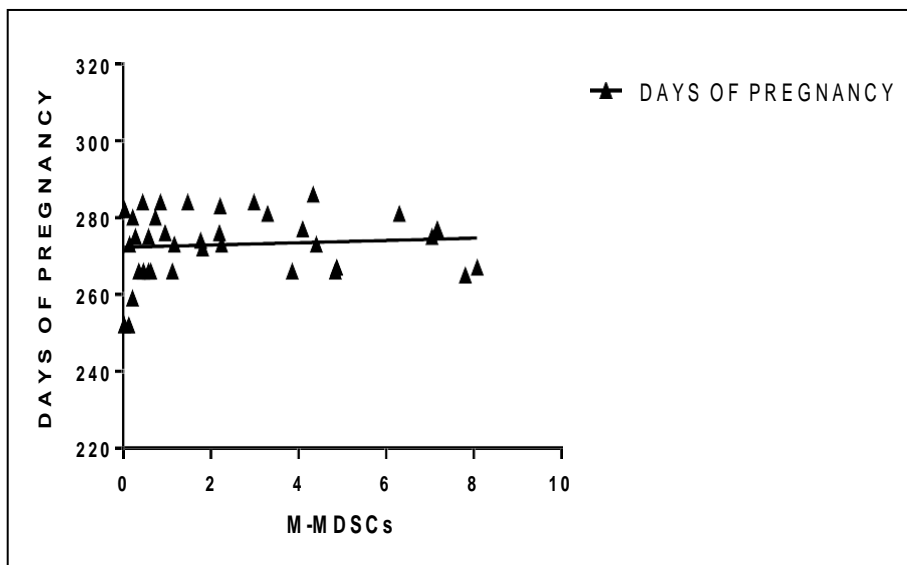
Πίνακας 6: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με τα CD34⁺ κύτταρα.



Γράφημα 4: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με τα CD34⁺ κύτταρα.

Spearman r	M-MDSCs vs. DAYS OF PREGNANCY
r	
95% confidence interval	0,156
	-0,1867 to 0,4648
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,3566
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	37

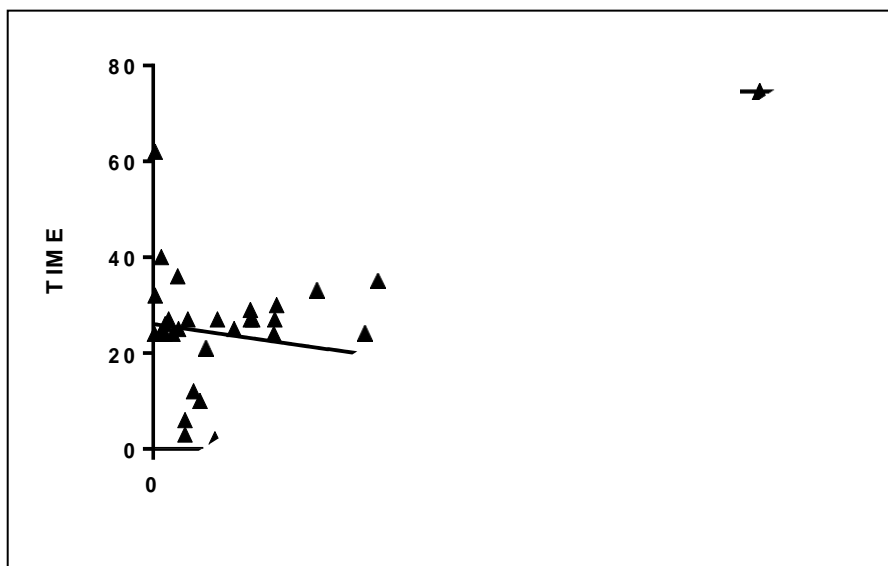
Πίνακας 7: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό.



Γράφημα 5: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό.

Spearman r	M-MDSCs vs. TIME
r	
95% confidence interval	-0,2804
	-0,5542 to 0,04830
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,0839
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	39

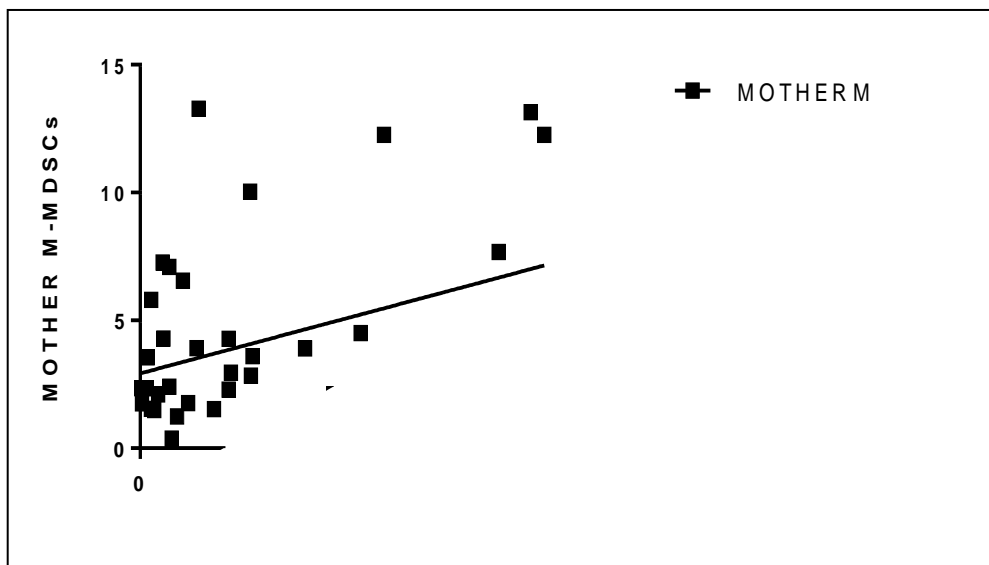
Πίνακας 8: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της.



Γράφημα 6: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της.

Spearman r	M-MDSCs vs. MOTHER M-MDSCs
r	
95% confidence interval	0,1782
	-0,1597 to 0,4787
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,2846
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	38

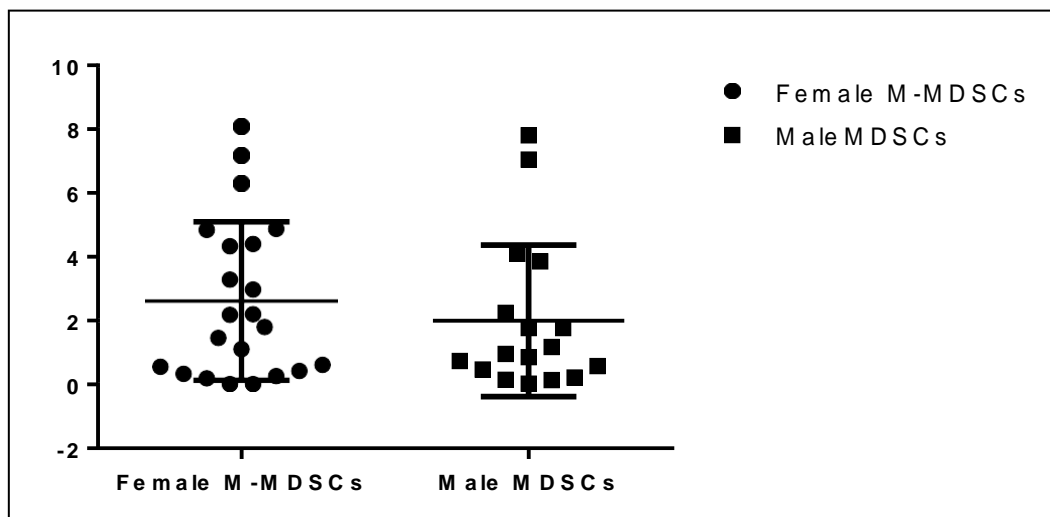
Πίνακας 9: Spearman's correlation για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με τα M-MDSCs της μητέρας.



Γράφημα 7: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με τα M-MDSCs της μητέρας.

Table Analyzed	Data 1
Column B	Male M-MDSCs
vs.	vs,
Column A	Female M-MDSCs
Mann Whitney test	
P value	0,3721
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	472,0 , 308,0
Mann-Whitney U	155
Difference between medians	
Median of column A	2,006
Median of column B	0,9566
Difference: Actual	-1,049
Difference: Hodges-Lehmann	-0,4044

Πίνακας 10: Στατιστική ανάλυση μέσω της συνάρτησης Mann-Whitney U-test για τα UCB M-MDSCs σε σχέση με το φύλο του νεογνού.



Γράφημα 8: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB M-MDSCs με το φύλο του νεογνού.

Τα PMN-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βάρος του νεογνού και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 11** και στο **Γράφημα 9**.

Τα PMN-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βάρος της μονάδας και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 12** και στο **Γράφημα 10**.

Τα PMN-MDSCs του UCB παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τα UCB-CD34⁺ κύτταρα ($r=0.5444$, $p=0.0006$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 13** και στο **Γράφημα 11**.

Τα PMN-MDSCs του UCB παρουσιάζουν οριακά μη στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό ($r=0.3169$, $p=0.056$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 14** και στο **Γράφημα 12**.

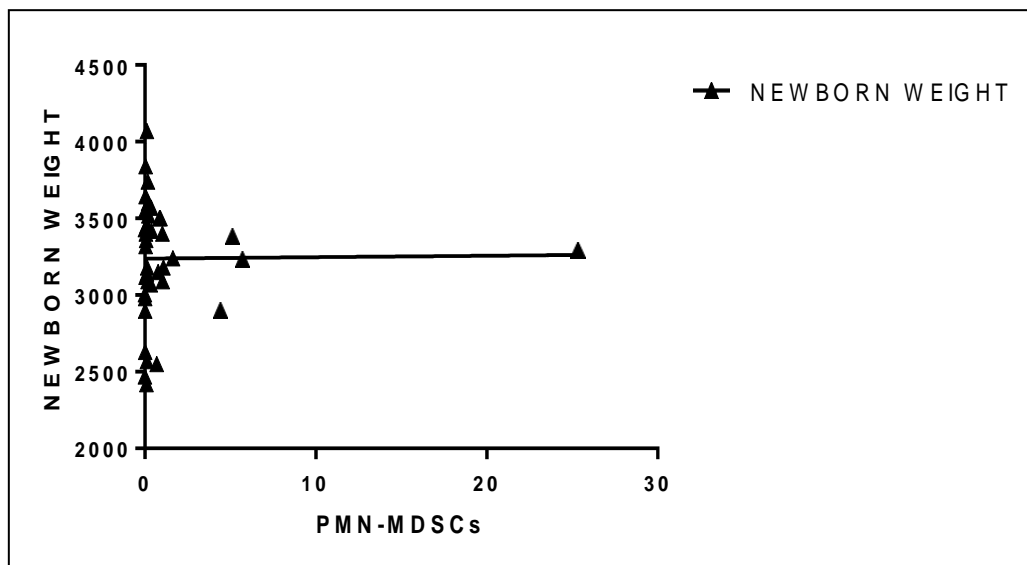
Τα PMN-MDSCs του UCB παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα PMN-MDSCs της μητέρας ($r=0.4678$, $p=0.0031$) και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 15** και στο **Γράφημα 13**.

Τα PMN-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 16** και στο **Γράφημα 14**.

Τα PMN-MDSCs του UCB δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο του νεογνού και η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 17** και στο **Γράφημα 15**.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. NEWBORN WEIGHT
r	
95% confidence interval	0,08322
	-0,2477 to 0,3968
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,6145
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	39

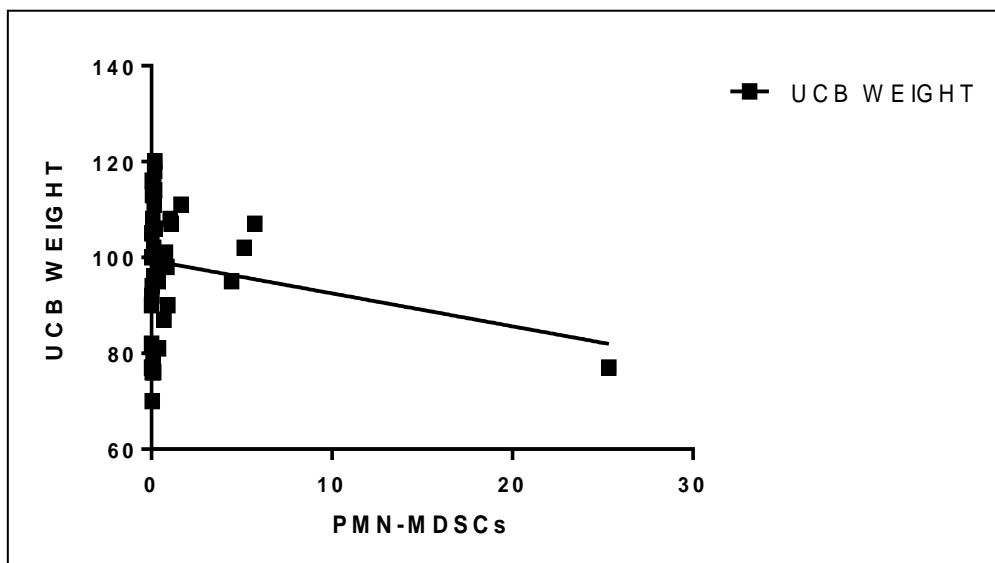
Πίνακας 11: Spearman's correlation για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με το βάρος του νεογνού.



Γράφημα 9: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με το βάρος του νεογνού.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. UCB WEIGHT
r	
95% confidence interval	0,1619
	-0,1714 to 0,4619
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,3249
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	39

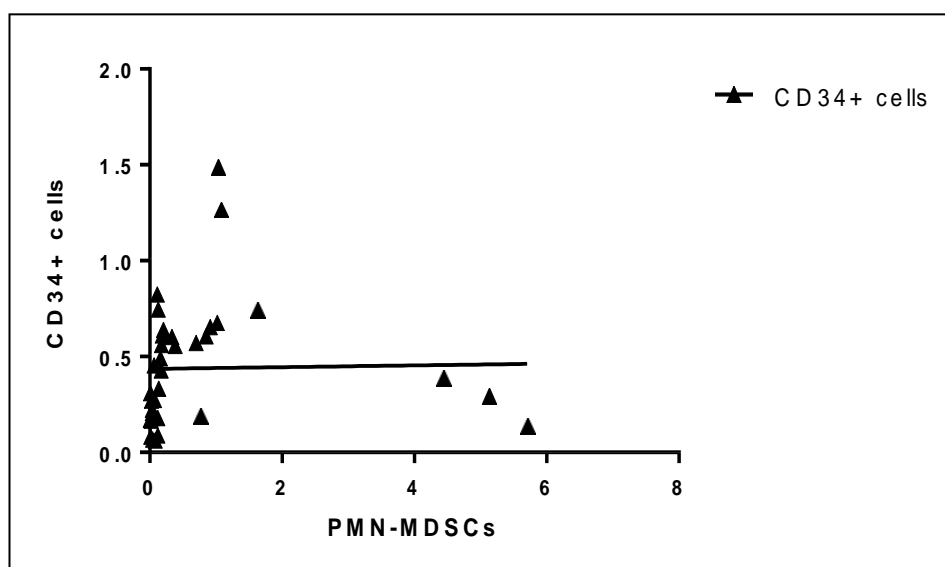
Πίνακας 12: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με το βάρος της μονάδας.



Γράφημα 10: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με το βάρος της μονάδας.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. CD34+ cells
r	
95% confidence interval	0,5444
	0,2534 to 0,7451
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,0006
Exact or approximate P value?	***
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	Yes
Number of XY Pairs	
	36

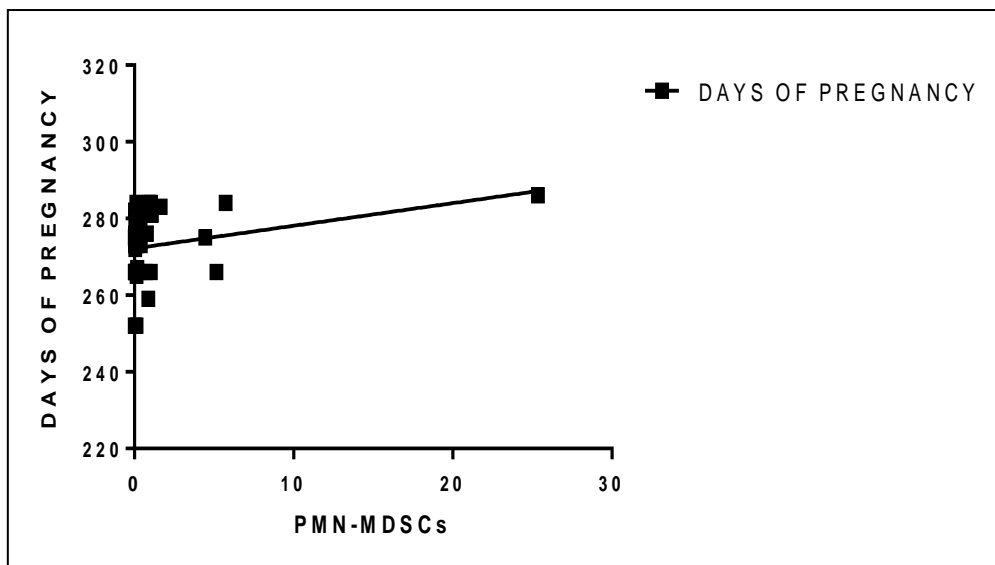
Πίνακας 13: Spearman's correlation για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με τα CD34⁺ κύτταρα.



Γράφημα 11: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με τα CD34⁺ κύτταρα.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. DAYS OF PREGNANCY
r	
95% confidence interval	0,3169
	-0,01792 to 0,5879
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,056
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	37

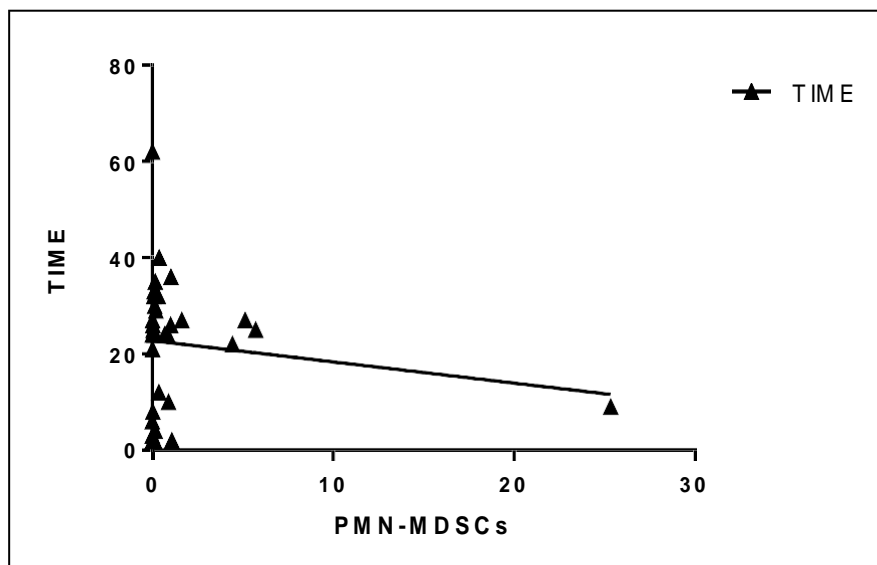
Πίνακας 14: Spearman's correlation για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό.



Γράφημα 12: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με την ηλικία της κύησης κατά τον τοκετό.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. TIME
r	
95% confidence interval	0,05798
	-0,2714 to 0,3752
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,7259
Exact or approximate P value?	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	No
Number of XY Pairs	
	39

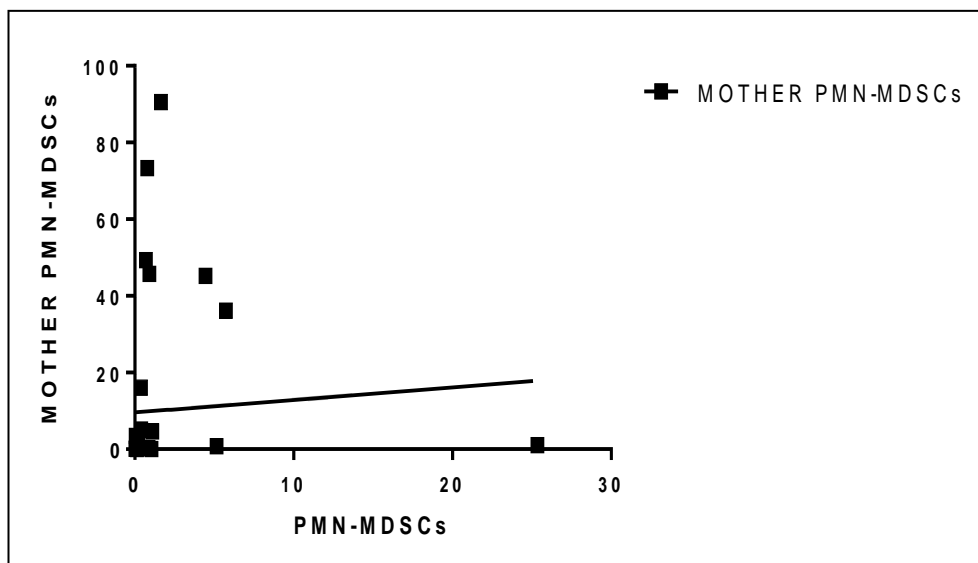
Πίνακας 15: Spearman's correlation για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της.



Γράφημα 13: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με το χρόνο από τη συλλογή της μονάδας έως την επεξεργασία της.

Spearman r	PMN-MDSCs vs. MOTHER PMN-MDSCs
r	
95% confidence interval	0,4678
	0,1646 to 0,6903
P value	
P (two-tailed)	
P value summary	0,0031
Exact or approximate P value?	**
Significant? (alpha = 0.05)	Approximate
	Yes
Number of XY Pairs	
	38

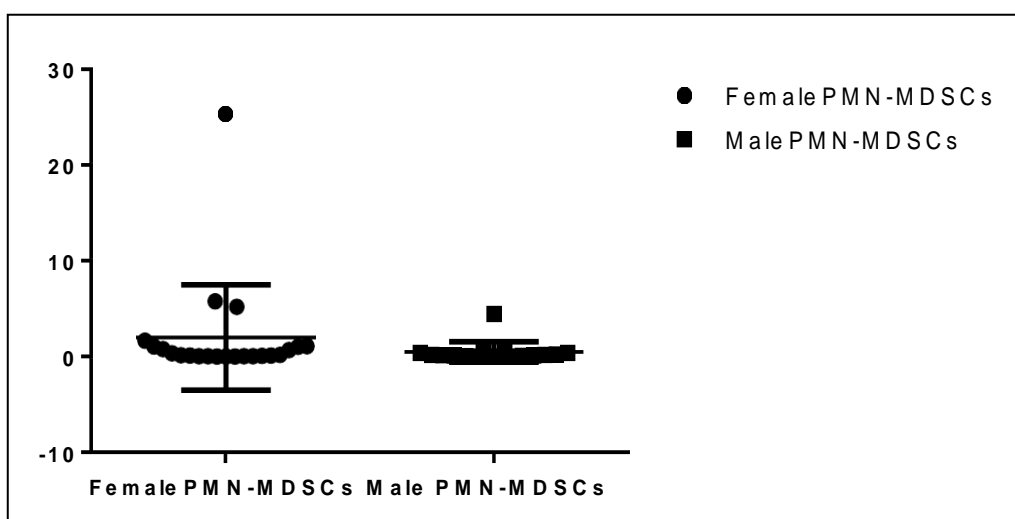
Πίνακας 16: Spearman's correlation για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με τα PMN-MDSCs της μητέρας.



Γράφημα 14: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με τα PMN-MDSCs της μητέρας.

Table Analyzed	Data 1
Column B	Male PMN-MDSCs
vs.	vs,
Column A	Female PMN-MDSCs
Mann Whitney test	
P value	0,3873
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	471,0 , 309,0
Mann-Whitney U	156
Difference between medians	
Median of column A	0,1685
Median of column B	0,1335
Difference: Actual	-0,03503
Difference: Hodges-Lehmann	-0,03743

Πίνακας 17: Στατιστική ανάλυση μέσω της συνάρτησης Mann-Whitney U-test για τα UCB PMN-MDSCs σε σχέση με το φύλο του νεογνού.



Γράφημα 15: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης των UCB PMN-MDSCs με το φύλο του νεογνού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παρατηρηθούν και να καταγραφούν τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των MDSCs κυττάρων στο UCB και να εκτιμηθούν οι παράγοντες που τα επηρεάζουν. Έως τώρα, ενώ υπάρχουν μελέτες που αναφέρονται στους πληθυσμούς των κυττάρων αυτών στο UCB, δεν υπάρχει μελέτη στη βιβλιογραφία που να έχει καταγράψει αυτές τις παραμέτρους. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται πιο πάνω συμπεραίνουμε ότι ο σκοπός της μελέτης επιβεβαιώνεται, διότι ορισμένοι παράγοντες συμβάλλουν στο μέγεθος των πληθυσμών των MDSCs ή στη βιωσιμότητα των MDSCs.

Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, οι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των MDSCs στο UCB είναι η εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό, το βάρος της μονάδας και του νεογνού και ο πληθυσμός των UCB-CD34⁺ κυττάρων. Η συσχέτιση των UCB-MDSCs με αυτά της μητέρας πιθανότατα δείχνει ότι ίδιοι παράγοντες επηρεάζουν τον αριθμό τους. Στα επόμενα βήματά μας είναι η μελέτη των λειτουργικών χαρακτηριστικών των UCB-MDSCs και η συσχέτισή τους με τις ανωτέρω παραμέτρους.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα MDSCs αποτελούν νέους βιοδείκτες και θεραπευτικούς στόχους. Ιδιαίτερα ελπιδοφόρες νέες θεραπευτικές στρατηγικές με την χορήγηση αυτών των κυττάρων φαίνεται να είναι υπό έρευνα σε διάφορες παθήσεις όπως το GvHD. Η παρούσα μελέτη είναι ιδιαίτερης αξίας καθώς καταδεικνύει ότι οι μονάδες UCB που δεν είναι κατάλληλες για αλλογενή μεταμόσχευση μπορούν να αποτελέσουν πλούσια πηγή MDSCs και για αυτό έχει σημασία η γνώση των παραμέτρων που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα των κυττάρων αυτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmadi M., Mohammadi M., Ali-Hassanzadeh M., Zare M. et al. (2019). MDSCs in pregnancy: Critical players for a balanced immune system at the feto-maternal interface. *Cellular Immunology*, 346, pp. 103990.
2. Bizymi N., Bjelica S., Kittang A.O., Mojsilovic S. et al. (2019). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. *HemaSphere*, 3(1), pp. e168.
3. Breut Koehn H. and Bruce Blazar R. (2017). Role of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(2), pp. 335-341.
4. Bronte V., Brandau S., Chen S., Colombo M.P. et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, pp. 12150.
5. Bruger A.M., Dorhoi A., Esendagli G., Barczyk-Kahlert K. et al. (2019). How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 68(4), pp.631-644.
6. Gervassi A., Lejarcegui N., Dross S., Jacobson A. et al. (2014). Myeloid Derived Suppressor Cells Are Present at High Frequency in Neonates and Suppress In Vitro T Cell Responses. *PLOS ONE*, 9(9), pp. e107816.
7. Kostlin N., Hofstadter K., Ostermeir A.L., Spring B. et al. (2016). Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *The Journal of Immunology*, 196(3), pp.1132-1145.
8. Kostlin N., Vogelmann M., Spring B., Schwarz J. et al. (2017). Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper

- cell response towards an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*, 152(1), pp.89-101.
9. Leiber A., Schwarz J., Kostlin N., Spring B. et al. (2017). Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with *Escherichia coli*. *European Journal of Immunology*, 47(6), pp.1009-1021.
 10. Mi-Young P., Bang-Geul L., Su-Yeon K., Hyun-Jung S. et al. (2019). GM-CSF Promotes the Expansion and Differentiation of Cord Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells, Which Attenuate Xenogeneic Graft-vs.-Host Disease. *Frontiers in Immunology*, 26(10), pp. 183.
 11. Schwarz J., Scheckenbach V., Kugel H., Spring B. et al. (2017). Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *The Journal of Translational Immunology*, 191(3), pp. 328-337.
 12. Wu W.C., Sun H.W., Chen H.T., Liang J. et al. (2014). Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients. *PNAS*, 111(11), pp. 4221-4226.
 13. Zhao Y., Wu T., Shao S., Shi B. et al. (2016). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *OncImmunity*, 5(2), pp. e1004983.
 14. Zoso A., Emilia M.C., Bicciato S., Mandruzzato S. et al. (2014). Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion. *European Journal of Immunology*, 44(11), pp. 3307-3319.