

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

TMHMA ΙΑΤΡΙΚΗΣ FACULTY OF MEDICINE



UNIVERSITY OF CRETE

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΣΤΑΤΙΚΩΝ C-X-C

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ

ENTEPOY

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΓΙΩΡΓΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΑΣ & ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ	ΟΜΟΤΙΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ	КАӨНГНТРІА
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΚΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΚΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΟΤΑΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΟΥΖΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΡΙΑ ΤΖΑΡΔΗ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΚΟΦΤΕΡΙΔΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΡΩΜΑΝΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

1. Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας & Ηπατολογίας του Ιατρικού Τμήματος του πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα τον διευθυντή του εν λόγω εργαστήριου, ομότιμο καθηγητή Ηλία Κουρούμαλη τον οποίο από καρδίας ευχαριστώ για την ολοκλήρωσή της. Η επιστημονική του γνώση και η αναλυτική του σκέψη ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχή της έκβαση και αποτέλεσαν προσωπικό παράδειγμα καθώς με διαμόρφωσαν ως ερευνητή. Κε Καθηγητά σας ευχαριστώ που υπήρξατε δάσκαλος και καθοδηγητής μου.

Ευχαριστώ θερμά τον φίλο Γεώργιο Αγιομαμίτη για την παραχώρηση των δειγμάτων που χρειάστηκαν για τις μετρήσεις της μελέτης μας. Η λεπτομερής και πλήρης καταγραφή τους μας βοήθησε να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα αρτιότερα και να οδηγηθούμε σε πρωτότυπα ερευνητικά συμπεράσματα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες (Κωνσταντίνα, Ράνια, Γιάννη, Στέφανο) του ερευνητικού εργαστηρίου με τους οποίους μοιραστήκαμε χρόνο, απόψεις και αγωνίες στην επίλυση των δυσκολιών που αντιμετωπίσαμε στην καθημερινή μας εργαστηριακή απασχόληση.

Ευχαριστώ ακόμα τον καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Γεώργιο Κολιό, με τον οποίο δυστυχώς δεν είχαμε την ευκαιρία να συνεργαστούμε επί μακρόν, για το θέμα της παρούσας διατριβής η οποία αποτελούσε συνέχεια της προσωπικής του ερευνητικής πορείας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη τους όλο αυτό το χρονικό διαάστημα και την περισσότερο από καθοριστική παρότρυνση τους για την ολοκλήρωση του έργου αυτού.

Τέλος θέλω να αναφερθώ σε τρεις ανθρώπους που είναι μάλλον οι αφανείς ήρωες της εργασίας αυτής. Χρόνη, Νικολέττα, Γιώργο σας ευχαριστώ για όσα κάνατε για εμένα και για τις στιγμές που μοιραστήκαμε.

Γιώργος Εμμανουήλ

2. Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

1. Ευχαριστίες	3
2. Περιεχόμενα	5
3. Γενικό Μέρος	8
3.1 Γενικά περί Χημειοκινών	8
3.1.1 CC Χημειοκίνες	10
3.1.2 CXC Χημειοκίνες	13
3.1.3 C Χημεικοκίνες	15
3.1.4 CX3C- Chemokines	15
3.2 Χημειοκίνες και Καρκίνος	16
3.2.1 Χημειοκίνες και ανοσολογική απόκριση	21
3.2.2 Χημειοκίνες και Αγγειογένεση	25
3.2.3 Χημειοκίνες και Μετάσταση	
3.2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
3.3 Χημειοκίνες και Καρκίνος του παχέος εντέρου	57
3.3.1 ELR ⁺ χημειοκίνες	58
3.3.2 ELR ⁻ Χημειοκίνες	62
3.3.3 Βιβλιογραφία	70
3.4 CXCL8 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου	77
3.5 CXCL4 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου	89
3.6 VEGF και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου	94
3.7 CXCL6 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου	104
3.8 ВІВЛІОГРАФІА	106
4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	123
4.1 Ασθενείς	123
4.2 Κυτταρικές σειρές	125

4.2.1 HT-29	125
4.2.2 Caco-2	125
4.3 ΥΛΙΚΑ και ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	127
4.3.1 Ομογενοποίηση Ιστοτεμαχίων	127
4.3.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων και Πρωτεϊνών	128
4.3.3 Western Blot	128
4.3.4 Φωτομέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford Assay	131
4.3.5 Καλλιέργειες Κυττάρων	132
4.3.6 Συστήματα ψύξης	133
4.3.7Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)	133
4.3.8 Φωτομέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο BCA	135
4.4 Μέθοδοι	135
4.4.1 Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων	135
4.4.2 Ομογενοποίηση Ιστοτεμαχίων	136
4.4.3 Απομόνωση πρωτεϊνών από το ομογενοποίημα με TRIzol	137
4.4.4 Western Blot	138
4.4.5 Κυτταρικές καλλιέργειες	147
4.4.6 Διεγέρσεις Κυτταρικών Καλλιεργειών	149
4.4.7 Ανοσοενζυμική Μεθόδος ((Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)	151
4.4.8 Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με την χρήση Βικινχονινικού οξέως (Bicinchoni	nic
Acid, BCA Method)	154
4.4.9 Υπολογισμός και ημιποσοτικοποίηση έκφρασης κλινικοπαθολογικών παρα	γόντων
	155
4.5 Στατιστική Αξιολόγηση	157
4.5.1Μελέτη έκφρασης χημειοκινών σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό	157
4.5.2 Μελέτη έκφρασης των χημειοκινών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	158
4.6 Αποτελέσματα	160
4.6.1 Μελέτη παρουσίας χημειοκινών στα ιστοτεμάχια	160

7.	Extended Summary	248
6.	Συμπεράσματα	247
5.	Εκτεταμένη Περίληψη	244
	4.8 Βιβλιογραφία	236
	4.7 Συζήτηση	215
	4.6.3 Μελέτη έκφρασης των χημειοκινών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	174
	4.6.2 Μελέτη έκφρασης χημειοκινών σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό	161

3. Γενικό Μέρος

3.1 Γενικά περί Χημειοκινών

Οι χημειοκίνες συνολικά αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη οικογένεια 45-50 πρωτεϊνών οι οποίες χαρακτηρίζονται από δομικές ομολογίες βασιζόμενες πάνω σε συντηρημένα αμινοξέα κυστεΐνης καθώς και στην ιδιότητα τους να συνδέονται πάνω σε ζεύγη Gπρωτεϊνικών υποδοχέων^[1]. Οι χημειοκίνες είναι χημειοτακτικές κυτταροκίνες (μεγέθους μεταξύ 8 και 17 kDA) που είχαν αρχικά αναγνωριστεί από την ικανότητα τους να έλκουν λευκοκύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα. Η ιδιότητά τους αυτή τις καθιστούσε ενεργούς και κύριους διαμεσολαβητές της διαδικασίας στοχευμένης μετανάστευσης των λεμφοκυττάρων, η οποία ονομάζεται χημειοταξία^[2]. Επιπλέον βάσει αυτού, είχαν αρχικά χαρακτηριστεί ως επαγωγοί της οξείας φλεγμονής, με διάφορες χημειοκίνες να βρίσκονται και να εκφράζονται έντονα σε λεμφοειδείς ιστούς, όπου τα λεμφοκύτταρα εκτός της έκφρασης ειδικών χημειοκινών, εκφράζουν και τους υποδοχείς τους. Παράλληλα συνεχώς νέα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι εκτός της φλεγμονής οι χημειοκίνες είναι σημαντικοί ρυθμιστές στην ανάπτυξη και την ομοιόσταση ποικίλων παθοφυσιολογικών διεργασιών όπως η οστεοπόρωση^[3], η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη^[4], οι ιϊκές λοιμώξεις^[5,6], οι ανοσολογικές αποκρίσεις^[7,8] και η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα^[9]. Πιο πρόσφατα οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους αναγνωρίστηκαν ως διαμεσολαβητικά μόρια στους μηχανισμούς και της χρόνιας φλεγμονής, η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη των καρκίνων του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του μαστού, του τραχήλου, του προστάτη, της κύστεως, των ωοθηκών , του οισοφάγου, του δέρματος και των λεμφαδένων^[10-13].

Οι μικρές αυτές πρωτεΐνες εκκρίνονται από μία πλειάδα διαφορετικών τύπων κυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα είτε sui generis είτε μετά από επαγωγή κάποιου φλεγμονώδους ερεθίσματος (μολυσματικοί μικροοργανισμοί, ιστικοί τραυματισμοί κ.α.)^[14-16].

Οι χημειοκίνες έχουν διαχωριστεί σε 4 κύριες οικογένειες βάσει της σχετικής θέσης των καταλοίπων κυτοσίνης που βρίσκονται στο Ν-άκρο της αμινοξικής αλυσίδας: CXC, CC, C και CX₃C, όπου το X αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε αμινοξύ^[14,15,17]. Oι CC, CXC, CX3C έχουν 0,1 και 3 μη συντηρημένα αμινοξέα ανάμεσα στις συντηρημένες κυστεΐνες αντίστοιχα ενώ από τις C χημειοκίνες απουσιάζουν το πρώτο και το τρίτο εκ των τεσσάρων συντηρημένων κυστεϊνών^[18]. Από τις 50 περίπου χημειοκίνες που έχουν καταγραφεί η πλειοψηφία ανήκει στις οικογένειες των CC και CXC. Οι CXC χημειοκίνες διαχωρίζονται περαιτέρω βάσει της παρουσίας ή όχι ενός μοτίβου αμινοξέων (Γλουταμίνη, Λευκίνη, Αργινίνη, ELR μοτίβο, από την συντομογραφία των συμβόλων των 3 αυτών αμινοξέων) το οποίο βρίσκεται μπροστά από την πρώτη εκ των δύο συνητηρημένων, κυστεϊνών^[19-21]. Οι ELR⁺ CXC χημειοκίνες έχει βρεθεί να έχουν ουδετερόφιλες χημειοτακτικές και αγγειογενετικές ιδιότητες, εν αντιθέσει με τις ELR⁻ CXC χημειοκίνες που είναι κυρίως αγγειοστατικές και προσελκύουν τα λεμφοκύτταρα και τα φυσιολογικά κύτταρα φονείς NK (Natural-Killer)^[20,21]. Οι CC χημειοκίνες επάγουν την μετανάστευση των μονοπύρηνων φαγοκυτταρικών λευκοκυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων, των Natural Killer καθώς και των εοσινόφιλων και βασεόφιλων κυττάρων. Οι C και CX₃C χημειοκίνες περιλαμβάνουν την λυμφοτακτίνη/XCL1 και φρακταλκίνη/ CX₃CL1 αντίστοιχα^[14,22]. Η λυμφοτακτίνη ελκύει τα λεμφοκύτταρα και τα Natural Killer, ενώ η φρακταλκίνη επιδρά κυρίως σε μονοπύρηνα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα, Natural Killer και λεμφοκύτταρα^[14,17].

Οι χημειοκίνες ρυθμίζουν την δράση τους μέσω της σύνδεσης τους σε 7 διαμεμβρανικούς G υποδοχείς^[15,23]. Τα μόρια των χημειοκινών προσδένονται στο εξωκυττάριο τους Ν-άκρο,

οδηγώντας στην φωσφοριλίωση των αμινοξέων σερίνης/θρεονίνης στο κυτταροπλασματικό C-άκρο και την αποευαισθητοποίηση του υποδοχέα^[24]. Κάθε υποδοχέας μπορεί να προσδένει χημειοκίνες μόνο από μία από τις γνωστές οικογένειες , και με βάσει αυτό το κριτήριο και οι υποδοχείς χωρίζονται σε 4 κατηγορίες (CXCR, CCR, CX3CR & CR) κάθε μία από τις οποίες μεσολαβεί για την δράση κάθε ομάδας χημειοκινών στα κύτταρα στόχους^[24]. Η σύνδεση ανάμεσα στις χημειοκίνες και του υποδοχείς παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και ποικιλία καθώς αρκετές χημειοκίνες προσδένονται σε διάφορους υποδοχείς ενώ και αντίστοιχα οι υποδοχείς αναγνωρίζουν περισσότερες από μία χημειοκίνες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα διαφορετικές χημειοκίνες να μπορούν να προσδεθούν σε ένα υποδοχέα και ένας υποδοχέας να μπορεί να αναγνωρίσει διαφορετικές χημειοκίνες, δημιουργώντας πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς, κάθε ένας εκ των οποίων οδηγεί και σε διαφορετική βιολογική απόκριση. Εκτός όμως της σύνδεσης τους με τους G υποδοχείς οι χημειοκίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλα πρωτεϊνικά στοιχεία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπως οι μη-σηματοδοτημένοι DARC (Duffy Antigen Receptor), D6 και CCX-CKR (υποδοχείς^[15,17,25-27]. ChemoCentryX ChemoKine Receptor) Επιπλέον εκτός της αλληλεπίδρασης τους με τους διάφορους υποδοχείς μπορούν ακόμα να προσδένονται σε γλυκοζαμινογλυκάνες που βρίσκονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον των λεμφοκυττάρων, των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων^[15,17,28]. Πέραν της διακυτταρικής σηματοδότησης η πρόσδεση τους αυτή δημιουργεί μία τοπική τεχνητή διαβάθμιση συγκέντρωσης ενισχύοντας την ευκολότερη προσέλκυση των κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς τους και επιπλέον μπορούν να προστατεύονται από την αποικοδόμηση τους^[28].

3.1.1 CC Χημειοκίνες

Η ομάδα των CC χημειοκινών διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες από την ύπαρξη 2 συντηρημένων κυστεϊνών κοντά στο Ν-αμινοτελικό τους άκρο. Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί 27 διαφορετικά είδη η ονοματολογία των οποίων είναι CCL1-CCL28 (οι CCL9 &

CCL10 αποτελούν την ίδια χημειοκίνη και έτσι προκύπτει το σύνολο των 27). Οι χημειοκίνες της ομάδας αυτής συνήθως περιέχουν 4 συντηρημένες κυστεΐνες (C4-CC χημειοκίνες) αλλά υπάρχει και ένας μικρός αριθμός με 6 κυστεΐνες (C6-CC χημειοκίνες) στις οποίες περιλαμβάνονται οι CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 & CCL28^[29,30,33]. Οι χημειοκίνες αυτής της οικογένειας συνολικά διεγείρουν την μετανάστευση των λευκοκυττάρων, καθώς και άλλων κυτταρικών τύπων όπως τα NK και τα δενδριτικά κύτταρα.

CC Chemokines						
Όνομα	Γονίδιο	Εναλλακτικές ονομασίες	Υποδοχέας	Βιολογική Δράση		
CCL 1	Scya 1	I-309, TCA-3	CCR8	προσελκύει : μονοκύτταρα, ΝΚ κύτταρα, αδιαμορφοποίητα Β-Λεμφοκύτταρα & Δενδριτικά κύτταρα		
CCL 2	Scya 2	MCP-1	CCR2	στρατολογεί : μονοκύτταρα, ενεργοποιημένα Τ-Λεμφοκυτταρα & Δενδριτικά κύτταρα		
CCL 3	Scya 3	MIP-1a	CCR1	στρατολογεί κ ενεργοποιεί πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα		
CCL 4	Scya 4	ΜΙΡ-1β	CCR1, CCR5	προσελκύει: μονοκύτταρα, ρυθμιστικά Τ-Λεμφοκύτταρα		
CCL 5	Scya 5	RANTES	CCR5	προσελκύει: Τ-Λεμφοκύτταρα, εοσινόφιλα, βασεόφιλα & στρατολογεί Λευοκύτταρα		
CCL 6	Scya 6	C10, MRP-2	CCR1			
CCL 7	Scya 7	MARC, MCP-3	CCR2	προσελκύει μονοκύτταρα ρυθμίζει την λειτουργία των μακροφάγων		
CCL 8	Scya 8	MCP-2	CCR1,CCR2B, CCR5	προσελκύει & ενεργοποιεί: μαστοκύτταρα, εοσινόφιλα, βασεόφιλα, Τ-Λεμφοκύτταρα, ΝΚ & Μονοκύτταρα		
CCL 9/10	Scya 9	MRP-2, CCF18, MIP-1γ	CCR1	προσελκύει: δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιεί τους οστεοκλάστες		
CCL 11	Scya 11	Eotaxin	CCR2, CCR3, CCR5	στρατολογεί εοσινόφιλα		
CCL 12	Scya 12	MCP-5		προσελκύει: εοσινόφιλα, μονοκύτταρα & λεμφοκύτταρα		
CCL 13	Scya 13	MCP-4, NCC-1, Ckβ10	CCR2, CCR3, CCR5	επάγει την χημειοταξία σε: μονοκύτταρα, εοσινόφιλα, βασεόφιλα & Τ-Λεμφοκύτταρα		

CCL 14	Scya 14	HCC-1, MCIF, Ckβ1, NCC-2, CCL	CCR1	ενεργοποιεί: μονοκύτταρα χωρίς όμως να επάγει την χημειόταξή τους
CCL 15	Scya 15	Lukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	CCR1,CCR3	Χημειοτακτική δράση σε: Ουδετρόφιλα, Μονοκύτταρα & Λεμφοκύτταρα
CCL 16	Scya 16	LEC, NCC-4, LMC, Ckβ12	CCR1,CCR2, CCR5, CCR8	προσελκύει μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα
CCL 17	Scya 17	TARC, Dendrokine, ABCD-2	CCR4	επάγει την χημειοταξία στα Τ- Λεμφοκύτταρα
CCL 18	Scya 18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ckβ7, MIP- 4		προσελκύει: αθώα(αδιαμορφοποίητα) Τ-Λεμφοκύτταρα, ρυθμιστικά Τ- Λεμφοκύτταρα, Τ2 βοηθητικά κύτταρα, Δενδριτικά κύτταρα, βασεόφιλα & Β- Λεμφοκύτταρα
CCL 19	Scya 19	ELC, Exodus-3, Ckβ11	CCR7	ενεργοποιεί επανακυκλοφορώντας λεμφοκύτταρα συμμετέχει στην μετανάστευση των Τ & Β Λεμφοκυττάρων
CCL 20	Scya 20	LARC, Exodus-1, Ckβ4	CCR6	ισχυρή χημειοταξία για τα λεμφοκύτταρα ασθενή χημειοταξία για ουδετερόφιλα
CCL 21	Scya 21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ckβ9, TCA-4	CCR7	
CCL 22	Scya 22	MDC, DC/β-CK	CCR4	
CCL 23	Scya 23	MPIF-1, Ckβ8, MIP-3, MPIF-1	CCR1	Ισχυρή χημειοτακτική δράση για ανενεργά Τ-Λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα Ασθενή χημειοτακτική δράση για τα ουδετρόφιλα
CCL 24	Scya 24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ckβ6	CCR3	Επάγει την χημείταξη στα εοσινόφιλα Ισχυρή χημειοτακτική δράση για ανενεργά Τ-Λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα Ασθενή χημειοτακτική δράση για τα ουδετρόφιλα
CCL 25	Scya 25	ΤΕϹΚ, Ϲkβ15	CCR9	Χημειοτακτική δράση σε: Θυμοκύτταρα, Μακροφάγα και Δενδριτικά κύτταρα
CCL 26	Scya 26	Eotaxin-3, MIP-4a, IMAC, TSC-1	CCR3	Χημειοτακτική δράση σε: εοσινόφιλα και βασεόφιλα
CCL 27	Scya 27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, Skinkine	CCR10	προσελκύει: Τ-Κυτταροτοξικά κύτταρα Διαδραματίζει ρόλο στην απόκριση των Τ-Λεμφοκυττάρων στις φλεγμονές
CCL 28	Scya 28	MEC	CCR3, CCR10	Καθοδηγεί στην εγκατάσταση στον βλενογόνο τα Β και Τ-Λεμφοκύτταρα Ε πάγει την μετανάστευση όλων των CCR3+ εοσινόφιλων κυττάρων

3.1.2 CXC Χημειοκίνες

Οι CXC χημειοκίνες μπορεί να διαφέρουν δομικά από τις αντίστοιχες της ομάδας των CC αλλά λειτουργικά επιτελούν παρόμοιο σκοπό καθώς συμμετέχουν στην καθοδήγηση της κίνησης διαφόρων κυτταρικών τύπων μέσω της σύνδεσης τους με τους ειδικούς τους υποδοχείς. Οι χημειοκίνες αυτής της κατηγορίας έχουν συσχετιστεί με την ανοσολογική απόκριση, την αγγειογένεση, και την βιολογία του καρκίνου.

Η έκφραση του υποδοχέα CXCR3 έχει βρεθεί σε αρκετά λευκοκύτταρα, αλλά εκεί κυρίως που έχει εντοπιστεί η δράση της είναι στην μετανάστευση των ενεργοποιημένων Τ- κυττάρων, ιδιαίτερα των προφλεγμονοδών Th1 T-κυττάρων τα οποία σημάνουν την περιοχή του τραυματισμού εκκρίνοντας Ιντερφερόνη-γ (IFNG) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor,TNF). Οι CXC χημειοκίνες φέρουν στο C-αμινοξικό τους άκρο μία θέση πρόσδεσης για την ηπαρίνη, συμμετέχοντας έτσι με διάφορους μηχανισμούς και στην αγγειογένεση^[31,32,33].

Το Ν-αμινοτελικό άκρο των CXC χημειοκινών είναι αυτό που ορίζει την ειδικότητα πρόσδεσης τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους. Τα μέλη τα οποία περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους το μοτίβο ELR (ELR⁺) έχουν αγγειογενετική δράση, ενώ κάποιες από αυτές όπως η IL-8 (CXCL8) είναι και πιθανό να δρουν σαν χημειοελκτικά μόρια για τα ουδετερόφιλα. Σε αντίθεση, μόρια όπως η PF-4 (CXCL4) και άλλες διεγερτικές για την ιντερφερόνη CXC χημειοκίνες, που δεν περιέχουν το ELR μοτίβο στην αλληλουχία τους έχουν πιθανή αγγειοστατική δράση.

CXC Chemokines					
Όνομα	Γονίδιο	Εναλλακτικές ονομασίες	Υποδοχείς	ELR μοτίβο	Βιολογική Δράση
CXCL1	Scyb 1	Gro-a, GRO1, NAP-3, KC	CXCR1,2	+	Εμπλέκεται στους μηχανισμούς: Αγγειογένεσης, αρτηριογένεσης, φλεγμονώδους απόκρισης, επώασης πληγών, καρκινογένεσης Έχει μιτογόνες ιδιότητες
CXCL2	Scyb 2	Gro-β, GRO-2, MIP-2α	CXCR2	+	Χημειοτακτική δράση σε: Πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα & αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα
CXCL3	Scyb 3	Gro-γ, GRO3, MIP-2β	CXCR2	+	Ελέγχει την μετανάστευση και την εγκατάσταση των: μονοκυττάρων και των πρόγωνων νευρικών κυττάρων

CXCL4	Scyb 4	PF-4	CXCR3	-	Χημειοτακτική δράση σε: Ουδετερόφιλα, Ινοβλάστες & μονοκύτταρα Επάγει την πήξη του αίματος, αναστέλλοντας την ΑΤΙΙΙ
CXCL5	Scyb 5	ENA-78	CXCR2	+	Επάγει την χημειοταξία των ουδετερόφιλων Εκφράζει αγγειογενετικές ιδιότητες
CXCL6	Scyb 6	GCP-2	CXCR1,2	+	Χημειοελκτική για κοκκιοκύτταρα ουδετερόφιλα
CXCL7	Scyb 7	ΝΑΡ-2, СТАРІІІ, β-ΤΑ, ΡΕΡ	CXCR2	+	Επάγει την: Μιτογένεση, σύνθεση μεσοκυτταρικής δομής, τον μεταβολισμό της γλυκόζης & σύνθεση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου
CXCL8	Scyb 8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1,CXCR2	+	Έχει χημειοτακτικές ιδιότητες και επάγει την μετανάστευση των: πρώιμων ουδετερόφιλων Επάγει : την φαγοκυττάρωση & την αγγειογένεση
CXCL9	Scyb 9	MIG, CRG-2	CXCR3	-	Χημειοελκτική για Τ- Λεμφοκύττρα
CXCL10	Scyb 10	IP-10, CRG-2	CXCR3	-	Χημειοτακτική για: Μονοκύτταρα, Μακροφάγα, Τ- Λεμφοκύτταρα, ΝΚ κύτταρα & Δενδριτικά κύτταρα Αντικαρκινικές Ιδιότητες Αγγειογενετική
CXCL11	Scyb 11	I-TAC, β-R1, IP-9	CXCR3, 7	-	Χημειοτακτική για : Ενεργοποιημένα Τ-Λεμφοκυτταρα
CXCL12	Scyb 12	SDF-1, PBSF	CXCR3, CXCR7	-	Ισχυρα Χημειοτακτική για Λεμφοκύτταρα & μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Κατευθύνει την μετανάστευση αιμοποιητικών κυττάρων Επάγει την αγγειογένεση
CXCL13	Scyb 13	BCA-1, BLC	CXCR3,5	-	Χημειοελκτική για: τις ομάδες Β1 & Β2 των Β-Λεμφοκυττάρων
CXCL14	Scyb 14	BRAK, Bolekine		-	Χημειοτακτική για: Μονοκύτταρα Επάγει την μετακίνηση των ενεργοποιημένων ΝΚ Αναστέλλει την αγγειγένεση μπλοκάροντας την χημειοταξία των ενδοθηκιακών κυττάρων
CXCL15	Scyb 15	Lungkine, WECHE		+	Στρατολογεί τα ουδετερόφιλα
CXCL16	Scyb 16	SRPSOX	CXCR6	-	Σηματοδοτεί την μετανάστευση για Τ-Λεμφοκύτταρα και ΝΚ
CXCL17	VCC-1	DMC, VCC-1		πιθανώς +	Έλκει δενδριτικά, ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα

3.1.3 C Χημεικοκίνες

Οι C ή γ Χημειοκίνες διαφέρουν ως προς τις υπόλοιπες ομάδες καθώς έχουν μόνο δύο κυστεϊνες, την Ν-τερματική και μία ακόμα ακριβώς ανοδικά της. Στην ομάδα αυτή έχουν εντοπιστεί μόνο 2 χημειοκίνες η XCL1 ή λυμφοτακτίνη-α και η XCL2 ή λυμφοτακτίνη-β^[33,34]. Οι χημειοκίνες αυτής της ομάδας εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στον σπλήνα, τον θύμο αδένα, το έντερο και στα λευκοκύτταρα του αίματος και έχουν αρκετά συγγενική αλληλουχία. Φέρονται να έλκουν τα Τ-κύτταρα και να επάγουν την χημειοταξία μέσω της πρόσδεσης τους στον υποδοχέα XCR1 καθώς και την κινητοποίηση του ασβεστίου στα λεμφοκύκυτταρα και τα ΝΚ^[34]. Η μεγάλη τους ομολογία ίσως υποδεικνύει ότι τα γονίδια των δύο αυτών χημεικοκινών έχουν προέλθει εξελικτικά μέσω απλού διπλασιασμού τους, υπόθεση που υποστηρίζεται πέραν της μεγάλης τους ομολογίας και από το γεγονός ότι σ' άλλα είδη(πχ. ποντίκι) εμφανίζεται να υπάρχει μόνο ένα εκ των δύο.

3.1.4 CX3C- Chemokines

Οι χημειοκίνες αυτής της κατηγορίας έχουν 3 αμινοξέα ενδιάμεσα των δύο συντηρημένων κυστεϊνών και από εκεί προκύπτει και η ονομασία τους CX3C. Η μόνη χημειοκίνη αυτής της ομάδας που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα είναι η Φρακταλκίνη (Fractalkine, CX3CL1)^[33,35,36]. Η χημειοκίνη αυτή είναι μία μεγάλη κυτταροκίνη 373 αμινοξέων, και περιέχει αρκετές διαφορετικές ενεργές περιοχές(domains). Η φρακταλκίνη φαίνεται να εκφράζεται εκτενώς στον εγκέφαλο και τους νευρώνες και ο υποδοχέας της CX3CR1, έχει εντοπιστεί στα μικρογλοιακά κύτταρα^[37].

3.2 Χημειοκίνες και Καρκίνος

Αν και αρχικά οι χημειοκίνες είχαν αναγνωριστεί ως χημειοελκτικά μόρια για τα λευκοκύτταρα, είναι πλέον ευρέως αναγνωρισμένο πως σχεδόν κάθε κυτταρικός τύπος, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινικών κυττάρων, είναι σε θέση να εκφράσει τόσο αυτές όσο και τους υποδοχείς τους^[38]. Οι όγκοι έχουν εξελικτικά αναπτύξει ποικίλους τρόπους ώστε να μπορούν να χρησιμοποιούν για ιδίον όφελος τους πολυλειτουργικούς ρόλους των μονοπατιών δράσης των χημειοκινών, με μοναδικό σκοπό την εξασφάλιση της δικής τους βιωσιμότητας και ανάπτυξης^[38]. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω: του ελέγχου πρόσβασης των λευκοκυττάρων στην περιοχή, της αναστολής της αντιογκογόνας ανοσολογικής απόκρισης, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση και τέλος επηρεάζοντας τον σχηματισμό και την διασπορά των μεταστατικών κυττάρων, διεργασίες που επιτελούνται μέσω τις έκκρισης των κατάλληλων χημειοκινών. Η αρχική δημιουργία του όγκου, η ανάπτυξη και η μετάστασή του είναι τρία στάδια που είναι άμεσα εξαρτώμενα από μία συγκεκριμένη αλληλουχία συμβάντων στα οποία οι χημειοκίνες έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Στην αρχική δημιουργία και τον μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν δύο κύριες κυτταρικές διαδικασίες^[40]:

- 1. Η Κυτταρική Γήρανση
- 2. Η απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Κοινό στοιχείο στις δύο αυτές διαδικασίες, στην διατήρηση τους αλλά και στην απώλεια τους, είναι ότι εμπλέκονται πλήθος διαφορετικών χημειοκινών και των υποδοχέων τους επηρεάζοντας την λειτουργία τόσο των ίδιων των κυττάρων που τις εκφράζουν όσο και των γειτονικών τους αλλάζοντας το περικυτταρικό τους περιβάλλον και μεταβάλλοντας την ομοιόστασή τους.

Η κυτταρική γήρανση είναι μία κατάσταση κατά την οποία διακόπτεται η ανάπτυξη του κυττάρου έτσι ώστε να αποτραπεί ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους^[41]. Ως αποτέλεσμα η κυτταρική γήρανση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για την προστασία των υγιών κυττάρων από την μετατροπή τους σε καρκινικά και για αυτό έχει έντονα προσελκύσει το ενδιαφέρον των διαφόρων καρκινικών μελετών. Η έκφραση διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι αυτή που παίζει σημαντικό ρόλο στο να έρθουν τα κύτταρα σε αυτή την κατάσταση, σταματώντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους^[42]. Πέραν όμως της γονιδιακής αυτής ρύθμισης η έκφραση διαφόρων χημειοκινών και κυτταροκινών καθώς και των υποδοχέων τους έχει βρεθεί να έχει ογκοκατασταλτικό (ενεργοποιώντας την κυτταρική γήρανση και σταματώντας την καρκινογένεση) ρόλο. Παράδειγμα γι' αυτό αποτελεί η IL-1^α και ο CXCR2 η απώλεια της ενεργότητας του οποίου σε συνδυασμό με τυχόν συσσωρευμένες βλάβες στο DNA μπορεί να μειώσει την έκφραση των ογκογονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση^[43]. Η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-kappa β και ο C/EBP β συνεισφέρει στην έκκριση των ειδικών για τον CXCR2 χημειοκινών^[43]. Επιπλέον η επανεισαγωγή στο κύτταρο του CXCR2 οδηγεί σε μία πρώιμη διαδικασία γήρανσης μέσω του p53 μονοπατιού, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας αυτός σε συνδυασμό με τις χημειοκίνες που προσδένει προάγει την διαδικασία της γήρανσης, επιβραδύνοντας την ογκογένεση. Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω, μεταλλαγή στο γονίδιο του υποδοχέα ή επίδραση σε ουσίες που δρουν καθοδικά του σηματοδοτικά, επηρεάζουν την ογκοπροστευτική του δράση^[44].

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Συνολικά η ομοιόσταση και ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα φυσιολογικά κύτταρα διατηρείται κάτω από αυστηρή χωροταξική και χρονική ρύθμιση της έκφρασης και της απόκρισης στους διάφορους αυξητικούς παράγοντες.

Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα τα οποία παρακάμπτουν την ρύθμιση αυτή του ξενιστή οργανισμού αναπτύσσοντας ένα δικό τους μοτίβο και αναλαμβάνοντας τον έλεγχο της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους^[45]. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν συσχέτιση ανάμεσα στις χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους με την ανάπτυξη και την εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων, μέσα από την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς και με ποικίλους άλλους τρόπους. Η πρόσδεση των υποστρωμάτων τους στους υποδοχείς χημειοκινών που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων επάγει την ενεργοποίηση των ΜΑΡΚ κινασών και του ΕRK σηματοδοτικού μονοπατιού, οδηγώντας στην έκφραση σημαντικών για τον όγκο ογκογόνων γονιδίων όπως οι κυκλίνες D1^[46] και ο HB-EGF^[47]. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο οι χημειοκίνες μπορούν να προωθήσουν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων είναι μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα καρκινικά κύτταρα (όπως αυξάνοντας την έκφραση του Mdm2^[48] και αντίστοιχα μειώνοντας την έκφραση του Bcl-2 ή αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών 3 κ 9^[49]). Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν εν καιρώ και την ικανότητα να παράγουν τα ίδια τις χημειοκίνες που χρειάζονται για να επάγουν την κυτταρική αύξηση και να εκφράζουν και τους υποδοχείς τους. Για παράδειγμα στο μελάνωμα έχουν βρεθεί να εκφράζονται ένας αριθμός χημειοκινών μεταξύ των οποίων οι CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8 CCL2 και CCL5, οι οποίες εμπλέκονται στην καρκινική ανάπτυξη^[50]. Εναλλακτικά στην προσπάθεια να μεταβάλλουν την ομοιόσταση του περικυτταρικού περιβάλλοντος τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να υπερεκφράσουν υποδοχείς χημειοκινών ώστε να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς πολλαπλασιασμού και στα γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα ο υποδοχέας CXCR4 έχει βρεθεί να εκφράζεται στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού όταν υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζεται καθόλου στα υγιή επιθηλιακά κύτταρα αυτού του ιστού^[51,52].

Ακόμα όμως και μετά την δημιουργία των καρκινικών κυττάρων σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη τους έχει η διατήρηση της ανάπτυξης τους, και στην οποία εκτός των άλλων συμμετέχουν διάφορες χημειοκίνες με τους υποδοχείς τους.

Πλήθος ερευνών υποδεικνύουν τον ρόλο των χημειοκινών και των υποδοχέων τους στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Οι χημειοκίνες, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ενεργοποιούν το MAPK/ERK σηματοδοτικό μονοπάτι και μέσω αυτού επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η CXCL12 εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνων όπως της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, χρόνιας Β κυτταρικής λευχαιμίας, του ωοθηκικού καρκίνου, του καρκίνου του μαστού, του μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων και του καρκίνου του παχέος εντέρου^[53-58]. Επιπλέον οι CXCL1, CXCL2 & CXCL3 έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος, των πνευμόνων, του οισοφάγου, του μελανώματος και του εντερικού αδενοκαρκινώματος^[59,60]. Ο CXCR4 ακόμα που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς τύπους και ενδεχόμενη αναστολή της έκφρασης του οδηγεί σε απόπτωση, καταδεικνύοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο του υποδοχέα στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό.

Ακόμα ένας υποδοχέας ο CXCR2 έχει βρεθεί να διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του οισοφάγου μέσω των CXCL1 & CXCL2 χημειοκινών^[61]. Οι υποδοχείς της CXCL8, CXCR1 και CXCR2, εκφράζονται σε καρκινικά γαστρικά κύτταρα επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Υπερέκφραση επίσης των 2 αυτών υποδοχέων σε κύτταρα ανθρωπίνου μελανώματος αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους και την ανάπτυξη του όγκου εν γένει^[62].

Ο υποδοχέας CCR6 εκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, και η διέγερση του μετά την σύνδεση με την χημειοκίνη CCL20 επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του ορθού^[63]. Επιπλέον η έκφραση του υποδοχέα CXCR6 όσο και της χημειοκίνης

που αναγνωρίζει, της CXCL16, μεσολαβεί στην εμφάνιση προ-ογκογόνων σχηματισμών στον προστάτη επάγοντάς την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων^[64]. Ο υποδοχέας CCR10 εκφράζεται σε κύτταρα μελανώματος και η έκθεση του στο μόριο στόχος CCL27 οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3-κινάσης η οποία προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Έτσι, ο συνδυασμός CCL27/CCR10 συνεισφέρει στην ανάπτυξη του μελανώματος με την ενεργοποίηση αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού μετριάζοντας ή ακόμα και αναστέλλοντας τις αντικαρκινικές αντιδράσεις του οργανισμού ξενιστή^[65]. Τα πλακώδη κύτταρα του καρκινώματος στην κεφαλή και τον λαιμό επίσης εκκρίνουν χημειοκίνες, τις CCL19 και CCL21, η οποίες με την σειρά τους οδηγούν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα CCR7 και την απαγωγή της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου^[66].

Από την άλλη όμως κάποιοι υποδοχείς χημειοκινών έχουν βρεθεί να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Ο υποδοχέας CCR1 για παράδειγμα μπορεί να μειώσει την δυνατότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του υπατοκυτταρικού καρκινώματος^[67]. Ακόμα η αναστολή του CCR5 σε κύτταρα με αρχέγονο τύπο p53 γονιδίου βρέθηκε να αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο του μαστού υποδεικνύοντας ότι ο CCR5 αναστέλλει μέσω κάποιου p53 επαγόμενου μονοπατιού την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού^[68].

Από όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στο ότι στην αρχική ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου στην οικογένεια των χημειοκινών υπάρχουν άλλες με ογκογόνο και άλλες με ογκοκατασταλτική δράση. Παρόμοιο μοτίβο δράσης τους (Επαγωγικό και κατασταλτικό) παρατηρείται και στις άλλες σημαντικές καρκινικές δραστηριότητες (ανοσολογική απόκριση, αγγειογένεση & μετάσταση) όπως θα δούμε και παρακάτω.

3.2.1 Χημειοκίνες και ανοσολογική απόκριση

Τα καρκινικά κύτταρα εκτός των εσωτερικών σηματοδοτικών αλλαγών που τους επιτρέπουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, αποκτούν την δυνατότητα να σχηματίσουν και να διατηρήσουν ένα ευνοϊκό περι-κυτταρικό περιβάλλον επάγοντας την αγγειογένεση, την δυνατότητα μετάστασης, την φλεγμονή και μετριάζοντας την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού ξενιστή. Τα δύο τελευταία χαρακτηριστικά του είναι και αυτά με τα οποία θα ασχοληθούμε στο παρόν κεφάλαιο.

Οι χημειοκίνες έχουν από καιρό συνδεθεί με την στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στις καρκινικές περιοχές καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή τους σ όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένων και των καρκινικών, συμβάλλοντας μ αυτό τον τρόπο καθοριστικά στον καθορισμό της σύστασης σε ανοσολογικά μόρια στο καρκινικό μικροπεριβάλλον^[69,70,71].

Τα ανοσολογικά κύτταρα που είναι επί το πλείστων επιφορτισμένα με την προστασία του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων, είτε σκοτώνοντάς τα είτε ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό τους, είναι τα Natural Killers (NK) και τα Τ-Λευκοκύτταρα και κυρίως οι CD4⁺ και CD8⁺ πληθυσμοί τους^[72]. Για να μπορέσουν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του όγκου είναι κρίσιμο για τα κύτταρα αυτά να μπορέσουν να αποικήσουν μέσα στην περιοχή του όγκου, και πιθανή εύρεση τους εκεί είναι πάντα ένας θετικός δείκτης πρόγνωσης. Στην δυνατότητα αυτή των κυττάρων του ανοσοποιητικού εμπλέκονται κυρίως χημειοκίνες των οικογενειών CC και CXC.

Η Th1 εξαρτώμενη ανοσολογική απόκριση, η ποιότητα και ισχύ της οποίας είναι και από τους πλέον κρίσιμους παράγοντες στην αντικαρκινική δράση του οργανισμού, είναι ήδη ισχυρά συνδεδεμένη με τον υποδοχέα CXCR3 και τις χημειοκίνες που αναγνωρίζει με κυριότερες τις CXCL9 και CXCL10^[72,73,74]. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μέσω του CXCR3

ανοσολογική απάντηση επιτυγχάνεται με την στρατολόγηση των ΝΚ ανοσοποιητικών κυττάρων, των CD4⁺ Th1 κυττάρων και των CD8⁺ T-Κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων μέσα στην περιοχή του όγκου^[75-78]. Η έκφραση των CXCL9 και CXCL10 επάγεται από τις τύπου Ι και ΙΙ Ιντερφερόνες, οι οποίες όταν επιστρατεύονται στην περιοχή του όγκου από τα παρόντα ανοσοποιητικά κύτταρα που τις εκκρίνουν έχουν την δυνατότητα να ρυθμίσουν αυξητικά την έκφραση των δυο αυτών χημειοκινών ενδοκαρκινικά μειώνοντας την ανάπτυξη του καρκίνου.

Ο υποδοχέας CCR5 και το μόριο στόχος του CCL5 εμπλέκονται επίσης στην στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων με έντονη αντικαρκινική δράση^[79]. Πιθανή ανεπάρκεια του CCR5 σε μοντέλα ποντικών έχει βρεθεί να επιταχύνει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών τύπων όπως του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος Lewis, του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και του λεμφώματος. Η έκφραση του CCR5 τόσο σε CD4⁺ όσο και σε CD8⁺ T-κύτταρα είναι σημαντική για την ανάπτυξη της αντικαρκινικής ανοσίας.

Οι όγκοι στην προσπάθεια τους να αποφεύγουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή έχει βρεθεί να διαταράσσουν ακόμα και να εξαφανίζουν την χημειοτακτική ομοιόσταση εντός τους. Για να υποστηρίξουν αυτή την δυνατότητα τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν μειωτικά την έκφραση της CCL27, η μείωση της οποίας έχει βρεθεί πειραματικά να μειώνει την δυνατότητα ανοσολογικής απόκρισης τους ξενιστή και να προκαλεί σημαντική αύξηση της ανάπτυξης του όγκου in vivo^[80].

CC και CXC χημειοκίνες έχουν ακόμα βρεθεί να εμπλέκονται στην έλξη των μυελοειδών κατασταλτικών κυττάρων (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) στην περιοχή του όγκου^[81]. Τα κύτταρα αυτά είναι ένας αρκετά ετερογενής πληθυσμός ανοσοποιητικών κυττάρων καθώς περιλαμβάνουν τόσο μυελοειδή όσο και μονοπύρηνα φαγοκύτταρα, με ανασοκατασταλτική δράση^[82,83].

Παραδόξως οι υποομάδες αυτές ανοσολογικών κυττάρων με την δράση τους μπορούν να καταστείλουν την απόκρισή των κυτταροτοξικών αντικαρκινικών ανοσολογικών κυττάρων βοηθώντας στην ουσία την ανάπτυξη του όγκου. Κύτταρα αυτών των πληθυσμών είναι τα συνδεόμενα με τον όγκο μακροφάγα (tumor-associated macrophages, TAM), τα μυελοειδικά κατασταλτικά κύτταρα (myeloid-derived suppressor cells, MDSD) και τα ρυθμιστικά Tκύτταρα (Treg) ^[72].Τα κύτταρα που φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο κλειδί σε πλήθος παραμέτρων που αφορούν την ανάπτυξη των νεοπλασμάτων ιστών είναι τα ώριμα καρκίνοσυνδεδεμένα μακροφάγα (Tumor-Associated Macrophages, TAM)^[84,85]. Τα μακροφάγα είναι τύποι λευκοκυττάρων του ανασοποιητικού συστήματος τα οποία κατά την ενεργοποίηση τους μπορούν να δημιουργήσουν 2 κυτταρικούς πληθυσμούς τους Μ1 και Μ2 εκ των οποίων ο πρώτος έχει την ικανότητα να επάγει την φλεγμονή ενώ ο δεύτερος να την καταστέλλει και να ξεκινάει την διαδικασία της επιδιόρθωσης των βλαβών του ιστού. Ο τύπος της διαμόρφωσης των μακροφάγων εξαρτάται από τα ενεργοποιητικά σήματα που θα λάβουν τα κύτταρα από το τοπικό τους περιβάλλον^[86] καθώς πιο συγκεκριμένα: η IFNγ προωθεί τα κύτταρα προς την M1 κατάσταση, ενώ οι IL-4, IL-13 και TGF-β προς την M2 . Τα M1 μακροφάγα έχουν ογκοκατασταλτική δράση, πιστεύεται κυρίως μέσω της δυνατότητας τους να εκφράζουν στην επιφάνεια τους αντιγόνα τα οποία θα αναγνωριστούν και θα ενεργοποιήσουν τους πληθυσμούς των Τ-κυττάρων. Αντίθετα τα Μ2 συμμετεχουν στην απόκρισή των Th2 λευκοκυττάρων και εκφράζουν υψηλά επίπεδα διαφόρων ογκογόνων παραγόντων που διευκολύνουν την καρκινική ανάπτυξη και μετάσταση. Κρίσιμο ρόλο στην διαμορφοποίηση αυτή διαδραματίζει ο υποδοχέας χημεικοκινών CXCR3^[87]. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έχει βρεθεί ότι στον καρκίνο του μαστού, ανεπάρκεια του υποδοχέα αυτού οδηγεί τα μακροφάγα προς την M2 διαμόρφωση η οποία ενισχύει την καρκινική ανάπτυξη, υποδηλώνοντας την σημασία της παρουσίας του για τον σωστό προσανατολισμό των μακροφάγων.

Τα μακροφάγα κύτταρα ΤΑΜ εκφράζουν κυρίως ιδιότητες των M2 μακροφάγων ^[88]και έχουν βρεθεί σε διάφορες μελέτες να επάγουν διάφορες ευνοϊκές για τον καρκίνο λειτουργίες , μεταξύ των οποίων , ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και η αποτροπή της ανοσολογικής απόκρισης. Επιπλέον η σημασία του ρόλου τους φαίνεται και από κλινικές μελέτες οι οποίες κατέδειξαν την συσχέτιση ανάμεσα στην υψηλή συγκέντρωση μακροφάγων και την αρνητική πρόγνωση για την εξέλιξη του όγκου^[89]. Αντίστροφα, γενετικά πειράματα σε ποντίκια δείχνουν χαμηλότερου βαθμού καρκινική ανάπτυξη και μικρότερες δυνατότητες μετάστασης σε πληθυσμούς με χαμηλότερο αριθμό ΤΑΜ κυττάρων^[90]. Τα μακροφάγα αυτά κύτταρα είναι πιθανό να έχουν την δυνατότητα και τα ίδια να εκφράζουν χημειοκίνες , όπως οι CCL17 & CCL22, οι οποίες έλκουν πληθυσμούς Τ-κυτταρων οι οποίοι δεν έχουν κυτταροτοξική δράση, (Treg και Th2 λευκοκύτταρα) ως μέσο για να εκφράσουν μέρος της λειτουργίας τους καταστολής του ανοσοσποιητικού συστήματος^[91]

Μακροφάγα ΤΑΜ κύτταρα που έχουν απομονωθεί από καρκίνο των ωοθηκών εκφράζουν ακόμα την CCL18 η οποία έλκει τα αδιαμορφοποίητα Τ-Λευκοκύτταρα, διαδικασία^[92] η οποία σε έναν ιστό με υψηλή συγκέντρωση σε M2 μακροφάγα και διάφορους άλλους αναστολείς της ανοσολογικής απόκρισης θα προκαλέσει απενεργοποίηση της Τ-εξαρτώμενης άμυνας του οργανισμού ξενιστή. Εξαιτίας αυτής της σημασίας τους είναι κρίσιμο για τα καρκινικά κύτταρα να μπορούν να εκφράζουν χημειοκίνες ώστε να είναι σε θέση να μπορούν να τα έλξουν προς την περιοχή του όγκου αυξάνοντας τις πιθανότητες επιβίωσης τους.

Για να μπορέσουν τα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν ένα ακόμα πλεονέκτημα στην ανάπτυξη τους, μπορούν και αλλάζουν το προφίλ έκφρασης των χημειοκινών στο μικροπεριβάλλον τους ώστε να μπορέσουν να στρατολογήσουν αυτά τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα. Τα Τ-κύτταρα Treg, ανευρίσκονται συχνά_στους όγκους, και είναι ισχυροί υποψήφιοι για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της παραγωγής IL-10 και TGB-β^[93]. Επιλεκτική καταστολή των Treg κυττάρων σε διάφορα πειράματα και καρκινικά μοντέλα έχει βρεθεί να επάγει την ΝΚ και Τ-εξαρτώμενη αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση^[94-96], ενώ αντίθετα η παρουσία τους έχει συνδεθεί με επιβαρυμένη πρόγνωση^[97]. Επιπλέον σε ένα μοντέλο καρκίνου του μαστού τα CCR4⁺ Treg βρέθηκαν να επάγουν τον σχηματισμό μεταστάσεων προκαλώντας την απόπτωση των ΝΚ κυττάρων^[98]. Σχετικά με τα Treg κύτταρα έχει ήδη αναφερθεί ότι εκτός των άλλων μπορούν να εκφράσουν και μεταγραφικούς παράγοντες των Th-κυττάρων και υποδοχείς χημειοκινών για να διασφαλίσουν τον απαραίτητο έλεγχο της Th-εξαρτώμενης προφλεγμονώδους ανοσολογικής απόκρισης^[99].

Τέλος στο κεφάλαιο της ανοσολογικής απόκρισής μία ιδιόμορφη περίπτωση χημειοκίνης είναι της CXCL16 η οποία συνεισφέρει στην μετακίνηση των λεμφοκυττάρων εντός των όγκων. Το οξύμωρο με αυτή την χημειοκίνη είναι ότι σε περιπτώσεις καρκίνων όπως του ανθρώπινου γλοιώματος, ορθοκολικού, νεφρικού και καρκίνου του μαστού, όγκοι με υψηλά επίπεδα έκφρασης της εν λόγω χημειοκίνης είχαν πιο βραδεία εξέλιξη και παρουσίαζαν μεταφορά CD4 & CD8 λεμφοκυττάρων εντός του όγκου^[100-104], ενώ αντίθετα στον καρκίνο του προστάτη η έκφραση της CXCL16 είναι συνδεδεμένη με επιβαρυμένη πρόγνωση^[105].

3.2.2 Χημειοκίνες και Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μία κρίσιμη βιολογική διαδικασία τόσο κάτω από φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες και επιπλέον διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη, την ανάπτυξη και την δυνατότητα μεταστάσεων ενός καρκίνου. Από το σύνολο των χημειοκινών, η CXC ομάδα είναι αυτή που φαίνεται να έχει τον πιο κεντρικό ρόλο στην διαδικασία αυτή, αν και τα μέλη της φαίνεται να συμμετέχουν με σημαντικά ανομοιογενή τρόπο, καθώς περιλαμβάνονται σ αυτήν μέλη τόσο με αγγειογενετικές όσο και με αγγειοκατασταλτικές ιδιότητες^[106]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η CXC οικογένεια των χημειοκινών διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες αναλόγως της παρουσίας ή όχι του μοτίβου γλουταμινικού οξέως-λευκίνηςαργινίνης (ELR motif)^[19-21].

Οι ELR⁺ χημειοκίνες χαρακτηρίζονται συνολικά από αγγειογενετικές ιδιότητες ενώ αυτές από τις οποίες απουσιάζει το μοτίβο ELR⁻ από αγγειοστατική δράση. Βάσει αυτού του διαχωρισμού στην κατηγορία των αγγειογενών χημειοκινών περιλαμβάνονται οι: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 & CXCL8 και οι οποίες έχουν βρεθεί να αλληλοεπιδρούν με δύο υποδοχείς, τους CXCR1 & CXCR2^[107]. Από τους δύο αυτούς υποδοχείς όμως ο CXCR2 φαίνεται να είναι ο υποδοχέας μέσω του οποίου κυρίως εκδηλώνεται η αγγειογενής τους δράση, καθώς η έκφραση του είναι απαραίτητη για την χημειοταξία εντός του ενδοθηλίου^[108]. Εκτός όμως από τους 2 αυτούς υποδοχείς οι CXCL1, CXCL5 και CXCL8 αλληλεπιδρούν και με έναν ακόμα μη σηματοδοτικό υποδοχέα, *τον υποδοχέα ερυθρών* αιμοσφαιρίων Duffy (red bllod Duffy Antigen Receptor for Chemokines, DARC), οποίος φαίνεται να λειτουργεί σαν ανταγωνιστής των άλλων δύο, δεσμεύοντας τις πλεονάζουσες αυτές χημειοκίνες, δημιουργώντας κατά συνέπεια ένα λιγότερο αγγειογενές περιβάλλον, το οποίο αναστέλλει την καρκινική ανάπτυξη και την δυνατότητα μετάστασης του όγκου^[109].

Οι ELR⁻ χημειοκίνες χαρακτηρίζονται από αγγεοστατική δράση και περιλαμβάνουν τις CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 & CXCL14. Οι χημειοκίνες CXCL9, CXCL10 και CXCL11 έχουν σαν κύριο υποδοχέα τον CXCR3^[111,112]. Πρόσφατα όμως περιεγράφηκαν δύο ακόμα ισόμορφες του υποδοχέα αυτού οι οποίες προέρχονται από εναλλακτικό ανασυνδυασμό του mRNA. Συνολικά οι τρεις αυτές μορφές περιγράφονται ως CXCR3A, CXCR3B & CXCR3-alt^[107,113]. Σε μελέτη κυτταρικής σειράς μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων-1, σχεδιασμένων να εκφράζουν είτε τον CXCR3A είτε τον CXCR3B, αναγνωρίστηκε η ικανότητα των κυττάρων να δεσμεύουν τις CXCL9, CXCL10 & CXCL11 ανεξαρτήτως τους εκφραζόμενου υποδοχέα, ενώ αντίθετα η CXCL4 βρέθηκε να προσλαμβάνεται μόνο στα κύτταρα που εξέφραζαν τον CXCR3B^[113], υποδεικνύοντας τον ρόλο του ως τον λειτουργικό υποδοχέα για την εν λόγω χημειοκίνη. Αντίστοιχα ο CXCR3alt που προκύπτει από εναλλακτική μετα-μεταγραφική διαμορφοποίηση των εξονίων του εμφανίζεται με μειωμένη σύνδεση για τις CXCL9 και CXCL10, ενώ διατηρεί την ικανότητα σύνδεσης με την CXCL11^[110]. Οι ELR⁻ χημειοκίνες CXCL4 και CXCL14, έχουν βρεθεί να έχουν έντονα αγγειοστατικές δυνατότητες. Η CXCL4 είναι η κατεξοχήν αγγειοστατική χημειοκίνη και δρα κυρίως μέσω του CXCR3 υποδοχέα^[114]. Επιπλέον όσον αφορά την CXCL14 μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα δείχνουν ότι απώλεια ή και μείωση της έκφρασης του συνδέεται με εντονότερη καρκινική ανάπτυξη. Ακόμα έχει βρεθεί από μελέτη η CXCL14 να αναστέλλει την κυτταρική χημειοταξία των CXCL8, VEGF & bFGF in vitro και την αγγειογένεση in vivo^{[115}Παρακάτω θα αναφερθούμε εκτενέστερα στις δύο αυτές ομάδες οι οποίες φαίνεται να επωμίζονται το μεγαλύτερο βάρος στον έλεγχο της αγγειογένεσης και της νεοαγγειογένεσης.

Εκτός όμως από τις CXC αγγειογενείς χημειοκίνες, έχουν συνδεθεί με την νεοαγγειογένεση και 3 μέλη της οικογένειας των CC χημειοκινών, οι CCL2, CCL11 και CCL16. Η CCL11 χρησιμοποιεί τον υποδοχέα CCR3 για να επάγει την χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων και να ενεργοποιήσει την αγγειογένεση^[116]. Η CCL16 αρχικά εκφράζεται στο ήπαρ, γεγονός που υποδεικνύει ότι ίσως να συμμετέχει στην ανάπτυξη των αγγείων στο ήπαρ και την αγγειογένεση σε διάφορες ηπατικές ασθένειες ^[117]. Ακόμα έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την διαφοροποίηση τους σε τριχοειδείς δομές, μέσω της ενεργοποίησης του CCR1^[117].

Η CCL2 είναι η καλύτερα μελετημένη CC χημειοκίνη που επάγει την αγγειογένεση.Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CCR2, που είναι ο υποδοχέας της, και συμμετέχουν στην χημειοταξία και τον σχηματισμό των αγγείων in vitro^[118-120]. Η CCL2εξαρτώμενη αγγειογένεση φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις διάφορες μεταλλοπρωτεϊνάσες και κυρίως την MT1-MMP, για την οποία ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι ενδεχόμενη απενεργοποίηση της οδηγεί σε μείωση της αγγειογένεσης τόσο in

vivo όσο και in vitro ^[119]. Η αγγειογενής δράση της CCL2 φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της επίδρασής της στην χημειοταξία των λευκοκυττάρων, και κυρίως την ασκεί απευθείας πάνω στο αγγειακό ενδοθήλιο^[121].

3.2.2.1 ELR+ χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες αυτής της υποομάδας μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη του καρκίνου μέσω της επαγωγής της αγγειογένεσης την οποία επιτυγχάνουν είτε με την απ' ευθείας σύνδεση τους στους ανάλογους υποδοχείς τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είτε έμμεσα στρατολογώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (όπως έχουμε ήδη αναφέρει) και τα οποία με την σειρά τους εκκρίνουν αγγειογενείς παράγοντες όπως ο VEGF και ο bFGF^[122].

Τα μέλη αυτή της ομάδας περιλαμβάνουν τις χημειοκίνες: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 και CXCL8, οι 3 πρώτες εκ των οποίων έχουν ήδη βρεθεί να εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ανθρώπινο μελάνωμα^[123]. Οι αγγειογενείς αυτές χημειοκίνες μπορούν να δρουν τόσο μόνες τους όσο και σε συνέργεια με άλλους αγγειογενείς παράγοντες^[124]. Ένα παράδειγμα για την δεύτερη αποτελεί η έκφραση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης τις αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η οποία με την σειρά της επάγει την έκκριση της CXCL8 στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[125]. Η τελευταία στην συνέχεια δρα αυτοκρινώς αλλά και παρακρινώς επηρεάζοντας τα παρακείμενα κύτταρα και διατηρώντας το αγγειογενετικό περιβάλλον στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζει και επηρεάζει^[126]. Έχει βρεθεί ακόμα η CXCL8 να μπορεί να μεσολαβεί και στην χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων, επάγοντας την αγγειογένεση in vivo αλλά και in vitro. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά παρατηρούνται ακόμα και χωρίς τον σχηματισμό φλεγμονής, υποδεικνύοντας την άμεση επίδραση πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[127]. Τόσο η αυτοκρινής όσο και η παρακρινής επίδραση του VEGF στην

αυξημένη ρύθμιση της έκκρισης του CXCL8 έχει τεκμηριωθεί και από μία έρευνα πάνω στα ουδετερόφιλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, στην οποία μελέτη βρέθηκε ότι η επαγωγή της αγγειογένεσης έλαβε χώρα μέσω ενός παρακρινούς αυτό-τροφοδοτούμενου μηχανισμού, ο οποίος ενεργοποιήθηκε από CXCL8 εκκρινόμενη από ενδοθηλιακά κύτταρα^[128].

Σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους όπως ο καρκίνος του προστάτη, έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά CXCL8 στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς όμως να συνοδεύονται και από αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις στα φυσιολογικά και στα καλοήθη υπερπλαστικά κύτταρα αυτών των ιστών^[129]. Επιπροσθέτως τα επίπεδα της CXCL8 έχουν βρεθεί να είναι 4 φορές υψηλότερα στα ομογενοποιήματα του μεγαλοκυτταρικού βρογχογενούς καρκινώματος σε σχέση με τον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό^[130]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αντισώματα έναντι της CXCL8 μπορούν αποτελεσματικά να αναστείλουν την καρκινογένεση και την σχετιζόμενη με τον καρκίνο αγγειογένεση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη.

Το γεγονός ότι όλοι οι υποδοχείς των ELR⁺ χημειοκινών επάγουν την αγγειογένεση, υπογραμμίζει την σημασία του να αναγνωριστεί ένας κοινός μηχανσιμός που προωθεί την βιολογική τους δράση στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Στα ποντίκια φαίνεται όλες οι ELR⁺ χημειοκίνες να δρουν μέσω του CXCR2 υποδοχέα, ενώ στον άνθρωπο τόσο μέσω του CXCR2 όσο και του CXCR1^[107]. Στον ανθρώπινο οργανισμό όλες οι ELR⁺ μπορούν και προσδένονται στον CXCR2 ενώ αντίθετα μόνο δύο εξ αυτών, οι CXCL6 και CXCL8, μπορούν να προσδεθούν και στον 1^[131]. Ως εκ τούτου ο CXCR2 θεωρείται ως ο κατεξοχήν υποδοχέας στην αγγειογένεση καθώς η έκφραση μόνο αυτού αρκεί για την χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρότι σ αυτά εντοπίζονται τόσο ο CXCR2 όσο και ο CXCR1^[131,132].

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα CXCR2 οδηγεί σε διαχωρισμό του συμπλέγματος των αμινοξικών αλυσίδων του υποδοχέα G (α, β, γ) στις υπομονάδες α και β,γ οι οποίες μεσολαβούν για την ρύθμιση διαφόρων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως:

Camp/PKA, της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), της φωσφολιπάσης C (PLC), 3-κινάσης φωσφοϊνοσιτίδης/AKT/ mTOR, Ras/Raf/MEK/JNK/ERK1/p38 και επίσης τα μονοπάτια του NF-kB^[133-138]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από τις ELR⁺ χημειοκίνες μπορεί να οδηγήσει είτε στην απορρόφηση από το κύτταρο του υποδοχέα, είτε στην αποδόμηση του ή και στην ανακύκλωση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη^[139]. Το μέλλον του υποδοχέα μετά την ενεργοποίηση καθορίζεται από την εκάστοτε εξωκυτταρική συγκέντρωση των μορίων στόχων του, καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο ενεργοποιημένος υποδοχέας μετά την ενδοκυτταρική του απορρόφηση επαναπροωθείται προς την κυτταρική μεμβράνη για να ξαναχρησιμοποιηθεί, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσει των ELR⁺ προσδετών του ο υποδοχέας κατευθύνεται προς τα λυσοσώματα για πρωτεόλυση^[140].

3.2.2.2 ELR⁻ Χημειοίνες

Αντίθετα με τις ELR⁺ χημειοκίνες, οι ELR⁻ έχουν αγγειοστατική δράση και αναστέλλουν την ενδοθηλιακή χημειοταξία^[141]. Στα αγγειοστατικά μέλη των CXC χημειοκινών ταξινομούνται οι : CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 και CXCL14^[141-144]]. Από αυτές οι CXCL 9, 10 και 11 επάγονται ισχυρά από τις τύπου Ι και ΙΙ ιντερφερόνες (IFN-α/β και IFN-γ, αντίστοιχα). Οι χημειοκίνες αυτού του τύπου είναι πιθανοί αναστολείς της αγγειογένεσης σε απόκριση των ELR⁺ χημειοκινών καθώς και των VEGF και bFGF. Η CXCL4 είναι η πρώτη αγγειοστατική χημειοκίνη που περιεγράφηκε^[145] και είναι ένας εν δυνάμει αναστολέας της χημειοταξίας των ενδοθηλιακών κυττάρων και του πολλαπλασιασμού τους, και επιπλέον έχει βρεθεί να αναστέλλει τις αγγειογενετικές ιδιότητες των VEGF και bFGF^[146].

Παρότι η εκκρινόμενη CXCL4 και CXCL4L1 διαφέρουν μόνο κατά τρία αμινοξέα, η δεύτερη είναι πιο πιθανό να αναστέλλει την αγγειογένεση που προκαλείται από την απόκριση σε αγγειογενετικούς παράγοντες^[144]. Ακόμα η σχέση Ιντερφερονών και των επαγόμενων από τις ιντερφερόνες χημειοκινών με την βιολογική τους δράση είναι σε άμεση συνάρτηση και με

άλλες κυτταροκίνες όπως οι Th1/Type 1 κυτταροκίνες οι οποίες και διεγείρουν περαιτέρω την έκφραση των ιντερφερονών. Έτσι κυτταροκίνες όπως η IL-23, IL-21, IL-18, IL-15 και IL-2 μαζί με άλλες διαφορετικής οικογένειας όπως οι CCL19 και CCL21 μέσω της αύξησης της έκφρασης των ιντερφερονών έχουν επίπτωση πάνω στην έκφραση των CXCL9, CXCL10 και CXCL11^[147,148].

Η CXCL10 είναι επίσης μία αγγειοστατική ELR⁻ χημειοκίνη η οποία παράγεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις από το ανθρώπινο μεγαλοκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)^[149]. Στο ανθρώπινο καρκίνωμα ο βαθμός της έκκρισης της CXCL10 εξαρτάται από το επίπεδο της ανάπτυξης του καρκινώματος, καθώς λιγότερο επιθετικοί καρκίνοι στον πνεύμονα εκκρίνουν περισσότερη CXCL10. Παρόμοια με την 10 δρα και η CXCL9, η οποία διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αγγειογένεσης των ανθρωπίνων NSCLC^[149].

Η CXCL14 είναι μία ακόμα ELR⁻ χημειοκίνη η οποία κυρίως εκφράζεται στον μαστό και τους νεφρούς και η οποία επίσης έχει βρεθεί να αναστέλλει την αγγειογένεση^[143]. Αρχικά η CXCL14 είχε αναγνωριστεί σε καρκινώματα της κεφαλής όπου η έκφραση της είχε βρεθεί να υπόκειται σε μειωτική ρύθμιση στα καρκινικά δείγματα^[150]. Υπάρχουσα μελέτη έχει ήδη δείξει ότι η χημειοκίνη αυτή μειώνει την χημειοταξία για τις CXCL8, VEGF και bFGF in vitro και δρα ως πιθανός καταστολέας της αγγειογένεσης in vivo^[143].

Η μέχρι τώρα βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι ο CXCR3 είναι ο θεωρούμενος υποδοχέας αναγνώρισης και απόκρισης απέναντι στις χημειοκίνες: CXCL4, CXCL9, CXCL10 και CXCL11. Παρ όλα αυτά όμως η CXCL4 εμφανίζει υψηλή συγγένεια μόνο με τον CXCR3B και παραμένει ακόμα ασαφές αν αυτές οι χημειοκίνες τον χρησιμοποιούν στο ενδοθήλιο για να προωθήσουν την αγγειοστατική τους δράση in vivo. Οι ELR⁻ χημειοκίνες, CXCL4 και CXCL14, έχει βρεθεί να επιδεικνύουν αποκλειστικά αγγειοστατικές ιδιότητες. Η CXCL4 είναι η χαρακτηριστικότερη αγγειοστατική χημειοκίνη που χρησιμοποιεί τον υποδοχέα CXCR3.

Ακόμα η CXCL4 μπορεί να δράσει και μέσω της αλληλεπίδρασής της με γλυκοζαμινογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας και με αγγειογενής διαμεσολαβητές και τους υποδοχείς τους όπως οι bFGF και CXCL8^[151]. Η CXCL10 από την άλλη ασκεί την αγγειοστατική της δράση αποκλειστικά μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον υποδοχέα CXCR3 και όχι τις γλυκοζαμινογλυκάνες^[152]. Η κύρια όμως αγγειοστατική δράση εν γένει των ELR⁻χημειοκινών επέρχεται μέσω της σύνδεσης με τον υποδοχέα, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση τους με τις κυτταροπλασματικές γλυκοζαμινογλυκάνες δεν είναι καίρια και απαραίτητη για την απόκριση των κυττάρων και την αγγειοκαταστολή^[153].

Μία ιδιαίτερη περίπτωση αυτής της ομάδας είναι η χημειοκίνη CXCL12. Αν και η CXCL12 είναι μία ELR⁻ χημειοκίνη, και ο υποδοχέας CXCR4 είναι ο κυριότερος υποδοχέας της, η σύζευξη των δύο έχει συνδεθεί με την καρκινική μετακίνηση και μετάσταση^[154-157]. Σε ένα πρόσφατο μοντέλο ογκογένεσης και μετάστασης του ανθρωπίνου NSCLC, αποδείχθηκε ότι ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται επικρατώς σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα, καρκινικά κύτταρα του εντέρου και του NSCLC προάγοντάς τόσο την ανάπτυξη του καρκίνου όσο και την ενδεχόμενη μετάστασή του. Παρ όλα αυτά σε μοντέλα ζώων καρκίνου του μαστού και των νεφρών, αδρανοποίηση του CXCL12 ή του CXCR4 εξασθένησε την δυνατότητα του όγκου για μετάσταση, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην αγγειογένεση εντός του όγκου καθώς και στην αύξηση του μεγέθους του, υποδεικνύοντας ότι η δυνατότητα του άξονα CXCL12-CXCR4 να επάγει την μετάσταση είναι ανεξάρτητη της δυνατότητας του να επάγει την αγγειογένεση^[159]. Ακόμα μελέτες σε κύτταρα HUVEC επίσης έδειξαν ότι επίδραση σ αυτά με VEGF ή bFGF, οδήγησε σε αυξανόμενη έκφραση του CXCR4 και αυξανόμενη μετανάστευση των κυττάρων προς την CXCL12^[158]. Κάποιες μελέτες ακόμα δείχνουν ότι ενέσεις με CXCL12 και VEGF σε μοντέλα ποντικιών αύξησαν τον ρυθμό δημιουργίας νέων μικροαγγειακών σχηματισμών μέσω του υποδοχέα αυτού, αποτέλεσμα όμως που χρειάζεται μεγαλύτερη τεκμηρίωση^[159].

Συνολικά η ρυθμιζόμενη από τις CXC χημειοκίνες αγγειογένεση είναι μία από τις πιο κρίσιμες διαδικασίες στην ανάπτυξη διαφόρων κακοηθειών μεταξύ των οποίων στον πνεύμονα, στο παχύ έντερο, στο πάγκρεας, στον προστάτη, στο μελάνωμα, στον εγκέφαλο και στους νεφρούς. Είναι γεγονός ότι όλες οι NSCLC κυτταρικές σειρές που συστηματικά εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα της CXCL8 έχουν μεγαλύτερη αγγειογενετική δράση^[160,161], και επιπλέον όταν οι αγγειογενετικές χημειοκίνες εν γένει αδρανοποιούνται η αγγειογένεση μειώνεται, συμπαρασύροντας και την καρκινική ανάπτυξη καθώς και την δυνατότητα μετάστασης του όγκου^[162].

3.2.3 Χημειοκίνες και Μετάσταση

Ο όρος μετάσταση αναφέρεται στην μετανάστευση κακοήθων κυττάρων σε περιοχές διαφορετικές από αυτές του αρχικού όγκου. Κατά την διαδικασία αυτή ένα κακόηθες καρκινικό κύτταρο, αφήνει την αρχική περιοχή του όγκου, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ή στην λεμφοαγγειακή κυκλοφορία και μεταναστεύει σε άλλα όργανα ή περιοχές στο σώμα του οργανισμού ξενιστή. Η μετάσταση είναι μία σειριακή, μη-τυχαία και ειδική για τα όργανα στόχους διαδικασία. Η οργανωμένη και εξειδικευμένη αυτή ακολουθία λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια: 1) αρχικά κακοήθη κύτταρα απελευθερώνονται από τον αρχικό όγκο, 2) τα ελεύθερα αυτά κύτταρα εισβάλουν στα αιμοφόρα αγγεία ή τα λεμφαγγεία και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος αυτά μεταφέρονται στην περιοχή των τριχοειδών αγγείων του απομακρυσμένου οργάνου 3) αφήνουν την κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται στο μεσεγχυματικό στρώμα του οργάνου όπου και πολλαπλασιάζονται^[163,164]. Από την στιγμή που η μεγάλη πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο οφείλεται σε μεταστάσεις του όγκου και όχι στον αρχικό όγκο καθ' αυτόν, η κατανόηση της διαδικασίας που οδηγεί στον μηχανισμό αυτό είναι μείζονος σημασίας^[165,166]. Η ELR⁻ χημειοκίνη CXCL12, όπως θα δούμε αναλυτικότερα και παρακάτω, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα των βλαστοκυττάρων^[167], καθώς και στην καρκινική εισβολή^[168]. Αν και είναι γενικά δύσκολο να διαχωριστεί πειραματικά η αγγειογενής δράση μίας χημειοκίνης, από την επίδραση της στην μετάσταση, είναι γενικώς πλέον αποδεκτό ότι το δίπολο CXCL12-CXCR4 συμμετέχει περισσότερο ενεργά στην καρκινική μετάσταση απ' ότι στην αγγειογένεση. Ακόμα έχει βρεθεί ερευνητικά ότι, in vivo, η έκφραση του CXCR4 αυξάνεται σε καρκινικά κύτταρα σε κατάσταση υποξίας μέσω του HIF-1α (Hypoxia-inducible factor-1α)^[169,170].

Αν και πρωτίστως η CXCL12 προσδένεται στον CXCR4, και η CXCL11 στον CXCR3, ένας νέος υποδοχέας των δύο αυτών χημειοκινών έχει ακόμα αναγνωριστεί, ο CXCR7^[156]. Ο τελευταίος είναι αυτός που έχει την δυνατότητα να ορίζει το μεταναστευτικό έναυσμα των κυττάρων και ως εκ τούτου είναι αρκετά πιθανό να διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο στην καρκινική μετάσταση και μεταφορά^[171].

Όργανα όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες, οι λεμφαδένες και ο μυελός των οστών είναι συνηθισμένοι στόχοι της μετάστασης, ενώ άλλα όπως οι νεφροί, το πάγκρεας και το δέρμα όχι^[172]. Η μετάσταση είναι η κυριότερη αιτία θανάτου, και η ικανότητα αυτή καθ' αυτή των καρκινικών κυττάρων είναι που διαφοροποιεί τα κακοήθη κύτταρα από τα καλοήθη. Ενώ η μετάσταση σαν διαδικασία περιλαμβάνει αρκετούς παράγοντες και μικρά μόρια ρυθμιστές, οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους διαδραματίζουν ένα ρόλο κλειδί στην εμφάνιση αυτής της ιδιότητας^[173].

Οι σημαντικότεροι υποδοχείς και τα μόρια στόχοι τους που έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή είναι:

a. CXCR4-CXCL12

Το δίπολο CXCR4-CXCL12 όπως έχουμε ήδη αναφέρει είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα συμπλέγματα χημειοκίνης-υποδοχέα που μελετήθηκε και βρέθηκε να διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην μετάσταση. Σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί ότι τα μεταστατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού επιλεκτικά εκφράζουν τον CXCR4 και μεταναστεύουν σε όργανα τα οποία αντίστοιχα εκφράζουν υψηλά επίπεδα της CXCL12^[172].

Ο υποδοχέας είναι σταθερά ρυθμισμένος σε υψηλά επίπεδα έκφρασης σε μεταστατικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του ήπατος, σε μεταστάσεις σε λεμφαδένες, ενώ αντίθετα είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα^[172]. Η χημειοκίνη CXCL12, εν τω μεταξύ, κατ' αντιστοιχία εκφράζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στις πιο συχνές περιοχές μετάστασης του καρκίνου του μαστού : πνεύμονες, εγκέφαλο, λεμφαδένες, ήπαρ και μυελό των οστών^[172,173]. Αυτό υποδεικνύει ότι τα μεταστατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού επιλεκτικά εκφράζουν τον CXCR4, που τα καθοδηγεί στις περιοχές του οργανισμού με υψηλά επίπεδα CXCL12. Ακόμα in vivo αναστολή της σύνδεσης των δύο αυτών μορίων οδηγεί σε αναστολή της απόκρισης στην μετάσταση που δίνει στον καρκίνο την δυνατότητα εισβολής σε άλλο όργανο. Επιπλέον η σύνδεση των δύο αυτών μορίων δίνει το έναυσμα στα καρκινικά κύτταρα για τον πολυμερισμό της ακτίνης, που επιτρέπει στα κύτταρα να μετακινηθούν ώστε να εισβάλουν στους γειτονικούς ιστούς,^{175]}, να σχηματίσουν ψευδοπόδια, και να επάγουν την κατευθυνόμενη εισβολή των καρκινικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Αναστολή των δύο αυτών παραγόντων με ειδικά αντισώματα, anti-CXCR4 και anti-CXCL12 μειώνει την δυνατότητα μετάστασης κατά 63-67% και 60-62% αντίστοιχα για τα δύο αυτά μόρια^[173].

Άλλες μελέτες βρήκαν ότι de novo έκφραση του CXCR4 είναι από μόνη της αρκετή για να αυξήσει την ικανότητα του όγκου για εισβολή και μετάσταση με έναν ειδικό

μη τυχαίο για το τελικό όργανο-στόχο τρόπο^[176]. Σε κυτταρικές σειρές ποντικών για το μελάνωμα B16 βρέθηκε σημαντική αύξηση των μεταστάσεων στον πνεύμονα όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με γενετικό υλικό για τον CXCR4^[177]. Παράλληλα βρέθηκε ότι αναστολή του με το μικρό μόριο ανταγωνιστή T22, σταμάτησε τον παραπάνω φαινότυπο^[176].

Πολλοί ακόμα μεταστατικοί καρκίνοι του προστάτη εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό^[177]. Η έκφραση του έχει βρεθεί να ενισχύει την μεταστατική ικανότητα του καρκίνου με την παράλληλη παρουσία της CXCL12, ενώ αντίθετα αναστολή οδηγεί σε μείωση αυτής τους της ικανότητας. Σε πλήρη αντίθεση μ' αυτόν τον φαινότυπο, έκφραση του υποδοχέα σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα δεν προκάλεσε καμία δυνατότητα μετάστασής τους ^[177]. Στον καρκίνο του προστάτη ο υποδοχέας μπορεί ακόμα να ρυθμίσει την προσκόλληση των μεταστατικών κυττάρων μέσω των Ιντεγκρινών α5 και β3^[178].

Υψηλά επίπεδα έκφρασης του CXCR4 παρατηρούνται ακόμα σε CD44⁺/CD133⁺ προστατικά βλαστοκύτταρα^[179]. Είναι σημαντικό γιατί αυτά τα κύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν την διαδικασία της μετάστασης στον όγκο, αλλά ακόμα και να ξαναδημιουργήσουν τον όγκο μετά την θεραπεία^[180]. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη έκφραση των CXCR4 και CXCL12, προωθεί την προσκόλληση των CD133⁺/CD44⁺ των προστατικών καρκινικών βλαστοκυττάρων στην εξωκυττάρια πρωτεΐνη ινονεκτίνη, η οποία είναι σημαντική για την απομακρυσμένη εγκατάσταση των μεταστατικών κυττάρων και την έναρξη των δευτερευόντων όγκων. Ακόμα η CXCL12 προκαλεί την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K και επάγει τον πολλαπλασιασμό των CXCR4⁺ κυττάρων^[179].

b. CCR7-CCL19/CCL21
Η CCR7 υποκινούμενη μετανάστευση των λευκοκυττάρων είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες μία απολύτως σημαντική διαδικασία κατά την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Μέσω του υποδοχέα αυτού στρατολογούνται τα αδιαμορφοποίητα Τκύτταρα και τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα στους λεμφαδένες, όπου επιδρούν μεταξύ τους εκκινώντας την ανοσολογική απόκριση^[181]. Στον CCR7 προσδένονται κυρίως δύο μόρια : η CCL21 & CCL19^[182,183]. Η πρώτη ρυθμίζει την συγκέντρωση των αδιαμορφοποίητων Τ-κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, ενώ η δεύτερη ενεργοποιεί τα Τ-κύτταρα^[184]. Απώλεια της CCL21 ή αναστολή του CCR7 οδηγεί σε μειωμένη εγκατάσταση των Τ-κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα^[185]. Σε αρκετές μελέτες φαίνεται τα καρκινικά κύτταρα να στρατολογούν αυτόν τον μηχανισμό εγκατάστασης των λευκοκυττάρων CCR7-CCL21, για δικό τους όφελος ώστε να μπορέσουν να μεταστατίσουν στους λεμφαδένες. Μελέτες δείχνουν ότι η πλειοψηφία τόσο των πρωτογενών κυττάρων του καρκίνου του μαστού όσο και των μεταστατικών τους κυττάρων εκφράζουν τον CCR7, και υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα την έκφραση του CCR7 και της μετάστασης στους λεμφαδένες. Επιπλέον υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα αυτού συνδέεται με χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης και επιβαρυμένη πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού^[186]. Συσχέτιση όμως μεταξύ του CCR7 και της μετάστασης στους λεμφαδένες παρατηρείται και σε αρκετούς ακόμα καρκινικούς τύπους όπως: στο οισοφαγικό καρκίνωμα^[187], το μελάνωμα^[188], μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα^[189], στον γαστρικό καρκίνο^[190], και τον καρκίνο του ορθού^[191] και της κεφαλής^[192].

De novo έκφραση του CCR7 είναι αρκετή για να πυροδοτήσει την κατευθυνόμενη μετάσταση στους λεμφαδένες σε πλήθος κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, ανθρώπινες αλλά και ποντικιών οι οποίες εν τη απουσία του θα μεθίσταντο

αποκλειστικά στον πνεύμονα^[193]. Ακόμα η έκφραση του σε μη μεταστατικό B16 μελάνωμα μπορεί να προάγει την μετάσταση του στους λεμφαδένες^[194]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η έκφραση του CCR7 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού σε ποντίκια επάγει την μετάστασή τους στους λεμφαδένες^[194] ενώ όπως έχουμε ήδη αναφέρει έκφραση του CXCR4 στα ίδια κύτταρα τα κατευθύνει στους πνεύμονες^[176]. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου βρέθηκε ο CCR7 να επάγει την μετάσταση μέσω ρύθμισης αυξημένης έκφρασης για την μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9)^[195].

Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι η συνδυασμένη έκφραση των CCR7 και CXCR4 συνδέεται με μεταστάσεις στους λεμφαδένες εκτός του καρκίνου του μαστού^[173,196,197] και σε άλλους καρκίνους όπως ο γαστρικός^[198], ο νωτιαομυελικός^[199], το μελάνωμα^[173]. Στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού παρατηρείται σταθερά ταυτόχρονη υψηλή έκφραση των δύο αυτών παραγόντων αν και στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζεται επίσης ο CCR7^[173]. Παρόμοια με τον CXCR4 η αλληλεπίδραση του δίπολου CCR7-CCL21 επάγει την κατευθυνόμενη εισβολή των καρκινικών κυττάρων , την δημιουργία ψευδοποδίων και τον πολυμερισμό της ακτίνης αυξάνοντας την δυνατότητα μετάστασης των κυττάρων^[173]. Εφ' όσον οι δύο χημειοκίνες CCL21 και CXCL12 είναι και οι δύο εκφραζόμενες σε υψηλά επίπεδα στους λεμφαδένες, και επιπλέον η αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς τους επάγει την κατευθυνόμενη προς αυτούς μετάσταση δεν είναι απίθανο να υπάρχει και συνέργεια των δύο αυτών για την αποτελεσματικότερη μετάσταση^[173,196].

Ο CCR7 εμφανίζεται να διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο και στις λευχαιμίες και τα λεμφώματα. Εξαιτίας της λεμφοειδους προέλευσης των δύο αυτών καρκινικών τύπων και οι δύο τους εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα αυτού και συχνά προκύπτουν από αυτούς μεταστάσεις στους λεμφαδένες^[200]. Οι κακοήθειες των Β κυττάρων με ευρεία διασπορά στους λεμφαδένες, όπως η Χρόνια Β-Κυτταρική Λεμφοκυτταρική λευχαιμία (B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL), εκφράζουν υψηλά επίπεδα του CCR7, που επάγουν την είσοδο των B-κυττάρων στους λεμφαδένες^[201], ενώ νεοπλασμίες με μικρή μετάσταση στους λεμφαδένες, όπως το πολλαπλό μυέλωμα, εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του CCR7 και μέσα προ χαμηλά επίπεδα του CXCR4^[200].

Τέλος ο CCR7 έχει βρεθεί να επάγει και την μετάσταση της Τ-Κυτταρικής Λευχαιμίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αυτό συμβαίνει μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch 1, το οποίο ρυθμίζει την αυξημένη έκφραση του εν λόγω υποδοχέα^[201].

c. CCR9-CCL25

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο CCR9 συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση εντός του βλεννογόνου και στην κατεύθυνση των λεμφοκυττάρων κατά την ανάπτυξη των Τκυττάρων^[202]. Το μόριο στόχος του CCL25 (TECK) εκφράζεται στο λεπτό έντερο και τον θύμο αδένα^[203]. Καθώς η μετανάστευση των CCR9⁺ λεμφοκυττάρων στο λεπτό έντερο βασίζεται στις, χημειοελκτικές ιδιότητες της CCL25 και της δράσης των α-β ετεροδιμερών ιντεγκρίνης, πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι το δίπολο CCR9-CCL25 επάγει την κατευθυνόμενη μετάσταση του μελανώματος στο λεπτό έντερο. Οι περισσότεροι καρκίνοι του λεπτού εντέρου, οι οποίοι είναι γενικά σπάνιοι και αποτελούν ποσοστό μικρότερο του 2% των συνολικών γαστρεντερολογικών καρκίνων, είναι αποτέλεσμα μεταστάσεων μελανώματος^[204-206]. Μελέτες του μελανώματος έχουν δείξει την υψηλή έκφραση του CCR9 στα κύτταρα του καθώς και στα κύτταρα των μεταστάσεών του στο παχύ έντερο^[207], και ότι η έκφραση του στα πρώτα μεσολαβεί για την αποτελεσματική μετάσταση τους στο δεύτερο^[208].

Μερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού εκφράζουν επίσης CCR9^[209], και έχει βρεθεί να προάγει την μετάστασή τους ενισχύοντας την δυνατότητα μετανάστευσής τους, μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης της MMP-9 επαγόμενης από την CCL25 καθώς και να βελτιώνει την δυνατότητα επιβίωσης τους στις περιοχές των μεταστάσεων τους^[209]. Ακόμα αν και δεν υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα σχετικά με τον ρόλο του, ο υποδοχέας αυτός έχει βρεθεί να εκφράζεται και σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών^[210].

d. CCR10 – CCL27/CCL28

Ο υποδοχέας CCR10 προσδένει την χημειοκίνη CCL27, η οποία και εκφράζεται τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα φλεγμονώδη κύτταρα του δέρματος^[211]. Στο δέρμα η CCL27 στρατολογεί τα λευκοκύτταρα που φέρουν CLA αντιγόνο και τα οποία εκφράζουν τον CCR10^[212]. Το κακοήθες μελάνωμα έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες να εκφράζει υψηλά επίπεδα του CCR10 καθώς και CXCR4 και CCR7^[213]. Το μελάνωμα μοιράζεται ένα πρότυπο μεταστάσεων παρόμοιο του καρκίνου του μαστού, με κύρια διαφορά τις μεταστάσεις που εμφανίζει σ άλλα σημεία του δέρματος σε αντίθεση με τον καρκίνο του μαστού^[173]. Δεδομένου του ρόλου των CCR10 - CCL27 στην μετανάστευση των λευκοκυττάρων στο δέρμα, είναι πιθανό τελικά η ίδια αυτή η έκφραση του CCR10 να είναι αυτή που επάγει τις μεταστάσεις του στο δέρμα. Παρ όλα αυτά σε διαφορετική μελέτη εμφανίζεται ο υποδοχέας αυτός να επάγει την μετάσταση των κυττάρων του μελανώματος στους λεμφαδένες και επιπλέον να ενισχύει την ικανότητα εισβολής, ανάπτυξης και διαφυγής μέσω του ανοσοποιητικού των κυττάρων του^[214]. Ο CCR7 και το μόριο στόχος του CCL27 βρίσκονται επιπλέον με αυξημένη ρύθμιση έκφρασης στο λεπιοειδές δερματικό κυτταρικό καρκίνωμα, και η έκφραση του έχει συνδεθεί με την εξέλιξη του καρκίνου^[215].

e. CXCR3 – CXCL9, CXCL10, CXCL11

Η έκφραση του υποδοχέα CXCR3 στο κακοήθες λεπιοειδές μελάνωμα σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου^[215] και είναι συστατικό στοιχείο της φυσιολογίας διαφόρων κυτταρικών σειρών ανθρωπίνων μελανωμάτων και του B16F10 μελανώματος των ποντικιών^[217]. Η απώλεια της έκφρασης του υποδοχέα αυτού στην τελευταία κυτταρική σειρά μειώνει την δυνατότητα μετάστασης των κυττάρων στους λεμφαδένες κατά 15%, υποδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει στην κατευθυνόμενη αυτή μετάσταση^[217]. Ακόμα ο CXCR3 εκφράζεται συστηματικά στα κύτταρα του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος, χωρίς όμως σε αυτά να συνδέεται με την μετάσταση στους λεμφαδένες^[218]. Ακόμα σε διάφορους καρκίνους του παχέος εντέρου εκφράζεται συστηματικά ο υποδοχέας αυτός και ασθενείς που παρατηρείται αυτό, βιώνουν πιο επιβαρυμένη πρόγνωση από τους υπολοίπους^[219]. Μελέτη των Kawada et al έδειξε ότι η έκφραση του CXCR3 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου αυξάνει in vivo την μετάσταση στους λεμφαδένες αλλά όχι στο ήπαρ ή τους πνεύμονες^[219], ενώ αντίθετα οι Cambien et al έδειξαν ότι in vivo ενεργοποίηση του υποδοχέα αυξάνει την μετάσταση στους πνεύμονες^[220]. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν την ενεργοποίηση του CXCR3 να δρα συνεργικά με την CXCR4 επαγόμενη μετάσταση στους λεμφαδένες, το ήπαρ και τους πνεύμονες^[221]. Ακόμα η λειτουργία του CXCR3 στο καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να εξαρτάται από την συνεργασία άλλων εκφραζόμενων υποδοχέων χημειοκινών όπως οι CXCR4 & CXCR7.

Στο οστεοσάρκωμα μελέτες υποδεικνύουν ότι ο CXCR3 και οι προσδέτες του επάγουν την μετάσταση στους πνεύμονες και αργότερα διεγείρουν την ανάπτυξη και εξάπλωση των μεταστάσεων αυτών^[222]. Θεραπεία σε ποντικούς με τον ανταγωνιστή του CXCR3, AMG487 έχει βρεθεί να μειώνει τις μεταστάσεις στους πνεύμονες και εν

συνεχεία και την εξάπλωση μέσα τους δευτερογενώς^[222]. Στον οργανισμό αυτό το ίδιο έχει παρατηρηθεί πλην του οστεοσαρκώματος και με τον καρκίνο του μαστού.

f. CXCR5 – CXCL13

Ο υποδοχέας CXCR5 μαζί με τους CXCR4 και CCR7 βοηθάει στην ρύθμιση της εισόδου των β-κυττάρων μέσα σε δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς και την εγκατάσταση τους στις Τ- και Β- κυτταρικές ζώνες μέσα στους ιστούς αυτούς. Μελέτες δείχνουν ότι βασικά λεμφώματα εκφράζουν τον CXCR5 μαζί με τον CCR7 σε κακοήθειες, οι οποίες συνοδεύονται από συχνές μεταστάσεις σε λεμφαδένες υποδεικνύοντας έτσι τον ρόλο του πρώτου στην διεργασία αυτή^[223,224]. Η έκφρασή του CXCR5 είναι ιδιαίτερα υψηλή σε χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες και τους λεμφοειδείς φλοιούς^[207]. Συστηματική υπερέκφραση του CXCR5 ακόμα παρατηρείται και στα λεπιδοειδή κυτταρικά καρκινώματα, αποκαλύπτοντας πιθανό ρόλο της αλληλεπίδρασης των CXCR5/CXCL13 ως πιθανό συμπληρωματικό μονοπάτι επαγωγής των μεταστάσεων στους λεμφαδένες^[200]. Ο υποδοχέας αυτός ακόμα επάγει την μετάσταση των κυττάρων του νευροβλαστώματος στον μυελό των οστών μέσα από την αλληλεπίδραση με την CCL16 που εκφράζουν τα στρωματικά κύτταρα^[225]. Παρ όλα αυτά σ άλλες κακοήθειες χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση του

3.2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunosol 18Q217-242
- 2. Lazennec, G.; Richmond, A. Chemokines and chemokine receptors: New insights into cancer-related inflammation. Trends Mol. Med. 2010, 16, 133–144.
- 3. Binder, N.B. et al. (2009) Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. Nat. Med. 15, 417–424
- 4. Chavey, C. et al. (2009) CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. Cell Metab. 9, 339–349

- Kohlmeier, J.E. et al. (2008) The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. Immunity 29, 101–113
- 6. Yoder, A. et al. (2008) HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. Cell 134,782–792
- Trifari, S. et al. (2009) Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. Nat. Immunol. 10,864–871
- 8. Molon, B. et al. (2005) T cell costimulation by chemokine receptors. Nat. Immunol. 6, 465–471
- Reboldi, A. et al. (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nat. Immunol. 10, 514–523
- 10. Balkwill, F. et al. (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell 7, 211–217
- 11. Mantovani, A. (2009) Cancer: Inflaming metastasis. Nature 457, 36–37
- 12. Ali, S. and Lazennec, G. (2007) Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev. 26, 401–420
- 13. Vindrieux, D. et al. (2009) Emerging roles of chemokines in prostate cancer. Endocr. Relat. Cancer 16, 663–673
- 14. Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. Cell Mol Immunol 2004;1:95–104.
- 15. Luster AD. Chemokines–chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998;338:436–45.
- 16. Verbeke H, Struyf S, Laureys G and Van Damme J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2011; 22: 345-358.
- 17. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Adv Immunol 2003;81:1–44.
- 18. Tanaka Toshiyuki, Bai Zhongbin, Srinoulprasert Yuttana et al (2005) Chemokines in tumor progression and metastasis. Cancer Sci 96(6):317–322
- 19. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Adv Immunol 2003;81:1–44.
- 20. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem 1995;270:27348–57.
- 21. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:593–609.
- 22. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome Biol 2006;7:243.
- 23. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. J Intern Med 2001;250:91– 104.
- 24. Vicari Alain P, Caux Christophe (2002) Chemokines in cancer.Cytokine Growth Factor Rev 13(2):143–154
- 25. Graham GJ. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. Eur J Immunol 2009;39:342–51.

- 26. Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, et al. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:679–86.
- 27. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:687–94.
- 28. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. Annu Rev Biochem 2005;74:385–410.
- 29. Laing, K; Secombes, CJ (2004). "Chemokines". Developmental & Comparative Immunology. 28 (5): 443–60. PMID 15062643. doi:10.1016/j.dci.2003.09.006
- 30. Oppenheim JJ, Howard OMZ, Goetzl E. Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors. In: Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defence, London: Academic Press;2000. p. 985–1021.
- 31. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogbourne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. J Exp Med 1998;187:2009–21.
- 32. Keane MP, Arenberg DA, Moore BB, Addison CL, Strieter RM. CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. P Assoc Am Physician 1998;110:288–96.
- 33. K.J. Laing, C.J. Secombes / Developmental and Comparative Immunology 28 (2004) 443–460
- 34. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada, DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. Science 1994;266:1395–9.
- 35. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membranebound chemokine with a CX(3)C motif. Nature 1997;385:640–4.
- Basu S, Schaefer TM, Ghosh M, Fuller CL, Reinhart TA. Molecular cloning and sequencing of 25 different rhesus macaque chemokine cDNAs reveals evolutionary conservation among C, CC, CXC, and CX3C families of chemokines. Cytokine 2002;18:140–8.
- Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma JY, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, GutierrezRamos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. Nature 1997;387:611–7.
- 38. Arya M, Patel HR, Williamson M (2003) Chemokines: key players in cancer. Curr Med Res Opin 19(6):557–564
- 39. Balkwill F (2004a) Cancer and chemokine network. Nat Rev Cancer 4(7):540–550
- Purvaba J. Sarvaiya, Donna Guo, Ilya Ulasov, Patrik Gabikian, Maciej S Lesniak (2013) Chemokines in tumor progression and metastasis. Oncotarget, December, Vol.4, No12
- 41. Collado M, Blasco MA and Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. Cell. 2007; 130(2):223-233.
- 42. Mooi WJ and Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. N. Engl. J. Med. 2006; 355(10):1037-1046.

- 43. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E and Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. Cell. 2008; 133(6):1006-1018.
- 44. Acosta JC and Gil J. A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer; Cancer Res. 2009; 69(6):2167-2170.
- 45. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646–74. [PubMed: 21376230]
- 46. Wani NA, Nasser MW, Ahirwar DK, Zhao H, Miao Z, Shilo K, et al. CXC motif chemokine 12/CXC chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. Breast Cancer Res. 2014; 16:R54. [PubMed: 24886617]
- 47. Bolitho C, Hahn M, Baxter R, Marsh D. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. Endocr Relat Cancer. 2010; 17:929–40. [PubMed: 20702723]
- 48. Su H, Sobrino NE, Toth T, Ng C, Lelievre S, Fred M, et al. Chemokine receptor CXCR4– mediated transformation of mammary epithelial cells by enhancing multiple RTKs expression and deregulation of the p53/MDM2 axis. Cancer Lett. 2011; 307:132–40. [PubMed: 21530075]
- 49. Song JK, Park MH, Choi D-Y, Yoo HS, Han SB, Yoon DY, et al. Deficiency of CC chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF-κB and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. PLoS One. 2012; 7:e33747. [PubMed: 22567084]
- 50. Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. J Invest Dermatol. 2002; 118:915–22. [PubMed: 12060384]
- 51. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer Res. 2004; 64:8604–12. [PubMed: 15574767]
- 52. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. Cancer Lett. 2006; 238:30–41. [PubMed: 16046252]
- 53. Hall JM and Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 2003; 17(5):792-803
- 54. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G and Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors; Cancer Res. 2001; 61(13):4961-4965.
- 55. Zhou Y, Larsen PH, Hao C and Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. J. Biol. Chem. 2002; 277(51):49481-49487.
- 56. Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE and Salgia R. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 2002; 62(21):6304-6311.
- 57. Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G and Martinelli G. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2002; 62(11):3106-3112.
- 58. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M and Kipps TJ. Bloodderived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from

spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. Blood. 2000; 96(8):2655-2663.

- 59. Richmond A and Thomas HG. Purification of melanoma growth stimulatory activity. J. Cell. Physiol. 1986;129(3):375-384.
- 60. Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. Histol. Histopathol. 2005; 20(3):907-926.
- 61. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F and Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. Cancer Res. 2006; 66(6):3071-3077.
- 62. Kitadai Y, Haruma K, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsutani N, Yasui W, Yamamoto S, Sumii K, Kajiyama G, Fidler IJ and Tahara E. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. Clin. Cancer Res. 2000; 6(7):2735-2740.
- 63. Ghadjar P, Rubie C, Aebersold DM and Keilholz U. The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer. Int. J. Cancer. 2009; 125(4):741-745.
- 64. Darash-Yahana M, Gillespie JW, Hewitt SM, Chen YY, Maeda S, Stein I, Singh SP, Bedolla RB, Peled A, Troyer DA, Pikarsky E, Karin M and Farber JM. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammationassociated cancers. PloS one. 2009; 4(8):e6695.
- 65. Murakami T, Cardones AR, Finkelstein SE, Restifo NP, Klaunberg BA, Nestle FO, Castillo SS, Dennis PA and Hwang ST. Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. J. Exp. Med. 2003; 198(9):1337-1347.
- 66. Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H and Ferris RL. Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. J. Natl. Cancer Inst. 2008; 100(7):502-512.
- 67. Lu P, Nakamoto Y, Nemoto-Sasaki Y, Fujii C, Wang H, Hashii M, Ohmoto Y, Kaneko S, Kobayashi K and Mukaida N. Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. Am. J. Pathol. 2003; 162(4):1249-1258
- 68. Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-Mouton C, Jimenez-Baranda S, Garzon A, Lacalle RA, Harshman K, Ruiz A and Martinez AC. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. J. Exp. Med. 2003; 198(9):1381-1389.
- B. Bottazzi, N. Polentarutti, R. Acero, A. Balsari, D. Boraschi, P. Ghezzi, M. Salmona,
 A. Mantovani, Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants, Science 220 (1983) 210–212.
- C.O. Zachariae, A.O. Anderson, H.L. Thompson, E. Appella, A. Mantovani, J.J. Oppenheim, K. Matsushima, Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line, J. Exp. Med. 171 (1990) 2177–2182.
- 71. A. Mantovani, The chemokine system: redundancy for robust outputs, Immunol. Today 20 (1999) 254–257.
- 72. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol. 2011; 29:235–71. [PubMed: 21219185]
- 73. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. Exp Cell Res. 2011; 317:620–31. [PubMed: 21376175]

- 74. Groom J, Richmond J, Murooka T, Sorensen E, Sung J, Bankert K, et al. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. Immunity. 2012; 37:1091–103. [PubMed: 23123063]
- 75. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-γ and CXCR3 ligands. Cancer Res. 2008; 68:8437–45.
 [PubMed: 18922917]
- 76. Hensbergen PJ, Wijnands PGB, Schreurs MW, Scheper RJ, Willemze R, Tensen CP. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. J Immunother. 2005; 28:343–51. [PubMed: 16000952]
- 77. Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-γ inducible chemokines. Cancer Res. 2012; 72:5209–18. [PubMed: 22915761]
- Andersson Å, Yang S-C, Huang M, Zhu L, Kar UK, Batra RK, et al. IL-7 promotes CXCR3 ligand-dependent T cell antitumor reactivity in lung cancer. J Immunol. 2009; 182:6951–8. [PubMed: 19454692]
- 79. González-Martín A, Gómez L, Lustgarten J, Mira E, Mañes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4+ and CD8+ T cells. Cancer Res. 2011; 71:5455–66. [PubMed: 21715565]
- A. Pivarcsi, A. Muller, A. Hippe, J. Rieker, A. van Lierop, M. Steinhoff, S. Seeliger, R. Kubitza, U. Pippirs, S. Meller, P.A. Gerber, R. Liersch, E. Buenemann, E. Sonkoly, U. Wiesner, T.K. Hoffmann, L. Schneider, R. Piekorz, E. Enderlein, J. Reifenberger, U.P. Rohr, R. Haas, P. Boukamp, I. Haase, B. Nurnberg, T. Ruzicka, A. Zlotnik, B. Homey, Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression, Proc. Natl Acad. Sci. USA 104 (2007) 19055–19060.
- Y. Sawanobori, S. Ueha, M. Kurachi, T. Shimaoka, J.E. Talmadge, J. Abe, Y. Shono, M. Kitabatake, K. Kakimi, N. Mukaida, K. Matsushima, Chemokine-mediated rapid turnover of myeloidderived suppressor cells in tumor-bearing mice, Blood 111 (2008) 5457–5466.
- 82. A. Sica, V. Bronte, Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development, J. Clin. Invest. 117 (2007) 1155–1166.
- 83. D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system, Nat. Rev. Immunol. 9 (2009) 162–174.
- 84. J.W. Pollard, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 71–78.
- G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, P. Allavena, Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, J. Leukoc. Biol. 86 (2009) 1065–1073.
- 86. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010; 11:889–96. [PubMed: 20856220]
- Oghumu S, Varikuti S, Terrazas C, Kotov D, Nasser MW, Powell CA, et al. CXCR3 deficiency enhances tumor progression by promoting macrophage M2 polarization in a murine breast cancer model. Immunology. 2014; 143:109–19. [PubMed: 24679047]
- A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, Trends Immunol. 23 (2002) 549–555.

- L. Bingle, N.J. Brown, C.E. Lewis, The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies, J. Pathol. 196 (2002) 254–265.
- 90. J. Condeelis, J.W. Pollard, Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis, Cell 124 (2006) 263–266.
- 91. F. Balkwill, Cancer and the chemokine network, Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 540–550
- 92. E. Schutyser, S. Struyf, P. Proost, G. Opdenakker, G. Laureys, B. Verhasselt, L. Peperstraete, I. Van de Putte, A. Saccani, P. Allavena, A. Mantovani, J. Van Damme, Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma, J. Biol. Chem. 277 (2002) 24584–24593.
- 93. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol. 2012; 30:531–64. [PubMed: 22224781]
- Teng MW, Ngiow SF, von Scheidt B, McLaughlin N, Sparwasser T, Smyth MJ. Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. Cancer Res. 2010; 70:7800–9. [PubMed: 20924111]
- 95. Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MW, Ngiow SF, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. Cancer Res. 2010; 70:7788–99. [PubMed: 20924102]
- 96. Li X, Kostareli E, Suffner J, Garbi N, Hämmerling GJ. Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors. Eur J Immunol. 2010; 40:3325–35.
 [PubMed: 21072887]
- 97. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med. 2004; 10:942–9. [PubMed: 15322536]
- 98. Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, Hakim F, Gress R, Anderson RL, et al. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. Cancer Res. 2009; 69:5996–6004. [PubMed: 19567680]
- 99. Koch MA, Tucker-Heard Gs, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. Nat Immunol. 2009; 10:595–602. [PubMed: 19412181]
- A. Ludwig, A. Schulte, C. Schnack, C. Hundhausen, K. Reiss, N. Brodway, J. Held-Feindt, R. Mentlein, Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells, J. Neurochem. 93 (2005) 1293–1303.
- 101. J. Meijer, J. Ogink, B. Kreike, D. Nuyten, K.E. de Visser, E. Roos, The chemokine receptor CXCR6 and its ligand CXCL16 are expressed in carcinomas and inhibit proliferation, Cancer Res. 68 (2008) 4701–4708.
- S. Matsumura, B. Wang, N. Kawashima, S. Braunstein, M. Badura, T.O. Cameron, J.S. Babb, R.J. Schneider, S.C. Formenti, M.L. Dustin, S. Demaria, Radiationinduced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells, J. Immunol. 181 (2008) 3099–3107.
- P. Gutwein, A. Schramme, N. Sinke, M.S. Abdel-Bakky, B. Voss, N.
 Obermuller, K. Doberstein, M. Koziolek, F. Fritzsche, M. Johannsen, K. Jung, H.
 Schaider, P. Altevogt, A. Ludwig, J. Pfeilschifter, G. Kristiansen, Tumoural CXCL16

expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients, Eur. J. Cancer 45 (2009) 478–489.

- 104. S. Hojo, K. Koizumi, K. Tsuneyama, Y. Arita, Z. Cui, K. Shinohara, T. Minami, I. Hashimoto, T. Nakayama, H. Sakurai, Y. Takano, O. Yoshie, K. Tsukada, I. Saiki, Highlevel expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer, Cancer Res. 67 (2007) 4725–4731.
- 105. M. Darash-Yahana, J.W. Gillespie, S.M. Hewitt, Y.Y. Chen, S. Maeda, I. Stein, S.P. Singh, R.B. Bedolla, A. Peled, D.A. Troyer, E. Pikarsky, M. Karin, J.M. Farber, The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammationassociated cancers, PLoS ONE 4 (2009) e6695.
- 106. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J et al (2006) Cancer CXC chemokine networks and tumor angiogenesis. Euro J Cancer. 42(6):768–778
- 107. Mehrad, B., Keane, M. P., and Strieter, R. M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. Thromb. Haemost. 97(5), 755–762.
- 108. Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehlert, J. E., Xue, Y. Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R. M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELRb CXC chemokine-induced angiogenic activity. J. Immunol. 165(9), 5269–5277.
- 109. Murdoch, C., Monk, P. N., and Finn, A. (1999). Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. Cytokine 11(9), 704–712.
- 110. Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehlert, J. E., Xue, Y. Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R. M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELRb CXC chemokine-induced angiogenic activity. J. Immunol. 165(9), 5269–5277.
- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., and Moser, B. (1998).
 Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: Regulation, chemokine binding and gene localization. Eur. J. Immunol. 28(11), 3696–3705.
- 112. Luster, A. D. (1998). Chemokines—Chemotactic cytokines that mediate inflammation. N. Engl. J. Med. 338(7), 436–445.
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., et al. (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. J. Exp. Med. 197 (11), 1537–1549.
- 114. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., and Sharpe, R. J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science 247(4938), 77–79.
- Struyf, S., Burdick, M. D., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R. M.
 (2004). Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. Circ. Res. 95(9), 855–857.
- 116. Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3 endothelial cells. J Immunol. 2001;166: 7571–7578.
- 117. Strasly M, Doronzo G, Capello P, Valdembri D, Arese M, Mitola S, Moore P, Alessandri G, Giovarelli M, Bussolino F. CCL16 activates an angiogenic program in vascular endothelial cells. Blood. 2004;103: 40–49.

- 118. Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. J Immunol. 2006;177:2651–2661.
- 119. Galvez BG, Genis L, Matias-Roman S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and IL-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. J Biol Chem. 2005;280:1292–1298.
- 120. Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2085–2093.
- 121. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. Blood. 2000;96:34–40.
- 122. Zhu Q, Han X, Peng J, Qin H, Wang Y. The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. J Mol Histol 2012; 43: 699-713 [PMID:22752457 DOI: 10.1007/s10735-012-9435-x]
- 123. Luan J, Shattuck BR, Haghnegahdar H et al (1997) Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. J Leukoc Biol 62(5):588–597
- 124. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J et al (2006) Cancer CXC chemokine networks and tumor angiogenesis. Euro J Cancer. 42(6):768–778
- 125. Nor JE, Christensen J, Liu J et al (2001) Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. Cancer Res 61(5):2183–2188
- 126. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB et al (2003) Angiogenic effects of interleukin 8(CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem 278(10): 8508–8515
- 127. Dias S, Choy M, Rafii S (2001) The role of CXC chemokines in the regulation of tumor angiogenesis. Cancer Invest 19(7):732–738
- 128. Schruefer R, Lutze N, Schymeinsky J et al (2005) Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288(3):H1186–H1192
- 129. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI et al (1998) Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. Urology 51(1):161–167
- 130. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM (2011) Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. Exp Cell Res 317(5):685–690
- 131. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD et al (2000a) The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR ? CXC chemokine-induced angiogenic activity. J Immunol 165(9):5269–5277
- 132. Singh S, Wu S, Varney M et al (2011) CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. Microvasc Res 82(3):318–325
- 133. Sugden PH, Clerk A (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. Cell Signal 9(5):337–351

- 134. Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 278(5346):2075–2080
- 135. Shyamala V, Khoja H (1998) Interleukin-8 receptors R1and R2 activate mitogen-activated protein kinases and induce c-fos, independent of Ras and Raf-1 in Chinese hamster ovary cells. Biochemistry 37(45):15918–15924
- 136. Couty JP, Gershengorn MC (2004) Insights into the viral G proteincoupled receptor encoded by human herpesvirus type-8. Biol Cell 96(5):349–354
- 137.Manna SK, Ramesh GT (2005) Interleukin-8 induces nuclear transcriptionfactor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. J Biol Chem 280(8):7010–7021
- 138. Moore BB, Arenberg DA, Addison CL et al (1998) CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. Angiogenesis 2(2):123–134
- 139. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM (2008) Chemokines as mediators of neovascularization. Aeterioscler Thromb Vasc Biol 28(11):1928–1936
- 140. Richmond A, Fan GH, Dhawan P et al (2004) How do chemokine/chemokine receptor activations affect tumorigenesis? Novartis Found Symp 256:74–89
- 141. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem 270(45):27348–27357
- 142. IUIS/WHO (2003) Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. Cytokine 21(1): 48–49
- 143. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M et al (2004) BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and is a chemotactic factor for immature dendritic cells. Cancer Res 64(22):8262–8270
- 144. Stuyf S, Burdick MD, Proost P et al (2004) Platelets release CXCL14L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. Circ Res 95(9):855–857
- 145. Maione TE, Gray GS, Petro J et al (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science 247(4938):77–79
- 146. Gupta SK, Singh JP (1994) Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. J Cell Biol 127(4):1121–1127
- 147. Sharma S, Yang SC, Hillinger S et al (2003) SLC/CCL21-mediated anti-tumor responses require IFN-c, MIG/CXCL9 and IP-10/CXCL10. Mol Cancer 2(1):22
- 148. Hillinger S, Yang SC, Zhu L et al (2003) EBV-inducedmolecule1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes IFN-c-dependent antitumor responses in a lung cancer model. J Immunol 171(12):6457–6465
- 149. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ et al (1996a) Interferon-cinducible protein IP-10 is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. J Exp Med 184(3):981–992
- 150. Frederick MJ, Henderson Y, Xu X et al (2000) In vivo expression of the novel
 CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. Am J Pathol
 156(6):1937–1950
- 151. Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A (2003) Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. Cell Tissue Res 314(1): 157–166
- 152. Yang J, Richmond A (2004) The angiostatic activity of interferoninducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. Mol Ther 9(6):846–855

- 153. Bikfalvi A (2004) Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. Semin Thromb Hemost 30(3):379–385
- 154. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM (2002) Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CCR4. Cancer Res 62(24):7203–7206
- Salcedo R, Oppenheim JJ (2003) Role of the chemokines in angiogenesis:
 CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses.
 Microcirculation 10(3–4): 359–370
- 156. Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M et al (2001) The SDF-1 -CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. Stem Cells 19(5):453–466
- 157. Salcedo R, Wasserman K, Young HA et al (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibrolast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovasculaeization induced by stromal-derived factor-l alpha.Am J Pathol 154(4):1125–1135
- Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M et al (2003) The stromal derived factor 1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer
 metastases. Am J Respir Crit Care Med 167(12):1676–1686
- 159. Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y.,Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature 393(6685), 591–594.
- D.R. Smith, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, M.B. Orringer, R.I. Whyte, M.D.
 Burdick, C.A. Wilke, R.M. Strieter, Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma, J. Exp. Med. 179 (1994) 1409–1415.
- J. Yatsunami, N. Tsuruta, K. Ogata, K.Wakamatsu, K. Takayama, M. Kawasaki,
 Y. Nakanishi, N. Hara, S. Hayashi, Interleukin-8 participates in angiogenesis in nonsmall cell, but not small cell carcinoma of the lung, Cancer Lett. 120 (1997) 101–108.
- D.A. Arenberg, S.L. Kunkel, P.J. Polverini, M. Glass, M.D. Burdick, R.M.
 Strieter, Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice, J. Clin. Invest. 97 (1996) 2792–2802.
- 163. Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat. Rev. Cancer 2(8), 563–572.
- 164. Geiger, T. R., and Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. Biochim. Biophys. Acta 1796(2), 293–308.
- Kruizinga, R. C., Bestebroer, J., Berghuis, P., de Haas, C. J., Links, T. P., de Vries, E. G., and Walenkamp, A. M. (2009). Role of chemokines and their receptors in cancer. Curr. Pharm. Des. 15(29), 3396–3416.
- 166. Leber, M. F., and Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). Int. J. Oncol. 34(4), 881–895.
- Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Tateno, M., Shieh, J. H., Hackett, N. R., Quitoriano, M. S., Crystal, R. G., Rafii, S., and Moore, M. A. (2001). Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. Blood 97(11), 3354–3360.
- 168. Chu, C. Y., Cha, S. T., Chang, C. C., Hsiao, C. H., Tan, C. T., Lu, Y. C., Jee, S. H., and Kuo, M. L. (2007). Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-

derived factor 1 alpha-directed invasion of human basal cell carcinoma cells. Oncogene 26(17), 2491–2501.

- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda,
 A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., et al.
 (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. J. Exp. Med. 198(9),
 1391–1402.
- 170. Schutyser, E., Su, Y., Yu, Y., Gouwy, M., Zaja-Milatovic, S., Van Damme, J., and Richmond, A. (2007). Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. Eur. Cytokine Netw. 18(2), 59–70.
- 171. Zabel, B. A., Wang, Y., Lewen, S., Berahovich, R. D., Penfold, M. E., Zhang, P., Powers, J., Summers, B. C., Miao, Z., Zhao, B., Jalili, A., Janowska-Wieczorek, A., et al. (2009). Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. J. Immunol. 183(5), 3204–3211.
- 172. Zlotnik A, Burkhardt AM and Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. Nat Rev Immunol. 2011; 11(9):597-606.
- 173. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001; 410(6824):50-56.
- 174. Bruce J, Carter DC and Fraser J. Patterns of recurrent disease in breast cancer. Lancet. 1970; 1(7644):433-435.
- 175. Verschueren H, Van der Taelen I, Dewit J, De Braekeleer J and De Baetselier
 P. Metastatic competence of BW5147 T-lymphoma cell lines is correlated with in vitro invasiveness, motility and F-actin content. J. Leukoc. Biol. 1994; 55(4):552-556.
- 176. Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO and Hwang ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. Cancer Res. 2002; 62(24):7328-7334.
- Arya M, Patel HR, McGurk C, Tatoud R, Klocker H, Masters J and Williamson
 M. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. J. Exp. Ther. Oncol. 2004; 4(4):291-303.
- 178. Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Muller I, Beecken WD, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D and Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. Neoplasia. 2006; 8(4):290-301.
- Dubrovska A, Elliott J, Salamone RJ, Telegeev GD, Stakhovsky AE, Schepotin
 IB, Yan F, Wang Y, Bouchez LC, Kularatne SA, Watson J, Trussell C, Reddy VA, Cho CY and Schultz PG. CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells. PloS one. 2012; 7(2):e31226.
- 180. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M and Rhim JS. CXCR4 and cancer. Pathol. Int. 2010; 60(7):497-505.
- 181. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, Sanvito F, Ponzoni M, Valentinis B, Bregni M, Prinetti A, Steffensen KR, Sonnino S, Gustafsson JA, Doglioni C, Bordignon C, et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nat. Med. 2010; 16(1):98-105.

- 182. Kim CH, Pelus LM, Appelbaum E, Johanson K, Anzai N and Broxmeyer HE. CCR7 ligands, SLC/6Ckine/ Exodus2/TCA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors. Cell. Immunol. 1999; 193(2):226-235.
- 183. Yoshida R, Nagira M, Imai T, Baba M, Takagi S, Tabira Y, Akagi J, Nomiyama H and Yoshie O. EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. Int. Immunol. 1998; 10(7):901-910.
- 184. Steinman RM, Pack M and Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. Immunol. Rev. 1997; 156:25-37.
- 185. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT and Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. J. Exp. Med. 1999; 189(3):451-460.
- 186. Mattern J, Koomagi R and Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. Br. J. Cancer. 1996; 73(7):931-934.
- 187. Ding Y, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, Komoto I, Hashimoto Y, Miyake M, Hashida H and Imamura M. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. Clin. Cancer Res. 2003; 9(9):3406-3412
- 188. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E and Hoon DS. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. Clin. Cancer Res. 2004; 10(7):2351-2358.
- 189. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. Int. J. Cancer. 2003; 105(2):186-189.
- 190. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H and Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. Cancer Res. 2002; 62(10):2937-2941.
- 191. Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W and Forster R. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expressionof chemokine receptor CCR7. Int. J. Cancer. 2005; 116(5):726-733.
- 192. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B and Hoffmann TK. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. Int. J. Cancer. 2006; 118(9):2147-2157.
- 193. Cunningham HD, Shannon LA, Calloway PA, Fassold BC, Dunwiddie I, Vielhauer G, Zhang M and Vines CM. Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice. Transl Oncol. 2010; 3(6):354-361.
- 194. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT and Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. J. Natl. Cancer Inst. 2001; 93(21):1638-1643
- 195. Li P, Liu F, Sun L, Zhao Z, Ding X, Shang D, Xu Z and Sun C. Chemokine receptor 7 promotes cell migration and adhesion in metastatic squamous cell

carcinoma of the head and neck by activating integrin alphavbeta3. Int. J. Mol. Med. 2011; 27(5):679-687.

- 196. Liu Y, Ji R, Li J, Gu Q, Zhao X, Sun T, Wang J, Du Q and Sun B. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2010; 29:16.
- Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE and Sahin
 A. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. Clin. Cancer Res. 2005; 11(16):5686-5693
- 198. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Arima H, Hirata M, Ishigami S and Aikou T. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. Int. J. Oncol. 2009; 35(1):19-24
- 199. Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A and Hiramatsu Y. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. Ann. Oncol. 2007; 18(1):70-76.
- 200. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M, De Soria VG, Fernandez-Ranada JM, Fernandez-Ruiz E and Munoz C. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. J. Leukoc. Biol. 2004; 76(2):462-471.
- 201. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC and et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994; 84(5):1361-1392.
- 202. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N, Qin S, Zovko M, LaRosa GJ, Yang LL, Soler D, Butcher EC, Ponath PD, Parker CM, et al. Human G protein-coupled receptor GPR- 9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokinemediated chemotaxis. J. Exp. Med. 1999; 190(9):1241-1256.
- 203. Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A and Naquet P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. Eur. J. Immunol. 2000; 30(1):262-271.
- 204. Bender GN, Maglinte DD, McLarney JH, Rex D and Kelvin FM. Malignant melanoma: patterns of metastasis to the small bowel, reliability of imaging studies, and clinical relevance. Am. J. Gastroenterol. 2001; 96(8):2392-2400.
- 205. Gill SS, Heuman DM and Mihas AA. Small intestinal neoplasms. J. Clin. Gastroenterol. 2001; 33(4):267-282
- 206. Blecker D, Abraham S, Furth EE and Kochman ML. Melanoma in the gastrointestinal tract. Am. J. Gastroenterol. 1999; 94(12):3427-3433
- 207. Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemissen AM, Thiel E and Scheibenbogen C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. J. Invest. Dermatol. 2004; 122(3):685-690.
- 208. Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, Faries MB, Morton DL and Hoon DS. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma

mediates preferential metastasis to the small intestine. Clin. Cancer Res. 2008; 14(3):638-645

- 209. Johnson-Holiday C, Singh R, Johnson E, Singh S, Stockard CR, Grizzle WE and Lillard JW, Jr. CCL25 mediates migration, invasion and matrix metalloproteinase expression by breast cancer cells in a CCR9-dependent fashion. Int. J. Oncol. 2011; 38(5):1279-1285.
- Singh R, Stockard CR, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. and Singh S. Expression and histopathological correlation of CCR9 and CCL25 in ovarian cancer. Int. J. Oncol. 2011; 39(2):373-381
- 211. Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, Muller A, McClanahan TK, Dieu-Nosjean MC, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Oldham E and Zlotnik A. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). J. Immunol. 2000; 164(7):3465-3470.
- 212. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. Nat. Med. 2002; 8(2):157-165.
- 213. Payne AS and Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. J. Invest. Dermatol. 2002; 118(6):915-922.
- 214. Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pieramici T, Rubini C, Biagini G and Offidani A. Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. Eur. J. Cancer. 2006; 42(8):1181-1187
- 215. Kai H, Kadono T, Kakinuma T, Tomita M, Ohmatsu H, Asano Y, Tada Y, Sugaya M and Sato S. CCR10 and CCL27 are overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma. Pathol. Res. Pract. 2011; 207(1):43-48.
- 216. Monteagudo C, Martin JM, Jorda E and Llombart-Bosch A. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. J. Clin. Pathol. 2007; 60(6):596-599.
- 217. Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, Takabayashi A, Yamaoka Y, Manabe T, Inaba K, Minato N, Oshima M and Taketo MM. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. Cancer Res. 2004; 64(11):4010- 4017.
- 218. Maekawa S, Iwasaki A, Shirakusa T, Kawakami T, Yanagisawa J, Tanaka T, Shibaguchi H, Kinugasa T and Kuroki M. Association between the expression of chemokine receptors CCR7 and CXCR3, and lymph node metastatic potential in lung adenocarcinoma. Oncol. Rep. 2008; 19(6):1461-1468.
- 219. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M and Taketo MM. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. Oncogene. 2007; 26(32):4679-4688
- 220. Cambien B, Karimdjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, Martini V, Birnbaum D, Scoazec JY, Abello J, Al Saati T, Johnson MG, Sullivan TJ, Medina JC, Collins TL, Schmid-Alliana A, et al. Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. Br. J. Cancer. 2009; 100(11):1755-1764
- 221. Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM and Sakai Y. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. Int. J. Cancer. 2013; 132(2):276-287.

- 222. Pradelli E, Karimdjee-Soilihi B, Michiels JF, Ricci JE, Millet MA, Vandenbos F, Sullivan TJ, Collins TL, Johnson MG, Medina JC, Kleinerman ES, Schmid-Alliana A and Schmid-Antomarchi H. Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. Int. J. Cancer. 2009; 125(11):2586-2594.
- 223. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M and Cyster JG. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature. 2000; 406(6793):309-314.
- 224. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR and Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. J. Exp. Med. 2002; 196(1):65-75.
- 225. Airoldi I, Cocco C, Morandi F, Prigione I and Pistoia V. CXCR5 may be involved in the attraction of human metastatic neuroblastoma cells to the bone marrow. Cancer Immunol. Immunother. 2008; 57(4):541-548

3.3 Χημειοκίνες και Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου ανάμεσα στις σχετιζόμενες με κακοήθειες απώλειες. Αν και η αντιμετώπιση σε αρχικά στάδια της νόσου είναι δυνατή μέσω της χειρουργικής αφαίρεσης του καρκινικού τμήματος του εντέρου, οι προχωρημένες του μορφές είναι δύσκολα αντιμετωπίσιμες καθώς πολύ συχνά σχηματίζουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα όπως το ήπαρ , οι πνεύμονες, οι λεμφαδένες, ο μυελός των οστών κ.α. Οι μεταστάσεις αυτές είναι δυνατό να εντοπιστούν ακόμα και μετά την αφαίρεση του αρχικού όγκου. Σε όλη την διαδικασία της δημιουργίας, της αγγειογένεσης, της ανάπτυξης και της μετάστασης σημαντικό ρόλο εμφανίζεται να διαδραματίζει μία οικογένεια μικρών πρωτεϊνικών μορίων με αρκετές ομολογίες , οι χημειοκίνες. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει αυτές χωρίζονται σε 4 οικογένειες και στο παρόν κεφάλαιο θα σημειώσουμε τα κυριότερα σημεία στα οποία συμμετέχουν οι χημειοκίνες της CXC οικογένειας καθ' όλη την διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, προτού προχωρήσουμε στην διεξοδική περιγραφή 4 εξ αυτών στα επόμενα κεφάλαια.

3.3.1 ELR⁺ χημειοκίνες

Το γονίδιο GRO (Growth-Regulated Oncogene) ήταν το πρώτο ογκογονίδιο που απομονώθηκε από κύτταρα ανθρωπίνου κακοήθους μελανώματος και τα πρωτεϊνικά του παράγωγα είχαν αρχικά χαρακτηριστεί σαν αυτοκρινής παράγοντας ανάπτυξης^[1]. Το γονίδιο αυτό έχει 3 διαφορετικά γενετικά αντίγραφα και τα οποία χαρακτηρίζονται ως GRO-α GRO-β και GRO-γ και συνθέτουν τις γνωστές CXCL1, CXCL2 και CXCL3 αντίστοιχα. Οι 3 αυτές χημειοκίνες προσδένονται στον ίδιο υποδοχέα, τον CXCR2, αν και ανάμεσά τους η CXCL1 παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγγένεια^[1]. Εκτός όμως των 3 αυτών χημειοκινών στον εν λόγω υποδοχέα προσδένονται ακόμα και οι CXCL5, CXCL6, CXCL7 και CXCL8 (όλες είναι μέλη της ίδιας οικογένειας, ELR⁺) και το σύνολο των προσδετών του κατέχουν οι προκαρκινικές ιδιότητες καθώς μπορούν και έλκουν προκαρκινικά ουδετερόφιλα και ρυθμίζουν την αγγειογένεση^[1,3,4-7]. Από τα ανωτέρω μόρια μόνο οι CXCL8 και CXCL6 μπορούν εκτός του CXCR2 να ενεργοποιήσουν και τον CXCR1^[6,8], και ως αποτέλεσμα η χημειοτακτική τους δράση για τα ουδετερόφιλα μπορεί να εκφραστεί μέσω και των δύο αυτών υποδοχέων, αν και φαίνεται το κύριο βάρος αυτής της λειτουργίας να το επωμίζεται ο CXCR2^[9].

Τα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου έχουν βρεθεί να εκφράζουν τις CXCL1 και CXCL5 ως στοιχείο της φυσιολογίας τους. Παρουσία χρόνιας φλεγμονής (είτε επαγόμενης από προφλεγμονώδης κυτταροκίνες όπως ο TNF-α, είτε από μικροβιακή μόλυνση πχ Escherichia Coli) μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της CXCL1^[10-13] Μελέτες πάνω σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος έχουν δείξει μία πιο καθυστερημένη αλλά με μεγαλύτερη διάρκεια έκφραση της CXCL5 σε σχέση με την CXCL8. Η διαφορά αυτή της απόκρισης μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές των εκκινητών των γονιδίων τους καθώς και διαφορετική ενεργοποίηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων τους^[12,13]. Συνολικά όμως η CXCL8 είναι πιο πιθανό ισχυρό χημειοελκτικό μόριο για τα ουδετερόφιλα καθώς η έκφραση του αυξάνεται γρηγορότερα και σε μεγαλύτερες ποσότητες από την CXCL5^[6,12].

Αυξημένη έκφραση των CXCL1, CXCL2 και CXCL3 έχει παρατηρηθεί σ όλα τα αδενοκαρκινώματα και αδενώματα του παχέος εντέρου σε σχέση με το φυσιολογικό επιθήλιο του εντέρου^[14-16].

Μη μεταστατικές και λιγότερο μεταστατικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου όπως οι Caco-2 και HT-29, εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα της CXCL1 σε σύγκριση με υψηλά μεταστατικές σειρές όπως η LS147T^[17]. Υψηλή επιπλέον συνεχής έκφραση του CXCR2 παρατηρήθηκε σε σειρές με υψηλή μεταστατική ικανότητα, σε αντίθεση όμως με την έκφραση των CXCL2 και CXCL3 η οποία και βρέθηκε να μην συνδέεται με την μεταστατική ικανότητα των διαφόρων κυτταρικών σειρών^[17].

Η CXCL1 παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων και είναι πιθανό να συμμετέχει σε αρκετές διαδικασίες στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ανοσοχημική χρώση της σε βιοψίες καρκίνων παχέος εντέρου υπέδειξε έντονη χρώση σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα. Επιπλέον ισχυρή ανοσοχημική χρώση προέκυψε για τον CXCR2 μόνο στα στρωματικά κύτταρα και όχι στα επιθηλιακά, αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με την εύρεση του CXCR2 σε εντερικά αδενοκαρκινώματα in vitro^[17,18]. Η αυξημένη ρύθμιση τόσο της CXCL1 όσο και του CXCR2 στα αδενοκαρκινώματα αυτά είναι πολύ πιθανό να διεγείρει την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου καθώς η εν λόγω χημειοκίνη δρα ως ένας αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας και αυξάνει την δυνατότητα μετάστασης του όγκου^[17]. Όγκοι οι οποίοι υπερεκφράζουν την CXCL1 έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση της Φιμπουλίνης-1 (Fibulin-1), η οποία είναι συστατικό της οργάνωσης της βασικής μεμβράνης και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος^[14]. Η κατάργηση της έκφρασης της Ινουλίνης-1 μπορεί να διευκολύνει την δυνατότητα των νεοπλαστικών κυττάρων να διαπεράσουν την βασική

όμως η ερευνητική ομάδα δεν βρήκε καμία έκφραση του CXCR2 σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου in situ, και έτσι προτάθηκε η ιδέα ότι η CXCL1 επάγει την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω της ενίσχυσης της αγγειογένεσης^[18]. Σε πλήρη αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτά που υποδεικνύουν τον προ-καρκινικό ρόλο της CXCL1 σε άλλη μελέτη είχε βρεθεί μία προστατευτική δράση της χημειοκίνης αυτής καθώς μπορεί να αναστείλει την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω του παχέος του παχέος εντέρου. αποτελέσματος αυτού μπορεί να είναι ότι προφανώς η CXCL1 υπερεκφραζόταν σε ασθενείς μικρότερους των 65 ετών, και στους οποίους το ανοσοποιητικό σύστημα είναι πιο αποτελεσματικό σε σχέση με τους πιο ηλικιωμένους καθώς και ότι εκφράζεται εντονότερα σε μη μεταστατικούς όγκους^[19,20].

Η CXCL5 είναι μία ELR+ χημειοκίνη η οποία παρά την μεγάλη της έκφραση^[15] και την ευρεία διασπορά στην κυτταρική επιφάνεια του υποδοχέα της CXCR2, δεν έχει βρεθεί να επάγει τον καρκινικό πολλαπλασιασμό^[21]. Καμία σύνδεση επίσης δεν έχει βρεθεί ανάμεσα στην συγκέντρωση της χημειοκίνης αυτής και της μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων και μελέτες που έχουν γίνει πάνω σε ιστούς σχετικά με την διαφορά έκφρασης τους ανάμεσα στο φυσιολογικό αδένωμα και το αδενοκαρκίνωμα έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα^[15,22]. Η ερευνητική μονάδα των Dimberg et al παρατήρησε στην μελέτη τους χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της CXCL5 στο πλάσμα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι οι ασθενείς με αυτού του τύπου τον καρκίνο εμφανίζουν μία ανοσολογική ανισορροπία η οποία και οδηγεί στην μειωμένη παραγωγή της CXCL5 από τα λευκοκύτταρα και την τοπική της έκκριση από τα επιθηλιακά κύτταρα στο έντερο και τον πρωκτό^[22]. Επιπλέον οι Speetjens et al. απέδειξαν ότι η διακοπή της έκφρασης της CXCL5 στον καρκίνο του παχέος εντέρου οδήγησε σε μειωμένη ικανότητα εισροής στον όγκο των κυτταροτοξικών CD8+ T-Λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον CXCR2 το οποίο μεταφράζεται σε επιβαρυμένη πρόγνωση και μειωμένη επιβίωση^[23]. Συνδυαζόμενα τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν

ότι η CXCL5 μπορεί να έχει τόσο προ-καρκινικές ιδιότητες (αγγειογένεση, προσέλκυση ουδετερόφιλων) όσο και αντί-καρκινικές (χημειοελκτικότητα για τα Τ κυτταροτοξικά κύτταρα). Παρ όλα αυτά φαίνεται ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου, επικρατεί η αντί-καρκινική της δράση μέσω της έλξης των αντικαρκινικών ανοσολογικών κυττάρων^[23].

Η CXCL6 χημειοκίνη επίσης προσδένεται και αναγνωρίζεται από τον CXCR2 υποδοχέα. Η χημειοκίνη αυτή έχει βρεθεί να εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα του εντερικού αδενοκαρκινώματος, αλλά αντίθετα η έκφραση της απουσιάζει από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού ιστού ^[24]. Επιπροσθέτως έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία και την εγκατάσταση των λευκοκυττάρων εντός του όγκου και της έκφρασής της^[24]. Η παραγωγή της από τα ενδοθηλιακά κύτταρα εντός του όγκου συνεισφέρει στην ανάπτυξή του και την δυνατότητα μετακίνησης και μετάστασης του μέσω της νεοαγγειογένεσης και της χημειοτακτικής έλξης των ουδετερόφιλων, τα οποία με τα αποδομητικά ένζυμα που εκφράζουν, δίνουν την δυνατότητα στον όγκο να δραπετεύσει από το βασικό στρώμα προς το κυκλοφορικό σύστημα. Περισσότερα για την δράση της CXCL6 στον καρκίνου τους παχέος εντέρου θα αναφέρουμε στα επόμενα κεφάλαια αναλυτικότερα.

Η CXCL7 παράγεται από την διάσπαση της ανενεργής πρόδρομης βασικής πρωτεϊνης των αιμοπεταλίων (Platelet Basic Protein, PBP) και το παράγωγό β-θρομβογλοβουλίνη (β-TG), το οποίο αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και ελευθερώνεται με εξωκυττάρωση κατά την ενεργοποίηση των τελευταίων^[7,25]. Η διαδικασία της παραγωγής της CXCL7 από PBP και τα παράγωγά της CTAP-III& βTG καταλύεται από πρωτεάσες οι οποίες απελευθερώνονται από μονοκύταρα και ουδετερόφιλα^[25]. Επιπλέον η CXCL7 έλκει τα ουδετερόφιλα και έτσι και η ίδια συμμετέχει στην σχάση της βασικής μεμβράνης και την κατάρρευση του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος κατά την αγγειογένεση και την μετάσταση. Σαν αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια και οι εκκρινόμενοι από αυτά παράγοντες διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και την μετάσταση^[25,26]. Επιπλέον νεοπλαστικά κύτταρα διαφόρων ιστών έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια^[27]. Τα επίπεδα της β-TG στο αίμα φέρονται να είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με γαστρικούς και εντερικούς καρκίνους σε σχέση με τα αντίστοιχα controls^[1]. Όμως όσον αφορά την σύνδεση των υψηλών επιπέδων της β-TG με την εμφάνιση μεταστάσεων σε απομακρυσμένους ιστούς ή στους λεμφαδένες στους καρκίνους του παχέος εντέρου τα αποτελέσματα είναι μέχρι στιγμής αρκετά αντιφατικά^[27,28].

Η CXCL8 είναι μία ακόμα χημειοκίνη της οικογένειας των ELR+ και είναι η χημειοκίνη με την πιο πιθανή χημειοελκτική δράση για τα ουδετερόφιλα στον ανθρώπινο οργανισμό και η πρώτη που περιγράφηκε η αγγειογενετική της δράση^[3,29]. Η χημειοκίνη αυτή ασκεί την δράση της μέσω της σύνδεσης της σε δύο υποδοχείς τους CXCR1 & CXCR2^[9]. Όσον αφορά την μετανάστευση των ουδετερόφιλων φαίνεται ότι αρκεί η αλληλεπίδραση της και με τους δύο αυτούς υποδοχείς, ενώ σχετικά με την αγγειογενετική της δράση φαίνεται να προωθείται μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον CXCR2^[9]. Σε διάφορες μελέτες φαίνεται η αυξημένη έκφραση της στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του στρωματικού τους περιβάλλοντος σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά^[30-32]. Αναλυτικά η δράση της και η λειτουργία της θα περιγραφεί σε επόμενο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

3.3.2 ELR⁻ Χημειοκίνες

Η CXCL4 χημειοκίνη είναι μία χημειοκίνη της ELR- ομάδας καθώς από αυτήν απουσιάζει το γνωστό μοτίβο αμινοξέων ELR, και συντίθεται στα μεγάλα εμπύρηνα κύτταρα όπου και αποθηκεύεται στα α-κοκκία έως ότου απελευθερωθεί κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων^[33]. Η χημειοκίνη αυτή εκφράζει πλήθος διαφορετικών βιολογικών λειτουργιών όπως η αναστολή της αγγειογένεσης και η χημειοταξία των Δενδριτικών Κυττάρων, των Τλεμφοκυττάρων και των ΝΚ. Τόσο η χημειοτακτική της δράση όσο και η αγγειοστατική της ασκείται μέσω του CXCR3 υποδοχέα^[34-36]. Η δεύτερη όμως φαίνεται να επάγεται και μέσω των θειο-ηπαρινικών πρωτεογλυκανών (heparin sulfate proteoglycans, HSPG) οι οποίες όπως και ο CXCR3 είναι παρούσες στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[35]. Η πρόσδεση επίσης της CXCL4 στους τελευταίους φαίνεται να αναστέλλει την πρόσδεση των καρκινικών κυττάρων στην αγγειογενίνη, πρόσδεση η οποία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μετάσταση τους^[37]. Η αγγειογενίνη είναι πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και επιπλέον αποτελεί φυσιολογικό συστατικό στοιχείο του πλάσματος. Ανάμεσα στις λειτουργίες της είναι και η πρόσδεση της στα ενδοθηλιακά κύτταρα και το εξωκυττάριο συνδετικό υπόστρωμα ώστε να υποστηρίξει την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στα στρωματικά στοιχεία^[37]. Η σύνδεση αυτή γίνεται όπως είπαμε μέσω των HSPG στην οποία δρα ανταγωνιστικά η CXCL4. Επιπλέον η CXCL4 φαίνεται να καθυστερεί την διαδικασία της αγγειογένεσης μέσω της αναστολής του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της επαγωγής της απόπτωσης, υπόθεση που έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά σε σειρές μεταλλαγμένων ποντικιών^[34,38,39]. Έχει περιγραφεί και μία δεύτερη παραλλαγή της η CXCL4L1, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, και η οποία έχει εντονότερη αγγειοστατική και αντίκαρκινική δράση σε σχέση με την αρχική CXCL4^[40]. Σε καρκινικές βιοψίες ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου ανιχνεύθηκε ισχυρότερη έκφραση της εναλλακτικής αυτής χημειοκίνης, σε σχέση με τα οισοφαγικά αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη κυτταρικά καρκινώματα όπου η έκφραση της εμφανίστηκε να είναι ιδιαίτερα αδύναμη^[41]. Περισσότερα για την δράση της ELR- αυτής χημειοκίνης θα αναφέρουμε και στην συνέχεια της εργασίας.

Οι CXCL9, CXCL10 και CXCL11 είναι 3 επαγόμενες από την Ιντερφερόνη-γ ELR- χημειοκίνες, και οι οποίες in vivo παράγονται από πλήθος διαφορετικών κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά, οι ινοβλάστες, τα μονοπύρηνα και τα καρκινικά κύτταρα^[3,42]. Το σύνολο των 3 αυτών χημειοκινών, χαρακτηρίζεται από αντι-καρκινικές ιδιότητες, καθώς δρουν ως αγγειοστατικοί παράγοντες και διαμεσολαβούν για την είσοδο των αντι-καρκινικών Τ-λεμφοκυττάρων και των ΝΚ στην περιοχή του όγκου. Η δράση τους όπως και της CXCL4 επάγεται μέσω της σύνδεσης τους με τον CXCR3 υποδοχέα. Επιπλέον η τριπλέτα αυτή των χημειοκινών φαίνεται

να αποτελεί συστατικό στοιχείο της φυσιολογίας των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και μπορεί περαιτέρω να ενισχυθεί εκτός της IFN-γ για τις μεν CXCL10 και CXCL11 από τον TNF-α και για την CXCL9 από την CXCL1^[12,43,44].

Οι χημειοκίνες CXCL9 και CXCL10 είναι ανάμεσα στα κυριότερα μόρια στόχους στην έρευνα για την καταπολέμηση και την αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης^[45]. Η CXCL9, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με την IL-2 έχει βρεθεί να μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και την δυνατότητα μετάστασης στον πνεύμονα στο εντερικό αδενοκαρκίνωμα^[45]. Συνδυασμένη θεραπεία με CXCL10 και κυτταροκίνες που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των Τ-κυτταροτοξικών και των Natural Killers, όπως ο TNF-α και η IL-12, ενίσχυσε τα αντικαρκινικά αποτελέσματα της χημειοκίνης όχι μόνο στον αρχικό όγκο αλλά και σε απομακρυσμένες μεταστάσεις του^[46,47]. Η κύρια αντί-καρκινική δράση των CXCL9 και CXCL10 επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της δράσης των αντιγόνων τού τάξης Ι Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompability Complex,MHC) των διαμορφοποιημένων CD8⁺ T-Λεμφοκυττάρων, με την συνέργεια των αντιγόνων τάξης ΙΙ ΜΗC των διαμορφοποιημένων CD4⁺ T-Λεμφοκυττάρων, των ΝΚ και της αναστολής της αγγειογένεσης. Επιπλέον φαίνεται ότι η δράση των CXCL9 και CXCL10 δεν αρκείται στην έλξη χημειοτακτικά των Τ-λεμφοκυττάρων, αλλά ενισχύει και την λειτουργική τους εξάπλωση^[45,47,48]. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε όταν λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από όγκους που είχαν επωασθεί με CXCL10 βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, αυξημένη κυτταροτοξική ενεργότητα και παρήγαγαν μεγαλύτερα επίπεδα IFN-γ, η οποία με την σειρά της ρυθμίζει αυξητικά την έκφραση της CXCL10 σε εντερικούς καρκίνους στρατολογώντας εκ νέου περισσότερα Τ-Κύτταρα^[49]. Ως εκ τούτου υψηλά επίπεδα των CXCL9 και CXCL10 στους όγκους του παχέος εντέρου συνδέονται με αυξημένη εισχώρηση εντός τους των διαφοροποιημένων CD8+ και CD4⁺ T-Κυττάρων, των μακροφάγων και συνεπακόλουθα με καλύτερη πρόγνωση^[50-52]. Ακόμα τα ποσοστά της CXCL10 έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα σε ασθενείς με επανεμφάνιση του όγκου μετά την θεραπεία, σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς υποτροπή.^[51,52]. Αντίστοιχα

αυξημένη έκφραση της χημειοκίνης αυτής στην περιοχή του όγκου σε σχέση με τον παρακείμενο υγιή ιστό εμφανίστηκε στο 50% των περιπτώσεων^[53,54].

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει για την δράση των CXCL9 και CXCL10 απαιτείται η σύνδεσή τους με τον CXCR3. Ο υποδοχέας αυτός εκτός των κυττάρων του ανοσοποιητικού έχει βρεθεί να εκφράζεται και από τα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου, διαδικασία η οποία είναι πιθανό να προκαλείται σαν αποτέλεσμα της διέγερσης τους από την IFN-γ^[55,56]. Η έκφραση του υποδοχέα αυτού στα καρκινικά κύτταρα μέχρι στιγμής δίνει ερευνητικά αντικρουόμενα αποτελέσματα καθώς έχει βρεθεί τόσο να ενισχύει την δυνατότητα μετάστασης τους στους λεμφαδένες χωρίς στην πλειοψηφία να την επηρεάζει για άλλους ιστούς όπως το ήπαρ και οι πνεύμονες, όσο και να ενοχοποιείται για την μετάσταση τους στους δύο αυτούς ιστούς ειδικά^[55-57]. Γεγονός είναι πάντως ότι έκφραση της CXCL10 έχει βρεθεί να λαμβάνει χώρα και στους 3 αυτούς ιστούς: ήπαρ, πνεύμονες και λεμφαδένες^[56]. Αντίστοιχα μελέτη σε βιοψίες καρκίνων του παχέος εντέρου έδειξε ότι περίπου το 1/3 των δειγμάτων εξέφραζαν τον υποδοχέα, και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτών ακολούθησε μετάσταση του αρχικού όγκου στους λεμφαδένες. Αντίθετα τα υγιή επιθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν καθόλου τον εν λόγω υποδοχέα. Επιπλέον ασθενείς στους οποίους εκφράζεται ο CXCR3 στα καρκινικά κύτταρα έχουν βρεθεί με επιβαρυμένη πρόγνωση, σε σχέση με τους υπολοίπους^[55]. Διέγερση in vitro των κυττάρων του εντερικού καρκίνου με CXCL10 προκαλεί αύξηση στην έκφραση της Μεταλοπρωτεάσης-9 (MMP-9), διευκολύνοντας την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, χωρίς όμως να επηρεάζει την ανάπτυξη του όγκου^[55,56].

Η CXCL12 είναι επίσης μία ELR⁻ χημειοκίνη με σημαίνοντα ρόλο στην καρκινογένεση και η οποία σε αντίθεση με τις υπόλοιπες χημειοκίνες της ELR⁻ ομάδας έχει αγγειογενείς ιδιότητες. Η άσκηση της αγγειογενετικής δράσης γίνεται είτε με την άμεση σύνδεσή της στον υποδοχέα CXCR4 ο οποίος και εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είτε έμμεσα με την επαγόμενη έκκριση αγγειογενών παραγόντων όπως οι Μεταλλοπρωτεάσες και ο VEGF^[58]. Η CXCL12 ακόμα επάγει την νεοαγγειογένεση μέσω της προσέλκυσης των αδιαμορφοποίητων ενδοθηλιακών κυττάρων, και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων επηρεάζοντας την επιβίωσή τους. Το δίπολο CXCL12/CXCR4 έχει βρεθεί να εμπλέκεται και στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων προς ιστούς οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση της χημειοκίνης αυτής όπως οι λεμφαδένες, το ήπαρ, οι πνεύμονες και ο μυελός των οστών^[58,59].

Πλήθος μελετών αναφέρουν ότι η έκφραση της CXCL12 είναι μειωμένη στο εντερικό αδένωμα και αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με τον υγιή εντερικό βλεννογόνο^[60-62]. Ανοσοχημική σήμανση σε υγιείς εντερικές βιοψίες έδωσε έντονη χρώση για την CXCL12 στα εντερικά ενδοθηλιακά κύτταρα που απαρτίζουν το άνω μέρος των εντερικών κρυπτών [63]. Για την σίγαση του γονιδίου κατά την μετατροπή των κυττάρων από φυσιολογικά σε καρκινικά, έχει προταθεί ο μηχανισμός της υπερμεθυλίωσης της περιοχής του εκκινητή. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι επανέκφραση της CXCL12 στα εντερικά αδενοκαρκινώματα μείωσε δραστικά την δυνατότητα της μετάστασης του όγκου στα ποντίκια και επιπλέον αύξησε την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές^[62]. Η ερευνητική ομάδα των Fushimi et al. απέδειξε ότι υπερέκφραση της χημειοκίνης αυτής στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των Τ-Λεμφοκυττάρων εντός του όγκου καταστέλλοντας την ανάπτυξή του^[64]. Παρ όλα αυτά ο ρόλος της στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων είναι ακόμα αμφιλεγόμενος καθώς άλλες μελέτες την παρουσιάζουν ως υποκινητή και άλλες ως αναστολέα της^[62,63,65-67]. Επιπλέον έχει προταθεί η θεωρία ότι τα καρκινικά κύτταρα που δεν εκφράζουν ενδογενώς την CXCL12 αποκρίνονται αποτελεσματικότερα στην εξωγενή CXCL12, γεγονός που οδηγεί στην μετάσταση^[62].

Σε αντίθεση με τα ανωτέρω αποτελέσματα αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η CXCL12 είναι αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, ιδιαίτερα σε αυτά του μετώπου της

μετάστασης, σε σχέση με το φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο^[68,69]. Ακόμα η CXCL12 έχει βρεθεί να είναι σε υψηλότερα επίπεδα στα εντερικά ανδενοκαρκινώματα σε σχέση με τα αντίστοιχα αδενώματα, στα οποία με την σειρά τους είναι πιο αυξημένη σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο^[70]. Εκτός των καρκινικών κυττάρων, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες είναι δύο ακόμα κυτταρικές ομάδες που έχουν να υποδείξουν έντονη δράση της CXCL12 ανοσοϊστοχημικά^[68-71]. Επιπλέον η αυξημένη έκφρασή της στις περιπτώσεις των καρκίνων του παχέος εντέρου έχει βρεθεί να συνδέεται με το στάδιο του καρκίνου, την μετακίνηση στα αγγεία, την μετάσταση στους λεμφαδένες, την απομακρυσμένη μετάσταση και το μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης^[68,69,71]. Αντίθετα σε μία μελέτη δεν βρέθηκε ούτε μία συσχέτιση ανάμεσα στην CXCL12 και διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους^[72]. Συνδυάζοντας όλα αυτά τα αντιμαχόμενα αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι κατά τα πρώτα καρκινικά στάδια, η εν λόγω χημειοκίνη μπορεί με την έκφρασή της να επάγει την αγγειογένεση και την καρκινική ανάπτυξη, ενώ σε μεταγενέστερα στάδια χαμηλότερα επίπεδα της έκφρασής της μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη του όγκου εμποδίζοντας την στρατολόγηση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και προωθώντας την μετάσταση του σε ιστούς με υψηλή έκφραση σε CXCL12.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει ο κύριος υποδοχέας της CXCL12 είναι ο CXCR4 και οποίος έχει συνεχή έκφραση τόσο στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο όσο και στο κύτταρα του καρκινώματος του παχέος εντέρου^[60,62,73]. Στον υγιή βλεννογόνο του παχέος εντέρου ο υποδοχέας έχει ανιχνευθεί τόσο στην επιφάνεια του όσο και στο εσωτερικό των κρυπτών του, όπου και η έκφραση του ήταν ισχυρότερη στα επιθηλιακά κύτταρα της βάσης τους^[60,63]. Ο CXCR4 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και την ανανέωση του εντερικού επιθηλίου καθώς η διαφοροποίηση των κυττάρων σε καρκινικά οδηγεί σε μειωτική ρύθμιση της έκφρασής του^[60,63]. Επί προσθέτως φαίνεται, η διέγερση του υποδοχέα από την CXCL12, να προωθεί την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα όργανα που εκφράζουν την χημειοκίνη αυτή^[63,74-76]. Ακόμα η ενεργοποίηση του υποδοχέα

διεγείρει την έκφραση της ICAM-1 στα καρκινικά κύτταρα η οποία τους επιτρέπει να εισβάλουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στάδιο κρίσιμο για την μετάσταση του όγκου^[60,74,75]. Από την στιγμή που τα καρκινικά κύτταρα θα εισβάλλουν στα απομακρυσμένα όργανα η τοπική έκφραση του CXCL12 αναλαμβάνει να προωθήσει την ανάπτυξη του όγκου στην περιοχή της μετάστασης βοηθώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση και επάγοντας την έκκριση της Μεταλλοπρωτεάσης 9 (ΜΜΡ-9), η οποία με την σειρά της διευκολύνει την διάσπαση του ΕCM και την ρύθμιση της αγγειογένεσης^[63,66,67,74,75,77,78]. Η CXCL12 μπορεί τόσο άμεσα όσο και έμμεσα να προωθήσει την νεοαγγειογένεση μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Από την μία μέσω της απ' ευθείας σύνδεσης της με τον υποδοχέα^[79] πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα και από την άλλη μέσω της επαγωγής της έκκρισης προ-αγγειογενών κυτταροκινών και χημειοκινών όπως οι VEGF, CXCL8, CXCL1, CXCL2 και CXCL3^[63,66,73]. Αντίστροφα ο VEGF δεν επάγει μόνο την έκφραση του υποδοχέα CXCR4 αλλά ενισχύει και την παραγωγή της CXCL12 στα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα εγκαθιστώντας ένα ευνοϊκό για τον όγκο περιβάλλον^[72,80,81]. Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορούν και ενεργοποιούν τους Ινοβλάστες για την μετατροπή τους σε καρκινοσυνδεδεμένους Ινοβλάστες (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) τα οποία επίσης παράγουν αυξημένα επίπεδα της CXCL12, συμμετέχοντας και μέσω του μηχανισμού αυτού στην ενίσχυση της μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων^[77,82].

Ο CXCR4 εκτός της έκφρασης του στα καρκινικά κύτταρα έχει βρεθεί να εκφράζεται και στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και στα εντός του όγκου λευκοκύτταρα^[71,72]. Επιπλέον αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του υποδοχέα αυτού είναι υψηλότερη στις ηπατικές μεταστάσεις σε σχέση με τον αρχικό εντερικό όγκο^[77,83]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ειδικά τα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου που η έκφραση του CXCR4 είναι σε υψηλά επίπεδα, μεθίστανται ευκολότερα

σε απομακρυσμένα όργανα. Παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα είναι η υποξία και ο VEGF^[80,81,84].

Εκτός όμως του CXCR4 η CXCL12 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά και με έναν ακόμα υποδοχέα, τον CXCR7^[85]. Σε σχέση με την έκφραση του υποδοχέα αυτού και του καρκίνου του παχέος εντέρου υπάρχουν ακόμα λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν έκφραση του τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα ενδοθηλιακά^[86] και μόνο μία μελέτη η οποία τον συνδέει με πιθανή επαγωγή της αγγειογένεσης^[66].

Η CXCL13 είναι ακόμα μία χημειοκίνη της οικογένειας των ELR- χημειοκινών, η οποία κυρίως έχει εντοπιστεί σε δευτερεύοντα λεμφικά όργανα και είχε αρχικά αναγνωριστεί ως πιθανός χημειοελκτικός παράγοντας για τα B-λεμφοκύτταρα ^[87]. Ο υποδοχέας της είναι ο CXCR5 και ο οποίος δεν εκφράζεται σε πρώιμα παρά μόνο σε ώριμα B κύτταρα. Αυτή η ιδιότητα του έρχεται σε πλήρη αντίθεση με την CXCL12 η οποία αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως παράγοντας ανάπτυξης των πρώιμων αυτών κυττάρων και χημειοελκτικό μόριο μόνο για παράγοντας ανάπτυξης των πρώιμων αυτών κυττάρων και χημειοελκτικό μόριο μόνο για πρώιμα B-Λεμφοκύτταρα ^[87]. Η ανίχνευση του υποδοχέα αυτού έγινε στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω ανοσοϊστοχημείας^[88,89]. Επιπλέον η έκφραση του υποδοχέα αυτού στα εντερικά καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην μετανάστευσή του σε όργανα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα της CXCL13 όπως ο σπλήνας και το ήπαρ. Τέλος η χημειοκίνη αυτή απ' ευθείας επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αδενοκαρκινώματος, βοηθώντας την ανάπτυξη του όγκου^[89].

Η CXCL16 είναι η μοναδική χημειοκίνη η οποία βρίσκεται τόσο σε διαμεμβρανική μορφή όσο και σε διαλυτό μόριο και φέρει ποικίλες βιολογικές δράσεις^[90]. Η διαλυτή της μορφή είναι χημειοελκτική για τα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR6 μεταξύ των οποίων βρίσκονται τα CD8⁺ & CD4⁺ T-κύτταρα, ενώ στην διαμεμβρανική της μορφή δρα περισσότερο ως μόριο προσκόλλησης για τα ίδια αυτά κύτταρα. Η ρύθμιση της έκφρασης έχει βρεθεί να είναι αυξημένη στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με τον υγιή βλεννογόνο^[90]. Εκτός της έκφρασης της στα καρκινικά κύτταρα, έχει βρεθεί και στα μακροφάγα. Όγκοι του παχέος εντέρου που εκφράζουν υψηλά επίπεδα της εν λόγω χημειοκίνης περιέχουν μεγαλύτερους πληθυσμούς των CD8+ & CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων σε σχέση με τους υπόλοιπους, ακολουθούμενοι συνεπακόλουθα και από καλύτερη πρόγνωση^[90].

Πλέον είναι αρκετά ξεκάθαρο ότι η έκφραση των χημειοκινών και των υποδοχέων τους στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου συμμετέχει σε αρκετά στάδια της εξέλιξης τους όπως η επιβίωση, η ανάπτυξη, η προσέλκυση των λευκοκυττάρων, η αγγειογένεση και τέλος η μετάσταση. Επιπλέον η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και τα υγιή στρωματικά μεταβάλλει το μοτίβο έκφρασης των χημειοκινών δημιουργώντας ένα ευνοϊκό για τον όγκο τοπικό μικροπεριβάλλον. Οι ELR⁺ χημειοκίνες εκφράζονται ευρέως στους γαστροεντερικούς καρκίνους και είναι συνδεδεμένη με επιβαρυμένη πρόγνωση. Παρ όλα αυτά η αντιφατική σε πολλές περιπτώσεις δράσεις τους μας υποδεικνύει πόσο σύνθετο είναι το μοτίβο δράσης τους και πόση μελέτη χρειάζεται ακόμα μέχρι την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών τους

3.3.3 Βιβλιογραφία

- 1. Richmond A, Lawson DH, Nixon DW, Chawla RK. Characterization of autostimulatory and transforming growth factors from human melanoma cells. Cancer Res 1985;45:6390–4.
- Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, et al. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:7732–6.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem 1995;270:27348–57.
- 4. Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R, Baggiolini M. Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. J Exp Med 1990;171: 1797–802.
- 5. Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL, Strieter RM. Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. J Exp Med 1991;174:1355–62.
- Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben Baruch A, Van Damme J, Wang JM. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. Eur J Biochem 1998;255:67–73.

- Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, et al. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. Eur J Immunol 1990;20:2113–8.
- 8. Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, Van Coillie E, Struyf S, Billiau A, et al. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. J Leukoc Biol 1997;62:563–9.
- 9. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem 2003;278:8508–15.
- 10. Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, et al. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain. J Biol Chem 2004;279:42984–92.
- 11. Kim JM, Cho SJ, Oh YK, Jung HY, Kim YJ, Kim N. Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by Bacteroides fragilis enterotoxin. Clin Exp Immunol 2002;130:59–66.
- 12. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1214–23.
- 13. Keates S, Keates AC, Mizoguchi E, Bhan A, Kelly CP. Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis. Am J Physiol 1997;273:G75–82.
- Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, et al. GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and downregulates fibulin-1. Clin Cancer Res 2006;12:5951–9.
- 15. Rubie C, Frick VO, Wagner M, Schuld J, Graber S, Brittner B, et al. ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions. BMC Cancer 2008;8:178–88.
- 16. Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, et al. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. Int J Colorectal Dis 2010;25:573–81.
- Li A, Varney ML, Singh RK. Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype. Clin Exp Metastasis 2004;21:571–9.
- Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, et al. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. J Exp Med 2006;203:941–51.
- 19. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:437–43.
- 20. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. Cell 2008;133:1006–18.
- 21. Fujisawa N, Sakao Y, Hayashi S, Hadden III WA, Harmon CL, Miller EJ. alpha-Chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for

alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. J Cancer Res Clin Oncol 2000;126:19–26.

- 22. Dimberg J, Dienus O, Lofgren S, Hugander A, Wagsater D. Expression and gene polymorphisms of the chemokine CXCL5 in colorectal cancer patients. Int J Oncol 2007;31:97–102.
- 23. Speetjens FM, Kuppen PJ, Sandel MH, Menon AG, Burg D, van de Velde CJ, et al. Disrupted expression of CXCL5 in colorectal cancer is associated with rapid tumor formation in rats and poor prognosis in patients. Clin Cancer Res 2008;14:2276–84.
- 24. Gijsbers K, Gouwy M, Struyf S, Wuyts A, Proost P, Opdenakker G, et al. GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors. Exp Cell Res 2005;303:331–42.
- 25. Walz A, Baggiolini M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. J Exp Med 1990;171:449–54.
- 26. Hoogewerf AJ, Leone JW, Reardon IM, Howe WJ, Asa D, Heinrikson RL, et al. CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes. J Biol Chem 1995;270:3268–77.
- Dymicka-Piekarska V, Kemona H, Piotrowski Z, Gryko M, Milewski Z, Matowicka-Karna J. Does colorectal cancer influence platelet activation? Przegl Lek 2003;60:716–8.
- 28. Abbasciano V, Guerra S, Reali MG, Guglielmini C. Pre- and postsurgery activation of blood coagulation in gastric and large bowel cancers: diagnostic, therapeutic and prognostic hints. Oncology 1990;47:261–6.
- 29. Van Damme J, Van Beeumen J, Opdenakker G, Billiau A. A novel NH2-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulocytosis-promoting activity. J Exp Med 1988;167: 1364–76.
- 30. Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW, Christmas SE. Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. Eur J Cancer 1996;32A:2142–7.
- 31. Cui G, Yuan A, Goll R, Vonen B, Florholmen J. Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Cancer Immunol Immunother 2009;58:1897–905.
- 32. Rubie C, Frick VO, Pfeil S, Wagner M, Kollmar O, Kopp B, et al. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer.World J Gastroenterol 2007;13:4996–5002.
- 33. Deuel TF, Keim PS, Farmer M, Heinrikson RL. Amino acid sequence of human platelet factor 4. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:2256–8.
- 34. Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. Semin Thromb Hemost 2004;30:379–85.
- 35. Struyf S, Salogni L, Burdick MD, Vandercappellen J, Gouwy M, Noppen S, et al. Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3. Blood 2011;117:480–8.
- 36. Mueller A, Meiser A, McDonagh EM, Fox JM, Petit SJ, Xanthou G, et al. CXCL4induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. J Leukoc Biol 2008;83:875–82.
- Soncin F, Shapiro R, Fett JW. A cell-surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin. J Biol Chem 1994;269:8999–9005.
- 38. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. J Exp Med 2003;197:1537–49.
- Sharpe RJ, Byers HR, Scott CF, Bauer SI, Maione TE. Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. J Natl Cancer Inst 1990;82:848–53.
- 40. Struyf S, Burdick MD, Peeters E, Van den BK, Dillen C, Proost P, et al. Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. Cancer Res 2007;67: 5940–8.
- Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E, et al. Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. Hum Pathol 2010;41:990–1001.
- 42. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. Adv Immunol 2003;81:1–44.
- 43. Dwinell MB, Lugering N, Eckmann L, Kagnoff MF. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 2001;120:49–59.
- 44. Yeruva S, Ramadori G, Raddatz D. NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. Int J Colorectal Dis 2008;23:305–17.
- 45. Ruehlmann JM, Xiang R, Niethammer AG, Ba Y, Pertl U, Dolman CS, et al. MIG (CXCL9) chemokine gene therapy combines with antibody-cytokine fusion protein to suppress growth and dissemination of murine colon carcinoma. Cancer Res 2001;61:8498–503.
- 46. Enderlin M, Kleinmann EV, Struyf S, Buracchi C, Vecchi A, Kinscherf R, et al. TNFalpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. Cancer Gene Ther 2009;16:149–60.
- 47. Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, et al. Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFNgamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. J Immunol 2000;164:3112–22.
- 48. Li G, Tian L, Hou JM, Ding ZY, He QM, Feng P, et al. Improved therapeutic effectiveness by combining recombinant CXC chemokine ligand 10 with Cisplatin in solid tumors. Clin Cancer Res 2005;11:4217–24.
- Yang X, Chu Y, Wang Y, Zhang R, Xiong S. Targeted in vivo expression of IFN gammainducible protein 10 induces specific antitumor activity. J Leukoc Biol 2006; 80:1434– 44.
- 50. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. Gastroenterology 2010;138: 1429–40.

- 51. Musha H, Ohtani H, Mizoi T, Kinouchi M, Nakayama T, Shiiba K, et al. Selective infiltration of CCR5(+)CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma. Int J Cancer 2005;116:949–56.
- 52. Jiang Z, Xu Y, Cai S. CXCL10 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. Mol Biol Rep 2010;37:3029–36.
- 53. Zhang R, Zhang H, Zhu W, Pardee AB, Coffey Jr RJ, Liang P. Mob-1, a Ras target gene, is overexpressed in colorectal cancer. Oncogene 1997;14:1607–10.
- Berencsi K, Meropol NJ, Hoffman JP, Sigurdson E, Giles L, Rani P, et al. Colon carcinoma cells induce CXCL11-dependent migration of CXCR3-expressing cytotoxic T lymphocytes in organotypic culture. Cancer Immunol Immunother 2007;56:359– 70.
- 55. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, et al. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. Oncogene 2007;26:4679–88.
- Zipin-Roitman A, Meshel T, Sagi-Assif O, Shalmon B, Avivi C, Pfeffer RM, et al. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. Cancer Res 2007;67:3396–405.
- 57. Cambien B, Karimdjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, et al. Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. Br J Cancer 2009;100:1755–64.
- 58. Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. Stem Cells 2005;23:879–94.
- 59. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 2001;410: 50–6.
- 60. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, et al. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. J Clin Invest 1999;104:1061–9.
- 61. Shibuta K, Begum NA, Mori M, Shimoda K, Akiyoshi T, Barnard GF. Reduced expression of the CXC chemokine hIRH/SDF-1alpha mRNA in hepatoma and digestive tract cancer. Int J Cancer 1997;73:656–62.
- 62. Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. Oncogene 2006;25:4986–97.
- 63. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, et al. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. Exp Cell Res 2005;310: 117–30.
- 64. Fushimi T, O'Connor TP, Crystal RG. Adenoviral gene transfer of stromal cellderived factor-1 to murine tumors induces the accumulation of dendritic cells and suppresses tumor growth. Cancer Res 2006;66:3513–22.
- 65. Wendt MK, Drury LJ, Vongsa RA, Dwinell MB. Constitutive CXCL12 expression induces anoikis in colorectal carcinoma cells. Gastroenterology 2008;135:508–17.
- 66. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GC, Tilton B, et al. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. Int J Cancer 2010;126:1302–15.

- 67. Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. World J Gastroenterol 2008;14:2308–13.
- 68. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. Am J Clin Pathol 2009;132:202–10.
- 69. Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, et al. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. Br J Cancer 2008;98:1682–9.
- 70. Greijer AE, Delis-van Diemen PM, Fijneman RJ, Giles RH, Voest EE, van Hinsbergh VW, et al. Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. Virchows Arch 2008;452:535–44.
- Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, et al. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. Ann Surg Oncol 2010;17:2051– 8.
- 72. Ingold B, Schulz S, Budczies J, Neumann U, Ebert MP, Weichert W, et al. The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. Histopathology 2009;55:576–86.
- 73. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 1999;117:359–67.
- 74. Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, Pisano C, Pignata S, Tatangelo F, et al. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. Cancer Immunol Immunother 2005;54:781–91.
- 75. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. Cancer Res 2003;63:3833–9.
- 76. Gassmann P, Haier J, Schluter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, et al. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. Neoplasia 2009;11:651–61.
- 77. Matsusue R, Kubo H, Hisamori S, Okoshi K, Takagi H, Hida K, et al. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. Ann Surg Oncol 2009;16:2645–53.
- 78. Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine-protease interactions in cancer. Semin Cancer Biol 2004;14:201-8.
- 79. Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, et al. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. Cancer Res 2005;65:5864–71.
- 80. Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang XP, DeCarvalho AC, et al. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. Cancer Lett 2006;236:39–45.
- 81. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. Am J Pathol 1999;154:1125–35.
- 82. Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, et al. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. Stem Cells 2007;25:520–8.

- 83. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. J Clin Oncol 2005;23:2744–53.
- 84. Richard CL, Tan EY, Blay J. Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/ SDF-1alpha. Int J Cancer 2006;119:2044–53.
- 85. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem 2005;280:35760–6.
- 86. Salmaggi A, Maderna E, Calatozzolo C, Gaviani P, Canazza A, Milanesi I, et al. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. Cancer Biol Ther 2009;8:1608–14.
- Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. J Exp Med 1998;187:655–60.
- Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. Int J Cancer 2005;116:726–33.
- 89. Meijer J, Zeelenberg IS, Sipos B, Roos E. The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver. Cancer Res 2006;66:9576–82.
- 90. Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, et al. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. Cancer Res 2007;67:4725–31.

3.4 CXCL8 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

Η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8, CXCL8) είναι μία CXC χημειοκίνη η οποία φέρει στην αλληλουχία της το αμινοξικό μοτίβο Γλουταμινικού Οξέως-Λευκίνης-Αργινίνης (Glu-Leu-Arg, E-L-R) εξ ου και ο χαρακτηρισμός της ως ELR⁺. Όλες οι χημειοκίνες αυτής της ομάδας χαρακτηρίζονται από χημειοτακτικές και αγγειογενετικές ιδιότητες^[1] και δεν είναι λίγες οι φορές που η CXCL8 υιοθετείται ως το χαρακτηριστικότερο τους παράδειγμα. Παράλληλα η CXCL8 είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη και μελετημένη χημειοκίνη της οικογένειας ως προς την δράση της και την έκφραση της, ενώ είναι και η πρώτη που ανακαλύφθηκε ως αγγειογενής παράγοντας. Η CXCL8 εκφράζεται σε ένα πλήθος διαφορετικών κυττάρων μεταξύ των οποίων τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα. Συνολικά η CXCL8 έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα υγιή και ειδικά στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου η CXCL8 φαίνεται να δρα και σαν αυτοκρινής παράγοντας. Η δράση της συνολικά χαρακτηρίζεται ως αγγειογενής και εμφανίζεται να ενισχύει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση του όγκου. Παράλληλα οι αγγειογενείς ιδιότητες της έχουν βρεθεί να είναι ανεξάρτητες της χημειοτακτικής της δράσης για τα ουδετερόφιλα και τους λοιπούς προφλεγμονώδεις παράγοντες^[2,3].

Αρχικά παράγεται ως μία πρωτεΐνη 99 αμινοξέων, η οποία μετά την μεταφραστική της τροποποίηση συνθέτει ένα πεπτίδιο 72 αμινοξέων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού (μονοκύτταρα και μακροφάγα) και ένα πεπτίδιο 77 αμινοξέων στα υπόλοιπα μηανοσοποιητικά κύτταρα^[4,5]. Οι δύο αυτές τελικές ισομορφές της αποτελούν και τις ενεργές της μορφές. Ο διμερισμός της τελικής πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την πρόσδεση της στον υποδοχέα^[6].

Η δράση της ασκείται μέσω της σύνδεσης σε δύο διαφορετικές διαμεμβρανικές G-πρωτεΐνες, τις CXCR1 και CXCR2, οι οποίες εκφράζονται πάνω στα ουδετερόφιλα, τα ιστιοκύτταρα, τα

Natural Killers και τα ενδοθηλιακά κύτταρα^[7]. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές^[8] και εκτός της CXCL8 ο CXCR1 αλληλοεπιδρά και με την CXCL6 ενώ ο CXCR2 και με τις CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 και CXCL7^[9]. Για την μετανάστευση των ουδετερόφιλων χρησιμοποιεί εξίσου και τους δύο υποδοχείς CXCR1 και CXCR2 ενώ για την αγγειογενετική της δράση κυρίως τον δεύτερο^[10].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την CXCL8 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στον μεγάλο βραχίονα στις θέσεις q13-q21^[5]. Το γονίδιο της CXCL8 περιέχει 4 εξόνια, 3 ιντρόνια και μία κοντινή περιοχή υποκινητή. Γενετικές αλλαγές όπως μικροί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μπορούν να συμβούν κατά την ανάπτυξη του όγκου. Τρεις καλά χαρακτηρισμένοι πολυμορφισμοί στην περιοχή του γονιδίου της έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής, 1 στην περιοχή του υποκινητή στην θέση -251 T/A και 2 στο ιντρόνιο 1 στις θέσεις 396 T/G και 781 C/T^[11]. Οι μελέτες που έχουν γίνει για την σύνδεση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς αυτούς και την σύνδεση με το εντερικό αδενοκαρκίνωμα είναι ελάχιστες και τα αποτελέσματά τους σε σχέση με τον πολυμορφισμό στο -251 και τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου χαρακτηρίζονται αντικρουόμενα^[12,13]. Η υψηλή έκφραση των T251A πολυμορφισμών της όCXCL8 όμως έχει βρεθεί να συνδέεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου σε ασθενείς με σταδίου ΙΙΙ καρκίνο του παχέος εντέρου^[14].

Η έκφραση του γονιδίου έχει βρεθεί να επηρεάζεται από την μεθυλίωση ή μη της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου αυτού καθ' αυτού. Μεθυλίωση της περιοχής αυτής οδηγεί σε περιορισμό της έκφρασης του γονιδίου ενώ τυχόν υπομεθυλίωση σε αύξηση.

Πειράματα με ειδική μεθυλιωμένη PCR έρχονται να επιβεβαιώσουν τον ανωτέρω ισχυρισμό καθώς έχει βρεθεί ότι στο 64% των καρκινικών δειγμάτων η περιοχή του υποκινητή ήταν υπομεθυλιωμένη ενώ η αντίστοιχη υπομεθυλίωση δεν εντοπίστηκε στα υγιή δείγματα^[15]. Επιπλέον βρέθηκε ότι οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου στους οποίους υπήρχε η υπομεθυλίωση εξέφραζαν και εκείνοι μεγαλύτερη ποσότητα της CXCL8 σε σχέση με τους υπολοίπους^[15,16]. Άξιο αναφοράς όμως είναι ότι σε αντίθεση με το αναμενόμενο οι ασθενείς στους οποίους διαγνώστηκε απομακρυσμένη μετάσταση του αρχικού όγκου τείνουν να έχουν χαμηλότερο ποσοστό υπομεθυλίωσης σε σχέση με τους υπολοίπους χωρίς εμφάνιση μετάστασης^[14]. Στις αντίστοιχες μελέτες μεθυλίωση στην περιοχή του γονιδίου της CXCL8 παρατηρήθηκε σ όλους τους υγιείς ιστούς των άσθενών ενώ το αντίστοιχο ποσοστό πέφτει στο 36% ανάμεσα στους καρκινικούς ιστούς των ίδιων ασθενών^[15].

Παράλληλα σε μελέτες κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου υψηλότερο ποσοστό μεθυλίωσης εντοπίστηκε στη κυτταρική σειρά Caco-2 ενώ τα HT-29 είχαν συνολικά προφίλ υπομεθυλίωσης. Παράλληλα εντονότερη έκφραση της CXCL8 παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά των HT-29 σε σύγκριση με την κυτταρική σειρά των Caco-2, αποτέλεσμα που ακολουθεί το πρότυπο μεθυλίωσης τους^[15].

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία κυρίως συμμετέχει η CXCL8 είναι τα εξής:

- Ενεργοποιεί την Κινάση της Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3 (Phospatidylinositol-3-kinase, PI3K) και την MAP κινάση^[17]. Η PI3K δρα ως το κύριο καθοδικό ενδοκυτταρικό σήμα της CXCL8 και η οποία φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα της Akt, φωσφορυλίωση η οποία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, της αγγειογένεσης και της κυτταρικής μετακίνησης^[18]. Στο μονοπάτι της MAP Κινάσης περιλαμβάνονται και διάφορες κινάσες σερίνης/θρεονίνης ανάμεσα στις οποίες ξεχωρίζουν οι Raf-1, MAP και Erk^[19-22]. Η απόκριση αυτή από την CXCL8 λαμβάνει χώρα στα ουδετερόφιλα και τα καρκινικά κύτταρα^[20-22].
- Ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C (Phospholipase C, PLC). Στην συνέχεια του μονοπατιού αυτού ενεργοποιείται η Πρωτεϊνική Κινάση C και η οποία επάγει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Η τελευταία σε συνδυασμό με μία αύξηση

των ιόντων ασβεστίου Ca²⁺ ρυθμίζει την κυτταροσκελετική ακτίνη βοηθώντας την μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων^[23].

 Ενεργοποίηση Τυροσινικών κινασών και των Rho-GTPασών. Η ενεργοποίηση των δύο αυτών κατηγοριών των πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε πλήθος καρκίνων και συνεισφέρει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και αντίσταση απέναντι σε διάφορες χημειοθεραπείες^[24,25].

Η CXCL8 διαδραματίζει και σημαντικό ρόλο στην ανοσοκαταστολή στην περιοχή του όγκου. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού στρατολογεί διάφορες κατηγορίες ανοσοποιητικών κυττάρων άλλωστε η CXCL8 είναι η χημειοκίνη με την εντονότερη χημειοελκτική δράση στα ουδετερόφιλα και την ικανότητα να τα ενεργοποιεί τόσο in vivo όσο και in vitro.

Η CXCL8 δρα χημειοελκτικά για τα παραγόμενα από τον μυελό ανοσοκατασταλτικά κύτταρα (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs). Τα κύτταρα αυτά ήταν τα πρώτα που απομονώθηκαν από το εσωτερικό καρκινικού όγκου και μεταστάσεων στους λεμφαδένες, και ο τρόπος με τον οποίον αποφεύγουν την ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού περιλαμβάνει την αναστολή της δράσης των Τ-κυττάρων^[26-29]. Οι υποδοχείς CXCR1 και CXCR2 έχουν βρεθεί να εκφράζονται πάνω στην επιφάνεια των MDSCs και έτσι εξ αρχής η CXCL8 θεωρήθηκε ως βασικό παράγοντας χημειοταξίας για την στρατολόγησή τους στην περιοχή του όγκου^[30]. Μάλιστα ο βαθμός της δράσης τους φαίνεται να εξαρτάται και από την συγκέντρωση της εκφραζόμενης CXCL8, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και στα υπερκείμενα καλλιεργειών κυτταρικής σειράς ΗΤ-29 καρκίνων του παχέος εντέρου^[31]. Ακόμα στην ίδια μελέτη βρέθηκε και ότι μόνο τα MDSCs που προέρχονταν από ορό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν σε θέση να καταστείλουν την ανοσολογική αντίδραση μέσω των Τ-κυττάρων^[30].

Ένας διαφορετικός τρόπος με τον οποίο η CXCL8 μπορεί να καταστείλει την ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει τα σχετιζόμενα με τον όγκο ουδετερόφιλα (tumor-associated

Neutrophils,TAN). Η παρουσία των κυττάρων αυτών σε καρκινικούς ασθενείς είναι συνδεδεμένη με επιβαρυμένη πρόγνωση και εκτενή καρκινική μετάσταση στους περισσότερους τύπους καρκίνων^[31-39]. Η ομάδα αυτή των κυττάρων περιλαμβάνει δύο πληθυσμούς τους, τους N1 TAN και N2 TAN^[40]. Ο πρώτος φαίνεται να φέρει αντικαρκινικές ιδιότητες επάγοντας την αντιγονο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα^[40,41], ενώ ο δεύτερος να καταστέλλει την ανοσολογική απόκριση μέσω της έκκρισης της Αργινάσης 1 η οποία και έχει την δυνατότητα να αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα των T-κυττάρων παρακάμπτοντας με αυτό τον τρόπο την δυνατότητα αναγνώρισης των αντιγόνων και την στρατολόγηση των T-κυττάρων^[42-45]. Η CXCL8 έχει βρεθεί να έλκει τα TAN κύτταρα και μέσω του N2 πληθυσμού τους φαίνεται να ασκεί την κύρια ανοσοκατασταλτική της δράση^[46].

Η CXCL8 αναγνωρίζεται ως ένα από τα εκκρινόμενα μόρια από τα μαρκοφάγα και τα ιστιοκύτταρα που μπορούν να επηρεάσουν την αγγειογένεση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*^{[47-^{50]}. Την αγγειογενή της δράση όμως μπορεί να την ασκήσει και μέσω της επαγωγής εναλλακτικών αγγειογενών μονοπατιών και μηχανισμών όπως η IL-1^[51], TNF-α^[52], H₂O₂^[53], η υποξία^[54,55] και οξέωση^[56]. Αρχικά η αγγειογενή της δράση βρέθηκε στο ανθρώπινο βρογχογενές καρκίνωμα όπου η συγκέντρωση της ήταν αυξημένη σε σχέση με τον υγιή ιστό^[57,58]. Λειτουργικές μελέτες σε ομογενοποίηματα καρκινικών ιστών υπέδειξαν την επαγωγή *in vitro* της ενδοθηλιακής χημειοταξίας και *in vivo* της κερατινοκυτταρικής νεοαγγειογένεσης^[59]. Ειδικότερα η προσθήκη στις μελέτες αυτές μορίων εξουδετέρωσης της δράσης της CXCL8 οδήγησε στην άμεση παύση της αγγειογένεσης αυτής γεγονός που σηματοδότησε την CXCL8 σαν ένα πρωταρχικό μόριο της^[59]. Η έκφραση ακόμα του υποδοχέα της και στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως έχουμε αναφέρει είναι πιθανό να δίνει την δυνατότητα στην CXCL8 να επάγει την αγγειογένεση και μέσω της χημειοταξίας και μετακίνησης των ίδιων των ενδοθηλιακών κυττάρων^[52].} Σε πολλές μελέτες η CXCL8 έχει βρεθεί να ρυθμίζεται αυξητικά στους καρκίνους του παχέος εντέρου τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα περιβάλλοντα στρωματικά σε σχέση με τους υγιείς ιστούς^[60-62]. Οι CXCR1 και CXCR2 έχουν επίσης βρεθεί να εκφράζονται τόσο στα στρωματικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα αν και δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο προφίλ έκφρασης τους σε σχέση με τα διάφορα στάδια του καρκίνου, ιδιαίτερα σε σχέση με τα υγιή δείγματα^[61]. Ανάμεσα στα στρωματικά κύτταρα και ιδιαίτερα τα ενδοθηλιακά, τους ινοβλάστες και κάποια από τα εισχωρήσαντα λευκοκύτταρα (κυρίως ουδετερόφιλα) βρέθηκε έντονη ανοσοϊστοχημική χρώση για την IL-8 ενώ αντίθετα ο υποδοχέας CXCR2 βρέθηκε κυρίως σε καρκινικά σχηματιζόμενα μικροαγγεία^[60,61]. Η έκφραση της CXCL8 στα ενδοθηλιακά έχει βρεθεί να επάγεται από την IL-1α η οποία εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα στον καρκίνο του παχέος εντέρου^[63]. Επιπλέον τα στρωματικά κύτταρα που εκφράζουν την CXCL8 έχουν βρεθεί και στους μεταστατικούς καρκινικούς σχηματισμούς^[61]. Μία σημαντική και σαφής υπερέκφραση της CXCL8 έχει βρεθεί στα δείγματα των εντερικών αδενοκαρκινωμάτων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αδενώματα, στα οποία επίσης με την σειρά τους υπερεκφραζόταν σε σχέση με τον υγιή βλεννογόνο^[61,62]. Η αύξηση της συγκέντρωσης της CXCL8 έχει βρεθεί να συνδέεται και με την αύξηση των δυσπλαστικών βαθμών στα αδενώματα^[61]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η CXCL8 είναι σε μεγαλύτερο βαθμό αυξητικά ρυθμισμένη στις μεταστάσεις των εντερικών καρκίνων στο ήπαρ συγκρινόμενη με την αντίστοιχη στον αρχικό όγκο^[62]. Από την άλλη βέβαια έχουν υπάρξει και μελέτες που δεν έχουν βρει σαφή διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της CXCL8 είτε ανάμεσα στα αδενώματα και τον φυσιολογικό βλεννογόνο είτε ανάμεσα στις ηπατικές μεταστάσεις και τον αρχικό όγκο^[64]. Συνδεόμενα τα αποτελέσματα αυτά μαζί δείχνουν μία σημαντική σύνδεση των αυξημένων επιπέδων της CXCL8 με το μέγεθος του όγκου, το βάθος εισροής των ουδετερόφιλων εντός του όγκου και την δυνατότητα της ηπατικής μετάστασης, γεγονότα που και τα τρία συνδέονται με επιβαρυμένη πρόγνωση και μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης^[62,65].

Διάφορα στοιχεία έχουν περιγραφεί να είναι υπεύθυνα για την αυξημένη έκφραση της CXCL8 στα εντερικά αδενοκαρκινώματα συμπεριλαμβανομένων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1β και ο TNF-α, μικροοργανισμοί και η υποξία, ένα βασικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά την εξέλιξη του καρκίνου^[66-70]. Γι' αυτό παθογόνοι οργανισμοί και συγχρόνως η επαγόμενη φλεγμονώδης απόκριση, θεωρούνται κυρίαρχα στοιχεία στην αιτιολογία και την εξέλιξη όλων των γαστροεντερικών καρκίνων. Στην βάση αυτή της θεωρίας έχει ήδη βρεθεί σύνδεση ανάμεσα στα εντερικά αδενώματα και αδενοκαρκινώματα και αυξημένων επιπέδων μόλυνσης από τον οργανισμό *Streptococcus gallolyticus* σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, και επιπλέον η ενισχυόμενη δράση του καρκίνου σ αυτές τις περιπτώσεις προέρχεται από την επαγωγή της φλεγμονής και αντι-αποπτωτικούς και αγγειογενείς παράγοντες όπως ο NF-κB και η CXCL8 στα καρκινικά κύτταρα^[71]. Προφανώς και η ποσότητα της εκκρινόμενης CXCL8 από τα εντερικά αδενοκαρκινώματα σε απάντηση των προφλεγμονοδών κυτταροκινών διαφέρει από κυτταρική σειρά σε κυτταρική σειρά , διαφορές οι οποίες πιθανότατα εξηγούνται από το εύρος της διασποράς των υποδοχέων τους και την δύναμη του παραγόμενου από αυτούς σήματος^[70].

Η CXCL8 διαδραματίζει διάφορους ρόλους στην εξέλιξη του εντερικού αδενοκαρκινώματος. Πρώτα απ' όλα ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, αυξάνοντας την έκφραση των προσκολλημένων μορίων και συνεπώς επάγοντας την ενδοογκική μεταφορά τους^[68]. Ακόμα παρομοίως προς τις προφλεγμονώδης κυτταροκίνες, η CXCL8 μπορεί να αυξάνει την έκφραση του Διακυτταρικού προσκολλητικού μορίου 1(Intracellular adhesion Molecule 1, ICAM-1) στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου προκαλώντας την αυξημένη προσκόλληση ουδετερόφιλων προς τα κύτταρα αυτά^[68]. Με την ενεργοποίηση και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα καρκινικά κύτταρα, αγγειογενείς πρωτεΐνες και πρωτεάσες αποδιοργανωτικές για το περικυτταρικό περιβάλλον απελευθερώνονται επάγοντας την εξέλιξη του καρκίνου^[68]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί η σημασία της CXCL8 για

την μεσολάβηση της πρόσδεσης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία είναι κρίσιμη για την καρκινική μετάσταση^[72].

Η CXCL8 προωθεί όπως έχουμε πει την ανάπτυξη αγγειωδών σχηματισμών οι οποίες επιτρέπουν στον όγκο να αποκτήσει πρόσβαση σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξή και την μετάστασή του^[73-76]. Πειράματα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές εντερικών καρκινωμάτων όπως οι HCT116A, η HT-29 και η Caco-2 έδειξαν ότι η CXCL8 συνεισφέρει στην αγγειογενή δραστηριότητα που υπάρχει στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των κυτταρικών αλλά και στην χημειοτακτική ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων^[75].

Η CXCL8 δρα και σαν αυτοκρινής παράγοντας ενίσχυσης της έκφρασης του CXCR1 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου^[72,75-77]. Επιπλέον εκτός της άμεσης ενίσχυσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων , μπορεί να την ενισχύσει και έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης του EGFR^[78]. Αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα όσων αφορά την σύνδεση ανάμεσα στην συνεχή εμφάνιση των δύο υποδοχέων της, CXCR1 και CXR2, και την επιθετικότητα των εντερικών καρκίνων^[61,72]. Τα εντερικά κύτταρα έχουν βρεθεί να χάνουν την ικανότητα τους να εκφράζουν τον CXCR2 με τον μετασχηματισμό τους σε καρκινικά καθώς ο τελευταίος δεν έχει βρεθεί να εκφράζεται σε υψηλής διαφοροποίησης καρκινικές σειρές όπως η Caco-2 και η HT-29^[77]. Η CXCL8 έχει βρεθεί να έχει έναν πιθανό ρόλο και πάνω στην δυνατότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου καθώς ενισχύει την μετανάστευσή τους μέσω της αυξημένης μιτογενούς δραστηριότητας στα καρκινικά κύτταρα με υψηλή μεταστατική ικανότητα^[72,76,78]. Επιπροσθέτως η χημειοτακτική απόκριση των εντερικών καρκινικών κυττάρων στην CXCL8 έχει βρεθεί εν μέρει να σχετίζεται μόνο με τον CXCR1 υποδοχέα της^[77,79]. Αντίθετα έχει βρεθεί ότι η CXCL8 ενισχύει την πρόσδεση, μεταξύ των κυττάρων και του συνδετικού ιστού, μέσω την αυξητικής ρύθμισης των CD44 πρωτεϊνών , οι οποίες και αποτελούν τους υποδοχείς για διάφορα εξωκυτταρικά

συστατικά του υποστρώματος, στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου^[80]. Αυτό το γεγονός σημαίνει ότι στο πλαίσιο της θεραπείας μέσω της χρήσης μορίων που στοχεύουν το σύστημα των χημειοκινών είναι πιθανό να επηρεαστεί η κακοήθεια ακόμα και σε όγκους με μικρή μεταστατική προοπτική^[80]. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η υπερ-έκφραση της CXCL8 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αντίσταση έναντι της οξαλοπλατίνης, που χρησιμοποιείται σαν χημειοθεραπευτικό σκεύασμα^[76]. Η αυξημένη έκφραση της CXCL8 και στον ορό των ασθενών συνδέθηκε και αυτή με αυξημένη αντίσταση στην οξαλοπλατίνη, αντίσταση η οποία φαίνεται να προέρχεται εν μέρει και από την απορρύθμιση της έκφρασης του NF-κB. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υπερ-έκφραση και την χημειοαντίσταση, αναδεικνύοντας την σε ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Οι μικροδορυφορικές περιοχές του γενετικού υλικού είναι πολύ σύντομες περιοχές στο DNA που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και στις οποίες είναι συνήθη τα λάθη κατά την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Οι καρκίνοι αναλόγως των πολυμορφισμών στις περιοχές αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως με *ασταθείς* μικροδορυφορικές περιοχές είτε ως με *σταθερές* μικροδορυφορικές περιοχές. Οι τύποι με υψηλά ασταθείς περιοχές έχει βρεθεί να παρουσιάζουν μη φυσιολογικά πεπτίδια, τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν την Τ- κυτταροτοξική ανοσολογική απόκριση^[81]. Ως λογικό επακόλουθο και στον καρκίνο του παχέος εντέρου οι τύποι με υψηλά ασταθείς περιοχές έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους^[81]. Παρ όλη όμως την προ-καρκινική δράση της CXCL8, η τελευταία έχει βρεθεί να έχει αυξημένη έκφραση στον πρώτο τύπο καρκίνων^[81]. Αυτό είναι ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα καθώς η CXCL8 επάγει την έλξη των ουδετερόφιλων κυττάρων και δρα αγγειογενετικά. Παρ όλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις απόκριση της CXCL8 μπορεί να έχει αντι-καρκινικό αποτέλεσμα επάγοντας την νέκρωση και την καρκινική υποχώρηση^[82].

Ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης, κυρίως των κερατινοκυττάρων, είναι η συνεχής και σταθερή τους έκφραση της CXCL8^[83]. Επιπλέον τα φυσιολογικά εντερικά κύτταρα εντός των επιφανειακών κρυπτών του εντέρου επίσης παράγουν συνεχώς CXCL8^[84] και η παραγωγή της στα αρχικά και μεταστατικά καρκινικά κύτταρα μπορεί περαιτέρω να αυξηθεί από την παρουσία βακτηρίων, βακτηριακών τοξινών ή κάποιας φλεγμονώδους νόσου^[884-86]. Η έκφρασή της αυτή από τα επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την χημειοελκτική προσέλκυση των ουδετερόφιλων στις περιοχές της φλεγμονής και την νεοαγγειογένεση^[887,88]. Ακόμα στα επιθηλιακά κύτταρα που εκτός της CXCL8 εκφράζουν και τους υποδοχείς της, η ίδια μπορεί να λειτουργήσει μ έναν αυτοκρινή τρόπο στην αναγέννηση του επιθηλίου^[89].

Πειράματα σχεδιασμένα ώστε να μπλοκάρουν την επίδραση της CXCL8 στο επίπεδο του υποδοχέα της έχουν δώσει σύνθετα αποτελέσματα. Όταν τα κύτταρα του εντερικού καρκινώματος αναπτύσσονται σε μικρή πυκνότητα, οι ανταγωνιστές της CXCL8, δεν φαίνεται να έχουν καμία επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη. Αντίθετα σε υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων, στην επίδραση με τους ανταγωνιστές είναι έντονα κατασταλτική η δράση της CXCL8. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να έχουν να κάνουν με τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων τα οποία αυξάνονται όσο η καλλιέργεια πλησιάζει σε βαθμό κορεσμού^[75].

Η ανάλυση της παραγωγής της CXCL8 σε κυτταρικές σειρές ανθρωπίνου καρκίνου του παχέος εντέρου με διαφορετική μεταστατική ικανότητα, υπέδειξε διαφορετικά προφίλ έκφρασής της ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων^[90]. Οι σειρές με υψηλή μεταστατική ικανότητα (KM12L4) εξέφραζαν πολύ υψηλά επίπεδα, η μη μεταστατική σειρά (Caco-2) τα χαμηλότερα και οι υπόλοιπες με μικρότερη από την πρώτη μεταστατική ικανότητα εξέφραζαν ενδιάμεσα επίπεδα^[90]. Το ίδιο μοτίβο έκφρασης παρατηρήθηκε και για τους

υποδοχείς της CXCL8 τους CXCR1 και CXCR2. Σ όλες τις περιπτώσεις η προσθήκη στις καλλιέργειες εξωγενούς CXCL8 προήγαγε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^[90]. Επιπλέον οι διαφορετικές με βάση την μεταστατική τους ικανότητα κυτταρικές σειρές εκτός της διαφορετικής συνεχούς έκφρασης της CXCL8 φαίνονται να αντιδρούν και διαφορετικά απέναντι στην εξωγενή CXCL8. Η καταστολή της επίδρασης της CXCL8 με αντισώματα τόσο έναντί της, όσο και έναντι των υποδοχέων της ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, υποδεικνύοντας και τον ρόλο της ως ενός αυτοκρινούς αυξητικού παράγοντα που συνεισφέρει στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων του εντέρου^[90].

Η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα πλησίον του όγκου είναι ένα στοιχείο κλειδί για την καρκινική εισδοχή εντός τους και την μετάσταση εν τέλει^{[91-^{93]}. Η CXCL8 έχει ήδη βρεθεί από διάφορες έρευνες να αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των καρκινικών κυττάρων στα ενδοθηλιακά βοηθώντας τα στην πραγματοποίηση της ενδεχόμενης εισβολής τους^[94]. Και η διαδικασία αυτή όπως και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός βρέθηκε να αυξάνεται με την προσθήκη εξωγενούς CXCL8 και να αναστέλλεται με την χρήση των ανάλογων αντισωμάτων^[90]. Η ιδέα αυτή είναι που καθιστά την παραγωγή της CXCL8 υπεύθυνη για την μεταστατική ικανότητα και εξηγείται από τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της αναλόγως της μεταστατικής ικανότητας της κάθε κυτταρικής σειράς.}

Σημαντική φαίνεται να είναι και η σημασία της έκφρασης της CXCL8 στα χειρουργικά αφαιρεθέντα δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου καθώς και στην εμφάνιση συγχρόνων και μετάχρονων μεταστάσεων του όγκου στο ήπαρ^[95]. Ανεξαρτήτως του σταδίου του όγκου η CXCL8 εκφράζεται σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σχέση με περιοχές φλεγμονής και αδενώματα του εντέρου. Από αυτό προκύπτει ότι υπάρχει μία στενή συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη

ρύθμιση της CXCL8 και της ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, γεγονός που συμφωνεί με την επικρατούσα θεωρία ότι η φλεγμονή είναι ένα κρίσιμο συστατικό της καρκινικής ανάπτυξης. Χρόνια φλεγμονή μπορεί να εκκινήσει κυτταρικές διεργασίες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμες βλάβες του DNA και στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Ακόμα η υπερέκφραση της CXCL8 στα μεταστατικά εντερικά καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Liver resection of colorectal metastasis, CRLM) σε σύγκριση με τους αρχικούς εντερικούς όγκους, δείχνει σύνδεση μεταξύ της έκφρασης της και της ανάπτυξης μεταστάσεων από τον καρκίνο του παχέος εντέρου, συμπέρασμα που προκύπτει και από την μελέτη καθώς υπάρχει ισχυρή σύνδεση ανάμεσα στην έκφραση της CXCL8 και την ανάπτυξη CRLM^[95]. Ακόμα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CXCL8 στον ορό των ασθενών βρέθηκαν να συνδέονται με το κλινικό στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου^[95].

Τα ποσοστά της CXCL8 που έχουν μετρηθεί τόσο στον ορό όσο και στα καρκινικά ιστοτεμάχια παχέος εντέρου δεν έδειξαν διαφοροποίηση ανάμεσα σε κλινικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το φύλο, η ιστολογική διαβάθμιση και το στάδιο παρά μόνο οι ασθενείς με απομακρυσμένη μετάσταση είχαν σαφώς μεγαλύτερη έκφραση έναντι των υπολοίπων^[15].

Η υπερέκφραση της CXCL8 στα εντερικά καρκινικά κύτταρα βρέθηκε ακόμα να συνδέεται και με αντίσταση έναντι στην οξαλοπλατίνη, αντίσταση η οποία φαίνεται να προέρχεται εν μέρει και από την απορρύθμιση της έκφρασης του NF-κB. γεγονός που ενδεχομένως να την καθιστά CXCL8 ως ένα υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο.

Διάφορα μικρά μόρια ανταγωνιστές της CXCL8 και ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αρχίζουν πλέον να προκύπτουν από τις τρέχουσες μελέτες ως παράγοντες που μπορούν να μετριάσουν την δράση της CXCL8 και των υποδοχέων της και ως αποτέλεσμα να επηρεάσουν την εξέλιξη της νόσου, καθώς και να ενισχύσουν την απόκριση στις εφαρμοζόμενες χημειοθεραπείες.

3.5 CXCL4 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την CXCL4 χημειοκίνη, παρομοίως με τις άλλες CXC χημειοκίνες βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του 4^{ου} χρωμοσώματος στην θέση 4q13.1^[96]. Η αλληλουχία του DNA περιλαμβάνει μία 3' αμετάφραστη περιοχή, την αλληλουχία νουκλεοτιδίων για την αποκωδικοποίηση της πλήρης αλληλουχίας των αμινοξέων και μία 5' περιοχή η οποία περιλαμβάνει πληροφορίες για 18 επιπλέον αμινοξέα^[97]. Ένα αξιοπρόσεκτο στοιχείο για το γονίδιο της CXCL4 είναι ότι περιλαμβάνει 3 εξόνια και 2 ιντρόνια, μοτίβο που παρατηρείται στα γονίδια για τις CC χημειοκίνες και όχι στις CXC χημειοκίνες (4 εξόνια και 3 εσόνια)^[98].

Η πλήρης πρωτεΐνη της CXCL4 αποτελείται από 101 αμινοξέα, μέσα στα οποία βρίσκεται και μία υδροφοβική περιοχή η οποία λειτουργεί σαν σήμα για την διαμεμβρανική μεταφορά της^[97]. Σημαντικό ρόλο στην κατάσταση και την μορφή της τελικής πρωτεΐνης έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν οι συνθήκες pH και ιόντων που επικρατούν στο περικυτταρικό περιβάλλον^[99]. Μειώνοντας το pH η πρωτεΐνη συναντάται σε μονομερή μορφή ενώ αντίθετα, η αύξηση του τείνει να οδηγεί στον σχηματισμό τετραμερών πρωτεΐνης. Σταθεροποίηση της τετραμέρους της μορφής παρατηρείται και μέσω της αύξησης της ιοντικής δύναμης του περιβάλλοντος^[99].

Η τετραμερής μορφή της CXCL4 είναι η πρώτη χημειοκίνη που περιγράφηκε και μπορεί και προσδένει την ηπαρίνη όταν απελευθερώνεται από τα α-κοκκία^[100]. Η CXCL4 αναστέλλει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την αγγειογέννηση τόσο in vivo όσο και in vitro^[101,102]. Η CXCL4 μπορεί και προσδένεται στο αγγειακό ενδοθήλιο επιλεκτικά σε ιστούς όπου η αγγειογένεση βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη^[103,104].

Η CXCL4 συντίθεται από μεγακαρυοκύτταρα και αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων^[105]. Έχει βρεθεί όμως και εκτός των τελευταίων να αποθηκεύεται και στα μαστοκύτταρα^[106]. Η CXCL4 μπορεί και εκκρίνεται ακόμα από τα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα και τα μονοκύτταρα^[107]. Ο βιολογικό της ρόλος περιλαμβάνει 4 κύριες δράσεις^[108]:

- Αναστέλλει την αιμοποίηση. Η CXCL4 αναστέλλει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την ωρίμανση των πρόδρομων μεγακαρυοκυττάρων in vitro^[109,110]. Αυτό το επιτυγχάνει προωθώντας την άμεση πρόσδεση και αλληλεπίδραση των πρόγονων αυτών κυττάρων με τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic progenitor cell, HPC) καθώς και την αλληλεπίδραση τους με άλλες σηματοδοτικές χημειοκίνες όπως η CXCL8^[111].
- 2. Η CXCL4 συμμετέχει στην διαδικασία της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω μία αλληλουχίας συνδεδεμένων πρωτεολυτικών αντιδράσεων. Κατά την διάρκεια της πήξης τόσο οι επαγωγικές όσο και οι ανασταλτικές πηκτικές λειτουργίες αποδίδονται στην CXCL4 και την ρύθμιση της συγκέντρωσής της^[108]. Από την μία πλευρά η εν λόγω χημειοκίνη μπορεί να εμποδίσει την ηπαρίνη να συνθέσει το σύμπλεγμα με την αντιθρομβίνη, μειώνοντας την ηπαρινοεξαρτώμενη επιτάχυνση της απενεργοποίησης της θρομβίνης μέσω της αντιθρομβίνης ΙΙΙ^[112]. Επιπλέον έχει και την ιδιότητα να επάγει την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες, προκαλώντας την απενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και μέσω και αυτής της διαδικασίας την πήξη του αίματος^[113,114].Στα πλαίσια αυτή της δράσης της η CXCL4 μπορεί ακόμα να διεγείρει την παραγωγή της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, η οποία και απενεργοποιεί τους παράγοντες πήξεως Va και VIIIa, που οδηγεί σ ένα αντιπηκτικό τελικό αποτέλεσμα^[115].
- 3. Επάγει την ανοσοποιητική απόκριση του οργανισμού. Εκτός της χημειοταξίας των κοκκιοκυττάρων η CXCL4 διαδραματίζει και έναν ειδικό ρόλο ,στην ενεργοποίηση των τελευταίων, προκαλώντας την απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων από τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα^[116]. Η διαδικασία αυτή αυξάνει την πρόσδεση των ουδετερόφιλων και των ηωσινόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγοντας την

μετατροπή του Ιστοενεργοποιημένου του συνδετικού ιστού πεπτιδίου ΙΙ Connective tissue-activating peptide III, CTAP-III) στην CXCL7 οδηγώντας στην επαγωγή της φλεγμονής^[116-118]. Επάγει ακόμα την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε έναν ειδικού τύπου μακροφάγα και κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων^[119-121]. Επιπλέον στην ανοσολογική απόκριση μπορεί να ενεργοποιήσει τα φυσικά κύτταρα φονείς, ώστε να προχωρήσουν στην παραγωγή CXCL8 και να μεταναστεύσουν προς τις περιοχές της φλεγμονής^[122,123]. Τέλος στο πλαίσιο της ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης ή αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων πληθυσμών του^[124,125].

4. Αναστέλλει την αγγειογένεση, την οποία επιτυγχάνει μέσω της διακοπής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων^[126,127]. Η δράση της αυτή χαρακτηρίζεται ως από τις πλέον σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες της χημειοκίνης αυτής καθώς ως αποτέλεσμά της αναστέλλεται τόσο η ανάπτυξη του όγκου^[126], όσο και η δυνατότητα μετάστασής του^[128] και έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου όπου η χρήση ανασυνδυασμένης χημειοκίνης υπέδειξε τις δράσεις της αυτές^[127].

Την τελευταία αυτή δράση της την επιτυγχάνει μέσω 5 πιθανών μηχανισμών^[108]:

i) Αλληλεπίδραση με άλλους αγγειογενείς αυξητικούς παράγοντες. Τόσο η φυσιολογική όσο και η καρκινο-εξαρτώμενη αγγειογένεση ρυθμίζεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες ,όπως ο Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και ο Βασικός ινοβλαστικός παράγοντας (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) ^[129,130]. Η αλληλεπίδραση με τους παράγοντες αυτούς μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Στην άμεση δράση της η CXCL4 μπορεί και προσδένεται πάνω στους δύο αυτούς παράγοντες εμποδίζοντας τον διμερισμό τους και κατ' επέκταση αναστέλλοντας την βιολογική τους δράση^[130,131]. Στην έμμεση αλληλεπίδραση της η CXCL4 μπορεί και να αντικαθιστά τα μόρια αυτά στους υποδοχείς τους, εμποδίζοντας την ενδοκυτταρική μεταφορά της δράσης τους^[130,131].

- ii) Ενεργοποίηση του υποδοχέα CXCR3B στα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση αυτή μειώνει την δυνατότητα των κυττάρων να συνθέσουν DNA και άρα να πολλαπλασιαστούν ενώ παράλληλα μπορεί και ενεργοποιεί διάφορα αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια^[132].
- iii) Αλληλεπίδραση με τις ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τα βασικά μόρια προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Η CXCL4 δρα σαν ανταγωνιστής τους, οδηγώντας στην αναστολή της προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετακίνησης τους^[133].
- iv) Παρεμβολή στον κυτταρικό κύκλο. Η CXCL4 μπορεί να διακόψει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου είτε εμποδίζοντας την μετάβαση από το στάδιο G1 στο στάδιο S των κυττάρων, είτε αναστέλλοντας την σύνθεση του DNA στα κύτταρα τα οποία ήδη βρίσκονται στην φάση S^[134]. Τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν την ρύθμιση των επιπέδων της p21 πρωτεΐνης ως αιτία της δράσης της αυτής^[135].
- ν) Αλληλεπίδραση με διάφορους άλλους παράγοντες. Εκτός των αγγειογενών παραγόντων όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η CXCL4 μπορεί να αλληλοεπιδρά και με πλήθος άλλων παραγόντων για την αναστολή της αγγειογένεσης.
 Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι και άλλες χημειοκίνες όπως η CXCL8^[111].

Η CXCL4 έχει και μία ακόμα ισομορφή την CXCL4L1 η οποία όπως και κύρια χημειοκίνη εκφράζεται κυρίως στα αιμοπετάλια, αν και σε μικρότερες ποσότητες, αλλά επάγεται και στα μονοκύτταρα^[136]. Εν αντιθέσει με την CXCL4 η οποία δρα πάνω στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα^[137,138] η CXCL4L1 φέρει αδύναμη χημειοελκτική δράση για τα κύτταρα αυτά, αλλά εμφανίζεται να έχει πιο έντονη αγγειοστατική δράση^[136]. Η CXCL4L1 διαφέρει από την αρχική χημειοκίνη σε 3 μόλις αμινοξέα στο καρβοξυτελικό της άκρο και ονομάζεται εναλλακτικά PF-4var^[139,140].

Η ενδοκαρκινική έγχυση της CXCL4L1 σε μοντέλα ποντικών είχε πιο αποφασιστική επίδραση στην μείωση του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνων σε σχέση με την CXCL4, και επιπλέον εμπόδισε και την δημιουργία μεταστάσεων^[141].

Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου σε δείγματα βιοψιών ασθενών με αυτό τον τύπο καρκίνου, παρατηρήθηκε ισχυρή έκφραση της CXCL4L1 ενώ αντίθετα η χρώση σε ιστοτεμάχια οισοφαγικού αδενοκαρκινώματος εμφανίστηκε να είναι ιδιαίτερα αδύναμη^[142].

Η έκφραση της CXCL4 στα κύτταρα και τους ιστούς του καρκίνου του παχέος εντέρου αυξάνεται μετά την θεραπεία με φθοριοουρακίλη (5-FU)^[143]. Παραδόξως η CXCL4 έχει βρεθεί να επάγει την καρκινική ανάπτυξη *in vivo* σε γενετικά μετασχηματισμένα ποντίκια, αποτέλεσμα όμως που δεν προέκυπτε και από τις αντίστοιχες *in vitro* μετρήσεις στις καλλιέργειες^[143]. Η CXCL4 βρέθηκε επιπλέον να εμποδίζει την επανεμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου μετά την εφαρμογή θεραπείας με 5-FU^[143].

Η εφαρμογή ανασυνδυασμένης CXCL4 σε κλινικές δοκιμές σε μεταστατικούς καρκίνους του παχέος εντέρου δεν έχει δώσει ακόμα κλινικά ευρήματα από την χορήγηση της^[144]. Όμως αυτό που έχει προκύψει είναι ότι η CXCL4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της ανάπτυξης του καρκίνου, καθώς τα επίπεδα της στο πλάσμα του αίματος έχουν βρεθεί να μειώνονται κατά την εξέλιξη του καρκίνου^[145-148].

3.6 VEGF και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

Πρώτη φορά το 1983 περιεγράφηκε μία πρωτεΐνη μεγέθους 34-42 kDa η οποία προωθούσε την αγγειακή διαπερατότητα^[149]. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor,VEGF) περιεγράφηκε το 1989 πρώτη φορά ως μιτωτικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων^[150] και οι επόμενες μελέτες έδειξαν ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες ήταν στην πραγματικότητα η ίδια^[151,152]. Στην συνέχεια περιγράφηκαν και άλλες ομόλογες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν κοινά δομικά και λειτουργικά στοιχεία και οι οποίες είναι οι VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (Placental Growth Factor, PGF)^[153-156].

Το γονίδιο του VEGF βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στην θέση 6p21.3 και αποτελείται από 8 εξόνια, διαχωρισμένα από 7 ιντρόνια, τα οποία επιδέχονται διαφορετικού ανασυνδυασμού, συνθέτοντας τις διαφορετικές ισομορφές του περισσότερα για τις οποίες θα αναφέρουμε παρακάτω^[157]. Στον άνθρωπο το εν λόγω γονίδιο είναι υψηλά πολυμορφικό καθώς έχουν βρεθεί και περιγραφεί περισσότεροι από 15 πολυμορφισμοί του που αφορούν απλές αλλαγές νουκλεοτιδίων (Single Noucleotide Polymorphisms, SNPs)^[157,158] ενώ και η έκφραση του φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα στις διάφορες φυλετικές πληθυσμιακές ομάδες^[159].

Τα 8 εξόνια εξ αιτίας του εναλλακτικού ανασυνδυασμού που επιδέχονται σχηματίζουν την οικογένεια αυτή των παρόμοιων πρωτεϊνών του, και καθιστούν το εν λόγω γονίδιο εξαιρετικά πολυμορφικό. Πέρα όμως της διαδικασίας ανασυνδυασμού πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και στην 3' αμετάφραστη περιοχή του επίσης συνεισφέρουν στην πολυμορφικότητα του εν λόγω γονιδίου. Διάφορες μεταλλαγές απλών βάσεων στον υποκινητή και την 3' και 5' αμετάφραστη περιοχή του εντοπίζονται στο γονίδιο του^[160] όπως για παράδειγμα η μεταλλαγή -634G>C η οποία βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή έχει επίδραση στην αποτελεσματικότητα της πρωτεΐνης^[157] και η 936C>T η οποία βρίσκεται στην 3 αμετάφραστη περιοχή και επηρεάζει την έκφραση του VEGF στο πλάσμα και τους καρκινικούς ιστούς^[161-163].

Ο VEGF προσδένεται σε έναν από τους 3 υποδοχείς του, τον VEGFR1 ή εμβρυακή υπατική κινάση τυροσίνης-1 (Fetal Liver tyrosine Kinase-1, Flt-1) τον VEGFR2 ή KDR (Kinase Domain Region) και VEGFR3 ή εμβρυϊκή ηπατική κινάση τυροσίνης-4 (Fetal Liver tyrosine Kinase-4, Flt-4)^[155,164,165].Η σηματοδοτική δράση του VEGF εξαρτάται από τον υποδοχέα με τον οποίο θα αλληλοεπιδράσει. Οι VEGF-A, VEGF-B και PIGF προσδένονται κυρίως στον VEGFR1, οι VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E κυρίως στον VEGFR2 και οι VEGF-D και VEGF-D κυρίως στον VEGFR3^[166]. Όλες οι ανωτέρω αλληλεπιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την αγγειογένεση^[167].

Ως διαδικασία η αγγειογένεση είναι αυτή που ρυθμίζει την ανάπτυξη νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα, και η οποία είναι ζωτική για την εξέλιξη των συμπαγών καρκινικών σχηματισμών και την μετάσταση τους^[168-170]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF είναι βασικός ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας και τα κυριότερα μέλη του που συμμετέχουν στην διεργασία αυτή είναι τα: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και PGF^[168]. Ο VEGF-A είναι το μόριο κλειδί για την ρύθμιση της αγγειογένεσης και μάλιστα πιθανές ισομορφές του έχουν και αντιφατικά πολλές φορές αποτελέσματα. Κάτω από συνθήκες υποξίας, ο επαγωγικός παράγοντας υποξίας (Hypoxia-Inducible Factor α, HIFα) προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης υποξίας το οποίο βρίσκεται στο γονίδιο του VEGF-A, ρυθμίζοντας την μεταγραφή του^[171]. Ο παραγόμενος VEGF προσδένεται σε δύο υποδοχείς τους VEGFR1/FLT1 και VEGFR2/KDR, υποστηρίζοντας την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους, την μετακίνηση και την διαφοροποίησή τους^[167]. Η πλειοψηφία των συνδεόμενων με ασθένειες SNP πολυμορφισμών του γονιδίου βρίσκεται εντός της ρυθμιστικής του περιοχής^[160].

Πέραν της μιτωτικής του δράσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο VEGF δρα επίσης αναστέλλοντας την απόπτωση βοηθώντας περαιτέρω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, δράση η οποία πιθανώς να προέρχεται από την επαγωγή των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A-1^[152,172]. Εκτός όμως της έκφρασής του από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα ο VEGF έχει βρεθεί να εκκρίνεται και από τα σχετιζόμενα με τον καρκίνο μακροφάγα τα οποία ο όγκος στρατολογεί για να μπορέσει να βελτιώσει τις δυνατότητες ανάπτυξής του^[173].

Όσον αφορά την βιολογική του δράση ο VEGF είναι ο εκτενέστερα μελετημένος αγγειογενής παράγοντας. Αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και είναι η πιο ισχυρή, με ευθεία δράση γνωστή αγγειογενής πρωτεΐνη^[174-178]. Κανονικά ο VEGF εκφράζεται ασθενώς μόνο σε πλήθος ιστών, τόσο ανθρώπινων όσο και ζώων, ενώ αντίθετα υψηλά επίπεδα έκφρασής του ανιχνεύονται στις περιοχές όπου λαμβάνει χώρα η αγγειογένεση, είτε φυσιολογικά όπως είναι οι εμβρυικοί ιστοί και ο πλακούντας, είτε παθολογικά όπως ο καρκίνος, οι χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι κ.α.^[177]. Ακόμα τόσο ο VEGF όσο και οι υποδοχείς του, εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ανθρώπινα μεταστατικά εντερικά καρκινώματα αλλά και στα σχετιζόμενα με τους όγκους αυτούς ενδοθηλιακά κύτταρα^[177]. Συνεπώς η έκφραση του VEGF αναγνωρίζεται ως ένας επιφανής αγγειογενής παράγοντας στους καρκίνους αυτούς και είναι πιθανό ο υπολογισμός της έκφρασής του να μπορεί να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο πρόβλεψης τυχών μεταστατάσεών τους^[177]. Είναι γεγονός ότι η έκφραση του VEGF έχει βρεθεί να είναι υψηλότερη σε ασθενείς με μεταστατικούς καρκίνους σε σχέση με τους μη μεταστατικός καρκίνους του συνδέονται με προχωρημένο καρκινικό στάδιο και αρνητική πρόγνωση^[179,180,181].

Ένας έμμεσος τρόπος υπολογισμού της πυκνότητας των μικροαγγειακών σχηματισμών και της ενεργότητας της αγγειογένεσης εν γένει είναι μέσω της ποσοτικοποίησης των αγγειογενών παραγόντων σε συμπαγείς κακοήθεις όγκους^[174,182]. Πολυάριθμες μελέτες

έχουν αποδείξει ότι ή υπερέκφραση του VEGF συνδέεται με υψηλή μικροαγγειακή πυκνότητα και κατ' επέκταση με προχωρημένο καρκινικό στάδιο ή υψηλή καρκινική ικανότητα εισβολής σε πλήθος διαφορετικών τύπων καρκίνων^[177,180,182,183].

Όσον αφορά τον καρκίνο γενικότερα οι μεταλλαγές στον VEGF φέρονται να σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης συμπαγών όγκων, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος των πνευμόνων(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του προστάτη^[163]. Η απουσία ομοφωνίας όμως στα αποτελέσματα είναι πιθανόν να προέρχεται από παράγοντες όπως η εθνικότητα, ο πληθυσμός, ο τύπος του καρκίνου, η ανεπάρκεια του δείγματος και η μέθοδος ανάλυσης των αποτελεσμάτων^[163]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού είναι ότι το αλληλόμορφο -634C είχε βρεθεί να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης για NSCLC^[163] και καρκίνο του προστάτη^[184,185] καθώς και απροσδόκητα με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου^[186,187]. Εναλλακτικά η αντιφατικότητα των αποτελεσμάτων αυτών θα μπορούσε να προέρχεται και από την πιθανή παράλληλη παρουσία και άλλων αγνώστων μεταλλαγών τόσο στον VEGF όσο και σε άλλους αγγειογενείς παράγοντες.

Οι VEGF-C και VEGF-D όπως και τα υπόλοιπα μέλη της πρωτεϊνικής τους ομάδας είναι γλυκοπρωτεΐνες, δομικά όμοιες και οι οποίες μοιράζονται ομόλογες περιοχές αμινοξικής αλληλουχίας και με την VEGF-A. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου αυξημένη έκφραση του VEGF-C έχει βρεθεί να συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες^[188]. Ακόμα αυξημένα επίπεδα του τελευταίου στον ορό έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, των πνευμόνων και του τραχήλου και εμφανίζεται να είναι και ένας ανεξάρτητος δείκτης για την πρώιμη διάγνωση μεταστάσεων^[189]. Αυξημένη έκφραση στους λεμφαδένες και επιβαρυμένη της πρόγνωση. Σύνδεση μεταξύ της έκφρασής του VEGF-D στον

αρχικό όγκο και την μετάσταση στους λεμφαδένες είναι ακόμα υπό συζήτηση με τα αποτελέσματα ωστόσο να είναι μέχρι στιγμής αντιφατικά^[190].

Όπως αναφέραμε ο εκκρινόμενος VEGF προσδένεται σε έναν από τους 3 υποδοχείς του: VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 οι οποίοι εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου ο VEGFR2 φαίνεται να είναι κυρίως αυτός που επάγει την αγγειογένεση προωθώντας την ανάπτυξη του καρκίνου, ενώ δεν είναι ακόμα απολύτως σαφής ο ρόλος και η λειτουργία του VEGFR1. Ο τελευταίος όμως φαίνεται επίσης να εκφράζεται στα κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου και να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι βκατενίνης/Wnt μέσω του οποίου επάγει την ανάπτυξη του όγκου^[191], το οποίο μονοπάτι αυτό με την σειρά του φαίνεται επίσης να ρυθμίζει την έκφραση του VEGF^[192]. Η σύνδεση VEGF/VEGFR2 μπορεί στους καρκίνους του παχέος εντέρου ακόμα να οδηγήσει στην φωσφοριλίωση της STAT3 και την ενίσχυση της καρκινικής ανάπτυξης^[193].

Η ανάπτυξη του όγκου, η διασπορά του και η μετάσταση του είναι 3 διαδικασίες, οι οποίες και οι τρεις είναι άμεσα συνδεδεμένες με την αγγειογένεση. Ο VEGF είναι ο επιφανέστερος αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στην αγγειογένεση. Η ισομορφή του, VEGF-A είναι αυτή με την εντονότερη δραστικότητα στην επαγωγή της αγγειογένεσης σε πλήθος διαφορετικών κακοηθειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Ένας μεγάλος αριθμός προ- κλινικών και κλινικών δοκιμών συνδέει την υπερέκφραση αυτή της ισομορφής του, με τον σχηματισμό μεταστάσεων και την επιβαρυμένη πρόγνωση στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Όλες οι διαφορετικές ισομορφές του VEGF που έχουν περιγραφεί προέρχονται από εναλλακτικό ανασυνδυασμό ενός αρχικού και μόνου γονιδίου. Πρόσφατα περιγράφηκε ότι και η έκφραση της ισομορφής VEGF-C συνδέεται σε σημαντικό βαθμό με την νεοαγγειογένεση και την μετάσταση στους καρκίνους του παχέος εντέρου, παραμένει όμως αδιευκρίνιστο κάτω από ποια αναλογία και αιτιολογία οι επί μέρους όγκοι εκφράζουν αυτές τις ισομορφές^[194]. Ο VEGF έχει βρεθεί να είναι ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης στις περιπτώσεις καρκίνων προχωρημένου σταδίου, δεδομένου ότι οι υψηλές του συγκεντρώσεις είναι συνδεδεμένες με μικρότερη συχνότητα απόκρισης^[195] στις θεραπείες και επιβαρυμένη πρόγνωση^[196,197], οι μεταλλαγές στον VEGF θα μπορούσαν να συμμετέχουν σημαντικά στον καθορισμό του ρίσκου, της πρόγνωσης και της επιβίωσης των ασθενών αυτών. Παρ ότι όμως έχουν βρεθεί ήδη διάφορες εναλλακτικές μορφές του και επιπλέον μεταλλαγές στο γονίδιό του^[198], στις περισσότερες περιπτώσεις η βιολογική και κλινική τους σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη^[198]. Σε έρευνα δείγματος 445 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου βρέθηκε ότι οι ασθενείς με γονότυπο -634GC ή -634CC βρέθηκαν να έχουν καλύτερη επιβίωση σε σχέση με του -634GG. Στο ίδιο δείγμα οι ασθενείς με γονότυπο 936CT και TT βρέθηκαν να εμφανίζουν χειρότερη επιβίωση σε σχέση με τους έχοντες CC γονότυπο^[199]. Αντίθετα οι μεταλλαγές 936C>T, -2578C>A και 634G>C δεν βρέθηκαν να σχετίζονται με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό βαθμό και το στάδιο του καρκίνου^[200].

Ο -643G>C ακόμα στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου όπως έχουμε ήδη αναφέρει και ο -1498C>T στην 3' αμετάφραστη περιοχή του έχουν βρεθεί να συνδέονται και με διαφοροποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου, και συγκεκριμένα ο πρώτος με υψηλή έκφραση επηρεάζοντας μέσω αυτής και την ενεργότητα της πρωτεΐνης^[157,201,202]. Η συμμετοχή των πολυμορφισμών του στην πρόγνωση για την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου δεν έχει μπορέσει να επιβεβαιωθεί πειραματικά ακόμα καθώς τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι όπως είδαμε αντιφατικά και αρκετές φορές και συγκρουόμενα μεταξύ τους^[199,200].

Η 936Τ έχει επίσης συνδεθεί σε διαφορετικές μελέτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης^[203], προχωρημένο στάδιο^[186], απομακρυσμένη μετάσταση^[186], μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης^[199] και πιθανότερη υποτροπή^[12] ενώ δεν φαίνεται να συνδέεται με το μέγεθος του όγκου και τον βαθμό^[200,204] χωρίς όπως έχουμε

όμως αναφέρει να αρκούν τα αποτελέσματα αυτά για την διαγνωστική αξιοποίησή της. Ο πολυμορφισμός τέλος -2578C>Α δεν έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, την επιβίωση και τον βαθμό και το μέγεθος του όγκου αν και σε έρευνα σε Κορεατικό πληθυσμό βρέθηκε να έχει προστατευτικό ρόλο^[205].

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως από όλα τα μόρια της οικογένειας του VEGF αυτά που κυρίως εκφράζονται στους μεταστατικούς καρκίνους του παχέος εντέρου είναι τα πρωτεϊνικά ισομερή του VEGF-A και οι υποδοχείς του. Το γονίδιο του VEGF-A φέρει όπως έχουμε αναφέρει, πολλαπλά εξόνια γεγονός που του επιτρέπει να εκφράζει μία ποικιλία πρωτεϊνών βάσει του εναλλακτικού του ανασυνδυασμού. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 12 ισομορφές του με εντυπωσιακότερο εύρημα, ότι τρεις εξ αυτών έχουν αντι-αγγειογενείς ιδιότητες, γεγονός που αιτιολογεί την προηγούμενη αναφορά σχετικά με τις αντικρουόμενες δράσεις τους. Οι ισομορφές αυτές του VEGF-A είναι οι VEGF111, VEGF121, VEGF121b, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, VEGF189b και VEGF206 στην ονοματολογία των οποίων ο αριθμός δηλώνει το σύνολο των αμινοξέων της αλυσίδας και το γράμμα b τις πρωτεΐνες εκείνες με την αντι-αγγειογενή δράση^[197].

Ο VEGF-Α υπερεκφράζεται συνήθως από μία μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων και αυτή του η υπερέκφραση συνδέεται με την εξέλιξη, την εισβολή, την μετάσταση, την μικροαγγειακή πυκνότητα και την επιβαρυμένη πρόγνωση και επιβίωση^[206]. Στους καρκίνους του παχέος εντέρου η ισομορφή αυτή είναι που σε συντριπτικό βαθμό υπερεκφράζεται και επάγει την αγγειογένεση μέσω της ενίσχυσης της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, της επιβίωσης, της μετακίνησης και του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων^[175,207]. Στα πρώιμα καρκινικά στάδια όπως είναι ο σχηματισμός του αδενώματος, οι δύο ισομορφές που έχουν βρεθεί να συμμετέχουν κυρίως είναι οι VEGF-A και VEGF-B^[208,209].

Ήδη από το 2004 έχει καταγραφεί ότι τα προ- χειρουργικά επίπεδα του VEGF στον ορό των ασθενών μπορούν να είναι χρήσιμα για την πρόβλεψη της εξέλιξης των ασθενών με καρκίνο

του παχέος εντέρου μετεγχειρητικά ^[177]. Αντιστρόφως αυξημένα επίπεδα του στον ορό μετεγχειρητικά, μπορούν να είναι ενδείξεις σημαντικής υπολειπόμενης νόσου ακόμα και αν μακροσκοπικά δεν προκύπτει κάτι τέτοιο^[177,182].

Σε άλλες μελέτες έχει γίνει εμφανές ότι ο VEGF μπορεί να είναι ένας ακόμα χρήσιμος βιοδείκτης πρόγνωσης, καθώς είναι ισχυρά συνδεδεμένος με την αγγειο-λεμφική εισβολή του όγκου και του βάθους στην οποία την επιτυγχάνει, χωρίς όμως να μπορεί να λειτουργήσει ως τέτοιος απουσία άλλων προγνωστικών παραγόντων^[175,210].

Αν και πλήθος δημοσιεύσεων καταπιάνονται με την μέτρηση του κυκλοφορούντα στον ορό VEGF για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς, η σχέση ανάμεσα στον παραγόμενο από τους ιστούς VEGF και της συγκέντρωσης στο αίμα παραμένει εν πολλοίς ασαφής^[211]. Μερικές από τις αντιφάσεις σχετικά με την κλινική αξία των μετρήσεων του στον ορό έχουν να κάνουν με το ότι ο ίδιος συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα αιμοπετάλια και έτσι δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν οι υψηλές του συγκεντρώσεις στο αίμα οφείλονται αποκλειστικά στον όγκο ή και σε άλλες πιθανές πηγές όπως τα ίδια τα κύτταρα του αίματος^[182]. Η υψηλή έκφραση του VEGF έχει συνδεθεί επίσης και με την απόκριση προχειρουργικά στην ακτινοβολία σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου^[212].

Ο VEGF-Α είναι όπως έχουμε αναφέρει ο επικρατέστερος αγγειογενής αυξητικός παράγοντας στον καρκίνο του παχέος εντέρου και η παρουσία του είναι συνδεδεμένη με τον σχηματισμό μεταστάσεων και την επιβαρυμένη πρόγνωση^[213]. Εξαιτίας αυτού του ρόλου του έχουν αναπτυχθεί οι αντι-αγγειογενείς θεραπείες που στοχεύουν τον υποδοχέα του, που δρα σαν κινάση τυροσίνης, καταστέλλοντας εν τέλει την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των ηπατικών μεταστάσεων του καρκίνου. Η αντι-VEGF θεραπεία ακόμα αυξάνει σημαντικά την απόπτωση στα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα, υποδεικνύοντας πέραν των άλλων τον VEGF και σαν ένα σημαντικό παράγοντα επιβίωσης για τον όγκο και το γειτονικό του ενδοθήλιο^[213]. Το μονοκλονικό αντίσωμα μπεβασιζουμάμπη είναι ο πρώτος

αντι-αγγειογενής παράγοντας που πήρε έγκριση για την χρήση σε θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, βασιζόμενο τόσο στο υψηλό ποσοστό απόκρισης όσο και στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης που ακολούθησε την χρήση του^[214]. Βασιζόμενες στην αναστολή της δράσης του VEGF, τρεις ακόμα αντι-αγγειογενείς θεραπείες έχουν εγκριθεί: η αφλιμπερσέπτη (aflibercept) και ραμουσιρουμάμπη (ramucirumab) είναι βιολογικά στοιχεία που δρουν ενάντια στις εξωκυτταρικές περιοχές του υποδοχέα του VEGF, ενώ η ρεγκοραφενίμπι (regorafenib) είναι βιοχημικό στοιχείο που δρα σαν αναστολέας της τυροσινικής κινάσης VEGFR2-TIE2. Παρ όλα αυτά οι προβλέψεις επιβίωσης παραμένουν μετριοπαθείς και μόνο το 10% των ασθενών έχουν προσδόκιμο μεγαλύτερο των 5 χρόνων^[168]. Ένα ακόμα πρόβλημα σχετικά με την εφαρμογή της θεραπείας έίναι η απουσία αξιόπιστου βιοδείκτη που να επιτρέπει στους κλινικούς ιατρούς την επιλογή του πληθυσμού που θα μπορούσε να επωφεληθεί από την εφαρμογή της. Δυστυχώς όμως δεν έχει καταστεί ακόμα δυνατή η εύρεση μοριακών δεικτών που θα μπορούσαν να υποδείξουν τις περιπτώσεις κατά τις οποίες μπορεί να ωφεληθεί ο ασθενής από την εφαρμογή της θεραπείας αυτής^[215].

Την τελευταία δεκαετία προ- κλινικές και κλινικές μελέτες έχουν υποδείξει και διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στον τρόπο με τον οποίο θα μπορούσε να κατασταλεί η αγγειογένεση^[216-219]. Ήδη ένα μικρό βιολογικό μόριο που δρα σαν αναστολέας της κινάσης τυροσίνης και υποδοχέα του VEGF, του Flk-1/KDR (SU5416) βρέθηκε επίσης να αναστέλλει την καρκινική αγγειογένεση και την μετάσταση σ ένα μοντέλο καρκίνου του παχέος εντέρου^[213]. Ακόμα το μόριο αυτό όπως και το αντίστοιχο SU6668 αναστέλλει την μετάσταση, τον σχηματισμό αγγείων ενώ παράλληλα αυξάνει την απόπτωση των καρκινικών και ενδοθηλιακών κυττάρων^[213]. Από τα αποτελέσματα αυτά έγινε εμφανές ότι η στόχευση του συστήματος VEGF και του υποδοχέα του, είναι μία λογική επιλογή στην καταστολή της καρκινικής ανάπτυξης και της επιμήκυνσης του προσδόκιμου ζωής^[213]. Με την εφαρμογή των αντι-αγγειογενών θεραπειών βελτιώνεται ραγδαία η πρόγνωση για την εξέλιξη του καρκίνου^[182,219-222]. Η μέση επιβίωση για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου με εφαρμογή των ενδεδειγμένων θεραπειών είναι 6 μήνες. Η εφαρμοζόμενη χημειοθεραπεία με Φθοριοουρακίλη (Fluorouracil,FU) σε συνδυασμό με Ιρινοτεκάνη και Οξαλοπλατίνη μπορεί όμως να αυξήσει το προσδόκιμο επιβίωσης στους 20 μήνες^[223]. Στις μέρες μας η αντί-αγγειογενής θεραπεία μπορεί να επιμηκύνει τον χρόνο επιβίωσης κατά μερικούς μήνες σε αρκετές περιπτώσεις όχι όμως στο σύνολό τους χωρίς να υπάρχουν δεδομένα μέχρι στιγμής που να αιτιολογούν το γεγονός αυτό^[224]. Οι κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι μπορεί μέχρι και το 94% των μεταστατικών καρκινωμάτων να έχουν ανταπόκριση στην θεραπεία αυτή^[225].

Η μπεβασιζουμάμπη (Bevacizumab, BV) όπως έχουμε αναφέρει είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF με αντί-αγγειογενείς ιδιότητες και σε διάφορες κλινικές δοκιμές προωθείται η χρήση της σαν πρώτης γραμμής θεραπεία απέναντι στους μεταστατικούς καρκίνους του παχέος εντέρου^[226]. Η BV χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η Οξαλοπλατίνη, η Ιρινοτεκάνη, η Λευκοβορίνη και η 5-Φθοριοουρακίλη (5-FU) για την θεραπεία ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου^[226,227]. Πλέον της άμεσης αντί-αγγειογενούς της δράσης, η BV μπορεί να βελτιώσει και την εφαρμογή της χημειοθεραπείας στην περιοχή του όγκου απ' ευθείας αλλάζοντας τον προσανατολισμό των αγγείων εντός του όγκου και μειώνοντας την αυξημένη εντός τους πίεση^[215]. Όταν συνδυάζεται με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα συνδέεται με σημαντική βελτίωση σε σχέση με την μεμονωμένη εφαρμογή της χημειοθεραπείας τόσο στην αποτελεσματικότητα για την προσδοκώμενη επιβίωση όσο και για την ανταπόκριση στους καρκίνους αυτούς σε μερικές δευτερεύουσες χημειοθεραπείς^[228].

3.7 CXCL6 και Καρκίνος του Παχέος Εντέρου

Η CXCL6 είναι μία χημειοτακτική για τα κοκκιοκύτταρα χημειοκίνη η οποία για πρώτη φορά εντοπίστηκε σε ανθρώπινα οστεοκαρκινώματα παράλληλα με την CXCL8^[229,230] και απομονώθηκε πρώτη φόρα από κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος MG-63^[231]. Είναι μία ELR⁺ χημεικοκίνη η οποία παρομοίως προς την CXCL8 δρα χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα και φέρει αγγειογενετικές ιδιότητες. Η ανθρώπινη CXCL6 μοιράζεται κατά 31% όμοια αμινοξική ακολουθία με την CXCL8 και κατά 77% με την CXCL5^[231]. Έχουν εντοπιστεί 4 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης από κύτταρα του οστεοκαρκινώματος: η ώριμη μορφή με μέγεθος 75 αμινοξέων και 3 ακόμα από τις οποίες απουσιάζουν 2, 5 και 8 αμινοξέα από αμινοτελικό της άκρο NH₂^[231]. Και οι 4 αυτές ισομορφές κατέχουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες στα κοκκιοκύτταρα. Ωστόσο σε σχέση με την CXCL8 είναι λιγότερο πιθανό, αν και ομοίως αποτελεσματικό, να έλξουν τα κοκκιοκύτταρα και να επάγουν την έκκριση των διαφόρων πρωτεασών όπως η Μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9) από τα κοκκία τους^[231,232]. Η ανίχνευση αυξημένων ποσοτήτων CXCL6 στον καρκίνο υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της στην ανάπτυξή του^[233]. Ειδικότερα η υπερέκφραση της CXCL6 έχει βρεθεί να επάγει την αύξηση του καρκινικού όγκου ως αποτέλεσμα της αγγειογένεσης και της χημειοτακτικής έλξης των ουδετερόφιλων^[233].

Εκτός των καρκινικών κυττάρων η CXCL6 έχει βρεθεί να εκφράζεται και σε φυσιολογικά μη μετασχηματισμένα κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά, οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά^[234-238]. Μάλιστα τα πρώτα χαρακτηρίζονται ως καλοί παραγωγοί της^[234].

Οι υποδοχείς της είναι παρομοίως με την CXCL8 οι CXCR1 και CXCR2^[232,239] και είναι υπεύθυνοι για την χημειοελκτική της δράση για τα ουδετερόφιλα, άλλα μόνο ο δεύτερος είναι υπεύθυνος και για τις αγγειογενείς της ιδιότητες^[240]. Εκτός των δύο CXCR υποδοχέων που έχουμε ήδη αναφέρει η CXCL6 μπορεί και αναγνωρίζεται επίσης και από τον Υποδοχέα αντιγόνων Duffy για χημειοκίνες(Duffy Antigen Receptor for chemokines, DARC) που

βρίσκεται πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια^[241]. Η πρόσδεση της CXCL6 στους υποδοχείς της επάγει την χημειοταξία των ουδετερόφιλων και την αγγειογένεση^[10,239,242]. Εν τούτοις όμως η δυνατότητα πρόσδεσης της CXCL6 είναι ισχυρότερη στον CXCR2 σε σχέση με τον CXCR1 γεγονός που πιθανόν να δείχνει ότι ο πρώτος μπορεί να έλξει χημειοτακτικά τα ουδετρόφιλα και από απομακρυσμένες από την περιοχή της φλεγμονής περιοχές, ενώ ο δεύτερος μάλλον χρησιμοποιείται τοπικά όταν περικυτταρικά βρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις της^[232].

Η χημειοκίνη αυτή σε διάφορες μελέτες έχει βρεθεί να διαδραματίζει ρόλο σε πλήθος ανθρωπίνων καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και στα μεσεγχυματικά κύτταρα [234]. Τόσο in vivo όσο και in vitro η CXCL6 έχει βρεθεί να φέρει αγγειογενής ιδιότητες, καθώς είναι χημειοτακτική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει την νεοαγγειογένεση^[73,233]. Οι αγγειογενής της ιδιότητες σχετίζονται με την έλξη των σχετιζόμενων με τον καρκίνο ουδετερόφιλων καθώς και με την ενδοογκική έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9)^[233]. Μάλιστα η έκφραση της τελευταίας ως απόκριση της απελευθέρωσης των κοκκίων των ουδετερόφιλων, προωθεί την εισβολή του καρκίνου σε άλλους ιστούς μέσω της αποδιάταξης του εξωκυτταρικού περιβλήματος και την μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων προς την κυκλοφορία του αίματος^[243]. Η έκφραση της CXCL6 από ενδοθηλιακά κύτταρα εντός των γαστρικών καρκίνων έχει βρεθεί να σχετίζεται με την νεοαγγειογένεση^[243]. Η CXCL6 ακόμα ρυθμίζεται αυξητικά από την IL-1β και την υποξία σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές του πνεύμονα^[234,244]. Επειδή οι καρκινικές αυτές κυτταρικές σειρές μπορούν επίσης να εκφράσουν του δύο υποδοχείς και σαν απόκριση στην CXCL6 να αυξήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι πιθανό η CXCL6 να δρα και σαν ένας αυτοκρινής μιτογόνος παράγοντας στην ανάπτυξη και την μετάσταση του καρκίνου^[244].

Σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου οι έκφραση του mRNA για την CXCL6 δεν έδωσε καμία αύξηση του στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και στις μετρήσεις της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους ιστών^[245].

Σε μελέτη αδρανοποίησης της CXCL6 σε κύτταρα μελανώματος ποντικών τα αποτελέσματα της επίδρασης έγιναν εμφανή σε πολύ μεταγενέστερο στάδιο (80 ημερών) δείχνοντας ότι ο περιορισμός της ανάπτυξης του όγκου μέσω αυτή της διαδικασίας είναι μία πολύ αργή διαδικασία^[246,247].

Η CXCL6 έχει βρεθεί να εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ασθενείς με γαστρεντερολογικούς καρκίνους. Η έκφραση της συνδέεται με την εισχώρηση στον όγκο των λευκοκυττάρων και την έκφραση της MMP-9, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της CXCL6 εντός του όγκου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να συνεισφέρει στην χημειοταξία των τελευταίων και την εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων έλκοντας και ενεργοποιώντας ουδετερόφιλα^[248].

3.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Vandercappellen J, Van DJ, Struyf S (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett 267:226–244
- Strieter RM, Kunkel SL, Elner VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, Elner SG (1992) Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. Am J Pathol 141(6): 1279–1284
- 3. Hu DE, Hori Y, Fan TP (1993) Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. Inflammation 17(2): 135–143
- 4. D.J. Brat, A.C. Bellail, E.G. Van Meir, The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis, Neuro Oncol. 7 (2005) 122–133.
- W.S. Modi, M. Dean, H.N. Seuanez, N. Mukaida, K. Matsushima, S.J. O'Brien, Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily, Hum. Genet. 84 (1990) 185–187
- 6. N.J. Skelton, C. Quan, D. Reilly, H. Lowman, Structure of a CXC chemokinereceptor fragment in complex with interleukin-8, Structure 7 (1999) 157–168.
- 7. A. Chuntharapai, J. Lee, C.A. Hebert, K.J. Kim, Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes, J. Immunol. 153 (1994) 5682–5688.
- 8. S.H. Park, B.B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H.J. Nothnagel, M. Chu, et al., Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers, Nature 491 (2012) 779–783.

- Y. Matsuo, M. Raimondo, T.A. Woodward, M.B. Wallace, K.R. Gill, Z. Tong, et al., CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic
- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem 2003;278:8508–15.c cancer, Int. J. Cancer 125 (2009) 1027–1037
- 11. Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM, et al. Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:2251–7
- Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. Ann Oncol 2008;19:1734–41.
- Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Felekouras E, Nikiteas N, Karakitsos P, Panoussopoulos D, et al. Relation between common polymorphisms in genes related to inflammatory response and colorectal cancer. World J Gastroenterol 2006;12:5037–43.
- Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, Husain H, Gordon MA, Nagashima F, Chang HM, Lenz HJ. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. Ann Oncol 2008;19:1734–41. [PubMed: 18550579]
- 15. Jan Dimberg & Karin Ström & Sture Löfgren & Niklas Zar & Mikael Lindh & Andreas Matusseκ. DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas. Int J Colorectal Dis (2012) 27:709–714
- 16. Baier PK, Eggstein S, Wolff-Vorbeck G, Baumgartner U, Hopt UT (2005) Chemokines in human colorectal cancer. Anticancer Res 25:3581–3584
- C. Knall, G.S. Worthen, G.L. Johnson, Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 3052–3057.
- G.Z. Cheng, S. Park, S. Shu, L. He, W. Kong, W. Zhang, et al., Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery, Curr. Cancer Drug Targets 8 (2008) 2–6.
- 19. C.F. MacManus, J. Pettigrew, A. Seaton, C. Wilson, P.J. Maxwell, S. Berlingeri, et al., Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgenindependent prostate cancer cells, Mol. Cancer Res. 5 (2007) 737–748
- 20. G. Venkatakrishnan, R. Salgia, J.E. Groopman, Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells, J. Biol. Chem. 275 (2000) 6868–6875.
- F. Luppi, A.M. Longo, W.I. de Boer, K.F. Rabe, P.S. Hiemstra, Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation, Lung Cancer 56 (2007) 25–33
- 22. C. Knall, S. Young, J.A. Nick, A.M. Buhl, G.S. Worthen, G.L. Johnson, Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils, J. Biol. Chem. 271 (1996) 2832–2838.
- K. Lang, B. Niggemann, K.S. Zanker, F. Entschladen, Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop, Int. J. Cancer 99 (2002) 673–680.
- 24. S. Kopetz, A.N. Shah, G.E. Gallick, Src continues aging: current and future clinical directions, Clin Cancer Res. 13 (2007) 7232–7236.

- 25. P.M. Siesser, S.K. Hanks, The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer, Clin. Cancer Res. 12 (2006) 3233–3237.
- 26. A.S. Pak, M.A. Wright, J.P. Matthews, S.L. Collins, G.J. Petruzzelli, M.R. Young, Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Clin. Cancer Res. 1 (1995) 95–103.
- P.C. Rodriguez, D.G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A.H. Zea, M.B. Piazuelo, et al., Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses, Cancer Res. 64 (2004) 5839–5849
- J. Yu, W. Du, F. Yan, Y. Wang, H. Li, S. Cao, et al., Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer, J. Immunol. 190 (2013) 3783– 3797.
- 29. M.K. Srivastava, P. Sinha, V.K. Clements, P. Rodriguez, S. Ostrand-Rosenberg, Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine, Cancer Res. 70 (2010) 68–77.
- C. Alfaro, A. Teijeira, C. Onate, G. Perez, M.F. Sanmamed, M.P. Andueza, et al., Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Clin. Cancer Res. (2016).
- M. Wislez, N. Rabbe, J. Marchal, B. Milleron, B. Crestani, C. Mayaud, et al., Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death, Cancer Res. 63 (2003) 1405–1412.
- 32. H.L. Rao, J.W. Chen, M. Li, Y.B. Xiao, J. Fu, Y.X. Zeng, et al., Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis, PLoS One 7 (2012) e30806.
- 33. J. Wang, Y. Jia, N. Wang, X. Zhang, B. Tan, G. Zhang, et al., The clinical significance of tumor-infiltrating neutrophils and neutrophil-to-CD8+ lymphocyte ratio in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma, J. Transl. Med. 12 (2014) 7.
- 34. S. Trellakis, H. Farjah, K. Bruderek, C.A. Dumitru, T.K. Hoffmann, S. Lang, et al., Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors, Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 24 (2011) 683–693.
- D.M. Kuang, Q. Zhao, Y. Wu, C. Peng, J. Wang, Z. Xu, et al., Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma, J. Hepatol. 54 (2011) 948–955.
- T.O. Jensen, H. Schmidt, H.J. Moller, F. Donskov, M. Hoyer, P. Sjoegren, et al., Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma, Cancer 118 (2012) 2476–2485.
- 37. F. Donskov, H. von der Maase, Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma, J. Clin. Oncol. 24 (2006) 1997–2005.
- H.K. Jensen, F. Donskov, N. Marcussen, M. Nordsmark, F. Lundbeck, H. von der Maase, Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma, J. Clin. Oncol. 27 (2009) 4709–4717.
- 39. Z.G. Fridlender, J. Sun, I. Mishalian, S. Singhal, G. Cheng, V. Kapoor, et al., Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic
myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils, PLoS One 7 (2012) e31524.

- 40. P. Hubert, A. Heitzmann, S. Viel, A. Nicolas, X. Sastre-Garau, P. Oppezzo, et al., Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy, Cancer Res. 71 (2011) 5134–5143.
- M. Zivkovic, M. Poljak-Blazi, K. Zarkovic, D. Mihaljevic, R.J. Schaur, N. Zarkovic, Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10, Cancer Lett. 246 (2007) 100–108.
- H. Nozawa, C. Chiu, D. Hanahan, Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 12493–12498.
- 43. Z. Sun, P. Yang, Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1antitrypsin in cancer development and progression, Lancet Oncol. 5 (2004) 182–190
- R. Rotondo, G. Barisione, L. Mastracci, F. Grossi, A.M. Orengo, R. Costa, et al., IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer, Int. J. Cancer 125 (2009) 887–893
- 45. I. Mishalian, R. Bayuh, E. Eruslanov, J. Michaeli, L. Levy, L. Zolotarov, et al., Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17-a new mechanism of impaired antitumor immunity, Int. J. Cancer 135 (2014)1178–1186.
- 46. J.M. David, C. Dominguez, D.H. Hamilton, C. Palena, The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance, Vaccines (Basel) 4 (2016).
- 47. Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Strieter RM. In vitro and in vivo systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis. Methods Enzymol 1997;288:190–220
- 48. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. J Leukocyte Biol 1994;55:410–22.
- 49. Oppenheim J, Fujiwara H. The role of cytokines in cancer. Cytokine Growth Factor Rev 1996;7:279–88.
- 50. Norrby K. Mast cells and de novo angiogenesis: angiogenic capability of individual mast-cell mediators such as histamine, TNF, IL-8 and bFGF. Inflamm Res (Suppl) 1997;1:S7–8.
- 51. Norrby K. Interleukin-1-alpha and de novo mammalian angiogenesis. Microvasc Res 1997;54:58–64.
- 52. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol Cell Biol 1997;17:4015–23.
- 53. Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M. Involvement of the transcription factor NF-_____B in tubular morphogenesis of human microvascular microvascular endothelial cells by oxidative stress. Mol Cell Biol 1996;16:4231–9.
- 54. Shi Q, Abbruzzese J, Huang S, Fidler IJ, Xie K. Constitutive and inducible interleukin-8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. Clin Cancer Res 1999;5:3711–21.
- 55. Kornmann M, Tangvoranuntakul P, Korc M. TGF-beta-1 up-regulates cyclin D1 expression in COLO-357 cells, whereas suppression of cyclin D1 levels is associated with down-regulation of the type I TGF-beta receptor. Int J Cancer 1999;83:247–54.
- 56. Shi Q, Le X, Wang B, Xiong Q, Abbruzzese JL, Xie K. Regulation of interleukin-8 expression by cellular pH in human pancreatic adenocarcinoma cells. J Interferon Cytokine Res 2000;20:1544–8.

- 57. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. J Exp Med 1994;179:1409–15
- 58. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, BurdicK MD, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. J Clin Invest 1996;97:2792–802.
- 59. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL. Role of C–X–C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. J Leukocyte Biol 1995;57:752–62.
- 60. Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW, Christmas SE. Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. Eur J Cancer 1996;32A:2142–7.
- 61. Cui G, Yuan A, Goll R, Vonen B, Florholmen J. Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Cancer Immunol Immunother 2009;58:1897–905.
- 62. Rubie C, Frick VO, Pfeil S, Wagner M, Kollmar O, Kopp B, et al. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. World J Gastroenterol 2007;13:4996–5002.
- Rhim JH, Kim SA, Lee JE, Kim DJ, Chung HK, Shin KJ, et al. Cancer cell-derived IL-1alpha induces IL-8 release in endothelial cells. J Cancer Res Clin Oncol 2008;134:45– 50.
- 64. Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, et al. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. Int J Colorectal Dis 2010;25:573–81.
- 65. Terada H, Urano T, Konno H. Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. Eur Surg Res 2005;37:166–72.
- 66. Kim JM, Cho SJ, Oh YK, Jung HY, Kim YJ, Kim N. Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by Bacteroides fragilis enterotoxin. Clin Exp Immunol 2002;130:59–66.
- 67. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1214–23.
- Kelly CP, Keates S, Siegenberg D, Linevsky JK, Pothoulakis C, Brady HR. IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells. Am J Physiol 1994;267:G991–7
- 69. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. Nat Med 2005;11:992–7.
- 70. Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. Immunology 1994;81:85–91.
- 71. Abdulamir AS, Hafidh RR, Mahdi LK, Al jeboori T, Abubaker F. Investigation into the controversial association of Streptococcus gallolyticus with colorectal cancer and adenoma. BMC Cancer 2009;9:403–14.
- 72. Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. Clin Cancer Res 2001;7:3298–304.
- 73. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem 1995;270:27348–57.

- 74. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:593–609.
- 75. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella RA, Slavin J and Christmas SE: Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. Cytokine 12(1): 78-85, 2000.
- 76. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. Int J Cancer 2010.
- 77. Sturm A, Baumgart DC, d'Heureuse JH, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass AU. CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. Cytokine 2005;29:42–8.
- 78. Wilson AJ, Byron K, Gibson PR. Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. Clin Sci (Lond) 1999;97:385–90.
- 79. Bates RC, DeLeo III MJ, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. Exp Cell Res 2004;299:315–24.
- 80. Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowers Y, Lider O, Schwartz B. TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. Clin Exp Metastasis 2002;19:327–37.
- 81. Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. Mol Cancer 2004;3:21–31.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumorassociated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N100 versus "N200 TAN. Cancer Cell 2009;16:183–94.
- 83. SticherlingM, Bornscheuer E, Schroder JM, Christophers E (1991) Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8-immunoreactivity in normal and psoriatic skin. J Invest Dermatol 96:26–30.
- Gibson P, Rosella O (1995) Interleukin-8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. Gut 37:536–543
- 85. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang Y-X, Anderson DJ, Fierer J, Stephens RS, Kagnoff MF (1997) Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. J Clin Invest 99:77–87.
- 86. Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP (1996) Effect of Clostridium difficile toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin-8 production and apoptosis after cell detachment. Gut 38:337–347.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science (Washington DC) 258:1798–1801.
- Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE (1994) Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic aneurysmal blood vessel growth. Pathobiology 62:134–139
- 89. Nanney LB, Mueller SG, Bueno R, Peiper SC, Richmond A (1995) Distributions of melanoma growth stimulatory activity or growth-regulated gene and the interleukin-8 receptor B in human wound repair. Am J Pathol 147:1248–1260.
- 90. Aihua Li, Michelle L. Varney and Rakesh K. Singh; Expression of Interleukin 8 and Its Receptors in Human Colon Carcinoma Cells with Different Metastatic Potentials. Clin Cancer Res 2001;7:3298-3304.

- 91. Nicolson, G. L. Metastatic tumor cell attachment and invasion assay utilizing vascular endothelial cell monolayers. J. Histochem. Cytochem., 30: 214–220, 1982
- 92. Cohen, M. C., Bereta, M., and Bereta, J. Effect of cytokines on tumour cellendothelial interactions. Indian J. Biochem. Biophys., 34:199–204, 1997.
- 93. Voura, E. B., Sandig, M., and Siu, C. H. Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. Microsc. Res. Tech. 1, 43: 265–275, 1998.
- 94. Nicolson, G. L., Irimura, T., Nakajima, M., and Estrada, J. Metastatic cell attachment to and invasion of vascular endothelium and its underlying basal lamina using endothelial cell monolayers. Symp. Fundam. Cancer Res., 36: 145–167, 1983.
- 95. Claudia Rubie, Vilma Oliveira Frick, Sandra Pfeil, Mathias Wagner, Otto Kollmar, Berit Kopp, Stefan Gräber, Bettina M Rau, Martin K Schilling :Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. World J Gastroenterol 2007 October 7; 13(37): 4996-5002
- R. Eisman, S. Surrey, B. Ramachandran, E. Schwartz, M. Poncz, Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt, Blood 76 (1990) 336–344
- 97. M. Poncz, S. Surrey, P. LaRocco, M.J. Weiss, E.F. Rappaport, T.M. Conway, E. Schwartz, Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line, Blood 69 (1987) 219–223.
- 98. A. Tunnacliffe, S. Majumdar, B. Yan, M. Poncz, Genes for beta-thromboglobulin and platelet factor 4 are closely linked and form part of a cluster of related genes on chromosome 4, Blood 79 (1992) 2896–2900.
- 99. K.H. Mayo, M.J. Chen, Human platelet factor 4 monomer–dimer–tetramer equilibria investigated by 1H NMR spectroscopy, Biochemistry 28 (1989) 9469–9478.
- 100. T.F. Deuel, P.S. Keim, M. Farmer, R.L. Heinrikson, Amino acid sequence of human platelet factor 4, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 2256–2258.
- R.M. Strieter, M.D. Burdick, J. Mestas, B. Gomperts, M.P. Keane, J.A.
 Belperio, Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis, Eur. J. Cancer.
 42 (2006) 768–778.
- 102. R.J. Sharpe, H.R. Byers, C.F. Scott, S.I. Bauer, T.E. Maione, Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4, J. Natl. Cancer Inst. 82 (1990) 848–853
- 103. P. Hansell, T.E. Maione, P. Borgstrom, Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo, Am. J. Physiol. 269 (1995) H829–H836.
- 104. P. Hansell, M. Olofsson, T.E. Maione, K.E. Arfors, P.Borgstrom, Differences in binding of platelet factor 4 to vascular endothelium in vivo and endothelial cells in vitro, Acta Physiol. Scand. 154 (1995) 449–459.
- E.M. Rabellino, R.B. Levene, L.L. Leung, R.L. Nachman, Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes, J. Exp. Med. 154 (1981) 88–100
- 106. K.M. McLaren, L. Holloway, D.S. Pepper, Human platelet factor 4 and tissue mast cells, Thromb. Res. 19 (1980) 293–297.
- 107. A. Schaffner, P. Rhyn, G. Schoedon, D.J. Schaer, Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes-role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway, J. Leukocyte Biol. 78 (2005) 202–209.
- 108. Zhe Wang, He Huang, Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): An angiostatic hemokine for cancer Therapy; Cancer Letters 331 (2013) 147–153
- 109. Z.C. Han, L. Sensebe, J.F. Abgrall, J. Briere, Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis in vitro, Blood 75 (1990) 1234–1239

- 110. M.P. Lambert, L. Rauova, M. Bailey, M.C. Sola-Visner, M.A. Kowalska, M. Poncz, Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications, Blood 110 (2007) 1153–1160.
- A.Z. Dudek, I. Nesmelova, K. Mayo, C.M. Verfaillie, S. Pitchford, A. Slungaard, Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis, Blood 101 (2003) 4687–4694.
- 112. M.W. Piepkorn, Dansyl (5-dimethylaminonaphthalene-1-sulphonyl)-heparin binds antithrombin III and platelet factor 4 at separate sites, Biochem. J. 196 (1981) 649–651.
- 113. M.F. Scully, K. Weerasinghe, V.V. Kakkar, Inhibition of contact activation by platelet factor 4, Thromb. Res. 20 (1980) 461–466.
- 114. L.L. Dumenco, B. Everson, L.A. Culp, O.D. Ratnoff, Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by platelet factor 4, J. Lab. Clin. Med. 112 (1988) 394–400.
- 115. J.H. Griffin, J.A. Fernandez, A.J. Gale, L.O. Mosnier, Activated protein C, J. Thromb. Haemost. 1 (2007) 73–80.
- S.T. Bebawy, J. Gorka, T.M. Hyers, R.O. Webster, In vitro effects of platelet factor 4 on normal human neutrophil functions, J. Leukocyte Biol. 39 (1986) 423–434.
- 117. N. Hayashi, J. Chihara, Y. Kobayashi, T. Kakazu, D. Kurachi, T. Yamamoto, S. Nakajima, Effect of platelet-activating factor and platelet factor 4 on eosinophil adhesion, Int. Arch. Allergy Immunol. 1 (1994) 57–59.
- 118. F. Schiemann, T.A. Grimm, J. Hoch, R. Gross, B. Lindner, F. Petersen, S. Bulfone-Paus, E. Brandt, Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G, Blood 107 (2006) 2234–2242.
- B. Scheuerer, M. Ernst, I. Durrbaum-Landmann, J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, E. Brandt, H.D. Flad, F. Petersen, The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages, Blood 95 (2000) 1158–1166.
- 120. I. Fricke, D. Mitchell, F. Petersen, A. Bohle, S. Bulfone-Paus, S. Brandau, Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells, Faseb. J. 18 (2004) 1588–1590.
- C.Q. Xia, K.J. Kao, Effect of CXC chemokine platelet factor 4 on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, Int. Immunol. 15 (2003) 1007–1015.
- 122. F. Marti, E. Bertran, M. Llucia, E. Villen, M. Peiro, J. Garcia, F. Rueda, Platelet factor 4 induces human natural killer cells to synthesize and release interleukin-8, J. Leukocyte Biol. 72 (2002) 590–597.
- S. Struyf, L. Salogni, M.D. Burdick, J. Vandercappellen, M. Gouwy, S. Noppen,
 P. Proost, G. Opdenakker, M. Parmentier, C. Gerard, S. Sozzani, R.M. Strieter, J. Van
 Damme, Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1
 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3, Blood 117 (2011) 480–488.
- 124. C.Y. Liu, M. Battaglia, S.H. Lee, Q.H. Sun, R.H. Aster, G.P. Visentin, Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25-(nonregulatory) T cells, J. Immunol. 174 (2005) 2680–2686.
- P. Romagnani, L. Maggi, B. Mazzinghi, L. Cosmi, L. Lasagni, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Angeli, M. Rotondi, L. Fili, P. Parronchi, M. Serio, E. Maggi, S. Romagnani, F. Annunziato, CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production, J. Allergy Clin. Immunol. 116 (2005) 1372–1379.

- 126. T.E. Maione, G.S. Gray, J. Petro, A.J. Hunt, A.L. Donner, S.I. Bauer, H.F. Carson, R.J. Sharpe, Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides, Science 247 (1990) 77–79.
- 127. R.J. Sharpe, H.R. Byers, C.F. Scott, S.I. Bauer, T.E. Maione, Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4, J. Natl. Cancer Inst. 82 (1990) 848–853.
- 128. D.L. Kolber, T.L. Knisely, T.E. Maione, Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4, J. Natl. Cancer Inst. 87 (1995) 304–309.
- 129. J.B. Watson, S.B. Getzler, D.F. Mosher, Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor, J. Clin. Invest. 94 (1994) 261–268.
- S. Gengrinovitch, S.M. Greenberg, T. Cohen, H. Gitay-Goren, P. Rockwell, T.E. Maione, B.Z. Levi, G. Neufeld, Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms, J. Biol. Chem. 270 (1995) 15059–15065.
- 131. C. Perollet, Z.C. Han, C. Savona, J.P. Caen, A. Bikfalvi, Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization, Blood 91 (1998) 3289–3299.
- 132. L. Lasagni, M. Francalanci, F. Annunziato, E. Lazzeri, S. Giannini, L. Cosmi, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, C. Orlando, E. Maggi, F. Marra, S. Romagnani, M. Serio, P. Romagnani, An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4, J. Exp. Med. 197 (2003) 1537–1549.
- 133. S. Aidoudi, A. Bikfalvi, Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis, Thromb. Haemost. 104 (2010) 941–948.
- 134. S.K. Gupta, J.P. Singh, Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression, J. Cell Biol. 127 (1994) 1121–1127.
- 135. G. Gentilini, N.E. Kirschbaum, J.A. Augustine, R.H. Aster, G.P. Visentin, Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cip1/WAF1), Blood 93 (1999) 25–33.
- 136. J. Vandercappellen, S. Noppen, H. Verbeke, W. Put, R. Conings, M. Gouwy, E. Schutyser, P. Proost, R. Sciot, K. Geboes, G. Opdenakker, J. Van Damme, S. Struyf, Stimulation of angiostatic platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var) versus inhibition of angiogenic granulocyte chemotactic protein-2 (CXCL6/GCP-2) in normal and tumoral mesenchymal cells, J. Leukoc. Biol. 82 (2007) 1519–1530.
- 137. B. Scheuerer, M. Ernst, I. Durrbaum-Landmann, J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, E. Brandt, H.D. Flad, F. Petersen, The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages, Blood 95 (2000) 1158–1166.
- 138. S.T. Bebawy, J. Gorka, T.M. Hyers, R.O. Webster, In vitro effects of platelet factor 4 on normal human neutrophil functions, J. Leukoc. Biol. 39 (1986) 423–434
- 139. R. Eisman, S. Surrey, B. Ramachandran, E. Schwartz, M. Poncz, Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt, Blood 76 (1990) 336–344.
- 140. C.J. Green, R.S. Charles, B.F.P. Edwards, P.H. Johnson, Identification and characterization of PF4var1, a human gene variant of platelet factor 4, Mol. Cell. Biol. 9 (1989) 1445–1451.

- 141. S. Struyf, M.D. Burdick, E. Peeters, K. Van den Broeck, C. Dillen, P. Proost, J. Van Damme, R.M. Strieter, Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis, Cancer Res. 67 (2007) 5940–5948.
- 142. Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E, et al. Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. Hum Pathol 2010;41:990–1001.
- 143. Yang Zhang, Jing Gao, Xia Wang, Shaorong Deng, Hao Ye, Wen Guan, Mingyuan Wu, Shunying Zhu, Yan Yu and Wei Han, CXCL4 mediates tumor regrowth after chemotherapy by suppression of antitumor immunity. Cancer Biology & Therapy 16:12, 1775--1783; December 2015; © 2015 Taylor & Francis Group, LLC
- 144. Belman N, Bonnem EM, Harvey HA, Lipton A: Phase I trial of recombinant platelet factor 4 (rPF4) in patients with advanced colorectal carcinoma. Invest New Drugs 1996, 14:387–389.
- 145. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kukuchi L, Cervi D, Podust V, Italiano JE, Wheatley E, Abou-Slaybi A, Bender E, Almog N, Kieran MW, Folkman J: Platelets actively sequester angiogenesis regulators. Blood 2009, 130:2835–2842.
- 146. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE Jr, Michel LV, Fox L, Klement GL, Folkman J: Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. Am J Hematol 2010, 85:487–493.
- 147. Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A, Naumov GN, Bender E, Almog N, Italiano JE Jr, Folkman J, Klement GL: Plateletassociated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. Blood 2008, 111:1201–1207
- 148. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE Jr, Michel LV, Connors S, Oenick M, D'Amato RJ, Klement GL, Folkman J: VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. Angiogenesis 2012, 15:265–273.
- 149. D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.F. Dvorak, Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, Science 219 (1983) 983–985.
- N. Ferrara, W.J. Henzel, Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 (1989) 851–858
- 151. P.J. Keck, S.D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder, D.T. Connolly, Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, Science 246 (1989) 1309–1312
- 152. D.W. Leung, G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, Science 246 (1989) 1306–1309.
- 153. D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, M.G. Persico, Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 9267–9271.
- M. Meyer, M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H.G. Augustin,
 M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H.J. Rziha, C. Dehio, A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases, EMBO J. 18 (1999) 363–374.
- 155. G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, FASEB J. 13 (1999) 9–22.

- 156. S. Ogawa, A. Oku, A. Sawano, S. Yamaguchi, Y. Yazaki, M. Shibuya, A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparinbinding domain, J. Biol. Chem. 273 (1998) 31273–31282.
- 157. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. Cytokine 2000; 12: 1232-1235
- 158. Credidio L, Lima CS, Leal R, de Ayrizono ML, Fagundes JJ, Magna LA, Coy CS. C936T polymorphism of the VEGF gene in relation to the risk and the clinical and biological characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma. BMC Res Notes 2014; 7: 768
- 159. Hansen TF, Spindler KL, Andersen RF, Lindebjerg J, Kølvraa S, Brandslund I, Jakobsen A. The prognostic value of haplotypes in the vascular endothelial growth factor a gene in colorectal cancer.Cancers (Basel) 2010; 2: 1405-1418
- Metzger CS, Koutsimpelas D, Brieger J. Transcriptional regulation of the VEGF gene in dependence of individual genomic variations. Cytokine 2015;76: 519-26.
- 161. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. J Vasc Res 2000;37: 443-8.
- 162. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2004;46: 293-8.
- 163. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. Mol Cancer Ther 2009;8: 2496-508
- 164. W.M. Boedefeld II, K.I. Bland, M.J. Heslin, Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma, Ann. Surg. Oncol. 10 (2003) 839–851
- 165. M. Shibuya, N. Ito, L. Claesson-Welsh, Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 237 (1999)59–83.
- 166. Shahnawaz Rasheed, Peter J. McDonald, John M. Northover, Thomas Guenther, Angiogenesis and hypoxic factors in colorectal cancer. Pathology – Research and Practice 204 (2008) 501–510
- 167. D.J. Hicklin, L.M. Ellis, Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis, J. Clin. Oncol. 23 (2005) 1011–1027.
- 168. Pare-Brunet L, Sebio A, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Rio E, Barnadas A, Baiget M, Paez D. Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. Pharmacogenomics J 2015;15: 397-404.
- 169. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nature medicine 2003;9: 653-60.
- 170. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000;407: 249-57.
- 171. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7: 359-71.
- 172. D.W. Leung, G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, Science 246 (1989) 1306–1309

- 173. E. Barbera-Guillem, J.K. Nyhus, C.C. Wolford, C.R. Friece, J.W. Sampsel, Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process, Cancer Res. 62 (2002) 7042–7049.
- 174. Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? Ann Oncol 2003; 14: 1026- 1038
- 175. Myśliwiec P, Pawlak K, Kukliński A, Kedra B. Combined perioperative plasma endoglin and VEGF-- a assessment in colorectal cancer patients. Folia Histochem Cytobiol 2009; 47: 231-236
- 176. Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. J Oncol 2010; 2010: 135285
- 177. De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E, Castellano P, Romano C, Ciardiello F, Catalano G, Pignatelli C, Galizia G. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. Cancer 2004; 100: 270-278
- 178. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, Rossi C, Baldelli AM, Graziano F, Saba V, Muretto P, Catalano G. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. Clin Cancer Res 2000; 6: 2803-2807
- 179. Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. World J Gastroenterol 2003; 9: 1227- 1230
- 180. Liang JF, Wang HK, Xiao H, Li N, Cheng CX, Zhao YZ, Ma YB, Gao JZ, Bai RB, Zheng HX. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. J Exp Clin Cancer Res 2010; 29: 71
- 181. Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. BMC Cancer 2009; 9: 432
- 182. Pang RW, Poon RT. Clinical implications of angiogenesis in cancers. Vasc Health Risk Manag 2006; 2: 97- 108
- 183. Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Moon JH, Kim SN, Bae HI, Chung HY, Yu W. No association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C expression with survival in patients with gastric cancer. Cancer Res Treat 2009; 41: 218-223
- 184. Zhai R, Liu G, Zhou W, Su L, Heist RS, Lynch TJ, Wain JC, Asomaning K, Lin X, Christiani DC. Vascular endothelial growth factor genotypes, haplotypes, gender, and the risk of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14: 612-7.
- 185. Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. Cytokine 2006;35: 21-8.
- 186. Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Ahn BM, Moon JH, Jeon SW, Park JY, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. J Korean Med Sci 2008;23: 421-7.
- 187. Jin Q, Hemminki K, Enquist K, Lenner P, Grzybowska E, Klaes R, Henriksson R, Chen B, Pamula J, Pekala W, Zientek H, Rogozinska-Szczepka J, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. Clin Cancer Res 2005;11: 3647-53.

- 188. He M, Cheng Y, Li W, Liu Q, Liu J, Huang J, Fu X. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. BMC Cancer 2010; 10: 170
- 189. Thiele W, Slee man JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? J Biotechnol 2006; 124: 224-241
- 190. Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N, Hiddemann W, Jung A, Kirchner T. The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. Dtsch Arztebl Int 2009; 106: 202-206
- 191. Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnica-Worms D. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is synthetic lethal to aberrant {beta}-catenin activation in colon cancer. *Clin Cancer Res* (2009) **15**:7529–37. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0336
- 192. Easwaran V, Lee SH, Inge L et al. Beta-catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. Cancer Res (2003) 63: 3145-53
- 193. Waldner MJ, Wirtz S, Jefremow A, Warntjen M, Neufert C, Atreya R, et al. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. J Exp Med (2010) **207**:2855–68. doi:10.1084/ jem.20100438
- 194. Miriam Canavese, Doan TM Ngo, Guy J Maddern, Jennifer E Hardingham, Timothy J Price and Ehud Hauben1, Biology and Therapeutic Implications of VEGF-A Splice Isoforms and Single-Nucleotide Polymorphisms in Colorectal Cancer, Volume 140, Issue 10, 15 May 2017, Pages 2183–2191
- 195. Bruhn MA, Townsend AR, Khoon Lee C, Shivasami A, Price TJ, Wrin J, Arentz G, Tebbutt NC, Hocking C, Cunningham D, Hardingham JE, AGITG BHIicw. Proangiogenic tumor proteins as potential predictive or prognostic biomarkers for bevacizumab therapy in metastatic colorectal cancer. International journal of cancer Journal international du cancer 2014;135: 731-41.
- 196. Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. Oncology 2003;64:61-73.
- 197. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. Br J Cancer 2006;94: 1823-32.
- Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, Galandiuk
 S. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. International journal of cancer Journal international du cancer 2002;101:32-6.
- 199. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY, Jeon SW, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 2008;14: 62-6.
- 200. Hofmann G, Langsenlehner U, Renner W, Langsenlehner T, Yazdani-Biuki B, Clar H, Gerger A, Wehrschuetz M, Samonigg H, Krippl P. Common single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer risk. J Cancer Res Clin Oncol 2008;134: 591-5.
- 201. Yamamori M, Taniguchi M, Maeda S, Nakamura T, Okamura N, Kuwahara A, Iwaki K, Tamura T, Aoyama N, Markova S, Kasuga M, Okumura K, Sakaeda T. VEGF T-1498C polymorphism, a predictive marker of differentiation of colorectal adenocarcinomas in Japanese. Int J Med Sci 2008; 5: 80-86
- 202. Wu X, Li D, Liu Z, Wan X, Wu Y, Jiang C, Qian Q. Vascular endothelial growth factor 1498C/T, 936C/T polymorphisms associated with increased risk of colorectal adenoma: a Chinese case-control study. Mol Biol Rep 2011; 38: 1949-1955

- Bae SJ, Kim JW, Kang H, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Gender-specific
 association between polymorphism of vascular endothelial growth factor (VEGF 936
 C>T) gene and colon cancer in Korea. Anticancer Res 2008;28: 1271-6.
- 204. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallbohmer D, Yang DY, Park D, Fazzone W, Schultheis A, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated withsurvival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. Pharmacogenet Genomics 2006;16: 475-83.
- 205. Park HM, Hong SH, Kim JW, Oh D, Hwang SG, An HJ, Kim UK, Kim NK. Gender-specific association of the VEGF -2578C > A polymorphism in Korean patients with colon cancer. Anticancer Res 2007;27: 2535-9.
- 206. Duhoux FP, Machiels JP. Antivascular therapy for epithelial ovarian cancer. J Oncol 2010; 2010: 372547
- 207. Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. J Pathol 2003; 200: 183-194
- 208. Barozzi C, Ravaioli M, D'Errico A, Grazi GL, Poggioli G, Cavrini G, Mazziotti A, Grigioni WF. Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma: a comparative study of a broad panel. Cancer 2002; 94: 647-6 57
- 209. Miyazaki T, Okada N, Ishibashi K, Ogata K, Ohsawa T, Ishiguro T, Nakada H, Yokoyama M, Matsuki M, Kato H, Kuwano H, Ishida H. Clinical significance of plasma level of vascular endothelial growth factor-C in patients with colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 2008; 38: 839-8 43
- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Mod Pathol 2004; 17: 197- 203
- 211. Cressey R, Wattananupong O, Lertprasertsuke N, Vinitketkumnuen U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis. BMC Cancer 2005; 5: 128
- 212. Zlobec I, Steeeele R, Nigam N, Compton CC.A predictive model of rectal tumor response to preoperative radiotherapy using classification and regression tree methods. Clin Cancer Res 2005; 15 : 5440-5443
- 213. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. Oncologist 2000;5 Suppl 1: 11-5.
- 214. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine 2004;350: 2335-42.
- 215. Mahfud M, Breitenstein S, El-Badry AM, Puhan M, Rickenbacher A, Samaras P, Pessaux P, Lopez-Ben S, Jaeck D, Figueras J, Alain-Clavien P. Impact of preoperative bevacizumab on complications after resection of colorectal liver metastases: case-e-matched control study. World J Surg 2010; 34: 92-100
- 216. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997;94: 7192-7.

- 217. Troiani T, Martinelli E, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F, Morgillo F. Beyond bevacizumab: new anti-VEGF strategies in colorectal cancer. Expert opinion on investigational drugs 2012;21: 949-59.
- 218. Amin EM, Oltean S, Hua J, Gammons MV, Hamdollah-Zadeh M, Welsh GI, Cheung MK, Ni L, Kase S, Rennel ES, Symonds KE, Nowak DG, et al. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. Cancer Cell 2011;20: 768-80.
- 219. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. Journal of cell science 2008;121: 3487-95.
- 220. Gille J. Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches. Exp Dermatol 2006; 15: 175-186
- 221. Sparano JA, Gray R, Giantonio B, O'Dwyer P, Comis RL. Evaluating antiangiogenesis agents in the clinic: the Eastern Cooperative Oncology Group Portfolio of Clinical Trials. Clin Cancer Res 2004; 10: 1206- 1211
- 222. Gruenberger B, Tamandl D, Schueller J, Scheithauer W, Zielinski C, Herbst F, Gruenberger T. Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26: 1830-1835
- 223. Ma AT, Ma BB, Lei KI, Mo FK, Chan AT. Clinical predictors of response to cetuximab-chemotherapy in metastatic colorectal cancer. Hong Kong Med J 2010; 16: 207- 212
- 224. Gurzu S, Jung J, Azamfirei L, Mezei T, Cîmpean AM, Szentirmay Z. The angiogenesis in colorectal carcinomas with and without lymph node metastases. Rom J Morphol Embryol 2008; 49: 149-152
- Boehm S, Rothermundt C, Hess D, Joerger M. Antiangiogenic drugs in oncology: a focus on drug safety and the elderly a mini-review. Gerontology 2010; 56: 303-309
- 226. Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. Clin Ther 2010; 32: 437- 453
- 227. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. Clin Ther 2006; 28: 177 9-1802
- 228. Rougier P, Mitry E. [Targeted biotherapy: a revolution in the management of patients with colorectal cancer?]. Gastroenterol Clin Biol 2009; 33: 67 2-68 0
- P. Proost, A. Wuyts, R. Conings, J.P. Lenaerts, A. Billiau, G. Opdenakker, J. Van Damme, Human and bovine granulocyte chemotactic protein-2: complete amino acid sequence and functional characterization as chemokines, Biochemistry. 32 (1993) 10170–10177.
- J. Van Damme, J. Van Beeumen, G. Opdenakker, A. Billiau, A novel, NH2terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skinreactive, and granulocytosis-promoting activity, J. Exp. Med. 167 (1988) 1364 P. Proost, C. Wolf-Peeters, R. Conings, G. Opdenakker, A. Billiau, J. Van
- 231. Damme, Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8, J. Immunol. 150 (1993) 1000–1010.–1376.
- J. Van Damme, A. Wuyts, G. Froyen, E. Van Coillie, S. Struyf, A. Billiau, P. Proost, J.M. Wang, G. Opdenakker, Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage, J. Leukocyte Biol. 62 (1997) 563–569.

- 233. E. Van Coillie, I. Van Aelst, A. Wuyts, R. Vercauteren, R. Devos, C. Wolf-Peeters, J. Van Damme, G. Opdenakker, Tumor angiogenesis induced by granulocyte chemotactic protein-2 as a countercurrent principle, Am. J. Pathol. 159 (2001) 1405– 1414
- 234. A. Wuyts, S. Struyf, K. Gijsbers, E. Schutyser, W. Put, R. Conings, J.P. Lenaerts, K. Geboes, G. Opdenakker, P. Menten, P. Proost, J. Van Damme, The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1beta and is downregulated by interferon-gamma: comparison with interleukin-8/CXCL8, Lab Invest. 83 (2003) 23–34.
- 235. R.A. Fillmore, S.E. Nelson, R.N. Lausch, J.E. Oakes, Differential regulation of ENA-78 and GCP-2 gene expression in human corneal keratocytes and epithelial cells, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44 (2003) 3432–3437
- 236. K. Gijsbers, G. Van Assche, S. Joossens, S. Struyf, P. Proost, P. Rutgeerts, K. Geboes, J. Van Damme, CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue, Eur. J. Immunol. 34(2004) 1992–2000
- 237. M. Collin, H.M. Linge, A. Bjartell, A. Giwercman, J. Malm, A. Egesten, Constitutive expression of the antibacterial CXC chemokine GCP-2/CXCL6 by epithelial cells of the male reproductive tract, J. Reprod. Immunol. 79 (2008) 37–43.
- E. Thorburn, L. Kolesar, E. Brabcova, K. Petrickova, M. Petricek, M. Jaresova,
 A. Slavcev, I. Striz, CXC and CC chemokines induced in human renal epithelial cells by inflammatory cytokines, APMIS 117(2009) 477–487
- 239. A. Wuyts, N. Van Osselaer, A. Haelens, I. Samson, P. Herdewijn, A. Ben-Baruch, J.J. Oppenheim, P. Proost, J. Van Damme, Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties, Biochemistry 36 (1997) 2716–2723.
- C.L. Addison, T.O. Daniel, M.D. Burdick, H. Liu, J.E. Ehlert, Y.Y. Xue, L. Buechi,
 A. Walz, A. Richmond, R.M. Strieter, The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the
 putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity, J. Immunol.
 165 (2000) 5269–5277
- 241. M. Kashiwazaki, T. Tanaka, H. Kanda, Y. Ebisuno, D. Izawa, N. Fukuma, N. Akimitsu, K. Sekimizu, M. Monden, M. Miyasaka, A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions, Int.Immunol. 15 (2003) 1219–1227.
- 242. M. Wolf, M.B. Delgado, S.A. Jones, B. Dewald, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, Eur. J. Immunol. 28 (1998) 164–170.
- 243. K. Gijsbers, M. Gouwy, S. Struyf, A. Wuyts, P. Proost, G. Opdenakker, F. Penninckx, N. Ectors, K. Geboes, J. Van Damme, GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors, Exp. Cell Res. 303 (2005) 331–342.
- 244. Y.M. Zhu, S.M. Bagstaff, P.J. Woll, Production and upregulation of granulocyte chemotactic protein-2/CXCL6 by IL-1beta and hypoxia in small cell lung cancer, Br. J.Cancer. 94 (2006) 1936–1941.
- 245. Claudia Rubie, Vilma Oliveira Frick, Mathias Wagner, Jochen Schuld, Stefan Gräber, Brigitte Brittner, Rainer M Bohle and Martin K Schilling, ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions, BMC Cancer 2008, 8:178

- 246. C. Uyttenhove, J. Van Snick, Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis, Eur. J. Immunol. 36 (2006) 2868–2874
- 247. C. Uyttenhove, B. Arendse, V. Stroobant, et al." Development of an anti-IL-12 p40 auto-vaccine: protection in experimental autoimmune encephalomyelitis at the expense of increased sensitivity to infection", Eur. J. Immunol. 34 (2004) 3572–3581.
- 248. Verbeke H, Struyf S, Berghmans N et al."Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis", Cancer Letters 302 (2011) 54–62

4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Ασθενείς

Για την μελέτη της έκφρασης των χημειοκινών σε καρκινικούς και υγιείς ιστούς τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν όλα από ασθενείς με επιβεβαιωμένη από την αντίστοιχη βιοψία διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου. Η μελέτη έγινε με βάση την διακήρυξη του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου. Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε γραπτή συγκατάθεση των ασθενών.

Η επιλογή των ασθενών έγινε με βάση τα εξής κριτήρια:

- Μόνο ασθενείς με στάδια ΙΙ και ΙΙΙ κατά την ΤΝΜ ταξινόμηση (στάδια Β και C κατά την Dukes κλίμακα) συμπεριλήφθηκαν. Ασθενείς με μεταστατικές μορφές καρκίνου (τύπος IV) αποκλείστηκαν από την μελέτη.
- Μόνο ασθενείς με χειρουργική θεραπεία της νόσου συμπεριλήφθηκαν και χωρίς
 την εφαρμογή χημειοθεραπείας (είτε λόγω άρνησης υποβολής των ιδίων, είτε
 λόγω του ότι δεν κρίθηκαν ως κατάλληλοι υποψήφιοι από τους θεράποντες
 ιατρούς).
- Μόνο ασθενείς με δυνατότητα τουλάχιστον 5ετούς μετεγχειρητικής
 παρακολούθησης συμμετείχαν. Δείγματα από ασθενείς που δεν κατέστη δυνατή η
 παρούσα συνθήκη αποκλείστηκαν από την μελέτη.

Συνολικά 35 ασθενείς που χειρουργήθηκαν για εντερικά αδενοκαρκινώματα εκπλήρωναν τις ανωτέρω προϋποθέσεις και συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Τα δημογραφικά στοιχεία του πληθυσμού αυτού παρουσιάζονται στον κατωτέρω πίνακα:

Χαρακτηριστικά		No
Φύλο		
	Άρεν	20
	Θύλη	15
Κάπνισμα		
	Ναι	21
	Όχι	14
ΔΜΣ		
	<25	15
	>25	20
Στάδιο κατά		
Dukes	В	16
	С	19
TNM		
	П	16
	III	19
Τοποθεσία του		
Όγκου	Ορθό	16
	Σιγμοειδές	15
	Αριστερό	
	κώλον	4

Κατά το χειρουργείο, με την αφαίρεση του όγκου συλλέχθηκαν δύο ξεχωριστά δείγματα, ένα από τον όγκο καθ' αυτό και ένα από φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο περίπου 10 cm μακρύτερα από το σημείο τομής. Και τα δύο δείγματα αυτά καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80° C μέχρι τον χρόνο μελέτης τους. Το υπόλοιπο εξαχθέν δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της κλασσικής βιοψίας.

4.2 Κυτταρικές σειρές

4.2.1 HT-29

Η κυτταρική σειρά ανθρωπίνου εντερικού αδενοκαρκινώματος ΗΤ-29 που χρησιμοποιήσαμε, είχε αρχικά απομονωθεί από πρωτογενή όγκο 44^{ης} Καυκάσιας θηλέως. Αρχικά τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη διαφόρων πτυχών των ανθρωπίνων καρκίνων, αυτό όμως που στην πορεία προσέλκυσε ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, ήταν η ικανότητα τους να εκφράζουν χαρακτηριστικά των ώριμων εντερικών κυττάρων, όπως τα εντεροκύτταρα και τα κύτταρα παραγωγής βλέννης.

Τα ΗΤ-29 χαρακτηρίζονται από μεγάλη κατανάλωση γλυκόζης στο θρεπτικό και βρέθηκε ότι η αντικατάσταση της γλυκόζης από την γαλακτόζη στο θρεπτικό υλικό επάγει την αναστρέψιμη εντεροκυτταρική διαφοροποίησή τους. Η ανακάλυψη αυτή στην ουσία καθιέρωσε αυτή την κυτταρική σειρά ως ένα μοναδικό μοντέλο μελέτης και των μοριακών μηχανισμών της εντερικής κυτταρικής διαφοροποίησης.

Οι παράγοντες που έχουν βρεθεί να εκκρίνονται από τα ΗΤ-29 στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων μεταβολίτες, κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες που είναι στοιχεία που επάγουν την κυτταρική ανάπτυξη.

4.2.2 Caco-2

Η κυτταρική σειρά Caco-2 (**Ca**ncer **co**li-2)απομονώθηκε την δεκαετία του 1970 από ανθρώπινο εντερικό αδενοκαρκίνωμα και το κυριότερο αρχικά χαρακτηριστικό της ήταν η αυτόματη διαφοροποίηση των κυττάρων σε συνθήκες πλήρωσης της επιφάνειας καλλιέργειας.

Τα κύτταρα αυτά μπορούν και εκφράζουν διάφορα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των εντεροκυττάρων του λεπτού εντέρου. Στην διάρκεια των 35+ ετών από την καθιέρωση τους τα κύτταρα αυτά βρίσκονται και χρησιμοποιούνται από πλήθος εργαστηρίων παγκοσμίως. Εξαιτίας των διαφορών στις συνθήκες καλλιέργειας τους αλλά και του συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ανακαλλιεργειών τους είναι συχνό φαινόμενο να αποκτάνε και να εκφράζουν κατά τόπους διαφορετικές ιδιότητες.

Παρ ότι τα Caco-2 έχουν βρεθεί να εκφράζουν πλήθος ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς που εκφράζονται και στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, έχει βρεθεί ότι το προφίλ έκφρασης των γονιδίων και των μεταγραφικών παραγόντων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες.

4.3 ΥΛΙΚΑ και ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

4.3.1 Ομογενοποίηση Ιστοτεμαχίων

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές ομογενοποίησεων:

- Mε TRIzol
- Με PBS 1% BSA

Το TRIzol είναι διάλυμα λύσης κυττάρων μέσω του οποίου είναι δυνατή η απομόνωση τόσο των πρωτεϊνικών όσο και των νουκλεϊκών παραγώγων της λύσης. Παρακάτω θα αναφερθούμε αναλυτικά στα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση των στοιχείων αυτών. Το διάλυμα TRIzol που χρησιμοποιήσαμε αποτελεί προϊόν του οίκου Invitrogen του Ηνωμένου Βασιλείου.

To Phosphate Buffered Saline (συντομογραφία PBS, σύσταση : 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂HPO₄ και 8,1 mM Na₂HPO₄ , pH 7,4 – 7,6) παράχθηκε από έτοιμα άνυδρα δισκία διάλυσης του οίκου Gibco Ηνωμένου Βασιλείου, Thermo Fisheer Scientfic, Cat No 18912014, καθένα από τα οποία διαλύθηκε σε 500 ml απεσταγμένου H₂O. Σε συγκέντρωση 1% (1gr ανα 100 ml διαλύματος PBS) προστέθηκε άνυδρη σε σκόνη αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) του οίκου Sigma-Aldrich, πλέον MERCK, Γερμανίας.

Η ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων έγινε με τον χειροκίνητο ομογενοποιητή του οίκου Wheaton Dounce του 1 ml, που κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Tissue Grinder 1mL, Cat No 06434.

Η διαδικασία ομογενοποίησης έγινε σε στείρες συνθήκες εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (hood) του οίκου Holten, Γερμανίας.

4.3.2 Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων και Πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από το διάλυμα με το TRIzol χρησιμοποιήθηκαν χλωροφόρμιο, ισοπροπανόλη και αιθανόλη του οίκου Sigma-Aldrich, Γερμανίας. Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε επιπλέον Guanidine Hydrochloride του ίδιου οίκου.

Όλες οι φυγοκεντρήσεις που χρειάστηκαν έγιναν στην φυγόκεντρο Robofuge 400R του οίκου Heraeus. Για την ανάδευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα vortex SA6 και SA2 του οίκου Staurt Scientific

Οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των οίκων Gilson και Nichiryo και τα ρύγχη του οίκου Kisker Γερμανίας.

Όπως και στην ομογενοποίηση η απόμονωση έγινε σε στείρες συνθήκες εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (hood) του οίκου Holten, Γερμανίας.

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων έγινε με το φωτόμετρο Spectrophotometer U-200 του οίκου Hitachi.

4.3.3 Western Blot

Η επιβεβαίωση της παρουσίας των χημειοκινών που θέλαμε να μελετήσουμε στα δείγματα έγινε μέσω της ανίχνευσης τους με την μέθοδο Western Blot Analysis.

Τα διαλύματα που χρειαστήκαμε είναι τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα αποτροπής πρωτεόλυσης και απενεργοποίησης ενζύμων
 (10 ml, -20° C)
 - 0,5 ml 1M Tris-HCl pH 8, Sigma-Aldich
 - 1 ml 10% NP40, μη- ιοντικό απορρυπαντικό, Sigma-Aldrich
 - 0,5ml 5% Sodium Deoxycholate, ιοντικό απορρυπαντικό, Sigma-Aldich
 - 0,75 ml 2M NaCl (αποτρέπει την δημιουργεία πρωτεϊνικων συσσωμάτων), Sigma-Aldrich
 - 40 μL 0,25 EDTA (απορροφά της ελεύθερες ρίζες αδρανοποιόντας τα
 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ εξαρτώμενα ένζυμα), Sigma-Aldrich
 - 100 μL 100 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), διαλυμένο σε ισοπροπανόλη, ετοιμάζεται μόνο πριν την χρήση καθώς σε υδατικά διαλύματα είναι ασταθές (T_{1/2} = 30 min), Sigma-Aldrich
 - 1 ml Aprotinin, προερχόμενο από διάλυση 10x (2-5 μg/ml),
 αποθηκεύεται στους -20° C, αναστολέας τρυψίνης, Sigma-Aldrich
- Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης, σε 1 lt απεσταγμένο Η₂Ο προστίθονται:
 - 30 gr Tris-HCl, Sigma-Aldrich
 - 144 gr Glycine, Sigma-Aldrich
 - 10 gr SDS, Sigma-Aldrich
- Διάλυμα διάλυσης δείγματος (-20° C)
 - 0,27 ml απεσταγμένο H₂O
 - 1,6 ml Glycerol, Sigma-Aldrich
 - 1,6 ml 20% SDS, Sigma-Aldrich

- 1 ml 1M Tris-HCl pH 6,8
- 1 ml β-μερκαπτοαιθανόλη, Gibco
- 0,005% w/v (2,375 mg) bromophenol blue, Sigma-Aldrich
- Διάλυμα βαφής Coomasie blue 1 lt
 - 1 gr Coomasieblue R250, Thermo Fisher Scientific
 - 400 ml Μεθανόλη
 - 100 ml Ακετικό οξύ

Η αποθήκευση του διαλύματος αυτού γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου

- Διάλυμα απομάκρυνσης βαφής
 - 400ml Μεθανόλης
 - 100 ml Ακετικό οξύ
- Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών στην μεμβράνη 5x
 - 30,285 gr Tris HCl
 - 142,6 gr Glycine
 - 5 gr SDS

Το διάλυμα αυτό αποθηκεύεται στους 4° C μέχρι την στιγμή της χρήσης του οπότε και διαλύεται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο αναλυτικό πρωτόκολλο της μεθόδου παρακάτω

- Διάλυμα Μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων TBST 10x
 - 200 ml 1M Tris-HCl pH 7,5
 - 87,4 gr NaCl

30 ml Tween-20, απορρυπαντικό, Riedel-de Haën

Το διάλυμα αυτό παράγεται σε αυξημένη συγκέντρωση 10x και χρησιμοποιείται σε διάλυση 1:10 για την παρασκευή του τελικού διαλύματος μπλοκαρίσματος λίγο πριν την χρήση του σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο αναλυτικό πρωτόκολλο της μεθόδου παρακάτω.

Η ακρυλαμίδη και τα συστατικά APS και TEMED που χρειάζονται για τον πολυμερισμό της και την παρασκευή του τελικού gel είναι όλα προϊόντα του οίκου BIORAD. Από τον ίδιο οίκο προμηθευτήκαμε την συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης καθώς επίσης και τις μεμβράνες ανοσοαποτύπωσης Immun-Blot PVDF Membrane. Τα πλαστικά χτένια (1,5 mm) για τον σχηματισμό των πηγαδιών στο gel ακρυλαμίδης καθώς και η γυάλινη φόρμα πήξης και σχηματισμού της προήλθαν από τον ίδιο οίκο. Το χρωμογόνο που χρησιμοποιήσαμε για την αποτύπωση του σήματος στο φιλμ είναι το SuperSignal west pico Substrate του οίκου ThermoScientific και το φιλμ είναι της Fujifilm.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε για τις 4 αυτές χημειοκίνες είναι του οίκου μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι των ανθρωπίνων αυτών πρωτεϊνών και είναι όλα του οίκου R&D Ηνωμένου Βασιλείου.

Τέλος η τροφοδοσία ρεύματος για την ηλεκτροφόρηση γινόταν μέσω της συσκευής Electrophoresis power-supply του οίκου Pharmacia-Biotek.

4.3.4 Φωτομέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford Assay

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα ομογενοποιήματα των ιστών πριν την western-blot ανάλυση έγινε με την μέθοδο Bradford. Για την μέθοδο αυτή

χρησιμοποιήθηκε Bovine Serum Albumin του οίκου Sigma-Aldrich για την παρασκευή των standards συγκέντρωσης για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο Bradford Protein Assay του οίκο BIORAD για την διάλυση των αγνώστου συγκέντρωσης δειγμάτων. Η φωτομέτρηση των έγινε στο Elisa Microplate Reader του οίκου BIOTEK. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων με την μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής ποσότητας που θα χρησιμοποιούσμα για την ανάλυση Western-Blot.

4.3.5 Καλλιέργειες Κυττάρων

Για τις καλλιέργειες των κυττάρων των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες των 5 και 25 cm² του οίκου NUNC Δανίας καθώς και πλάκες καλλιέργειας 6 βοθρίων (επιφάνειας 9,6 cm²) του ίδιου οίκου. Οι φλάσκες που χρησιμοποιήσαμε ήταν όλες με φίλτρο πόρων 0,25 μm στο πώμα ώστε να επιτυγχάνεται αποτελεσματική κυκλοφορία του αέρα αποτρέποντας παράλληλα τον κίνδυνο μόλυνσης. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα: McCoy's, MEM, RPMI και HBSS και είναι όλα του οίκου GIBCO. Το θρεπτικό υλικό McCoy's χρησιμοποιούταν για την κυτταρική σειρά HT-29 ενώ το MEM για την CaCO-2. Το θρεπτικό υλικό HBSS χρησιμοποιούνταν σε δύο μορφές που χαρακτηρίζονταν από την παρουσία ή απουσία ιόντων Ca⁺⁺ και Mm⁺⁺. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούσαμε ήταν εμπλουτισμένα με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100mg/mI), στρεπτομυκίνη (100mg/mI) και αμφοτερικίνη B (2,5 mg/mI). Τόσο ο ορός FBS όσο και τα αντιβιοτικά ήταν όλα προϊόντα του οίκου Gibco, όπως και το διάλυμα θρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε για την αποκόλληση των κυττάρων και την ανακαλλιέργεια τους σε νέα φλάσκα με μικρότερη κυτταρική συγκέντρωση. Οι αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες όγκου 15 και 50 ml τύπου falcon, ήταν προϊόντα της Eppendorf Γερμανίας όπως και τα πλαστικά σωληνάρια όγκου 1,5 και 0,5 ml. Οι ορολογικές πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταφορά υγρών ήταν όγκου 1,5, 5, 10 και 50 ml και ήταν όλες προϊόντα του οίκου Sarstedt.

Ο υπολογισμός της πυκνότητας των κυττάρων γινόταν με πλάκα Neu-Bauer του οίκου BRAND.

Οι καλλιέργειες συντηρούταν στον κλίβανο CO₂ Incubator της Thermo Scientific και όλες οι ενέργειες στις καλλιέργειες γίνονταν σε στείρες συνθήκες εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (hood) του οίκου Holten, Γερμανίας.

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικού τύπου μικροσκόπια. Το ανάστροφο μικροσκόπιο για την μέτρηση των κυττάρων στην πλάκα Neu-Bauer και το φωτονικό μικροσκόπιο για την παρατήρηση των καλλιεργειών εντός των φλασκών. Το μεν πρώτο είναι προϊόν του οίκου Leica Microsystems Γερμανία και το δεύτερο την εταιρίας Nikon Ιαπωνίας.

4.3.6 Συστήματα ψύξης

Ο οριζόντιος καταψύκτης θερμοκρασίας -20° C της De' Longhi Ιταλίας και ο καταψύκτης βαθείας ψύξης θερμοκρασίας -80° C της εταιρίας Jouan ΗΠΑ. Οι κυτταρικές σειρές φυλάσσονταν σε υγρό άζωτο σε δεξαμενές του οίκου Taylor Wharton. Τέλος για την ηλεκτρόφορηση σε συνθήκες 4° C που χρειάστηκε για την Western Blot χρησιμοποιήθηκε ο θάλαμος ψυγείου του αιματολογικού εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης

4.3.7Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

Όλες οι μετρήσεις συγκέντρωσης των χημειοκινών της διατριβής έγιναν σε ομογενοποιήματα ιστών και υπερκείμενα καλλιεργειών. Για τις μετρήσεις αυτές το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν για την ανοσοενζυμική μέθοδο. Σε καμία από τις μετρήσεις δεν χρησιμοποιήθηκε έτοιμο προς χρήση kit για την ουσία που μελετούσαμε. Οι πλάκες 96 βοθρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Nunc. Σε κάθε πρωτόκολλο (παρακάτω θα ακολουθήσει αναλυτική περιγραφή του κάθε πρωτοκόλλου) χρησιμοποιήθηκε αρχικά σαν πρωτεύον αντίσωμα ένα μονοκλωνικό μη-συζευγμένο αντίσωμα ποντικού έναντι της ανθρώπινης μορφής της χημειοκίνης που μελετούσαμε. Τα τέσσερα αντισώματα που χρειαστήκαμε ήταν όλα του οίκου R&D Ηνωμένου Βασιλείου. Παράλληλα με το πρωτεύον χρησιμοποιήθηκε και δεύτερο αντίσωμα για κάθε μόριο, αυτή την φορά βιοτυνιλιωμένο. Από τον ίδιο οίκο προήλθε και η δεύτερη αυτή σειρά αντισωμάτων. Η στρεπταβιδίνη, το χρωμογόνο διάλυμα (Conjugate Solution) και το διάλυμα τερματισμού της ενζυμικής δράσης (Stop Solution) ήταν όλα προϊόντα επίσης του εν λόγω οίκου. Για την παρασκευή των διαλυμάτων πλύσης και των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν ταμπλέτες PBS του οίκου Gibco, BSA του οίκου Sigma-Aldrich και απορρυπαντικό Tween-20 του οίκου Riedel-de Haën. Τα πλυσίματα έγιναν με το αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για πλάκες 96 βοθρίων του οίκου BioTek Instruments Γερμανίας. Από το ίδιο οίκο προερχόταν και το φωτόμετρο έντασης μονοχρωματικού φωτός που χρησιμοποιήθηκε και στο οποίο είχαν τοποθετηθεί τα φίλτρα για την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm (Ανοσοενζυμική μέθοδος) και 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς).

4.3.8 Φωτομέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο BCA

Για τον υπολογισμό της ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα των ιστοτεμαχίων για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοενζυμικής μεθόδου (ElISA) χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο BCA. Για την μέθοδο αυτή χρησιμοποιήσαμε το έτοιμο kit του οίκου ThermoFisher Scientific καθώς και BSA του οίκου Sigma-Aldich για την δημιουργία των δειγμάτων κλιμακωτής γνωστής συγκέντρωσης. Για την εκτέλεση της μεθόδου ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή για την μέτρηση σε πλάκες των 96 βοθρίων και η φωτομέτρηση έγινε στο Elisa Microplate Reader του οίκου BIOTEK.

4.4 Μέθοδοι

4.4.1 Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

Όλα τα δείγματα: καρκινικά και φυσιολογικά αφαιρέθηκαν επεμβατικά από τους ασθενείς. Τα δύο πρώτα αφαιρέθηκαν κατά την διάρκεια χειρουργείων αφαίρεσης του όγκου και προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή με τον φυσιολογικό ιστό να προέρχεται από περιοχή λήψης μακρύτερα κατά 10 cm της περιοχής του όγκου. Τα δείγματα απ' ευθείας από την λήψη τους τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και ακολούθως μεταφέρθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες βαθείας ψύξης στους -80° C έως το στάδιο της ομογενοποίησης και τις περαιτέρω επεξεργασίας τους.

4.4.2 Ομογενοποίηση Ιστοτεμαχίων

Η ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων έγινε σε στείρες συνθήκες εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής. Προκειμένου να προχωρήσουμε στην ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων είχε προηγηθεί καθαρισμός και απολύμανση τόσο του θαλάμου Hood όσο και του ομογενοποιητή. Προκειμένου να εμποδίσουμε την πρωτεόλυση από τις πρωτεάσες που βρίσκονται φυσιολογικά στον ιστό είναι απαραίτητο η διαδικασία της ομογενοποίησης να γίνει σε πάγο οπότε και το δείγμα στην διάρκειά της θα διατηρεί μία θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη των 4° C, μειώνοντας έως και καταστέλλοντας την ενεργότητα των εν λόγω ενζύμων. Μόλις ήμαστε έτοιμοι να προχωρήσουμε στην ομογενοποίηση του ιστοτεμαχίου τότε αφαιρούμε το δείγμα από τον καταψύκτη των -80° C και το τοποθετούμε άμεσα στο φιαλίδιο του ομογενοποιητή, το οποίο ήδη βρίσκεται στον πάγο. Μόλις τοποθετήσουμε το δείγμα εκεί προσθέτουμε 1 ml με το υλικό της ομογενοποίησης (TRIzol ή PBS με 1% BSA) το οποίο βρίσκεται στους 4° C. Μόλις επέλθει η ομογενοποίηση με αποστειρωμένη πιπέτα τύπου Pasteur μεταφέρουμε το ομογενοποίημα σε αποστειρωμένο σωληνάριο 1,5 ml τύπου Eppendorf. Αν η ομογενοποίηση έχει γίνει με διάλυμα PBS για να χρησιμοποιηθεί σε ELISA το δείγμα μεταφέρεται άμεσα στους -80° C. Αν έχουμε χρησιμοποιήσει TRIzol φυγοκεντρούμε το ομογενοποίημα στα 12000 g για 10 λεπτά στους 4° C, μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση που περιέχει το γενετικό υλικό του δείγματος (RNA και DNA) σε καινούριο σωληνάριο και αποθηκεύουμε τα δύο αυτά σωληνάρια στους -80° C μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε για να απομονώσουμε από την υπερκείμενη υδατική φάση το γενετικό υλικό και απ την υπόλοιπη το πρωτεϊνικό φορτίο του δείγματος.

4.4.3 Απομόνωση πρωτεϊνών από το ομογενοποίημα με TRIzol.

Αφαιρούμε το σωληνάριο που περιέχει την υπολειπόμενη φαινολο-αιθανολική φάση της πρώτης φυγοκέντρησης και αφήνουμε να ξεπαγώσει. Αφού έρθει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου προσθέτουμε ισοπροπανόλη σε αναλογία 1,5 mL για κάθε 1 mL αρχικού όγκου TRIzol που χρησιμοποιήσαμε κατά την ομογενοποίηση. Στο δικό μας πρωτόκολλο βάσει της αρχικής μας ποσότητα αντιστοιχεί 1,5 mL ισοπροπανόλης. Μετά την προσθήκη της ισοπροπανόλης αφήνουμε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Με το πέρας των 10 λεπτών το δείγμα φυγοκεντρείται στα 12000 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Στην διάρκεια της φυγοκέντρησης φτιάχνουμε το διάλυμα πλύσης της πελέτας το οποίο αποτελείται από 0,3 M υδροχλωρικής γουανιδίνης διαλυμένο σε 95% αιθανόλη.

Μετά την φυγοκέντριση αφαιρούμε το υπερκείμενο κρατώντας την σχηματισμένη πελέτα η οποία και περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών του αρχικού ιστοτεμαχίου. Την σχηματισμένη πελέτα την αναδιαλύουμε στο διάλυμα πλύσης που έχουμε προετοιμάσει με αναλογία 2 mL διαλύματος ανά 1 mL TRIzol που έχουμε χρησιμοποιήσει. Αφού αναδιαλύσουμε την πελέτα αφήνουμε το διάλυμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εναλλακτικά μπορούμε στο σημείο αυτό να διακόψουμε το πρωτόκολλο και να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους -20° C μέχρι να τα επεξεργαστούμε εκ νέου. Αφού παρέλθει το 20λεπτά στους 4° C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο επαναλαμβάνοντας το στάδιο της πλύσης για δύο επιπλέον φορές. Μετά το πέρα της τρίτης πλύσης προσθέτουμε στο σωληνάριο με

την πελέτα 2 mL καθαρής αιθανόλης 100% και ανακατεύουμε το δείγμα με την χρήση του αναδευτήρα Vortex για μικρό χρονικό διάστημα.

Μετά την προσθήκη της αιθανόλης φυγοκεντρούμε το δείγμα στα 7500 x g για 5 λεπτά στους 4° C. Μετά την φυγοκέντρηση αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει στον αέρα ώστε να απομακρυνθεί τυχόν αιθανόλη που έχει παραμείνει στο σωληνάριο. Αφού στεγνώσουν τα δείγματα προσθέτουμε 200 μL διαλύματος 8Μ ουρίας με 0,1 % SDS και αναδιαλύουμε αναδεύοντας το δείγμα με την πιπέτα. Το συγκεκριμένο διαλυτικό διάλυμα ΔΕΝ χρειάζεται θέρμανση στους 50° C όπως τα συνήθη διαλύματα με σκέτο SDS 1%, αλλά αντίθετα η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους 25° C. Αφού διαλυθεί η πελέτα τα δείγματα είτε αποθηκεύονται στους -80° C έως ότου τα χρησιμοποιήσουμε για να φωτομετρήσουμε την συγκέντρωση της πρωτεΐνης και να τρέξουμε την Western-Blot ανάλυση για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν είτε προχωράμε άμεσα στην περαιτέρω ανάλυση τους. Στο δικό μας πρωτόκολλο για να αποφύγουμε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης και απόψυξης των δειγμάτων, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στα δείγματα η φωτομέτρηση για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά το τέλος της απομόνωσης.

4.4.4 Western Blot

Προτού προχωρήσουμε στην ποσοτικοποίηση των χημειοκινών που θα μετρήσουμε τρέξαμε σε μία σειρά δειγμάτων Western-blot analysis για τις χημειοκίνες αυτές ώστε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη τους στα δείγματα μας. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για την μέθοδο προερχόταν από την Biorad όπως και τα περισσότερα εκ των υλικών και αναλωσίμων. Στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης πρέπει να γίνει η σύνθεση της γέλης Ακρυλαμίδης. Η πυκνότητα και η σύσταση του υπολογίζονται βάσει του μεγέθους της πρωτεΐνης που θέλουμε να αποτυπώσουμε πάνω στην μεμβράνη με σκοπό την τελική της ανίχνευση. Τα μεγέθη των τεσσάρων χημειοκινών που ασχοληθήκαμε ήταν:

- CXCL8: 8 kDa
- CXCL4: 7,8 kDa
- CXCL6: 8 kDa
- VEGF: 19-21 kDa

Τα μεγέθη και των τεσσάρων αυτών πρωτεϊνών είναι εντός του εύρους έως 30 kDa οπότε και η σύσταση του διαλύματος μας είναι στο 12%. Η γέλη ακρυλαμίδης συντίθεται από δυο άλλα διαφορετικά είδη γέλης, το τρεξίματος (Running Gel) και το απόθεσης (Stacking Gel), με το πρώτο να τοποθετείται καθοδικά του δεύτερου εντός της συσκευής σχηματισμού της γέλης.

4.4.4.1 Κατασκευή γέλης ακρυλαμίδης

Προτού προχωρήσουμε στον σχηματισμό των δύο αυτών γελών συνθέσαμε αρχικά την μονάδα σύνθεσης (Casting Gel Unit) εντός την οποία θα τοποθετηθούν τα δύο διαλύματα ώστε να πολυμεριστούν σχηματίζοντας την τελική μας γέλη. Σημαντική λεπτομέρεια κατά τον σχηματισμό της μονάδας σύνθεσης είναι η υποχρεωτική εργασία μας με γάντια τόσο για την τοξική φύση της ακρυλαμίδης όσο και γιατί οποιαδήποτε ξένη ουσία βρεθεί στην μονάδα μπορεί να αναστείλει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Για αυτό τον λόγο είναι και απαραίτητος ο πολύ καλός καθαρισμός των γυαλιών της μονάδας με αιθανόλη 70% και πολύ καλό στέγνωμα τους. Για την σύνθεση του διαλύματος τρεξίματος σε τελικό όγκο 5mL χρησιμοποιήσαμε 1,9mL απεσταγμένο νερό, 1,7 mL διάλυμα ακρυλαμίδης 30%, 1,3 mL ρυθμιστικό διάλυμα 1,5M Tris (pH 8,8), 50 μL 10% SDS και τέλος 2 μL TEMED. Το τελευταίο συστατικό καθώς είναι και ο καταλύτης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης είναι απαραίτητο να τοποθετείται τελευταίο και αμέσως μόλις προστεθεί το υγρό διάλυμα να τοποθετηθεί άμεσα στην μονάδα σχηματισμού. Τυχόν καθυστέρηση στην τοποθέτηση του διαλύματος στην μονάδα μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη του πολυμερισμού πριν την τοποθέτηση του gel και συνεπακόλουθα τον σχηματισμό φυσαλίδων αέρα οι οποίες θα αποτρέψουν την ομαλή ηλεκτρόφορηση καθώς είναι κακοί αγωγοί του ηλεκτρισμού. Αφού τοποθετήσουμε το διάλυμα στην μονάδα ελέγχουμε αν υπάρχουν τυχόν διαρροές του διαλύματος και τοποθετούμε στην ελεύθερη επιφάνεια του μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης, αποτρέποντας την επαφή με τον αέρα μέχρι να τοποθετήσουμε το διάλυμα απόθεσης.

Εφόσον έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς η τοποθέτηση του διαλύματος τρεξίματος προχωράμε άμεσα στην σύνθεση 2mL του διαλύματος απόθεσης σε συγκέντρωση 5%. Για τον σχηματισμό χρησιμοποιήσαμε 1,4 mL απεσταγμένο νερό, 330 μL 30% διάλυμα ακρυλαμίδης, 250 μL ρυθμιστικό διάλυμα 1M Tris (pH 6,8), 20 μL 10% SDS, 20 μL θειούχα αμμωνία (ammonium persulfate) και τέλος 2 μL TEMED το οποίο όπως και στο διάλυμα τρεξίματος τοποθετείται τελευταίο. Μόλις προσθέσουμε και το TEMED τοποθετούμε το διάλυμα απόθεσης στην μονάδα σύνθεσης της γέλης και ακολούθως πριν πήξει τοποθετούμε και το χτένι (πλάτους 1,5 mm) για τον σχηματισμό των βοθρίων απόθεσης των δειγμάτων. Κατόπιν αφήνουμε το διάλυμα να πήξει για 15 λεπτά και προετοιμάζουμε τα δείγματα που θέλουμε να αναλύσουμε.

4.4.4.2 Προετοιμασία και ηλεκτροφόρηση Δειγμάτων

Αρχικά αφαιρούμε τα δείγματα από την κατάψυξη, εφ΄ όσον η απομόνωση των πρωτεϊνών έχει λάβει χώρα σε προγενέστερο χρόνο. Για την ηλεκτροφόρηση θα χρειαστούμε 50 μg ολικής πρωτεΐνης οπότε και βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης υπολογίζουμε τον όγκο που θα χρησιμοποιήσουμε από το αρχικό διάλυμα που έχουμε από την απομόνωση. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι 15 μL, τα 7,5 μL των οποίων είναι 2x διάλυμα διάλυσης δείγματος ηλεκτροφόρησης ώστε στον τελικό όγκο να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση. Για τα υπολειπόμενα μL χρησιμοποιούμε τον όγκο που έχουμε υπολογίσει και πληρώνουμε μέχρι τον τελικό όγκο των 7,5 μL με το διάλυμα διάλυσης πρωτεΐνης που έχουμε χρησιμοποιήσει κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών. Αν ο όγκος που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε υπερβαίνει τα 7,5 μL τότε υποχρεωτικά ηλεκτροφορούμε ποσότητα μικρότερη των 50 μg πρωτεΐνης.

Παράλληλα παρασκευάζουμε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης με το οποίο πληρώνουμε την δεξαμενή ηλεκτροφόρησης καθώς και το κάτω μέρος της μονάδας τοποθέτησης του gel. Μόλις ήμαστε έτοιμοι και εφ' όσον έχει ολοκληρωθεί η προετοιμασία των δειγμάτων προχωράμε στην φόρτωση τους στο αντίστοιχο βοθρίο της γέλης προσέχοντας να μην υπερχειλίσουμε τον διαθέσιμο όγκο.

Στην συνέχεια τοποθετούμε το καπάκι στην δεξαμενή ηλεκτροφόρησης κλείνοντας το κύκλωμα για την δημιουργία τάσης και την συνδέουμε με την συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε να εκκινήσει η διαδικασία. Για όση ώρα οι πρωτεϊνικά

141

διαλύματα βρίσκονται στην γέλη απόθεσης ηλεκτροφορούμε στα 80-100 V και μόλις περάσουν στην γέλη τρεξίματος και διαχωρισμού στα 200 V για περίπου 2 με 2,5 ώρες.

4.4.4.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Πριν προχωρήσουμε στην ηλεκτροφόρηση για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης παρασκευάζουμε το διάλυμα μετακίνησης (Transfer Buffer). Η παρασκευή αυτή γίνεται προσθέτοντας την απαιτούμενη ποσότητα μεθανόλης στο stock διάλυμα που διαθέτουμε. Η διάλυση αυτή γίνεται πάντα αμέσως πριν την χρησιμοποίηση του τελικού διαλύματος ώστε να χρησιμοποιούμε πάντα φρέσκο τελικό διάλυμα.

Κατόπιν κόβουμε στις διαστάσεις της γέλης ηλεκτροφόρησής μας δύο κομμάτια χαρτί Whatmann που διαθέτει πόρους των 0,45 μm και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που επίσης διαθέτει τους ίδιους πόρους. Στην μεμβράνη στην μία γωνία σημειώνουμε με ανεξίτηλο μαρκαδόρο ώστε με το πέρας της διαδικασίας να γνωρίζουμε την πλευρά στην οποία έχει γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών.

Στην συνέχεις προχωράμε στην σύνθεση της ακολουθίας μεταφοράς όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Πηγή εικόνας: http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html

Τοποθετούμε ανοιχτή την κασέτα εντός του δοχείου με το διάλυμα μεταφορά προσέχοντας να καλύπτεται εξολοκλήρου από το διάλυμα μετακίνησης. Το διάλυμα μεταφοράς σε όλη την διάρκεια της διαδικασία πρέπει να διατηρεί θερμοκρασία περίπου 4° C για την αποτελεσματική μεταφορά των πρωτεϊνών. Παράλληλα σε παραπλήσιο δοχείο διατηρούμε μικρή επιπλέον ποσότητα διαλύματος ώστε να εμβαπτίζουμε τα επιμέρους στοιχεία της κατασκευή μας προτού τα τοποθετήσουμε στην κασέτα.

Στην καθοδική πλευρά της κασέτα τοποθετούμε αρχικά το ειδικό φίλτρο ηλεκτροφόρησης, σφουγγαράκι, και αμέσως από πάνω το πρώτο εκ των δύο χαρτιών Whatmann. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει και τα δύο αυτά στοιχεία προτού τα τοποθετήσουμε φροντίζουμε να έχουν περάσει απ' το δοχείο με το διάλυμα μετακίνησης. Αυτό γίνεται ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας που περιέχεται και στα δύο αυτά συστατικά και θα μας εμποδίσει την σωστή εφαρμογή της ηλεκτρικής τάσης. Στο επόμενο στάδιο πρέπει να τοποθετήσουμε την μεμβράνη της ηλεκτροφόρησης. Αρχικά απομακρύνουμε την μονάδα τοποθέτησης της γέλης από την δεξαμενή ηλεκτροφόρης και την τοποθετούμε στο δοχείο με το διάλυμα μετακίνησης. Εκεί ξεσφίγγουμε τα clips που διατηρούν τη σταθερότητα της κατασκευής και απομακρύνουμε τα τζαμάκια εντός των οποίων βρίσκεται η γέλη ηλεκτροφόρησης. Πολύ προσεκτικά και πάντα εντός του διαλύματος ώστε να μην στεγνώσει η γέλη απομακρύνουμε το ένα απ' τα δύο τζαμάκια. Με την ειδική σπάτουλα κατόπιν κόβουμε και απομακρύνουμε την γέλη απόθεσης κρατώντας μόνο το κομμάτι με την γέλη ηλεκτροφόρησης εντός του οποίου βρίσκονται οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το κομμάτι αυτό της γέλης το μεταφέρουμε άμεσα και προσεκτικά για να μην σπάσει πάνω στο χαρτί Whatmann που βρίσκεται στην κασέτα μεταφοράς. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η γέλη και σ αυτό το στάδιο φροντίζουμε να παραμένει σκεπασμένη από το διάλυμα μεταφοράς. Αμέσως πάνω από την γέλη και με τις τέσσερις πλευρές να εφαρμόζουν τοποθετούμε την μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης κυλάμε με προσοχή πάνω στην δεύτερη ένα μαγνητάκι ανάδευσης ή ένα ρύγχος πιπέτας ώστε να απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες αέρα που έχουν εγκλωβιστεί ανάμεσα στα δύο αυτά συστατικά. Στο σημείο αυτό επιπλέον σημειώνουμε τον προσανατολισμό του μαρκαρισμένου μέρους της ώστε να γνωρίζουμε στο τέλος της διαδικασίας την πλευρά στην οποία έχει γίνει η μετακίνηση των πρωτεϊνών. Αμέσως πάνω από την μεμβράνη με την διαδικασία που έχουμε ήδη περιγράψει τοποθετούμε πρώτα το δεύτερο χαρτί Whatmann και κατόπιν το ειδικό σφουγγαράκι. Στο τέλος της διαδικασίας κλείνουμε την κασέτα και την τοποθετούμε στην δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.
Η ηλεκτροφόρηση αυτή γίνεται σε κρυοθάλαμο 4° C καθώς καθ' όλη την διάρκεια της πρέπει να διατηρείται χαμηλή θερμοκρασία στα διαλύματα ηλεκτροφόρησης. Εναλλακτικά όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος κρυοθάλαμος εκτός της κασέτας ηλεκτροφόρησης στην δεξαμενή τοποθετούμε και παγοκύστη η οποία με την βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μπορεί να διατηρήσει χαμηλή θερμοκρασία στα διαλύματα για όλη την διάρκεια της μεταφοράς. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ορίζονται στα 350mA για 1 ώρα με μέγιστη τάση τα 90-100 Volts.

4.4.4 Πλύσιμο και σήμανση της μεμβράνης

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης στους απαιτούμενους χρόνους αφαιρούμε την κασέτα από την δεξαμενή ηλεκτροφόρησης και την λύουμε. Αφαιρούμε από εκεί την μεμβράνη η οποία πλέον περιέχει το πρωτεϊνικό φορτίο που μας ενδιαφέρει και την τοποθετούμε σε τριβλίο το οποίο περιέχει διάλυμα Ponceau. Μ αυτό τον τρόπο μπορούμε να ελέγξουμε αν έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών πάνω στην μεμβράνη. Αφήνουμε την μεμβράνη στο εν λόγω διάλυμα να αναδεύεται για 5-10 λεπτά. Με το πέρας το χρόνου αυτού πραγματοποιούμε μερικά πλυσίματα της μεμβράνης με το διάλυμα TBST για να αφαιρεθεί κάποια ανεπιθύμητο πρωτεϊνικό υπόβαθρο που έχει μεταφερθεί προσέχοντας όμως να μην απομακρύνουμε και την πρωτεϊνη που μας ενδιαφέρει απ' το υπερβολικό πλύσιμο.

Με το πέρα των πλυσιμάτων επωάζουμε την μεμβράνη σε διάλυμα μπλοκαρίσματος τυχόν μη ειδικών αντισωμάτων που έχουν μεταφερθεί στην μεμβράνη. Για το μπλοκάρισμα αυτό επωάζουμε την μεμβράνη σε αναδευτήρα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 1x TBST που περιέχει 5% γάλα σε σκόνη χωρίς λιπαρά. Με το πέρας του χρόνου αυτού ξεπλένουμε την μεμβράνη 3 φορές για 5 λεπτά σε αναδευτήρα με 1x TBST διάλυμα.

Μετά τα τρία αυτά πλυσίματα επωάζουμε την μεμβράνη μας με το πρωτογενές αντίσωμα για την χημειοκίνη που μας ενδιαφέρει για περίπου μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήσαμε ήταν για τη CXCL8 2 μg/mL, για την CXCL4 1 μg/mL, για την CXCL6 2 μg/mL και για τον VEGF 2 μg/mL. Η διάλυση των αντισωμάτων έγινε σε διάλυμα PBS στο οποίο είχαμε προσθέσει 0,02% NaN₃, το οποίο μας επέτρεπε να διατηρούμε το διάλυμα στους 4° C και να μπορεί κάθε ένα από τα διαλύματα αυτά να χρησιμοποιηθεί περισσότερες της μίας φορές. Εναλλακτικά η επώαση αυτή μπορεί να γίνει και σε συνθήκες οvernight στους 4° C όμως στην πειραματική εφαρμογή της παραλλαγής αυτής μας εμφανίστηκε περισσότερο background και έτσι δεν την συνιστούμε.

Με το πέρας της επώασης αυτής πλένουμε εκ νέου την μεμβράνη 4 φορές για 10-15 λεπτά σε 1x TBST σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανάδευση.

Με το πέρας των πλυσίματων αυτών επωάζουμε με το δευτερογενές αντίσωμα. Εν αντιθέσει με την προηγούμενη διαδικασία εδώ επώαση και μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων συμβαίνει συγχρόνως καθώς το αντίσωμα διαλύεται σε 1x TBST με 1% γάλα σε σκόνη. Οι συγκεντρώσει που χρησιμοποιήσαμε ήταν για την CXCL8 0,2 μg/mL, για την CXCL4 0,2 μg/mL, για την CXCL6 0,2 μg/mL και για τον VEGF 2 μg/mL. Τα διαλύματα αυτά των αντισωμάτων απορρίπτονται καθώς δεν είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίησή τους. Επαναλαμβάνουμε όπως και μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα το πλύσιμο της μεμβράνης για 4 φορές 10-15 λεπτά με 1x TBST σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφριά ανάδευση.

146

Στην διάρκεια του τελευταίου πλυσίματος αναμιγνύουμε 1 mL από κάθε διάλυμα τους χρωμογόνου kit Supersignal West Pico της Biorad και το οποίο αποθηκεύουμε προσωρινά στο σκοτάδι. Με το τέλος του τελευταίου πλυσίματος στεγνώνουμε την μεμβράνη ακουμπώντας την σε λίγο χαρτί χωρίς όμως να ξεραθεί. Τοποθετούμε την μεμβράνη σε καθαρό τριβλίο, με την μεριά των πρωτεϊνών πάντα προς τα πάνω και προσθέτουμε το έτοιμο πλέον χρωμογόνο. Επωάζουμε στο σκοτάδι για περίπου 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου στεγνώνουμε ελαφρά την μεμβράνη και την τοποθετούμε πάνω στο φιλμ εντός της κασέτα έκθεσης και αφήνουμε να επωαστεί αναλόγως της πρωτεΐνης για χρόνο 1-5 λεπτά. Ενδεικτικά οι χρόνοι επώασης στο πρωτόκολλο μας ήταν για την CXCL8 1 λεπτό, για την CXCL4 4 λεπτά, για την CXCL6 5 λεπτά και για τον VEGF 1 λεπτό. Με το πέρας του απαιτούμενου χρόνου αφαιρούμε τον φιλμ από την κασέτα και το τοποθετούμε στο μηχάνημα εμφάνισης απ' όπου έχουμε και την τελική εικόνα με το σήμα των πρωτεϊνών μας και την επιβεβαίωση της παρουσίας τους. Σημαντικό να αναφέρουμε ότι το τελευταίο αυτό στάδιο γίνεται σε συνθήκες σκότους και η μόνη πηγή φωτός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι οι ειδικές κόκκινες φωτογραφικές λάμπες.

4.4.5 Κυτταρικές καλλιέργειες

Για όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες επιφάνειας 75 cm² με φίλτρο πόρων 0,25 μm στο πώμα για την αποφυγή μολύνσεων. Οι συνθήκες επώασης των καλλιεργειών ήταν στους 37° C με 5% CO² και τα θρεπτικά υλικά ήταν για τα HT-29 το McCoys και για τα CaCo2 το MEM. Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν εμπλουτισμένα με 10% FBS και τον συνδυασμό των εξής αντιβιοτικών: πενικιλίνη (100 mg/mL), στρεπτομυκίνη (100μg/mL) και αμφοτερικίνη Β (2,5 mg/mL). Αλλαγή

θρεπτικού υλικού γινόταν μόλις υπήρχε σημαντική μεταβολή του pH της καλλιέργειας και η οποία εξαρτιόνταν από τον πληθυσμό και την πυκνότητα των κυττάρων της φλάσκας. Όταν η φλάσκα έφτανε σε ποσοστό 95% πληρότητας κάλυψης της επιφάνειας τότε προχωρούσαμε στην μετακίνηση τους σε νέα φλάσκα και την ανακαλλιέργεια τους σε μεγαλύτερη αραίωση.

Για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα αρχικά αφαιρούσαμε το υπάρχον θρεπτικό υλικό και κατόπιν πραγματοποιούνταν 2 σύντομες πλύσεις της φλάσκας με HBSS παρουσία αντιβιοτικών και απουσία ιόντων Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺. Το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητο ώστε να απομακρυνθούν τα εν λόγω ελεύθερα ιόντα από την καλλιέργεια και να μην υπάρχει κίνδυνος απενεργοποίησης του ενζύμου της θρυψίνης.

Μετά από τις πλύσεις αυτές τοποθετούνταν στην φλάσκα 3 mL ισότονο διάλυμα PBS που περιείχε το ένζυμο θρυψίνη, υπεύθυνο για την διάσπαση των κυτταρικών δεσμών και την αποκόλληση από την φλάσκα των κυττάρων, και τον χηλικό παράγοντα EDTA που μπορεί να δεσμεύσει τα ελεύθερα ιόντα. Η φλάσκα με την θρυψίνη κατόπιν επωάζονταν στους 37° C για 5-10 λεπτά. Η θρυψίνη ως ένζυμο μπορεί πρωτεολύει κάποιες εκ των πρωτεϊνών της επιφάνειας του κυττάρου, λύοντας κατ' αυτό τον τρόπο τόσο τις δια κυτταρικές συνδέσεις όσο και τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια της φλάσκας, απελευθερώνοντάς τα στο υπερκείμενο διάλυμα ως εναιώρημα πλέον. Με το πέρας του χρόνου αυτού προστίθονταν άμεσα στο διάλυμα θρυψίνης/EDTA σημαντικός όγκος θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με FBS το οποίο λόγω της μεγάλης του συγκέντρωσης σε ιόντα Ca και Mg⁺⁺ αδρανοποιούσε την θρυψίνη αποτρέποντας πιθανό κυτταρικό θάνατο λόγω διατήρησης των πρωτεολυτικών συνθηκών αυτών. Στην συνέχεια συλλέγουμε σε κωνικό σωληνάριο τύπου falcon των 50 mL το θρεπτικό υλικό και επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο της φλάσκας με το εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό και την συλλογή του 2-3 φορές ακόμα με σκοπό την συλλογή του συνόλου όσο είναι δυνατόν των κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα κατόπιν εντός των κωνικών φιαλιδίων φυγοκεντρούνταν στα 150 g για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρηση απορρίπταμε το υπερκείμενο και αναδιαλύαμε την σχηματισμένη κυτταρική πελέττα σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Η σχέση ανακαλλιέργειας ήταν 1: 3-5 για τα HT-29 και 1: 2 για τα CaCo2 και ο απαιτούμενος όγκος θρεπτικού υλικού για την πλήρωση μίας φλάσκας 75 cm² 15 mL. Με βάση τα δύο αυτά κριτήρια υπολογίζαμε κάθε φορά τον όγκο θρεπτικού υλικού που θα προσθέταμε για την αναδιάλυση της πελέττας.

4.4.6 Διεγέρσεις Κυτταρικών Καλλιεργειών

Τα πειράματα με τις κυτταρικές διεγέρσεις των ΗΤ-29 και CaCo2 έγιναν όλα αντί φλασκών σε πλάκες 6 βοθρίων επιφάνειας 9,6 cm². Η τοποθέτηση των κυττάρων στα εν λόγω βοθρία γινόταν κατά την ανακαλλιέργεια των φλασκών και χρησιμοποιούνταν σε κάθε μία καλλιέργεια 1,5 mL θρεπτικού υλικού. Μόλις τα κύτταρα έφθαναν σε πληρότητα 95% αντικαθιστούσαμε το εμπλουτισμένο θρεπτικό τους υλικό με το αντίστοιχο χωρίς FBS προκειμένου να απομονώσουμε την επίδραση που προκαλεί το FBS προτού προχωρήσουμε στις υπό εξέταση επιδράσεις. Μετά από 24 ώρες απομακρύναμε το εν λόγω θρεπτικό υλικό και το αντικαθιστούσαμε με το αντίστοιχο χωρίς FBS που περιείχε τις ουσίες επίδρασης που θέλαμε να μελετήσουμε. Στην δική μας πειραματική σειρά οι επιδράσεις που χρησιμοποιούσαμε ήταν 4 διαφορετικές και περιλάμβαναν:

- θρεπτικό υλικό και FBS
- θρεπτικό υλικό και ορό αίματος καρκινοπαθών
- θρεπτικό υλικό και ορό αίματος υγιών
- θρεπτικό υλικό χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη.

Στα καθορισμένα από πριν χρονικά σημεία (2, 4, 6, 12 και 24 ώρες) συλλέγαμε το υπερκείμενο και την κυτταρική στοιβάδα. Το υπερκείμενο (1,5 mL) συλλέγονταν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και φυλάσσονταν άμεσα στους -80° C προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των εκφραζόμενων χημειοκινών μέσω της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

Για την συλλογή της κυτταρικής στοιβάδας προσθέταμε 1 mL TRIzol σε κάθε βοθρίο αφού πρώτα είχαμε συλλέξει και φυλάξει το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό. Κατόπιν σκεπάζουμε την πλάκα με τις καλλιέργειες και αναδεύουμε ελαφρά έως ότου ομογενοποιηθεί το διάλυμα με το TRIzol και αποκολληθούν τα κύτταρα απ' τον πυθμένα. Κατόπιν με την χρήση μία πίπετας τύπου Pasteur ξεπλένουμε κάθε βοθρίο με το περιεχόμενο TRIzol ώστε να απομακρύνουμε το σύνολο των κυττάρων και μεταφέρουμε το διάλυμα αυτό σε καθαρά σωληνάρια τύπου Eppendorf και το αποθηκεύουμε στους -80° C έως ότου το χρησιμοποιήσουμε είτε για την απομόνωση του γενετικού φορτίου (DNA και RNA) είτε των πρωτεϊνών των κυττάρων.

4.4.7 Ανοσοενζυμική Μεθόδος ((Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

Μέσω της ανοσοενζυμικής μεθόδου προσδιορίσαμε την έκφραση των 4 χημειοκινών CXCL8, CXCL4, CXCL6 και VEGF τόσο σε υπερκείμενα καλλιεργειών όσο και ομογενοποιήματα ιστοτεμαχίων. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων και αντιδραστηρίων με βάσει τις προδιαγραφές του κάθε προμηθευτή. Οι μετρήσεις σ' όλες τις περιπτώσεις έγιναν σε διπλέτες. Οι γενικές αρχές των πρωτοκόλλων ELISA που σχεδιάσαμε και εφαρμόσαμε για τις μετρήσεις αυτές περιελάμβαναν τον σχηματισμό σε μοριακό επίπεδο ενός "ELISA sandwich" με την δραστική ουσία στο μέσο όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Πηγή εικόνας: https://www.lsbio.com/elisakits/human-acetylcholine-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f26688/26688

Αρχικά πλάκες των 96 βοθριών επωάζονταν overnight σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου με 100 μL ισότονου διαλύματος PBS που περιείχε την συνιστόμενη από τον κατασκευαστή συγκέντρωση πρωτεύοντος αντισώματος (αντίσωμα πρόσδεσης). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν: για την CXCL8 0,5 μg/ mL, για την CXCL4 2 μg/mL, για την CXCL6 0,5 μg/ mL και για τον VEGF 1 μg/ mL. Η επώαση αυτή επέτρεψε την εμπέδωση του πρωτεύοντος αντισώματος στον πυθμένα των βοθρίων. Με το πέρας της επώασης απομακρύναμε το διάλυμα του αντισώματος και πραγματοποιήσαμε πλύση των βοθρίων με 300 μL διαλύματος πλύσης (PBS με 0,05% Tween 20, pH 7,2-7,4). Σε κάθε στάδιο πραγματοποιούσαμε συνολικά 3 πλύσης με σκοπό την αποτελεσματική απομάκρυνση των αδέσμευτων και μη ειδικών ουσιών.Στην συνέχεια το κάθε βοθρίο επωάζονταν για μία ώρα σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου με 300 μL διάλυμα μπλοκαρίσματος (PBS με 1% BSA και 0,05% NaN₃) το οποίο δέσμευε όλες τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων. Με το πέρας της μία ώρας επαναλαμβάναμε το πλύσιμο των βοθρίων όπως περιγράψαμε και προηγουμένως για 3 φορές.

Στο επόμενο στάδιο προσθέταμε σε κάθε βοθρίο 100 μL του δείγματος (ομογενοιποίημα ιστοτεμαχίου ή υπερκείμενο καλλιεργειών) για το οποίο θέλαμε να ποσοτικοποιήσουμε την παραγωγή των χημειοκινών. Ο χρόνος επώασης για αυτό το στάδιο ήταν 2 ώρες και πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως και στα προηγούμενα στάδια με το πέρας των 2 ωρών απομακρύναμε το δείγμα από τα βοθρία και ξεπλέναμε 3 φορές με το διάλυμα πλύσης. Στην συνέχεια προσθέσαμε σε κάθε βοθρίο 100 μL διαλύματος (TBS με 0,1% BSA και 0,05% Tween 20) που περιείχε το δευτερεύον αντίσωμα (αντίσωμα ανίχνευσης) στις συγκεντρώσεις που σύστηνε ο κατασκευαστής και το οποίο σ' όλες τις περιπτώσεις ήταν συζευγμένο με ένα μόριο βιοτίνης. Οι συγκεντρώσεις με τις οποίες εργαστήκαμε ήταν: για την CXCL8 0,2 μg/mL,για την CXCL4 100 ng/mL, για την CXCL6 100 ng/mL και για τον VEGF 0,4 μg/mL. Η επώαση αυτή έγινε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και με το πέρας της ξεπλύναμε τα βοθρία με την μεθοδολογία που έχουμε ήδη περιγράψει. Η βιοτίνη που ήταν συζευγμένη στο δευτερογενές αντίσωμα μας εξασφάλιζε μία ειδική θέση πρόσδεσης για την στρεπταβιδίνη η οποία ήταν συζευγμένη με ένα μόριο ενζύμου Horeradish υπεροξειδάση (Horseradish peroxidase, HRP). Για την σύζευξη βιοτίνης-στρεπταβιδίνης απαιτούνταν όγκος 100 μL διαλύματος της δεύτερης και χρόνος 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας του χρόνου αυτού επαναλαμβάναμε το πλύσιμο όπως έχει ήδη περιγραφεί.

Στο επόμενο βήμα προσθέταμε 100 μL διαλύματος τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) και H₂O₂ (τα δύο αυτά συστατικά αποτελούν υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και περιέχονταν σε αναλογία 1:1 στο τελικό διάλυμα). Αφήναμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και το χρώμα του διαλύματος μεταβαλλόταν από διάφανο σε κυανό. Στον προβλεπόμενο χρόνο σταματούσαμε την αντίδραση προσθέτοντας 50 μL 2N H₂SO₄ το οποίο και άλλαζε άμεσα το χρώμα σε κίτρινο. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστεί μετρούσαμε την οπτική απορρόφηση του κάθε βοθρίου στα 450 nm απ' την οποία αφαιρούσαμε την αντίστοιχη στα 540nm.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για κάθε χημειοκίνη εκτός των αγνώστων δειγμάτων τρέχαμε και μία σειρά μετρήσεων διαλυμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης. Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών σε Excel αρχείο υπολογίζαμε την πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης για κάθε χημειοκίνη, και μέσω αυτή σε κάθε δείγμα υπολογίζαμε την τελική συγκέντρωση. Για τον σχηματισμό των 4 σειρών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιούσαμε ανασυνδιασμένη πρότυπη ανθρώπινη χημειοκίνη σε διάλυμα PBS. Καθώς σε κάθε δείγμα είχαμε δύο μετρήσεις για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης του κάθε δείγματος λαμβάναμε υπόψη τον μέσο όρο των δύο τιμών. 4.4.8 Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με την χρήση Βικινχονινικού οξέως (Bicinchoninic Acid, BCA Method)

Κατά την μέτρηση των χημειοκινών στα ιστοτεμάχια βρεθήκαμε αντιμέτωποι με την υπόθεση κατά πόσο οι μετρήσιμες διαφορές στην συγκέντρωση προέρχονταν από την διαφορά έκφρασης των διαφόρων ιστών και όχι από την πιθανή μεγαλύτερη ολική συγκέντρωση κάθε δείγματος. Για να μπορέσουμε να υποστηρίξουμε την αρχική μας υπόθεση σχεδιάσαμε την μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος στην οποία θα αναγάγαμε την συγκέντρωση της χημειοκίνης που θα βρίσκαμε. Μ' αυτή την μέθοδο θα αποκλείαμε την υπόθεση οι διαφορές να οφείλονταν απλά σε συνολικά μεγαλύτερο πρωτεϊνικό φορτίο του δείγματος καθώς τα αποτελέσματα και η συγκέντρωση πλέον θα εκφραζόταν ως ποσοστό επί της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος pg χημειοκίνης ανά ng ολικής πρωτεΐνης.Για τον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης κάθε δείγματος χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο BCA, την οποία και επιλέξαμε αποκλειστικά για τα ιστοτεμαχία που θα προχωρούσαμε σε ανοσοενζυμικό προσδιορισμό της συγκέντωσης των χημειοκινών. Ο λόγος της επιλογής μας αυτή είναι ότι η μέθοδος ατή μπορεί να αποδώσει πιο ακριβή αποτελέσματα σε δείγματα με υψηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση όπως ήταν τα δικά $\mu\alpha\varsigma^{[1]}$.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ετοιμάσαμε το ενεργό διάλυμα μέτρησης αναμειγνύοντας 50 μέρη του διαλύματος Α με 1 μέρος του διαλύματος Β. Στην συνέχεις σε μία πλάκα 96 βοθρίων προσθέταμε 25 μL δείγματος και 200 μL του έτοιμου διαλύματος μέτρησης. Στην συνέχεια σε οριζόντιο ανακινητή αναδεύαμε την πλάκα για 30 δευτερόλεπτα και επωάζαμε στους 37° C για 30 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου μετρούσαμε την οπτική απορρόφηση στα 562 nm. Όπως και με την

154

ανοσοενζυμική μέθοδο έτσι και εδώ παράλληλα με τα αγνώστου συγκέντρωσης δείγματα τρέχαμε και μία σειρά δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, την απορρόφηση των οποίων χρησιμοποιούσαμε για την εξαγωγή της πρότυπης καμπύλης, βάσει της οποίας γινόταν και ο τελικός υπολογισμός στα άγνωστα δείγματα.

4.4.9 Υπολογισμός και ημιποσοτικοποίηση έκφρασης κλινικοπαθολογικών παραγόντων

Η ανίχνευση της έκφρασης των κλινικοπαθολογικών παραγόντων MLH1, Ki-67, bcl2, p53 και p21 έγινε ανοσοϊστοχημικά^[2]. Για κάθε ασθενή που μετρήσαμε χρησιμοποιήθηκε 1 Block παραφίνης με καρκινικό ιστό του ασθενούς. Για τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο χρησιμοποιήσαμε 4μm από εμβαπτισμένα σε παραφίνη καρκινικά ιστοτεμάχια από τον αρχικό όγκο των ασθενών. Με την χρήση έτοιμου kit της Dako προχωρήσαμε στην σήμανση με υπεροξειδάση των δειγμάτων σε 3 βήματα. Αρχικά τα δείγματα αποπαριαφινοποιήθηκαν με ξυλόλη και επανυδατώθηκαν με την πλύση διαλυμάτων αλκοόλης διαβαθμισμένης πυκνότητας. Στην συνέχεια με την εφαρμογή 0,3% H₂O₂ σε Tris (pH 7,6) ρυθμιστικό διάλυμα για 15 λεπτά μπλοκάραμε την ενδογενή υπεροξειδάση των ιστοτεμαχίων. Μετά την επώαση αυτή και πριν την εφαρμογή του πρωτεύοντος αντισώματος τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε 10 mM διάλυμα κιτρικού και πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TBS. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων σε φούρνο μικροκυμάτων στα 650-800 W για 30 λεπτά. Με σκοπό να αποτρέψουμε τυχόν μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στον ορό πριν την εφαρμογή του πρωτεύοντος αντισώματος εκτελέσαμε ένα ακόμα πλύσιμο των τεμαχίων με ρυθμιστικό διάλυμα TBS. Τα πρωτεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε ήταν: antihuman MutL protein homologue-1, clone E 505 (έτοιμο για χρήση, από τον οίκο Dako), anti-Ki-67 (MIB-1Ab, σε αραίωση 1:80 Dako), anti-p53

(DO-7, σε αραίωση 1:100, του οίκου Biogenex), anti p21 (σε αραίωση 1:40 Dako), anti-EGFR (DAK-H1-WT σε αραίωση 1:100, Dako) και τέλος anti-bcl2 (σε αραίωση 1:10, Biogenex).

Όγκοι με γνωστά επίπεδα έκφρασης για τις Ki-67, p53, p21, EGFR και bcl-2 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί δείκτες, ενώ ευαισθητοποιημένος ορός κονίκλου ως τυφλό δείγμα για τον έλεγχο ενδεχόμενων μη ειδικών χρώσεων. Ο χαρακτηρισμός της έκφρασης σε κάθε δείγμα έγινε από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους, στους οποίους δεν είχαν γίνει γνωστά κλινικά στοιχεία των ασθενών. Ο ορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τις υπάρχουσες οδηγίες. Ο MLH1 χαρακτηριζόταν ως θετικός αν τουλάχιστον το 10% των κυττάρων βρισκόταν θετικό. Η έκφραση του Ki-67 οριζόταν ως χαμηλή αν λιγότερα του 20% κυττάρων ήταν θετικά, μέση αν το ποσοστό κυμαινόταν μεταξύ 20% - 50% και υψηλή για μεγαλύτερο του 50%. Για τις p53 και p21 τα κριτήρια ήταν τα ίδια και οριζόντουσαν ως αρνητική με λιγότερο του 5% των κυττάρων θετικά, χαμηλή για 5% - 30% των κυττάρων θετικά, μέση για 31% -60% των κυττάρων θετικά και υψηλότερα για τα μεγαλύτερα ποσοστά. Για τον bcl2 ανιχνεύαμε θετική εικόνα για το κυτταρόπλασμα και το όριο των θετικών ορίστηκε στο 5%.

4.5 Στατιστική Αξιολόγηση

4.5.1Μελέτη έκφρασης χημειοκινών σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό

Σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός πιθανών διαφοροποιήσεων μεταξύ φυσιολογικών (ομάδα ελέγχου) και καρκινικών (ομάδα μελέτης) δειγμάτων ιστού του ίδιου ατόμου για 4 χημειοκίνες (IL-8, CXCL-6, CXCL-4, VEGF). Το μέγεθος του δείγματος σε κάθε ομάδα χημειοκίνης είναι 35 ζεύγη μετρήσεων και οι μετρήσεις αφορούν στην συγκέντρωση χημειοκίνης μέσα στο φυσιολογικό και καρκινικό ιστό του κάθε ατόμου.

Λόγω (α.) της μη τήρησης της προϋπόθεσης της κανονικότητας σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων, (β.) του σχετικά μικρού μεγέθους των δειγμάτων και (γ.) της παρατηρούμενης υψηλής μεταβλητότητας των μετρήσεων μέσα σε κάθε ομάδα χημειοκίνης, προτιμήθηκε η χρήση μη παραμετρικών τεχνικών ελέγχου των πιθανών διαφορών και πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος Wilcoxon για 2 εξαρτημένα δείγματα (Wilcoxon Signed Ranks Test for Paired Samples). Ο έλεγχος Wilcoxon (σε αντίθεση με τον αντίστοιχο παραμετρικό έλεγχο t για 2 εξαρτημένα δείγματα) χρησιμοποιεί τη σύγκριση των διατάξεων των μετρήσεων μέσα σε κάθε ζεύγος μετρήσεων και όχι τις καθ' αυτές τιμές των μετρήσεων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των ελέγχων ορίστηκε σε κάθε περίπτωση σε 5% (α=0.05).

Παράλληλα μελετήσαμε την έκφραση των εν λόγω χημειοκινών και των κλινικοπαθολογικών δεικτών σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών. Λόγω (α.) της μη τήρησης της προϋπόθεσης της κανονικότητας σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων, (β.) του σχετικά μικρού μεγέθους των δειγμάτων και (γ.) της παρατηρούμενης υψηλής μεταβλητότητας των μετρήσεων μέσα σε κάθε ομάδα, προτιμήθηκε η χρήση μη παραμετρικών τεχνικών ελέγχου των πιθανών διαφορών και πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος Mann-Whitney για 2 ανεξάρτητα δείγματα (Mann-Whitney Test for Independent Samples). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των ελέγχων ορίστηκε σε κάθε περίπτωση σε 5% (α=0.05).

4.5.2 Μελέτη έκφρασης των χημειοκινών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Σκοπός της μελέτης είναι, αφ' ενός να προσδιοριστεί η πιθανή μορφή της σχέσης («μαθηματική καμπύλη») που συνδέει τις 5 διαδοχικές χρονικά μετρήσεις κάθε υλικού, αφ' ετέρου, κυρίως, να ελεγχθούν πιθανές στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των 5 διαδοχικών χρονικά μετρήσεων.

Για τις συγκρίσεις μεταξύ των 4 μετρήσεων (FBS, Ca Serum, Con Serum, MEM) μέσα σε καθε χρονική περίοδο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Οι μετρήσεις είναι ανεξάρτητες και έγινε έλεγχος Kolmogorov-Smirnov απ τον οποίο προέκυψε ότι τηρείται η υπόθεση της κανονικότητας. Για τους επιμέρους ελέγχους χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος των Ελαχίστων Σημαντικών Διαφορών (Least Significant Difference-LSD). Σε κάθε περίπτωση, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των ελέγχων ορίστηκε σε 5% (α=0.05).

Τέλος για τον έλεγχο πιθανών διαφορών των τιμών των Ca Serum και Con Serum μεταξύ HT29 και CACO2, καθώς και της μορφής της σχέσης («μαθηματική καμπύλη») μέσα στις 5 διαδοχικές χρονικά μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Γενικού Γραμμικού Μοντέλου για Επαναλαμβανόμενες Μετρήσεις (General Linear Model for Repeated Measures). Πιθανός παράγοντας διαφοροποίησης εντός των ομάδων (μετρήσεων) είναι ο χρόνος (2,4,6,12 και 24 ώρες), μεταξύ των ομάδων το είδος κυττάρων (HT29 και CACO2), ενώ ελέγχεται και η αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου και είδους, ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή διαφορετική μορφή σχέσης. Έγινε η παραδοχή ότι οι μετρήσεις είναι ανεξάρτητες, υπάρχει ομοιογένεια και τηρείται η υπόθεση της κανονικότητας. Σε κάθε περίπτωση, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των ελέγχων ορίστηκε σε 5% (α=0.05).

4.6 Αποτελέσματα

4.6.1 Μελέτη παρουσίας χημειοκινών στα ιστοτεμάχια

Μέσω της πειραματικής διαδικασίας της Western-Blot μπορέσαμε σε αρχικό στάδιο να επιβεβαιώσουμε την παρουσία των τεσσάρων χημειοκινών που μας ενδιέφερε να αναζητήσουμε. Σε κάποια δείγματα όπως φαίνεται και από τις παρακάτω εικόνες επωάσαμε παράλληλα με το αντίσωμα της χημειοκίνης και με αντίσωμα έναντι της ακτίνης ως πρωτεΐνης αναφοράς. Συγκριτική έστω ποσοτικοποίηση όμως δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί καθώς είναι εκτός των ορίων της μεθόδου και έτσι προχωρήσαμε σε ELISA για τα εν λόγω δείγματα όπου είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της υπό εξέτασης μεθόδου



4.6.2 Μελέτη έκφρασης χημειοκινών σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μετρήσεις μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών για τις χημειοκίνες IL-8 (p=0.177>0.05) και CXCL-4 (p=0.795>0.05). Αντίθετα, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μετρήσεις μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών για τοτών για τις χημειοκίνες CXCL-6 (p=0.005<0.05) και VEGF (p=0.003<0.05). Μάλιστα, για τις συγκεκριμένες ομάδες χημειοκίνων, οι τιμές των μετρήσεων των καρκινικών ιστών είναι εμφανώς μεγαλύτερες έναντι αυτών των φυσιολογικών

Χημειοκίνη (pgr/ngr Protein)	Kolmogorov-Smirnov Z	p-value
IL-8 (Cancer)	.687	.732
IL-8 (Control)	.721	.676
CXCL-6 (Cancer)	1.091	.185
CXCL-6 (Control)	1.519	.020
VEGF (Cancer)	.956	.320
VEGF (Control)	1.105	.174
CXCL-4 (Cancer)	.823	.507
CXCL-4 (Control)	.667	.766

Πίνακας Αποτελεσμάτων Ελέγχου Κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov

Χημειοκίνη	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη Τιμή	Μέγιστη Τιμή	Wilcoxon Z	p- value
IL-8 (Cancer)	7.85	4.28	7.26	2.69	17.68	1 2 4 0	4 7 7
IL-8 (Control)	6.58	5.22	4.90	0.70	18.02	-1.349	.1//
CXCL-6 (Cancer)	8.94	11.55	3.95	0.26	39.15	2.047	005
CXCL-6 (Control)	2.50	3.81	0.83	0.40	14.21	-2.817	.005
VEGF (Cancer)	74.63	72.79	47.93	6.29	258.12	2.047	
VEGF (Control)	21.12	16.81	16.26	7.33	64.41	-2.947	.003
CXCL-4 (Cancer)	576.03	337.85	469.68	231.24	1377.57	260	705
CXCL-4 (Control)	565.54	352.20	503.80	101.30	1393.53	260	.795

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Wilcoxon για 2



Εξαρτημένα Δείγματα



Box-Plot of IL-8 pgr/ngr Protein





Box-Plot of VEGF pgr/ngr Protein



Box-Plot of CXCL-4 pgr/ngr Protein

3 year survival

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων και των λοιπών μετρήσεων (Serum Insulin, Serum IGF-1 και Serum Gastrin) ανάλογα με την 3ετή επιβίωση για καμία από τις 4 χημειοκίνες ούτε για τις Serum Insulin, Serum IGF-1 και Serum Gastrin.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

Χημειοκίνη	3 year survival	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	NO	8,05	4,06	12.0	121
IL-8 (Cancer)	YES	5,23	2,44	12,0	.121
	NO	5,18	5,06	20.0	.565
CXCL-6 (Cancer)	YES	13,05	16,22	20,0	
	NO	115,10	108,21	12.0	
VEGF (Cancer)	YES	49,54	28,22	13,0	.253
CXCL-4 (Cancer)	NO	586,29	324,23		
	YES	392,66	200,30	12,0	.121
	YES	78,76	53,25		

ανεξάρτητα δείγματα - 3 year survival

5 year survival

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων και των λοιπών μετρήσεων (Serum Insulin, Serum IGF-1 και Serum Gastrin) ανάλογα με την 5ετή επιβίωση μόνο για την IL-8 και την CXCL-4. Μάλιστα, για τις 2 αυτές χημειοκίνες, οι τιμές των μετρήσεων για αυτούς που δεν επιβίωσαν είναι εμφανώς μεγαλύτερες έναντι αυτών που επιβίωσαν.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2 ανεξάρτητα δείγματα - 5 year survival

Χημειοκίνη	5 year survival	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	NO	8,17	3,82	6.0	000
IL-8 (Cancer)	YES	4,45	1,70	6,0	.028
	NO	5,78	4,97		.841
CXCL-6 (Cancer)	YES	15,13	19,17	21,0	
	NO	101,33	96,37		200
VEGF (Cancer)	YES	45,34	25,30	13,0	.306
	NO	603,03	307,42		
CXCL-4 (Cancer)	YES	323,79	120,73	6,0	.028
	YES	88,00	61,66		

Duke's Staging

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του Duke's Staging για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2 ανεξάρτητα δείγματα - Duke's Staging

Χημειοκίνη	Duke's Staging	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	2	8,20	4,53	22.0	770
IL-8 (Cancer)	3-5	7,54	4,30	33,0	.//3
	2	9,22	11,56	26.0	1 000
CXCL-6 (Cancer)	3-5	8,69	12,23	36,0	1.000
	2	78,54	78,15	20.0	024
VEGF (Cancer)	3-5	70,71	72,20	30,0	.834
CXCL-4 (Cancer)	2	577,81	365,63	22.0	770
	3-5	574,45	333,62	55,0	.//3

TNM Staging

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του TNM Staging για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

ανεξάρτητα δείγματα - TNM Staging

Χημειοκίνη	TNM Staging	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	2-4	7,73	4,46	22.0	770
IL-8 (Cancer)	5-8	7,98	4,37	33,0	.773
	2-4	9,44	10,84	22.0	770
CXCL-6 (Cancer)	5-8	8,38	13,03	33,0	.//3
	2-4	70,51	76,96		.560
VEGF (Cancer)	5-8	79,91	72,74	26,0	
CXCL-4 (Cancer)	2-4	548,02	353,50	20.0	F.01
	5-8	607,55	340,50	29,0	.501

Κί67. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του Κί67 για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2 ανεξάρτητα δείγματα - Κί67. Χαμηλή Έκφραση (1), Μέση έκφραση (2), Υψηλή έκφραση (3)

Χημειοκίνη	Ki67	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	1-2	7,97	3,43	21.0	<u> </u>
IL-8 (Cancer)	3	7,77	4,97	31,0	.696
	1-2	11,06	14,66	30,0	.763
CXCL-6 (Cancer)	3	7,78	10,09		
	1-2	104,62	101,73	22,0	245
VEGF (Cancer)	3	51,30	27,81		.315
CXCL-4 (Cancer)	1-2	486,85	170,26	22.0	770
	3	638,46	416,03	32,0	.770

Bcl2

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του Bcl2 για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

ανεξάρτητα δείγματα - Bcl2 .Αρνητική έκφραση (0), Θετική έκφραση (1)

Χημειοκίνη	Bcl2	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value	
II. 8 (Concort)	0	7,60	3,83	25,0	010	
	1	8,65	6,17		.910	
	0	9,18	12,59	25,0	.910	
	1	8,15	8,68			
VECE (Cancar)	0	88,76	79,16	11,0	115	
	1	32,22	17,95		.115	
CYCL 4 (Cancor)	0	553,72	299,45	26.0	1 000	
CACE-4 (Caller)	1	648,55	490,81	20,0	1.000	

p53

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του p53 για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

ανεξάρτητα δείγματα - p53. Αρνητική (0), Χαμηλή (1), Μέση (2), Υψηλή (3).

Χημειοκίνη	p53	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
II & (Cancor)	0-2	5,93	2,81	19,0	102
IL-8 (Cancer)	3	9,56	4,77		.102
	0-2	11,79	15,46		.847
CXCL-6 (Cancer)	3	6,40	6,49	34,0	
	0-2	80,71	75,95	26,0	520
VEGF (Cancer)	3	68,54	74,17		.529
CXCL-4 (Cancer)	0-2	506,56	249,26	22.0	700
	3	637,79	405,96	32,0	.700

EGFR

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του EGFR μόνο για την IL-8. Πιο συγκεκριμένα, για την IL-8, οι τιμές των μετρήσεων στην κατηγορία 0 είναι μεγαλύτερες έναντι της κατηγορίας 1-2.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2 ανεξάρτητα δείγματα – EGFR.Αρνητική έκφραση (0). Μέση έκφραση (1), Υψηλή έκφραση (2).

Χημειοκίνη	EGFR	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	0	10,17	3,91	10.0	010
IL-8 (Cancer)	1-2	5,78	3,61	10,0	.012
	0	5,99	6,37	34,0	.847
CXCL-6 (Cancer)	1-2	11,56	14,65		
	0	77,89	65,52		260
VEGF (Cancer)	1-2	70,44	86,52	23,0	.368
CXCL-4 (Cancer)	0	672,37	313,01	20.0	124
	1-2	490,40	353,59	20,0	.124

p21

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του p21 μόνο για την CXCL-6. Πιο συγκεκριμένα, για την CXCL-6, οι τιμές των μετρήσεων στην κατηγορία 0 είναι μεγαλύτερες έναντι της κατηγορίας 1-3.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

ανεξάρτητα δείγματα - p21. Αρνητική (0), Χαμηλή (1), Μέση (2), Υψηλή (3).

Χημειοκίνη	p21	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	0	7,52	4,71	20.0	504
IL-8 (Cancer)	1-3	8,14	4,13	29,0	.501
	0	14,73	14,27	11,0	.016
CXCL-6 (Cancer)	1-3	3,79	4,99		
	0	45,17	29,89	20,0	.208
VEGF (Cancer)	1-3	104,08	92,08		
CXCL-4 (Cancer)	0	579,20	389,80	22.0	
	1-3	573,22	308,73	33,0	.773

MLH1

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των ελέγχων, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.05) στις μετρήσεις των χημειοκίνων ανάλογα με τις κατηγορίες του MLH1 για καμία από τις 4 χημειοκίνες.

Πίνακας Περιγραφικών Μέτρων και Αποτελέσματα Ελέγχου Mann-Whitney για 2

ανεξάρτητα δείγματα - MLH1 Θετικό (1), Αρνητικό (0).

Χημειοκίνη	MLH1	Μέσος Όρος	Τυπ. Απόκλιση	Mann- Whitney U	p-value
	0	8,89	5,35	21.0	COC
IL-8 (Cancer)	1	7,12	3,47	31,0	.090
	0	11,18	12,92	31,0	.841
CXCL-6 (Cancer)	1	7,72	11,19		
	0	102,39	102,61	29,0	701
VEGF (Cancer)	1	53,03	28,96		.791
CXCL-4 (Cancer)	0	588,84	391,89	22.0	770
	1	567,07	316,73	32,0	.770

4.6.3 Μελέτη έκφρασης των χημειοκινών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

4.6.3.1 Αποτελέσματα ανάλυσης μεταξύ μετρήσων χρονικών σημείων για κάθε καλλιέργεια και χημειοκίνη

<u>HT29 – CXCL8</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων κατά τη 2^η, 4^η και 6^η ώρα (p-value<0.05), όχι όμως κατά τη 12^η και την 24^η ώρα (p-value>0.05).

-						
Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value	
	FBS	52,95042	,439919			
	Ca_Serum	50,67065	,841927	22.662	,003	
2,0	Con_Serum	54,04201	2,636787	32,662		
	McCoys	41,49413	,344738			
	Total	49,78930	5,389193			
	FBS	140,96712	11,844294			
	Ca_Serum	124,86578	19,373194			
4,0	Con_Serum	120,40814	12,606658	20,464	,007	
	McCoys	47,53423	,740454			
	Total	108,44382	39,706463			
	FBS	193,19400	8,023186			
	Ca_Serum	177,60935	2,213369		,000	
6,0	Con_Serum	201,38941	4,391770	454,054		
	McCoys	50,00377	,623147			
	Total	155,54913	65,877413			
	FBS	199,90428	3,113966			
	Ca_Serum	198,11469	47,476776			
12,0	Con_Serum	188,23739	4,495837	,042	,987	
	McCoys	190,57870	62,006771			
	Total	194,20877	30,051985			
	FBS	138,56469	,000000			
24,0	Ca_Serum	134,41499	13,795479			
	Con_Serum	112,34654	59,897289	,754	,575	
	McCoys	98,23542	6,728067			
	Total	120,89041	29,243677			

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά τη 2^η, την 4^η και την 6^η ώρα, οι τιμές της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις.
- Κατά την 6^η ώρα, οι τιμές της Ca Serum είναι μικρότερες σε σχέση με την Con Serum.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I-J)	p-value
		Ca_Serum	2,279774	,527
	FBS	Con_Serum	-1,091590	,892
		McCoys	11,456298 [*]	,006
		FBS	-2,279774	,527
	Ca_Serum	Con_Serum	-3,371364	,271
		McCoys	9,176524*	,014
2,0		FBS	1,091590	,892
	Con_Serum	Ca_Serum	3,371364	,271
		McCoys	12,547888*	,004
		FBS	-11,456298*	,006
	McCoys	Ca_Serum	-9,176524*	,014
		Con_Serum	-12,547888 [*]	,004
		Ca_Serum	16,101347	,695
	FBS	Con_Serum	20,558989	,541
		McCoys	AcCoys 93,432897*	
		FBS	-16,101347	,695
	Ca_Serum	Con_Serum	4,457642	,988
		McCoys	77,331549*	,019
4,0		FBS	-20,558989	,541
	Con_Serum	Ca_Serum	-4,457642	,988
		McCoys	72,873907*	,023
		FBS	-93,432897*	,009
	McCoys	Ca_Serum	-77,331549*	,019
		Con_Serum	-72,873907*	,023
		Ca_Serum	15,584657	,122
	FBS	Con_Serum	-8,195404	,477
		McCoys	143,190235*	,000
		FBS	-15,584657	,122
6,0	Ca_Serum	Con_Serum	-23,780061 [*]	,033
		McCoys	127,605578*	,000
		FBS	8,195404	,477
	Con_Serum	Ca_Serum	23,780061*	,033
	McCoys		151,385638*	,000

	FBS	-143,190235*	,000
McCoys	Ca_Serum	-127,605578*	,000,
	Con_Serum	-151,385638*	,000,

<u>HT29 – CXCL6</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων για καμία από τις χρονικές περιόδους (p-value>0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	11,09076	5,341051		,908
	Ca_Serum	9,65911	1,373988	475	
2,0	Con_Serum	9,36647	6,996531	,175	
	McCoys	7,80128	1,923882		
	Total	9,47940	3,664164		
4,0	FBS	13,69610	10,858973		
	Ca_Serum	20,24305	5,197763	245	0.64
	Con_Serum	18,59070	11,257190	,245	,861
	McCoys	14,17921	8,425511		
	Total	16,67726	7,612536		

	FBS	21,60836	7,939215		
	Ca_Serum	15,26811	8,635813	1 200	207
6,0	Con_Serum	10,38954	1,054837	1,309	,387
	McCoys	13,22652	,000000,		
	Total	15,12313	6,266552		
	FBS	14,04698	1,160313		
	Ca_Serum	17,88439	5,823220	2 0 2 0	162
12,0	Con_Serum	14,77678	5,863486	2,938	,162
	McCoys	6,01765	,000000,		
	Total	13,18145	5,645487		
	FBS	5,03110	1,395179		
	Ca_Serum	9,65911	1,373988	C 174	050
24,0	Con_Serum	9,16560	,676065	6,174	,056
	McCoys	5,64613	1,735187		
	Total	7,37549	2,423540		

<u> HT29 – CXCL4</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων σε όλες τις χρονικές περιόδους (p-value<0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	36,35422	,436133		
2,0	Ca_Serum	35,67052	,918180	102,152	,000
	Con_Serum	36,00024	,193568		

	McCoys	6,94132	3,934103		
	Total	28,74158	13,545436		
	FBS	3,20504	,281116		
	Ca_Serum	27,84039	,107574	144 614	000
4,0	Con_Serum	31,18636	,897098	144,614	,000
	McCoys	4,69817	3,358135		
	Total	16,73249	13,796508		
	FBS	1,20000	,075076		
	Ca_Serum	35,45333	,096565	F1 00C	001
6,0	Con_Serum	31,05877	5,700232	51,906	,001
	McCoys	27,40416	2,020832		
	Total	23,77906	14,447279		
	FBS	6,87958	2,944988		
	Ca_Serum	29,72238	2,430895		001
12,0	Con_Serum	28,36624	1,280731	65,460	,001
	McCoys	3,87054	2,611860		
	Total	17,20968	12,841920		
	FBS	,67329	,127343		
24,0	Ca_Serum	30,74107	5,250948	F2 400	001
	Con_Serum	26,52093	2,096631	52,409	,001
	McCoys	2,54490	2,389723		
	Total	15,12005	14,732736		

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά τη 2^η ώρα, οι τιμές της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις.
- Κατά την 4^η ώρα, οι τιμές της FBS και της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Ca Serum και της Con Serum.
- Κατά την 6^η ώρα, οι τιμές της FBS είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες
 3 μετρήσεις.
- Κατά τη 12^η ώρα, οι τιμές της FBS και της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Ca Serum και της Con Serum.

- Κατά την 24ⁿ ώρα, οι τιμές της FBS και της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Ca Serum και της Con Serum.
- Οι τιμές της Ca Serum και της Con Serum δεν διαφέρουν σε καμία χρονική περίοδο.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I- J)	Sig.
		Ca_Serum	,683699	,989
	FBS	Con_Serum	,353984	,998
		McCoys	29,412901*	,001
		FBS	-,683699	,989
	Ca_Serum	Con_Serum	-,329715	,999
2.0		McCoys	28,729202*	,001
2,0		FBS	-,353984	,998
	Con_Serum	Ca_Serum	,329715	,999
		McCoys	29,058917*	,001
		FBS	-29,412901*	,001
	McCoys	Ca_Serum	-28,729202*	,001
		Con_Serum	-29,058917*	,001
		Ca_Serum	-24,635348*	,001
	FBS	Con_Serum	-27,981319*	,000,
		McCoys	-1,493132	,862
		FBS	24,635348*	,001
	Ca_Serum	Con_Serum	-3,345971	,409
		McCoys	23,142217*	,001
4,0		FBS	27,981319*	,000,
	Con_Serum	Ca_Serum	3,345971	,409
		McCoys	26,488188*	,001
		FBS	1,493132	,862
	McCoys Ca_Serun		-23,142217*	,001
		Con_Serum	-26,488188*	,001
		Ca_Serum	-34,253328*	,002
	FBS	Con_Serum	-29,858761*	,003
		McCoys	-26,204153*	,005
		FBS	34,253328*	,002
6,0	Ca_Serum	Con_Serum	4,394567	,598
		McCoys	8,049175	,213
		FBS	29,858761*	,003
	con_Serum	Ca_Serum	-4,394567	,598
		McCoys	3,654608	,710
------	-----------	-----------	------------------------	---------------
		FBS	26,204153*	,005
	McCoys	Ca_Serum	-8,049175	,213
		Con_Serum	-3,654608	,710
		Ca_Serum	-22,842796*	,003
	FBS	Con_Serum	-21,486658*	,004
		McCoys	3,009043	,689
		FBS	22,842796*	,003
	Ca_Serum	Con_Serum	1,356138	,952
12.0		McCoys	25,851839*	, 00 2
12,0		FBS	21,486658*	,004
	Con_Serum	Ca_Serum	-1,356138	,952
		McCoys	24,495701*	,003
		FBS	-3,009043	,689
	McCoys	Ca_Serum	-25,851839*	,002
		Con_Serum	-24,495701*	,003
		Ca_Serum	-30,067784*	,003
	FBS	Con_Serum	-25,847641*	,005
		McCoys	-1,871615	,941
		FBS	30,067784*	,003
	Ca_Serum	Con_Serum	4,220143	,633
		McCoys	28,196170*	,004
24,0		FBS	25,847641 [*]	,005
	Con_Serum	Ca_Serum	-4,220143	,633
		McCoys	23,976026*	,007
		FBS	1,871615	,941
	McCoys	Ca_Serum	-28,196170*	,004
		Con Serum	-23,976026*	,007

<u>HT29 – VEGF</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων κατά την 4^η, 6^η, 12^η και 24^η ώρα (p-value<0.05), όχι όμως κατά τη 2^η ώρα (p-value>0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	,88481	,075384		
	Ca_Serum	,93132	,060225	6.000	057
2,0	Con_Serum	,81022	,013107	6,090	,057
	McCoys	,73779	,003255		
	Total	,84104	,086889		
	FBS	3,03116	,324807		
	Ca_Serum	1,90241	,239980	20.055	004
4,0	Con_Serum	1,25793	,142151	29,055	,004
	McCoys	1,15024	,148453		
	Total	1,83544	,817645		
	FBS	6,91620	,771446		
	Ca_Serum	3,18866	,802660	42 412	002
6,0	Con_Serum	1,19909	,007054	42,413	,002
	McCoys	1,46974	,262305		
	Total	3,19342	2,476269		
12.0	FBS	12,02420	1,042056	44.076	002
12,0	Ca_Serum	5,84231	,974964	44,076	,002

	Con_Serum	5,26309	,916444		
	McCoys	2,27681	,403048		
	Total	6,35160	3,845066		
	FBS	2,76100	,008121		
	Ca_Serum	2,68577	,114515	161 000	000
24,0	Con_Serum	3,43594	,121254	101,822	,000
	McCoys	1,33521	,102013		
	Total	2,55448	,818122		

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά την 4^η, 6^η και 12^η ώρα, οι τιμές της FBS είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις. Σε αυτές τις χρονικές περιόδους οι τιμές της McCoys, της Ca Serum και της Con Serum δεν διαφέρουν μεταξύ τους.
- Κατά την 24^η ώρα, οι τιμές της Con Serum είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις, ενώ οι τιμές της McCoys είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I- J)	Sig.
		Ca_Serum	1,128747*	,034
	FBS	Con_Serum	1,773224*	,007
		McCoys	1,880914*	,006
		FBS	-1,128747*	,034
	Ca_Serum	Con_Serum	,644478	,181
• •		McCoys	,752168	,120
4,0		FBS	-1,773224*	,007
	Con_Serum	Ca_Serum	-,644478	,181
		McCoys	,107690	,970
		FBS	-1,880914*	,006
	McCoys	Ca_Serum	-,752168	,120
	Con_Seru		-,107690	,970
6.0	EDC	Ca_Serum	3,727537*	,013
6,0	ГДЭ	Con_Serum	5,717115*	,003

		McCoys	5,446457*	,003
		FBS	-3,727537*	,013
	Ca_Serum	Con_Serum	1,989578	,106
		McCoys	1,718919	,157
		FBS	-5,717115*	,003
	Con_Serum	Ca_Serum	-1,989578	,106
		McCoys	-,270658	,970
		FBS	-5,446457*	,003
	McCoys	Ca_Serum	-1,718919	,157
		Con_Serum	,270658	,970
		Ca_Serum	6,181888*	,010
	FBS	Con_Serum	6,761109*	,007
		McCoys	9,747384*	,002
		FBS	-6,181888*	,010
	Ca_Serum	Con_Serum	,579220	,926
42.0		McCoys	3,565496	,065
12,0		FBS	-6,761109*	,007
	Con_Serum	Ca_Serum	-,579220	,926
		McCoys	2,986275	,110
		FBS	-9,747384*	,002
	McCoys	Ca_Serum	-3,565496	,065
		Con_Serum	-2,986275	,110
		Ca_Serum	,075232	,893
	FBS	Con_Serum	-,674944*	,011
		McCoys	1,425791*	,001
		FBS	-,075232	,893
	Ca_Serum	Con_Serum	-,750176*	,007
24.0		McCoys	1,350560*	,001
24,0		FBS	,674944*	,011
	Con_Serum	Ca_Serum	,750176*	,007
		McCoys	2,100735*	,000,
		FBS	-1,425791*	,001
	McCoys	Ca_Serum	-1,350560*	,001
		Con_Serum	-2,100735 [*]	,000

<u>CACO2 – IL8</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων κατά την 4^η, 6^η και 12^η ώρα (p-value<0.05), όχι όμως κατά τη 2^η και την 24^η ώρα (p-value>0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	43,55701	,723729		
	Ca_Serum	45,46684	1,793840	2 (74	120
2,0	Con_Serum	42,07896	,655476	3,674	,120
	MEM	43,65017	,135996		
	Total	43,68825	1,499215		
	FBS	42,98283	,357107		
	Ca_Serum	44,72083	,092888	44.020	010
4,0	Con_Serum	41,77559	1,084506	11,838	,019
	MEM	41,22196	,556515		
	Total	42,67530	1,512940		
	FBS	45,31628	,282371		
	Ca_Serum	44,39664	,737680	26.004	004
6,0	Con_Serum	46,53302	,773178	26,891	,004
	MEM	41,43363	,430292		
	Total	44,41989	2,062631		
12.0	FBS	47,04733	,635160	7 220	042
12,0	Ca_Serum	45,32996	1,600266	7,338	,042

	Con_Serum	43,63501	1,721567		
	MEM	41,34456	,729899		
	Total	44,33921	2,450058		
	FBS	45,15123	,515788		
	Ca_Serum	45,71699	,094957	4 500	000
24,0	Con_Serum	44,62873	1,065907	4,509	,090
	MEM	42,27781	1,624148		
	Total	44,44369	1,592095		

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά την 4^η ώρα, οι τιμές της Ca Serum είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές της MEM της και της Con Serum.
- Κατά την 6^η ώρα, οι τιμές της ΜΕΜ είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες
 3 μετρήσεις.
- Κατά τη 12^η ώρα, οι τιμές της ΜΕΜ είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της
 FBS.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I- J)	Sig.
		Ca_Serum	-1,738003	,200
	FBS	Con_Serum	1,207234	,417
		MEM	1,760871	,194
		FBS	1,738003	,200
	Ca_Serum	Con_Serum	2,945237*	,044
		MEM	3,498874*	,025
4,0		FBS	-1,207234	,417
	Con_Serum	Ca_Serum	-2,945237*	,044
		MEM	,553637	,857
		FBS	-1,760871	,194
	MEM	Ca_Serum	-3,498874*	,025
		Con_Serum	-,553637	,857
		Ca_Serum	,919637	,554
6,0	FBS	Con_Serum	-1,216745	,364
		MEM	3,882648*	,013

		FBS	-,919637	,554
	Ca_Serum Con_Serum		-2,136381	,096
		MEM	2,963012*	,034
		FBS	1,216745	,364
	Con_Serum	Ca_Serum	2,136381	,096
		MEM	5,099393*	,005
		FBS	-3,882648*	,013
	MEM	Ca_Serum	-2,963012*	,034
		Con_Serum	-5,099393*	,005
		Ca_Serum	1,717362	,644
	FBS	Con_Serum	3,412320	,208
		MEM	5,702769*	,049
		FBS	-1,717362	,644
	Ca_Serum	Con_Serum	1,694958	,652
12.0		MEM	3,985407	,141
12,0		FBS	-3,412320	,208
	Con_Serum	Ca_Serum	-1,694958	,652
		MEM	2,290449	,452
		FBS	-5,702769*	,049
	MEM	Ca_Serum	-3,985407	,141
		Con_Serum	-2,290449	,452

CACO2 – CXCL6



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων για καμία από τις χρονικές περιόδους (p-value>0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	22,66059	2,697972		
2,0	Ca_Serum	23,27402	,000000		
	Con_Serum	20,77905	2,625005	1,876	,275
	MEM	29,03286	6,313776		
	Total	23,93663	4,310317		
	FBS	22,37534	4,028248		
	Ca_Serum	21,74562	3,991940		
4,0	Con_Serum	17,15030	,823966	1,338	,380
	MEM	21,06369	,439620		
	Total	20,58374	3,075056		
	FBS	22,73681	5,393704		
	Ca_Serum	20,13989	,866841	205	000
6,0	Con_Serum	23,07256	5,868527	,205	,888
	MEM	22,66059	2,697972		
	Total	22,15246	3,434188		
	FBS	32,08634	16,899007		
	Ca_Serum	22,01343	1,782747	4 2 4 2	270
12,0	Con_Serum	18,62388	,422867	1,343	,379
	MEM	16,28108	,405300		
	Total	22,25118	9,104712		
	FBS	22,07331	4,455375		
	Ca_Serum	26,81716	9,447250	70.4	504
24,0	Con_Serum	20,14872	1,733588	,/34	,584
	MEM	26,57467	2,837374		
	Total	23,90347	5,158930		

<u>CACO2 – CXCL4</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων σε όλες τις χρονικές περιόδους (p-value<0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	,92471	,006591		
	Ca_Serum	48,45348	,986644	2011 004	000
2,0	Con_Serum	48,88358	1,035573	2011,864	,000
	MEM	45,54476	,362065		
	Total	35,95163	21,669818		
	FBS	42,81234	,410557		
	Ca_Serum	41,91373	4,016086	100 700	
4,0	Con_Serum	26,85582	,365797	180,766	,000
	MEM	1,52004	,141671		
	Total	28,27548	17,915809		
	FBS	,27952	,071939		
	Ca_Serum	47,13914	,246853	462.256	000
6,0	Con_Serum	46,21977	1,843234	403,350	,000
	MEM	13,29676	2,486890		
	Total	26,73380	21,917298		
	FBS	9,88144	8,390604		
12.0	Ca_Serum	38,46363	,113893	46.424	010
12,0	Con_Serum	29,14008	,031044	16,434	,010
	MEM	22,22986	,334336		

	Total	24,92876	11,586911		
24,0	FBS	47,84875	,954163	10,816	
	Ca_Serum	46,30117	4,326244		
	Con_Serum	41,53449	4,716934		,022
	MEM	25,66177	5,852624		
	Total	40,33655	9,955027		

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά τη 2^η ώρα, οι τιμές της FBS είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις. Επιπλέον, οι τιμές της MEM είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Con Serum.
- Κατά την 4^η ώρα, οι τιμές της ΜΕΜ είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες
 3 μετρήσεις. Επιπλέον, οι τιμές της Con Serum είναι μικρότερες σε σχέση με
 τις τιμές της FBS και της Ca Serum.
- Κατά την 6^η ώρα, οι τιμές της FBS είναι μικρότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 μετρήσεις. Επιπλέον, οι τιμές της MEM είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Con Serum και της Ca Serum.
- Κατά τη 12ⁿ ώρα, οι τιμές της FBS είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της Con Serum και της Ca Serum.
- Κατά την 24^η ώρα, οι τιμές της ΜΕΜ είναι μικρότερες σε σχέση με τις τιμές της
 FBS και της Ca Serum.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I- J)	Sig.
2,0	FBS	Ca_Serum Con_Serum	-47,528777* -47,958871*	,000, ,000,

		MEM	-44,620053*	,000
		FBS	47,528777*	,000,
	Ca_Serum	Con_Serum	-,430094	,948
		MEM		,073
		FBS	47,958871*	,000
	Con_Serum	Ca_Serum	,430094	,948
		MEM	3,338818*	,047
		FBS	44,620053 [*]	,000
	MEM	Ca_Serum	-2,908724	,073
		Con_Serum	-3,338818*	,047
		Ca_Serum	,898607	,975
	FBS	Con_Serum	15,956522*	,007
		MEM	41,292297*	,000,
		FBS	-,898607	,975
	Ca_Serum	Con_Serum	15,057915 [*]	,008
4.0		MEM	40,393690*	,000
4,0		FBS	-15,956522*	,007
	Con_Serum	Ca_Serum	-15,057915*	,008
		MEM	25,335775*	,001
		FBS	-41,292297*	,000
	MEM	Ca_Serum	-40,393690*	,000
		Con_Serum	-25,335775*	,001
		Ca_Serum	-46,859618*	,000
	FBS	Con_Serum	-45,940246*	,000
		MEM	-13,017241*	,005
		FBS	46,859618*	,000
	Ca_Serum	Con_Serum	,919372	,946
6.0		MEM	33,842377*	,000
0,0		FBS	45,940246*	,000
	Con_Serum	Ca_Serum	-,919372	,946
		MEM	32,923005*	,000
		FBS	13,017241*	,005
	MEM	Ca_Serum	-33,842377*	,000
		Con_Serum	-32,923005*	,000
		Ca_Serum	-28,582191*	,012
	FBS	Con_Serum	-19,258634*	,045
		MEM	-12,348420	,166
12.0		FBS	28,582191*	,012
12,0	Ca_Serum	Con_Serum	9,323556	,314
		MEM	16,233770	,077
	Con Serum	FBS	19,258634*	,045
	con_ocram	Ca_Serum	-9,323556	,314

		MEM	6,910214	,514
		FBS	12,348420	,166
	MEM	Ca_Serum	-16,233770	,077
		Con_Serum	-6,910214	,514
		Ca_Serum	1,547581	,987
	FBS	Con_Serum	6,314259	,600
		MEM	22,186985 [*]	,032
		FBS	-1,547581	,987
	Ca_Serum	Con_Serum	4,766678	,762
24.0		MEM	20,639404*	,041
24,0		FBS	-6,314259	,600
	Con_Serum	Ca_Serum	-4,766678	,762
		MEM	15,872727	,093
		FBS	-22,186985*	,032
	MEM	Ca_Serum	-20,639404*	,041
		Con Serum	-15,872727	,093

<u>CACO2 – VEGF</u>



Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων κατά τη 2^η, 4^η και 6^η ώρα (p-value<0.05), όχι όμως κατά τη 12^η και την 24^η ώρα (p-value>0.05).

Hour		Mean	Std. Deviation	F	p-value
	FBS	,60488	,003558		
	Ca_Serum	,56066	,002474		
2,0	Con_Serum	,52377	,025410	14,167	,013
	MEM	,58083	,000854		
	Total	,56753	,033237		
	FBS	,55203	,011366		
	Ca_Serum	,57934	,027255		
4,0	Con_Serum	,56663	,039968	9,366	,028
	MEM	,67258	,007913		
	Total	,59265	,053877		
	FBS	,44610	,013776		
	Ca_Serum	,50791	,001494		
6,0	Con_Serum	,35945	,063059	8,293	,034
	MEM	,50287	,020702		
	Total	,45408	,068858		
	FBS	,47984	,017639		
	Ca_Serum	,48990	,016568		
12,0	Con_Serum	,45067	,003314	5,015	,077
	MEM	,51672	,024309		
	Total	,48428	,028422		
	FBS	,46527	,064796		
	Ca_Serum	,54980	,072562	4.677	
24,0	Con_Serum	,46446	,002732	1,875	,275
	MEM	,59810	,095471		
	Total	,51941	,079925		

Από τις επιμέρους συγκρίσεις όπως αυτές απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι:

- Κατά τη 2^η ώρα, οι τιμές της FBS είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές της
 Con Serum.
- Κατά την 4ⁿ ώρα, οι τιμές της ΜΕΜ είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές της FBS.

Κατά την 6ⁿ ώρα, δεν είναι ξεκάθαρο το πού οφείλονται οι παρατηρούμενες δαφοροποιήσεις.

Hour	(I) Measure	(J) Measure	Mean Difference (I- J)	Sig.
		Ca_Serum	,044223	,110
	FBS	Con_Serum	,081107*	,015
		MEM	,024047	,428
		FBS	-,044223	,110
	Ca_Serum	Con_Serum	,036885	,178
		MEM	-,020176	,548
2,0		FBS	-,081107*	,015
	Con_Serum	Ca_Serum	-,036885	,178
		MEM	-,057061	,051
		FBS	-,024047	,428
	MEM	Ca_Serum	,020176	,548
		Con_Serum	,057061	,051
		Ca_Serum	-,027309	,766
	FBS	Con_Serum	-,014597	,948
		MEM	-,120551*	,039
		FBS	,027309	,766
	Ca_Serum	Con_Serum	,012712	,965
		MEM	-,093242	,088
4,0		FBS	,014597	,948
	Con_Serum	Ca_Serum	-,012712	,965
		MEM	-,105954	,059
		FBS	,120551*	,039
	MEM	Ca_Serum	,093242	,088
		Con_Serum	,105954	,059
		Ca_Serum	-,061809	,444
	FBS	Con_Serum	,086651	,233
		MEM	-,056766	,502
		FBS	,061809	,444
	Ca_Serum	Con_Serum	,148460	,053
6.0		MEM	,005043	,999
6,0		FBS	-,086651	,233
	Con_Serum	Ca_Serum	-,148460	,053
		MEM	-,143417	,059
		FBS	,056766	,502
	MEM	Ca_Serum	-,005043	,999
		Con Serum	.143417	.059

4.6.3.2 Αποτελέσματα ανάλυσης διαφορών έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών για τις ίδιες επιδράσεις και τα ίδια χρονικά σημεία.

<u>IL8 - Ca Serum</u>

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=224,031, pvalue=0,004<0,05), του χρόνου (F(4,8)=10,519, p-value=0,003<0,05), αλλά και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=10,660, p-value=0,003<0,05) στις τιμές της Ca Serum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Έλεγχοι Επιδράσεων Εντός Ομάδων και Αλληλεπιδράσεων

Source	Type III Sum	٩t	Mean	F	Sig.
Source	of Squares	u	Square	г	
Hr	12905,535	4	3226,384	10,519	,003
Hr * Group	13078,294	4	3269,573	10,660	,003
Error(Hr)	2453,750	8	306,719		

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercep t	166095,987	1	166095,987	879,098	,001
Group	42328,131	1	42328,131	224,031	,004
Error	377,878	2	188,939		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Ca Serum μεταξύ HT29 και CACO2 (pvalue<0,05) για όλες τις χρονικές μετρήσεις, με εξαίρεση τη 2ⁿ ώρα (p-value=0,065>0,05). Πιο συγκεκριμένα, κατά την 4ⁿ, 6ⁿ, 12ⁿ και 24ⁿ ώρα οι μέσες τιμές των HT29 είναι εμφανώς μεγαλύτερες των CACO2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

						95% Cor	nfidence
Dependent	Doromotor	D	Std.		Sig.	Inte	rval
Variable	Parameter	D	Error	L		Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	45 <i>,</i> 467	,991	45 <i>,</i> 889	,000,	41,204	49 <i>,</i> 730
IL8_Ca_Serum_2	[Group=1]	5,204	1,401	3,714	,065	-,825	11,233
	[Group=2]	0 ^a				•	•
	Intercept	44,721	9,687	4,617	,044	3,042	86,399
IL8_Ca_Serum_4	[Group=1]	80,145	13,699	5,850	,028	21,203	139,087
	[Group=2]	0 ^a					
	Intercept	44,397	1,167	38,059	,001	39,377	49,416
IL8_Ca_Serum_6	[Group=1]	133,213	1,650	80,748	,000,	126,115	140,311
	[Group=2]	0 ^a				•	•
	Intercept	45 <i>,</i> 330	23,752	1,908	,197	-56,866	147,526
IL8_Ca_Serum_12	[Group=1]	152,785	33,590	4,548	,045	8,258	297,312
	[Group=2]	0 ^a				•	•
	Intercept	45,717	6,898	6,628	,022	16,038	75 <i>,</i> 396
IL8_Ca_Serum_24	[Group=1]	88 <i>,</i> 698	9,755	9,092	,012	46,725	130,671
	[Group=2]	0 ^a	•		•	•	•

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

				95% Confide	ence Interval
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper
				Bound	Bound
	2	50,671	,991	46,408	54,934
HT29	4	124,866	9,687	83,187	166,544
	6	177,609	1,167	172,590	182,629
	12	198,115	23,752	95,919	300,311
	24	134,415	6,898	104,736	164,094
	2	45,467	,991	41,204	49,730
	4	44,721	9,687	3,042	86,399
CACO2	6	44,397	1,167	39,377	49,416
	12	45,330	23,752	-56,866	147,526
	24	45,717	6,898	16,038	75,396

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



IL8 - Con Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=247,398, pvalue=0,004<0,05), του χρόνου (F(4,8)=8,775, p-value=0,005<0,05), αλλά και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=8,028, p-value=0,007<0,05) στις τιμές της Con Serum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Έλεγχοι	Επιδράσεων	Εντός Ομάδων κα	ι Αλληλεπιδράσεων
--------------------	------------	-----------------	-------------------

Source	Type III Sum	٩£	Mean	-	Sia
Source	of Squares	ar	Square	F	Sig.
Hr	15182,599	4	3795,650	8,775	,005
Hr * Group	13891,171	4	3472,793	8,028	,007
Error(Hr)	3460,555	8	432,569		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	160231.783	1	160231.783	945.837	.001
Group	41911,072	1	41911,072	247,398	,004
Error	338,815	2	169,407		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Con Serum μεταξύ HT29 και CACO2 (pvalue<0,05) για όλες τις χρονικές μετρήσεις, με εξαίρεση την 24ⁿ ώρα (p-value=0,251>0,05). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη 2ⁿ, 4ⁿ, 6ⁿ και 12ⁿ ώρα οι μέσες τιμές των HT29 είναι εμφανώς μεγαλύτερες των CACO2.

						95% Confidence	
Dependent	Daramatar	D	Std.		Sia	Interval	
Variable	Parameter	D	Error	ι	Sig.	Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	42,079	1,359	30 <i>,</i> 974	,001	36,234	47,924
IL8_Con_Serum_2	[Group=1]	11,963	1,921	6,227	,025	3,697	20,229
	[Group=2]	0 ^a		•			
	Intercept	41,776	6,327	6,603	,022	14,554	68,997
IL8_Con_Serum_4	[Group=1]	78,633	8,947	8,789	,013	40,136	117,129
	[Group=2]	0 ^a		•			
	Intercept	46,533	2,230	20,870	,002	36,940	56,126
IL8_Con_Serum_6	[Group=1]	154,856	3,153	49,111	,000	141,289	168,424
	[Group=2]	0 ^a	•	•	•	•	•
	Intercept	43,635	2,407	18,128	,003	33,278	53,992
IL8_Con_Serum_12	[Group=1]	144,602	3,404	42,478	,001	129,956	159,249
	[Group=2]	0 ^a		•			
	Intercept	44,629	29,953	1,490	,275	-84,250	173,508
IL8_Con_Serum_24	[Group=1]	67,718	42,360	1,599	,251	-114,545	249,980
	[Group=2]	0 ^a		•			

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

				95% Confid	ence Interval
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper
				Bound	Bound
	2	54,042	1,359	48,197	59,887
	4	120,408	6,327	93,187	147,629
HT29	6	201,389	2,230	191,796	210,983
	12	188,237	2,407	177,881	198,594
	24	112,347	29,953	-16,532	241,226
	2	42,079	1,359	36,234	47,924
	4	41,776	6,327	14,554	68,997
CACO2	6	46,533	2,230	36,940	56,126
	12	43,635	2,407	33,278	53,992
	24	44,629	29,953	-84,250	173,508

ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



CXCL6 - Ca Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=32,527, pvalue=0,029<0,05), όχι όμως του χρόνου (F(4,8)=0,458, p-value=0,765>0,05) και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=1,601, p-value=0,264>0,05) στις τιμές της Ca Serum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Έλεγχοι Επιδράσεων Εντός Ομάδων και Αλληλεπιδράσεων									
Source	Type III Sum	٩t	Mean	F	Sia				
Source	of Squares	ai	Square	Г	Sig.				
Hr	52,052	4	13,013	,458	,765				
Hr * Group	182,058	4	45,514	1,601	,264				
Error(Hr)	227,444	8	28,430						

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercep t	6971,668	1	6971,668	665,501	,001
Group	340,747	1	340,747	32,527	,029
Error	20,952	2	10,476		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Ca Serum μεταξύ HT29 και CACO2 (pvalue=0,005<0,05) μόνο για τη 2^η ώρα και πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των CACO2 είναι μεγαλύτερη των HT29.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλο

Dependent Variable	Daramator	В	Std.	t	Sia	95% Confidence Interval	
	Parameter		Error		Sig.	Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	23,274	,687	33,878	,001	20,318	26,230
CXCL6_Ca_Serum_2	[Group=1]	- 13,615	,972	- 14,014	,005	- 17,795	-9,435
	[Group=2]	0 ^a	•	•		•	•

	Intercept	21,746	3,277	6,636	,022	7,646	35,845
CXCL6_Ca_Serum_4	[Group=1]	-1,503	4,634	-,324	,777	- 21,442	18,437
	[Group=2]	0 ^a	•	•			•
	Intercept	20,140	4,340	4,641	,043	1,468	38,812
CXCL6_Ca_Serum_6	[Group=1]	-4,872	6,137	-,794	,511	- 31,278	21,534
	[Group=2]	0 ^a	•		•		•
	Intercept	22,013	3,045	7,229	,019	8,912	35,115
CXCL6_Ca_Serum_12	[Group=1]	-4,129	4,306	-,959	,439	- 22,657	14,399
	[Group=2]	0 ^a	•	•		•	•
	Intercept	26,817	4,773	5,618	,030	6,279	47,355
CXCL6_Ca_Serum_24	[Group=1]	- 17,158	6,750	-2,542	,126	- 46,203	11,887
	[Group=2]	0 ^a	•	•	•	•	•

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

				95% Confidence Interval			
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper		
				Bound	Bound		
	2	9,659	,687	6,703	12,615		
	4	20,243	3,277	6,144	34,342		
HT29	6	15,268	4,340	-3,404	33,940		
	12	17,884	3,045	4,783	30,986		
	24	9,659	4,773	-10,879	30,197		
	2	23,274	,687	20,318	26,230		
	4	21,746	3,277	7,646	35,845		
CACO2	6	20,140	4,340	1,468	38,812		
	12	22,013	3,045	8,912	35,115		
	24	26,817	4,773	6,279	47,355		

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



CXCL6 - Con Serum

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=4,399, p-value=0,171>0,05), του χρόνου (F(4,8)=0,432, p-value=0,782>0,05) και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=2,287, p-value=0,148>0,05) στις τιμές της Con Serum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Έλεγχοι	. Επιδράσεων Εντός	Ομάδων και Α	λληλεπιδράσεων
---------------------	--------------------	--------------	----------------

Source	Type III Sum	df	Mean	F	Sig.
	of Squares		Square	-	8-
Hr	27,895	4	6,974	,432	,782
Hr * Group	147,579	4	36,895	2,287	,148

Error(Hr)	129,061	8	16,133
-----------	---------	---	--------

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	5252,922	1	5252,922	82,232	,012
Group	281,031	1	281,031	4,399	,171
Error	127,758	2	63,879		

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Con Serum μεταξύ HT29 και CACO2 (pvalue=0,014<0,05) μόνο για την 24^η ώρα και πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των CACO2 είναι μεγαλύτερη των HT29.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

						95% Confidence	
Donondont Variable	Daramator	D	Std.	+	Sia	Int	erval
Dependent variable	Parameter	D	Error	L	JIg.	Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	20,779	3,736	5,561	,031	4,703	36,855
CXCL6_Con_Serum_2	[Group=1]	-11,413	5,284	-2,160	,163	-34,148	11,323
	[Group=2]	0 ^a			•		
	Intercept	17,150	5,644	3,039	,093	-7,132	41,433
CXCL6_Con_Serum_4	[Group=1]	1,440	7,981	,180	,873,	-32,900	35,781
	[Group=2]	0 ^a					
	Intercept	23,073	2,981	7,739	,016	10,245	35,900
CXCL6_Con_Serum_6	[Group=1]	-12,683	4,216	-3,008	,095	-30,824	5,458
	[Group=2]	0 ^a					
	Intercept	18,624	2,939	6,336	,024	5 <i>,</i> 977	31,271
CXCL6_Con_Serum_12	[Group=1]	-3,847	4,157	-,925	,452	-21,733	14,039
	[Group=2]	0 ^a					
CXCL6_Con_Serum_24	Intercept	20,149	,930	21,657	,002	16,146	24,152
	[Group=1]	-10,983	1,316	-8,347	,014	-16,644	-5,322
	[Group=2]	0 ^a					

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

				95% Confidence Interval		
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper	
				Bound	Bound	
	2	9,366	3,736	-6,710	25,443	
	4	18,591	5,644	-5,692	42,873	
HT29	6	10,390	2,981	-2,438	23,217	
	12	14,777	2,939	2,130	27,424	
	24	9,166	,930	5,163	13,169	
	2	20,779	3,736	4,703	36,855	
	4	17,150	5,644	-7,132	41,433	
CACO2	6	23,073	2,981	10,245	35,900	
	12	18,624	2,939	5,977	31,271	
	24	20,149	,930	16,146	24,152	

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



204

CXCL4 - Ca Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=84,060, pvalue=0,012<0,05) και του χρόνου (F(4,8)=8,165, p-value=0,006<0,05), όχι όμως και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=1,037, p-value=0,445>0,05) στις τιμές της Ca Serum.

Source	Type III Sum	.16	Mean	-	Sig.
	of Squares	ατ	Square	F	
Hr	210,039	4	52,510	8,165	,006
Hr * Group	26,687	4	6,672	1,037	,445
Error(Hr)	51,446	8	6,431		

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Έλεγχοι Επιδράσεων Εντός Ομάδων και Αλληλεπιδράσεων

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	urce Type III Sum of Squares		Mean Square	F	Sig.
Intercept	29138,803	1	29138,803	3101,077	,000
Group	789,860	1	789,860	84,060	,012
Error	18,793	2	9,396		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Ca Serum μεταξύ HT29 και CACO2 (pvalue<0,05) για όλες τις χρονικές μετρήσεις, με εξαίρεση την 24ⁿ ώρα (p-value=0,084>0,05). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη 2ⁿ, 4ⁿ, 6ⁿ και 12ⁿ ώρα οι μέσες τιμές των CACO2 είναι μεγαλύτερες των HT29.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

Dependent Variable	Parameter	В	Std. Error	t	C .	95% Confidence Interval	
Dependent Variable					Sig.	Lower	Upper
						Bound	Bound
CXCL4_Ca_Serum_2	Intercept	48,453	,674	71,901	,000	45,554	51,353

	[Group=1]	-12,783	,953	- 13,413	,006	-16,884	-8,682
	[Group=2]	0 ^a				•	
	Intercept	41,914	2,009	20,865	,002	33,271	50,557
CXCL4_Ca_Serum_4	[Group=1]	-14,073	2,841	-4,954	,038	-26,296	-1 <i>,</i> 850
	[Group=2]	0 ^a		•	•	•	
	Intercept	47,139	,133	355,67 6	,000,	46,569	47,709
CXCL4_Ca_Serum_6	[Group=1]	-11,686	,187	- 62,347	,000,	-12,492	-10,879
	[Group=2]	0 ^a	•	•		•	•
	Intercept	38,464	1,217	31,611	,001	33,228	43,699
CXCL4_Ca_Serum_12	[Group=1]	-8,741	1,721	-5,080	,037	-16,145	-1,337
	[Group=2]	0 ^a		•	•		
	Intercept	46,301	3,402	13,611	,005	31,664	60,938
CXCL4_Ca_Serum_24	[Group=1]	-15 <i>,</i> 560	4,811	-3,234	,084	-36,260	5,139
	[Group=2]	0 ^a		•		•	

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

				95% Confidence Interva		
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper	
				Bound	Bound	
	2	35,671	<i>,</i> 674	32,771	38,570	
	4	27 <i>,</i> 840	2,009	19,197	36,483	
HT29	6	35,453	,133	34,883	36,024	
	12	29,722	1,217	24,487	34,958	
	24	30,741	3,402	16,104	45,378	
	2	48 <i>,</i> 453	<i>,</i> 674	45,554	51,353	
	4	41,914	2,009	33,271	50,557	
CACO2	6	47,139	,133	46,569	47,709	
	12	38 <i>,</i> 464	1,217	33,228	43,699	
	24	46,301	3,402	31,664	60,938	

ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

ΓΡΑΦΗΜΑ 5: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



CXCL4 - Con Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=33,158, pvalue=0,029<0,05), του χρόνου (F(4,8)=24,209, p-value<0,001<0,05), αλλά και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=13,861, p-value=0,001<0,05) στις τιμές της Con Serum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 21: Έλεγχο	ι Επιδράσεων Εν	τός Ομάδων και	Αλληλεπιδράσεων
--------------------	-----------------	----------------	-----------------

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hr	573,783	4	143,446	24,209	,000
Hr * Group	328,527	4	82,132	13,861	,001
Error(Hr)	47,402	8	5,925		

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	23910,862	1	23910,862	2540,549	,000
Group	312,069	1	312,069	33,158	,029
Error	18,823	2	9,412		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Con Serum μεταξύ HT29 και CACO2 κατά τη 2^η και 4^η ώρα (p-value<0,05), όχι όμως κατά την 6^η, 12^η και 24^η ώρα (p-value>0,05). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη 2^η ώρα η μέση τιμή των CACO2 είναι μεγαλύτερη των HT29, αλλά αντίθετα κατά την 4^η ώρα η μέση τιμή των HT29 είναι μεγαλύτερη των CACO2.

95% Confidence Std. Interval **Dependent Variable** Parameter В t Sig. Error Lower Upper Bound Bound Intercept 48,884 ,527 92,801 ,000, 51,150 46,617 CXCL4_Con_Serum_2 [Group=1] -12,883 ,745 -17,294 ,003 -9,678 -16,089 [Group=2] **0**^a Intercept 26,856 ,484 55,441 ,000, 24,772 28,940 4,331 CXCL4_Con_Serum_4 [Group=1] ,685 6,321 ,024 1,383 7,278 [Group=2] 0^a ,004 59,108 Intercept 46,220 2,995 15,430 33,332 ,070, CXCL4_Con_Serum_6 [Group=1] -15,161 4,236 -3,579 -33,388 3,066 [Group=2] **0**^a 29,140 ,000, Intercept ,641 45,492 26,384 31,896 CXCL4_Con_Serum_12 [Group=1] -,774 ,906 -,854 ,483 -4,672 3,124 [Group=2] 0^a ,004 52,639 Intercept 41,534 2,581 16,093 30,430 CXCL4_Con_Serum_24 [Group=1] -15,014 3,650 -4,113 ,054 ,691 -30,718 [Group=2] **0**^a

ΠΙΝΑΚΑΣ 23: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

				95% Confide	ence Interval
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper
				Bound	Bound
	2	36,000	,527	33,734	38,267
	4	31,186	,484	29,102	33,271
HT29	6	31,059	2,995	18,171	43,947
	12	28,366	,641	25,610	31,122
	24	26,521	2,581	15,416	37,626
	2	48,884	,527	46,617	51,150
	4	26 <i>,</i> 856	,484	24,772	28,940
CACO2	6	46,220	2,995	33,332	59,108
	12	29,140	,641	26,384	31,896
	24	41,534	2,581	30,430	52,639

ΠΙΝΑΚΑΣ 24: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

ΓΡΑΦΗΜΑ 6: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



CXCL4 - CON SERUM

VEGF - Ca Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=1287,683, pvalue=0,001<0,05), του χρόνου (F(4,8)=16,161, p-value=0,001<0,05), αλλά και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=17,331, p-value=0,001<0,05) στις τιμές της Ca Serum.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hr	13,185	4	3,296	16,161	,001
Hr * Group	14,139	4	3,535	17,331	,001
Error(Hr)	1,632	8	,204		

ΠΙΝΑΚΑΣ 25: Έλεγχοι Επιδράσεων Εντός Ομάδων και Αλληλεπιδράσεων

ΠΙΝΑΚΑΣ 26: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	59,430	1	59,430	2718,992	,000
Group	28,146	1	28,146	1287,683	,001
Error	,044	2	,022		

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Ca Serum μεταξύ HT29 και CACO2 για όλες τις χρονικές μετρήσεις (p-value<0,05). Πιο συγκεκριμένα, οι μέσες τιμές των HT29 είναι εμφανώς μεγαλύτερες των CACO2, ιδίως κατά την 6^η, 12^η και 24^η ώρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

Dopondont Variable	Paramotor	P	Std.	+ Sia		95% Confidence Interval	
Dependent variable	Falametei	D	Error	L	JIg.	Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	,561	,030	18,603	,003	,431	,690
VEGF_Ca_Serum_2	[Group=1]	,371	,043	8,697	,013	,187	,554
	[Group=2]	0 ^a	•		•	•	
VEGF_Ca_Serum_4	Intercept	,579	,121	4,797	,041	,060	1,099
	[Group=1]	1,323	,171	7,747	,016	,588	2,058

	[Group=2]	0 ^a				•	•
	Intercept	,508	,401	1,266	,333	-1,219	2,235
VEGF_Ca_Serum_6	[Group=1]	2,681	,568	4,723	,042	,239	5,123
	[Group=2]	0 ^a			•	•	•
	Intercept	,490	,488	1,005	,421	-1,608	2,588
VEGF_Ca_Serum_12	[Group=1]	5,352	,690	7,763	,016	2,386	8,319
	[Group=2]	0 ^a				•	
	Intercept	,550	,068	8,111	,015	,258	,841
VEGF_Ca_Serum_24	[Group=1]	2,136	,096	22,282	,002	1,724	2,548
	[Group=2]	0 ^a					

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

				95% Confidence Interv		
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper	
				Bound	Bound	
	2	,931	,030	,802	1,061	
	4	1,902	,121	1,383	2,422	
HT29	6	3,189	,401	1,462	4,915	
	12	5,842	,488	3,745	7,940	
	24	2,686	,068	2,394	2,977	
	2	,561	,030	,431	,690	
	4	,579	,121	,060	1,099	
CACO2	6	,508	,401	-1,219	2,235	
	12	,490	,488	-1,608	2,588	
	24	,550	,068	,258	,841	





VEGF - Con Serum

Υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους κυττάρων (F(1,2)=1367,788, pvalue=0,007<0,05), του χρόνου (F(4,8)=46,825, p-value<0,001<0,05), αλλά και της αλληλεπίδρασης χρόνου και είδους (F(4,8)=48,448, p-value<0,001<0,05) στις τιμές της Con Serum.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hr	14,321	4	3,580	46,825	,000
Hr * Group	14,817	4	3,704	48,448	,000
Error(Hr)	,612	8	,076		

ΠΙΝΑΚΑΣ 30: Έλεγχοι Επιδράσεων Μεταξύ Ομάδων

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Intercept	41,077	1	41,077	304,759	,003	
Group	18,437	1	18,437	136,788	,007	
Error	,270	2	,135			

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές των Con Serum μεταξύ HT29 και CACO2 για όλες τις χρονικές μετρήσεις (p-value<0,05). Πιο συγκεκριμένα, οι μέσες τιμές των HT29 είναι εμφανώς μεγαλύτερες των CACO2, ιδίως κατά τη 12^η και 24^η ώρα.

						95% Cor	nfidence
	Parameter	_	Std.		Sig.	Inte	rval
Dependent Variable		В	Error	t		Lower	Upper
						Bound	Bound
	Intercept	,524	,014	36,638	,001	,462	<i>,</i> 585
VEGF_Con_Serum_2	[Group=1]	,286	,020	14,169	,005	,199	,373
	[Group=2]	0 ^a			•	•	•
	Intercept	,567	,074	7,675	,017	,249	,884
VEGF_Con_Serum_4	[Group=1]	,691	,104	6,621	,022	,242	1,141
	[Group=2]	0 ^a	•			•	•
	Intercept	,359	,032	11,330	,008	,223	,496
VEGF_Con_Serum_6	[Group=1]	,840	,045	18,714	,003	,647	1,033
	[Group=2]	0 ^a	•				
	Intercept	,451	,458	,984	,429	-1,521	2,422
VEGF_Con_Serum_12	[Group=1]	4,812	,648	7,426	,018	2,024	7,601
	[Group=2]	0 ^a	•			•	•
	Intercept	,464	,061	7,659	,017	,204	,725
VEGF_Con_Serum_24	[Group=1]	2,971	,086	34,648	,001	2,602	3,340
_	[Group=2]	0 ^a					

ΠΙΝΑΚΑΣ 31: Εκτιμήσεις Παραμέτρων Μοντέλου

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

ΠΙΝΑΚΑΣ 32: Μέσοι Όροι και 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης Μέσων

				95% Confidence Interval			
Group	Hr	Mean	Std. Error	Lower	Upper		
				Bound	Bound		
HT29	2	,810	,014	,749	,872		

	4	1,258	,074	,940	1,576
	6	1,199	,032	1,063	1,336
	12	5,263	,458	3,292	7,235
	24	3,436	,061	3,175	3,697
	2	,524	,014	,462	,585
	4	,567	,074	,249	,884
CACO2	6	,359	,032	,223	,496
	12	,451	,458	-1,521	2,422
	24	,464	,061	,204	,725

ΓΡΑΦΗΜΑ 8: Μέσοι Όροι ανά Χρονική Μέτρηση



4.7 Συζήτηση

Στο πρώτο μέρος της διατριβής έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των χημειοκινών CXCL8, CXCL4, CXCL6 και VEGF στον καρκινικό και φυσιολογικό βλεννογόνο του ιδίου ασθενούς. Ενώ είναι γενικά αποδεκτό ότι τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα, εξίσου σημαντική φαίνεται να είναι και η αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος για την ανάπτυξη του καρκίνου. Μεταξύ άλλων, η έκφραση των αγγειοδραστικών παραγόντων μπορεί να είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην ανάπτυξή του καθώς μπορούν να δράσουν είτε ανασταλτικά είτε επαγωγικά στην διαδικασία της νεοαγγειογένεσης, μίας λειτουργίας εξαιρετικής ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη του όγκου^[3,4]. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου, μεταξύ των καρκινικών θανάτων στις Δυτικές χώρες. Περισσότεροι από τους μισούς θανάτους προκαλούνται από μεταστάσεις του που έχουν αναπτυχθεί μετά την χειρουργική απομάκρυνση του όγκου παρά την εφαρμογή επιπλέον χημειοθεραπείας^[5,6]. Η ταξινόμηση κατά TNM θεωρείται ο καλύτερος προγνωστικός δείκτης κατά τα πρώιμα στάδια του εντερικού καρκίνου^[7].

Στην παρούσα μελέτη, μετρήθηκε σε εντερικούς καρκινικούς ιστούς η ποσότητα των αγγειογενών χημειοκινών CXCL6 (GCP-2) και CXCL8 (IL-8), του πιο ευρέως μελετημένου αγγειογενετικού παράγοντα VEGF καθώς και της αγγειοστατικής χημειοκίνης CXCL4 (PF-4). Για καλύτερη σύγκριση των αποτελέσμάτων οι 4 αυτοί παράγοντες μετρήθηκαν επιπλέον και σε δείγματα φυσιολογικού εντερικού βλενογόνου των ιδίων ασθενών.

Οι χημειοκίνες εμπλέκονται στην καρκινική ογκογένεση και μετάσταση επηρεάζοντας το καρκινικό μικροπεριβάλλον κυρίως μέσω της ανάπτυξης τοπικής φλεγμονής και αγγειογένεσης^[8].

Οι CXC χημειοκίνες μπορούν και έλκουν στην περιοχη του όγκου τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα ρυθμίζοντας έτσι την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού και επεμβαίνοντας αποφασιστικά στην ρύθμιση της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού και της καρκινικής μετάστασης. Η δυνατότητας εισβολής και μετάστασης εξάλλου των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς και απομακρυσμένους ιστούς είναι βαθιά εξαρτώμενη από την παρουσία προαγγειογενούς περιβάλλοντος στην περιοχή του όγκου^[9].

Στην μελέτη μας δείξαμε ότι τα επίπεδα δύο αγγειογενετικών παραγόντων, των CXCL6 και VEGF, είναι σημαντικά υψηλότερα στην περιοχή του συμπαγούς όγκου σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον αυξημένα επίπεδα των δύο άλλων χημειοκινών που εξετάσαμε, της αγγειογενούς CXCL8 και της αγγειοστατικής CXCL4 είναι συνδεδεμένα με επιβαρυμένη πρόγνωση πενταετούς επιβίωσης. Όσον αφορά την CXCL8 στην μελέτη μας τα αποτελέσματα για την παραγωγή της στον καρκινικό ιστό δεν έρχονται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς δεν μπορέσαμε να επιβεβαίωσουμε τα υψηλότερα επίπεδα στον ιστό αυτό σε σχέση με τον φυσιολογικό βλεννογόνο. Αυτό μας το εύρημα έρχεται επίσης σε αντίθεση με διάφορες μελέτες που δείχνουν αυξημένα επίπεδα της CXCL8 και στα περιβάλλοντα τον όγκο στρωματικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα^[10-13]. Αυτή η ένδειξη ενισχύεται περαιτέρω και από μία πρόσφατη μελέτη ότι η έκφραση της CXCL8 είναι σημαντικά ενισχυμένη σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή και η διαφορά αυτή γινόταν ακόμα περισσότερο εμφανής όσο αυξανόταν η ηλικία των ασθενών^[14]. Η εξήγηση για αυτή μας την ασυμφωνία είναι πιθανό να βρίσκεται στην μελέτη της ομάδας του Ning, σύμφωνα με την οποία ασθενείς με στάδιου Ι/ καρκίνο του παχέος εντέρου εμφάνιζαν έως και 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση της CXCL8 στον ορό του αίματος σε σχέση με την ομάδα μελέτης των υγιών^[15]. Σε αντίθεση με άλλες μελέτες στην δική μας συμπεριλήφθηκαν μόνο ασθενείς σταδίων ΙΙ και ΙΙΙ ώστε να αποφευχθεί πιθανή παρεμβολή στην επιβίωση των ασθενών, από περιπτώσεις νοσούντων με ήδη διεσπαρμένους καρκίνους στους οποίους
παρατηρούνται και οι υψηλότερες τιμές της CXCL4 , γεγονός που ενδεχομένως να εξηγεί και τα αποτελέσματά μας.

Θέλοντας να ελέγξουμε αν τα επίπεδα των χημειοκινών είναι συνδεδεμένα με την επιβίωση και την κατηγοριοποίηση κατά την TNM ή την Duke's κλίμακα, ελέγξαμε μόνο ασθενείς οι οποίοι δεν έλαβαν πέραν της χειρουργικής αντιμετώπισης επιπλέον χημειοθεραπεία. Στην ομάδα μελέτης μας η γενική 5ετής επιβίωση βρέθηκε στο 55,1%, ποσοστό όμοιο και με τις προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν ποσοστό επιβίωσης στο 96%, 87%, 55% και 5% για τα ΤΝΜ στάδια Ι, ΙΙ, ΙΙΙ και ΙV αντίστοιχα^[16]. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι η χαμηλή επιβίωση συνδέθηκε με υψηλά επίπεδα των χημειοκινών CXCL8 και CXCL4. Η ίδια τάση υψηλής συγκέντρωσης παρατηρήθηκε στους ασθενείς με χαμηλή επιβίωση και για τον VEGF, χωρίς όμως το εύρημα αυτό να μπορεί να επιβεβαιωθεί και στατιστικά. Τα ευρήματα μας για την CXCL8 και την μη 5ετή επιβίωση έρχονται σε πλήρη συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες όπου η συνολική χαμηλή επιβίωση έχει συνδεθεί με υψηλά επίπεδα της εν λόγω χημειοκίνης^[17-19]. Σε μία μεγάλης κλίμακας μετα-ανάλυση υψηλά επίπεδα της CXCL8 έχουν συνδεθεί με χαμηλή συνολικά πρόβλεψη επιβίωσης, αν και τα αποτελέσματα ήσαν εμφανέστερα σε σταδίου ΙV κατά την ΤΝΜ ταξινόμηση ασθενείς, ενώ η συσχέτιση ήταν ασθενέστερη στα πιο πρώιμα στάδια^[20]. Η σύνδεση προφανώς πηγάζει από την τροφική επίδραση της CXCL8 στα εντερικά καρκινικά κύτταρα μαζί με την επίδραση της στην αυξημένη περιογκική νεοαγγειογένεση^[21]. Η επιβαρυντική επίδραση της CXCL8 υποστηρίζεται περαιτέρω από την προκαλούμενη αύξηση των Μεταλλοπρωτεασών (MMPs) των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας έτσι το μεταστατικό δυναμικό του όγκου^[22].

Από την άλλη η σύνδεση της CXCL8 με την υψηλότερη θνησιμότητα μπορεί και να προέρχεται από την πρόελευση της CXCL8 αυτής καθ' αυτής. Υψηλότερη έκφραση της στην περιοογκική φλεγμονή έχει συνδεθεί με καλύτερη επιβίωση χωρίς επανεμφάνιση της νόσου^[23]. Αυτό είναι πιθανό λόγω της επίδρασης της CXCL8 στην στρατολόγηση των ουδετερόφιλων. Η

217

αγγειογόνος δράση της CXCL8 είναι ανεξάρτητη της χημειοτακτικής της δράσης για τα ουδετερόφιλα και τους υπόλοιπους φλεγμονώδεις παράγοντες^[24]. Τα ουδετερόφιλα που έλκονται στην περιοχή του όγκου από την CXCL8, επηρεάζουν την ανάπτυξη του καρκίνου μέσω δύο ανεξάρτητων τρόπων αναλόγως του φαινοτύπου τους. Τα N1 ογκοσυσχετιζόμενα ουδετερόφιλα (TAN) συνεισφέρουν στην ανοσολογική του εποπτεία μέσω της κυτταροτοξικής τους δράσης και των αλληλεπιδράσεών τους^[25].

Παρά το γεγονός ότι ο VEGF ήταν σημαντικά αυξημένος στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό στους ασθενείς μας, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση του σε σχέση με την ταξινόμηση του καρκίνου (τόσο κατά Dukes όσο και κατά TNM) αλλά και ακόμα σημαντικότερο με την επιβίωση των ασθενών. Δύο είναι οι πιθανές εξηγήσεις γι αυτό. Πρώτον ο ρόλος της αγγειογένεσης ως ένας προγνωστικός παράγοντας δεν είναι ακόμα πλήρως ξεκάθαρος και τα αποτελέσματα του είναι αντιφατικά. Κάποιες μελέτες άλλωστε έχουν ήδη αποδείξει ότι η μέτρηση της αγγειογένεσης δεν μπορεί να παράσχει επαρκείς προγνωστικές πληροφορίες^[26-28]. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι μία αλληλεπίδραση μεταξύ του VEGF και της CXCL8 ίσως παίζει σημαντικότερο ρόλο από την έκφραση καθενός απ τους δύο αυτούς παράγοντες ξεχωριστά. Ήδη φαίνεται ότι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα παράγουν VEGF, ο οποίος με την σειρά του ρυθμίζει αυξητικά την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα^[29,30]. Πρέπει όμως να ανεφερθεί ότι τα επίπεδα του VEGF βρέθηκαν αυξημένα και στους ασθενείς με μη 5ετή επιβίωση, χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό.

Τα υψηλά επίπεδα του VEGF έχουν συνολικά συνδεθεί με προχωρημένο καρκινικό στάδιο και επιβαρυμένη πρόβλεψη^[31-33]. Παρ όλα αυτά μία πρόσφατη μελέτη, είναι πιθανό να μας προσφέρει μία πιο επαρκή αιτιολογία. Σύμφωνα με την τελευταία, η έκφραση της CXCL4 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου βρέθηκε να αντισταθμίζει την αγγειογενή δράση τόσο

του VEGF όσο και της CXCL8. Είναι επομένως πιθανό να είναι η σχετική κάθε φορά έκφραση διαφορετικών χημειοκινών και το χημειοτακτικό περιβάλλον που προκύπει από αυτήν που επηρεάζει την εξέλιξη των καρκίνων του παχέος εντέρου^[34]. Αυτό το τελευταίο ίσως και να είναι υπεύθυνο για την σύνδεση της αγγειοστατικής χημειοκίνης CXCL4 με την επιβίωση των ασθενών μας. Είναι επομένως εύλογο να υποθέσουμε ότι είναι η ισορροπία μεταξύ των αγγειογενών και αγγειοστατικών παραγόντων που εν τέλει επηρεάζει και καθορίζει την τελική επιβίωση. Έτσι τα αυξημένα επίπεδα CXCL4 που βρήκαμε σε συνδυασμό με την χαμηλή επιβίωση είναι πιθανό να μην αρκούσαν για να αντισταθμίσουν την επιβαρυντική δράση των CXCL8 και VEGF.

Τα δεδομένα από την άλλη για την CXCL6 και τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι αρκετά περιορισμένα. Στην μελέτη μας προέκυψαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα της χημειοκίνης αυτής στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τον υγιή ιστό. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με την μελέτη της ομάδας του *Gijsbers* οι οποίοι ανίχνευσαν την CXCL6 σε ενδοθηλιακά κύτταρα εντερικών αδενοκαρκινωμάτων όχι όμως και ενδοθηλιακά κύτταρα υγιών ιστών^[35].

Η παραγωγή της CXCL6 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στον καρκίνο μπορεί να υποδεικνύει τυχόν παρεμβολή της με την ανάπτυξη, την εξέλιξη, την μετακίνηση και την μετάσταση του όγκου, γεγονός όμως που δεν μπορεί να υποστηριχθεί από την μελέτη μας καθώς δεν προέκυψε σύνδεση της έκφρασης της με την ταξινόμηση του όγκου τόσο κατά Dukes όσο και κατά TNM. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλα ευρήματα όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά τόσο ανάμεσα στην έκφραση του mRNA όσο και στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης ανάμεσα σε καρκινικούς και υγιείς ιστούς, αποτέλεσμα που είναι πιθανό να οφείλεται και στην μελέτη διαφορετικών ασθενών^[36].

Ένα ακόμα ενδιαφέρον αποτέλεσμα της έρευνας μας είναι η έλλειψη σύνδεσης μεταξύ των παραδοσιακών ιστοπαθολογικών δεικτών και της επιβίωσης. Μόνο ασθενείς με ισχυρή

έκφραση του p53 βρέθηκαν να έχουν σημαντικά μειωμένη επιβίωση. Παρ όλα αυτά πρέπει να αναφερθεί ότι ήταν εμφανής η τάση για αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς με μειωμένη έκφραση των MLH1 και p21 και αυξημένη του EGFR, αποτέλεσμα όμως που δεν μπορέσαμε να υποστηρίξουμε και στατιστικά.

Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών πάνω στην σύνδεση των ιστοπαθολογικών βιοδεικτών και της επιβίωσης είναι αντιφατικά. Έτσι σε συμφωνία με την μελέτη μας η έκφραση του bcl2 δεν βρέθηκε να έχει σύνδεση ούτε με την αγγειογένεση ούτε με την επιβίωση σε Έλληνες ασθενείς^[37]. Παρομοίως μόνο νέοι ασθενείς, ηλικίας μικρότερης των 40 ετών βρέθηκαν να έχουν επιβαρυμένη πρόγνωση όταν οι όγκοι βρέθηκαν να είναι bcl2 αρνητικοί^[38]. Δύο άλλες όμως μελέτες βρήκαν ότι η έκφραση του bcl2 συνδέεται με καλύτερη επιβίωση^[39,40]. Ομοίως έλλειψη της έκφρασης του bcl2 έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής, ενώ η ανοσοστοχημική ανίχνευσή της είναι συνδεδεμένη με μειώμενη ανάπτυξη του όγκου^[41]. Όσον αφορά την έκφραση του p53 βρήκαμε σημαντικά μειωμένη επίβιωση των ασθενών με ισχυρή έκφραση του τελευταίου, σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες^[39,42].

Η p21 είναι ένας κυκλινοεξαρτώμενος αναστολέας κινάσης ο οποίος ελέγχει την διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Αυξημένη ρύθμιση της έκφρασης του αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καταστέλλει παράγοντες που ενισχύουν τον καρκινικό πολλαπλασιασμό^[43].

Προηγούμενες μελέτες πάνω στην απώλεια του p21 και της κλινικής εξέλιξης των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου δεν έχουν καταφέρει να αποδώσουν ξεκάθαρα αποτελέσματα. Ενώ η απώλεια του p21 φαίνεται να συνδέεται με επιβαρυμένη πρόγνωση^[44], οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν καταφέρει να αποδείξουν κάποια ανεξάρτητη διαγνωστική αξία για τον εν λόγω παράγοντα^[45-47]. Η απώλεια του p21 στις περιπτώσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει αναφερθεί να συνδέεται με αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς ηλίκιας ≥60 ετών, ενώ βρέθηκε να συνδέεται με μειωμένη επιβίωση σε αθενείς <60 ετών^[48]. Στην μελέτη μας ασθενείς χωρίς έκφραση του p21 τείνουν να ζουν περισσότερο, αν και το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανό να προκύπτει από τον μικρό αριθμό των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Η έκφραση του EGFR φαίνεται να είναι εξαρτώμενη από την περιοχή της ανάπτυξης του καρκίνου. Ο EGFR βρέθηκε να είναι θετικός στο 92% από 619 δείγματα σε μία ευρείας κλίμακας μελέτη καρκίνων του παχέος εντέρου και η έκφραση αυτή φάνηκε να έχει ευνοϊκό αποτέλεσμα πάνω στην επιβίωση^[49]. Σε μία άλλη μελέτη περισσότερων των 10000 δειγμάτων βρέθηκε η έκφραση του EGFR να εντοπίστηκε στο 45% των δειγμάτων στους όγκους του αριστερού κόλον, αποτέλεσμα σύμφωνο με το δικό μας όπου το αντίστοιχο ποσοστό βρέθηκε στο 47%^[50].

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του EGFR βρέθηκε επίσης να συνδέεται με αυξημένη επιβίωση, χωρίς όμως για το αποτέλεσμα αυτό να προκύπτει στατιστική σημαντικότητα. Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας όμως είναι ότι η έλλειψη της έκφρασης του βρέθηκε να συνδέεται με υψηλότερη έκφραση για την CXCL8, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία και με το εύρημά μας ότι η υψηλότερη έκφραση του CXCL8 συνδέεται με μειωμένη επιβίωση. Μία εξήγηση για αυτό είναι η αναφερόμενη ευθεία ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω της επαγωγής του EGFR και την πρωτεόλυση των συνδετών του τελευταίου που ρυθμίζονται από την CXCL8^[51].

Η γενετική Μικροδορυφορική Αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI) είναι μία μορφή γενετικής αστάθειας η οποία προκαλείται από αλλαγές στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού. Η αστάθεια αυτή μπορεί να προέλθει είτε από κάποια γενετική βλάβη σε κάποιο από τα υπεύθυνα για την διαδικασία αυτή γονίδια (MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2) είτε σε επιγενετική καταστολή του MLH1. Η μεθυλίωση του εκκινητή του MLH1 επάγει την καταστολή αυτή του γονιδίου και οδηγεί στην μείωση ή ακόμα και στην απώλεια της έκφρασης του. Η τελευταία μάλιστα θεωρείται ως ένα γρήγορος και αξιόπιστος τρόπος ώστε να αναγνωριστούν οι MSI-H (H-High) φαινότυποι του καρκίνου του παχέος εντέρου^[52,53]. Παρ' όλα αυτά είναι ακόμα αρκετά ασαφή τα δεδομένα σχετικά με την σύνδεση της θνησιμότητας και της έκφρασης του MLH1. καθώς απώλεια της έκφρασης του εν λόγω γονιδίου έχει ανιχνευθεί στο 90% των MSI-H καρκινωμάτων. Ενώ όμως φαίνεται η τάση των ασθενών με απώλεια έκφρασης να εμφανίζουν αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με τους ασθενείς που παρατηρείται έκφραση, το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να αποδειχθεί στατιστικά^[54]. Από την άλλη πλευρά οι MSI-H εντερικοί καρκίνοι έχουν συνδεθεί με μεγαλύτερη επιβίωση, καλύτερη πρόγνωση και μικρότερη τάση για εμφάνιση μεταστάσεων^[55-58]. Οι μελέτες αυτές έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Στους MLH1 αρνητικούς ασθενείς της μελέτης μας φαίνεται η τάση για καλύτερη πρόβλεψη πενταετούς επιβίωσης, αλλά όπως και με το p21 η τάση αυτή δεν μπορεί να υποστηριχθεί και στατιστικά.

Συνολικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η συγκέντρωση των αγγειογενών παραγόντων VEGF και CXCL6 είναι σημαντικά αυξημένη στα καρκινικά δείγματα του παχέος εντέρου σε σχέση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό, αποτέλεσμα που μπορεί να υποδεικνύει την συμμετοχή τους στην τοπική αγγειογένεση και εξάπλωση του όγκου. Επιπλέον σημαντικά υψηλότερες τιμές για CXCL8 και CXCL4 συνδέθηκαν με επιβαρυμένη πενταετή επιβίωση, ενώ η ίδια τάση μετρήθηκε και για τον VEGF. Τα επίπεδα από την άλλη των χημειοκινών δεν βρέθηκαν να συνδέονται με την ταξινόμηση των όγκων ενώ οι όγκοι με απουσία έκφρασης για EGFR και p21 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για CXCL8 και CXCL6 αντίστοιχα.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής έγινε μελέτη της παραγωγής των χημειοκινών CXCL8, CXCL4, CXCL6 και VEGF από χαρακτηρισμένες εντερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές τόσο σε

συνθήκες βασικής έκφρασης όσο και μετά από επίδραση ανθρώπινου ορού (5 καρκινοπαθών και 5 υγιών) και FBS.

Η εξέλιξη των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, όπως και πολλές άλλες περιπτώσεις καρκίνων, εξαρτάται από πολλούς μηχανισμούς τόσο τοπικούς όσο και συστημικούς του ξενιστή οργανισμού. Ανάμεσα στους τοπικούς μηχανισμούς η στρατολόγηση και το "φιλτράρισμα" για την είσοδο εντός του όγκου των κατάλληλων ανοσοποιητικών κυττάρων είναι ένας κρίσιμος παράγοντας. Οι χημειοκίνες είναι διαλυτοί παράγοντες με διττό ρόλο καθώς συμμετέχουν τόσο στην στρατολόγηση των ανοσοποιητικών κυττάρων ούο καθώς συμμετέχουν τόσο στην στρατολόγηση των ανοσοποιητικών κυττάρων οδο και στην ρύθμιση της έκφρασης ποικίλλων αγγειογενών και αγγειοστατικών παραγόντων. Πολλά κύτταρα, μεταξύ των οποίων τα μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα, μπορούν και εκφράζουν χημειοκίνες, παρ' όλα αυτά υπάρχουν πλέον ισχυρά στοιχεία ότι και τα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν C-X-C και C-C χημειοκίνες.

Στρωματικά και επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους τόσο απ' ευθείας μέσω διακυτταρικής επαφής, όσο και μέσω παρακρινούς σηματοδότησης, καθώς και οι δύο αυτές κυτταρικές ομάδες εκκρίνουν μία ποικιλία διαλυτών πρωτεϊνών του μικροπεριβάλλοντός τους όπως: αυξητικούς παράγοντες, πρωτεάσες παράλληλα με τους αναστολείς τους, και κυτταροκίνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού είναι η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα ώστε να ενεργοποιήσουν τα παρακείμενα ενδοθηλιακά και να επάγουν την νεοαγγειογένεση^[4].

Η διαφορετική παραγωγή των χημειοκινών από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα φέρεται να συνεισφέρει στο χαρακτηριστικό προφίλ "φιλτραρίσματος" ειδικών ανοσολογικών πληθυσμών που παρατηρείται στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτής των χημειοκινών από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου μπορεί να διαφοροποιηθεί από εκκρινόμενες από διαφοροποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα κυτταροκίνες. Επίσης

223

υποδεικνύει μία αλληλεπίδραση ανάμεσα στα τελευταία και τα επιθηλιακά κύτταρα πιθανής κρίσιμης σημαντικότητας για τον καρκίνο. Έτσι η IL-13 αυξάνει την επαγόμενη από την IL-1a έκφραση της CXCL8 στην εντερική επιθηλιακή κυτταρική σειρά HT-29 και ο συνδυασμός TNFa και TNF-γ προκαλεί έκκριση διαφόρων C-C χημειοκινών όπως είναι η RANTES και η MCP-1 μέσω της ενεργοποίησης μίας ευαίσθητης για την βορτμανίνη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3-Κινάσης^[59].

Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε ότι οι ιστοί εντερικών καρκινωμάτων περιέχουν αυξημένες ποσότητες των αγγειογενών μορίων CXCL6 και VEGF σε σχέση με τον φυσιολογικό βλενογόνο. Επιπλέον η πενταετής επιβίωση των ασθενών είναι αντίστροφα σχετιζόμενη προς τα επίπεδα των χημειοκινών CXCL4 και CXCL8 στον καρκινικό ιστό. Η βιολογική συμπεριφορά των εντερικών καρκινικών κυττάρων δεν είναι ακόμα πολύ καλά μελετημένη.

Αντίθετα τα κύτταρα HT-29 και Caco-2 στις καλλιέργειες έχουν μελετηθεί επαρκως καθώς τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν βρεθεί να είναι μία κύρια πηγή παραγωγής χημειοκινών^[60].

Επιπλέον, έκθεση των ινοβλαστών σε ολικό ορό έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές στην έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, πολλά από τα οποία έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην επούλωση των τραυμάτων. Τα γονίδια αυτά που βρέθηκαν να επάγονται στα πειράματα αυτά εκφράζονται και στους όγκους (συμπεριλαμβανομένων των εντερικών), είτε από τα καρκινικά κύτταρα και τους καρκινοσυνδεόμενους ινοβλάστες μεμονομένα είτε και από τα δύο συγχρόνως^[61].

Ήδη ένα πρότυπο έκφρασης γονιδίων που εντοπίστηκε σε ινοβλάστες που είχαν επωαστεί με ορό αίματος έχει βρεθεί ταυτόσημο και σε καρκίνους του μαστού και συνδέεται με επιβαρυμένη κλινική πρόβλεψη. Επιπλέον το ίδιο αυτό πρότυπο είναι πολύ πιθανό να αυξάνει τον κίνδυνο εισβολής των καρκινικών κυττάρων στα περιβάλλοντα ενδοθήλια ανεξαρτήτως των υπολοίπων κλινικοπαθολογικών παραγόντων κινδύνου^[62].

224

Βασιζόμενοι πάνω στην διαπιστωμένη αλληλεπίδραση ανάμεσα στις Ιντερλευκίνες και τις χημειοκίνες αποφασίσαμε στην παρούσα μελέτη να εξετάσουμε την επίδραση που μπορεί να έχει ο ορός ασθενούς πάνω σε γνωστές καλά χαρακτηρισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν συνεχώς CXCL8 και έτσι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της εν λόγω χημειοκίνης αντανακλούν την καρκινική επιβάρυνση και μπορούν να καθορίσουν την πρόβλεψη εξέλιξης της νόσου. Ο ορός των καρκινοπαθών ασθενών σε προχωρημένο στάδιο είναι συνήθως πλούσιος σε CXCL8, καθώς η χημειοκίνη αυτή είναι ευρέως παραγόμενη από τα κακοήθη κύτταρα^[63].

Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά εντερικού αδενοκαρκινώματος HT-29 έχει απομονωθεί από αρχικό όγκο 44χρονης Καυκάσιας το 1964 από τους *Fogh* και *Trempe*^[64]. Ο λόγος που τα κύτταρα αυτά τράβηξαν εξαρχής την επιστημονική προσοχή προέρχεται από το γεγονός ότι μπορούν και εκφράζουν χαρακτηριστικά ώριμων εντερικών κυττάρων, όπως τα εντεροκύτταρα και τα κύτταρα που παράγουν βλέννα. Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά τους τα HT-29 θεωρούνται μία πολυδύναμη εντερική κυτταρική σειρά η οποία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των δομικών και μοριακών γεγονότων που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση^[65].

Μια θεμελιώδης διαφορά ανάμεσα στα ΗΤ-29 και τα Caco-2 είναι ότι τα πρώτα μπορούν και παράγουν βλεννίνη σε σχετικά υψηλά επίπεδα^[66]. Τα ΗΤ-29 εκκρίνουν μία σειρά μορίων όπως: προφλεγμονώδης κυτταροκίνες [ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNFα) και οι Ιντερλευκίνες IL1β και IL6], αυξητικούς παράγοντες [αυξητικός παράγοντας διαχωρισμού αιμοπεταλίων AA (PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης α και β(TGF)], χημειοκίνες (φρακταλκίνη, CXCL8, χημειοελκτική πρωτεΐνη-1 μονοκυττάρων και επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ πρωτεΐνη 10), προαγγειογενής παράγοντες (IL-15 και VEGF) και κυτταροκίνες που ρυθμίζουν τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού (παράγοντας ρύθμισης των αποικιών κοκκιοκυττάρων, παράγοντας ρύθμισης των αποικιών των κοκκιοκυτταρικών

μακροφάγων και IL-3). Παρόμοιο προφιλ έκφρασης των κυτταροκινών έχει προταθεί από προϋπάρχουσες μελέτες σε δείγματα βιοψιών ότι μπορεί να παρατηρηθεί και *in vivo*^[67].

Τα Caco2 κύτταρα είναι ιδιαίτερα ως προς το γεγονός ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν αυθόρμητα μόλις οι καλλιέργειές του φτάσουν σε υψηλό βαθμό πλήρωσης. Τα Caco2 (*Cancer coli-2*) απομονώθηκαν από εντέρικο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα από τον Jorgen Fogh στο Sloan-Kettering Ινστιτούτο Έρευνας του Καρκίνου. Τα Caco2 παράγουν διάφορες κυτταροκίνες όπως οι IL-6, CXCL8, TNFα, TGF-β1, IL-15 και η στρωματική λεμφοπρωτεΐνη του θύμου αδένα (TSLP)^[68].

Η ικανότητα των Caco2 να μπορούν να διαφοροποιηθούν αυθόρμητα ώστε να σχηματίσουν μία μονοστρωματική στοιβάδα κυττάρων και η οποία έχει βρεθεί να εκφράζει διάφορα χαρακτηριστικά και βιοδείκτες των εντεροκυττάρων είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητές τους^[69,70]. Έτσι τα Caco2 έχουν καταλήξει να είναι η κύρια κυτταρική σειρά επιλογής στις μελέτες των in vitro μοντέλων του εντέρου^[71,72]. Η κυτταρική σειρά HT-29 από την άλλη είναι αρκετά ετερογενής καθώς αποτελείται από ένα κύριο πληθυσμό αδιαφοροποίητων κυττάρων και έναν μικρότερο υποπληθυσμό ικανό να παράγει βλέννα^[66,73,74]. Σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εντεροκυτταρικό φαινότυπο. Με την χρήση στα δεύτερα κατάλληλα επιλεγμένων συνθηκών επώασης μπορούμε όμως να δημιουργήσουμε ομοιογενείς πληθυσμούς τους βλεννοπαραγωγών κυττάρων^[66,74-76]. Οι δύο αυτές κυτταρικές σχηματίζουν την βάση των διαφόρων μοντέλων μελέτης του εντέρου είτε στην φάση την μονοκυτταρικής τους συμπεριφοράς είτε σε προηγμένα πολυκυτταρικά μοντέλα^[77-78]. Βασικό απαιτούμενο όμως για την δημιουργία σύνθετων in vitro μοντέλων είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης κυτταρικων σειρων καλά χαρακτηρισμένων, γεγονός το οποίο θα μας επιτρέψει την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ελέγχου εντός των κυττάρων.

Στην μελέτη μας αυτή προσπαθήσαμε να απαντήσουμε σε τέσσερις κύριες ερωτήσεις: 1) Παράγουν τα HT-29 και τα Caco2 αγγειοδραστικές κυτταροκίνες στην βασική τους κατάσταση 2) Υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα HT-29 και τα Caco2 στην απόκριση τους σε ορό καρκινικών ασθενών σε σχέση με την επίδραση με ορό υγιών 3) Υπάρχει διαφορά στην εξέλιξη το χρόνου στο προφίλ έκφρασης χημεικοκινών για τις δύο αυτές κυτταρικές σειρές κατά τις διάφορες επιδράσεις, με ορό ασθενών και υγιών όσο και απουσία τους 4) υπάρχει σημαντική λειτουργική διαφορά όταν επιδρούμε στα κύτταρά αυτά με ορό ασθενών και ορό υγιών;

1) Παράγουν τα HT-29 και τα Caco2 αγγειοδραστικές κυτταροκίνες στην βασική τους κατάσταση;

Όσον αφορά την πρώτη μας ερώτηση υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα τα οποία είναι και αρκετές φορές αντικρουόμενα όσον αφορά κυρίως την έκφραση της CXCL8 από τα HT-29. Η τελευταία έχει βρεθεί στο υπερκείμενο καλλιεργειών των κυττάρων αυτών τόσο σε μη διεγερμένες (1,1 ng/mL) όσο και σε διεγερμένες με IL-1 β (16,1 ng/mL) καλλιέργειες^[79].

Παρόμοια χαμηλά επίπεδα έκκρισης της CXCL8 σε HT-29 κύτταρα έχουν αναφερθεί και σε άλλη μελέτη ενώ και τα επίπεδα στα αδιέγερτα Caco2 κύτταρα έχουν βρεθεί να είναι 10 φορές χαμηλότερα^[80].

Σε αντίθεση μ' αυτές τις μελέτες υπάρχει και μία τρίτη στην οποία δεν βρέθηκαν μετρήσιμα επίπεδα της CXCL8 σε HT-29 κύτταρα^[59].

Πολύ χαμηλά επίπεδα βασικής έκφρασης mRNA για τις CXCL8 και CXCL6 από HT-29 κύτταρα έχουν πρόσφατα αναφερθεί σε μελέτη ενώ μετά από επώαση με IL-17 και TNFα τα ποσοστά αυτά βρέθηκαν πολύ αυξημένα. Πέραν όμως του mRNA δεν υπάρχουν στις μελέτες αυτές καθόλου δεδομένα σχετικά με την παραγωγή και έκκριση των δύο αυτών χημειοκινών^[81,82].

Η CXCL4 από την άλλη εκκρίνεται από ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα και μονοκύτταρα αλλά δεδομένα σχετικά με την έκκριση της από τους δύο αυτούς κυτταρικούς τύπους δεν υπάρχουν^[83].

Ακόμα δεδομένα και για την έκκριση του VEGF σε βασικές συνθήκες δεν υπάρχουν. Τα Caco2 όμως έχουν βρεθεί να εκφράζουν VEGF σε μελέτες με *Real-Time PCR*. Επιπλέον ενώ το καλά χαρακτηρισμένο μόριο PGE2 στοχεύει στο γονίδιο του VEGF, δεν βρέθηκε να μεταβάλλει την έκφραση του όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε εξωγενές PGE2^[84].

Τα δικά μας αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα HT-29 κύτταρα σε βασικές συνθήκες (καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό McCoys) εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες από CXCL8 και VEGF ενώ οι CXCL4 και CXCL6 βρέθηκαν οριακά μετρήσιμες στα κατώτερα όρια μετρήσεων της μεθόδου (ELISA). Στα Caco2 τα επίπεδα έκκρισης της CXCL8 βρέθηκαν να είναι παρόμοια με τα HT-29, οι CXCL4 και CXCL6 βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες ενώ η έκκριση του VEGF σημαντικά χαμηλότερη.

Η δεύτερη παρατήρηση που μπορεί ενδεχομένως να εξηγήσει τις διαφορές που έχουν βρεθεί στις διάφορες μελέτες είναι ότι η βασική έκφραση εξαρτάται από τα συστατικά του θρεπτικού υλικού. Όταν ο ορός βόειου εμβρύου (FBS) είναι συστατικό του θρεπτικού υλικού τότε οι εκκρίσεις των χημειοκινών αυξάνονται σημαντικά. Έτσι άμεσες συγκρίσεις μπορούν να γίνουν μόνο όταν χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Αυτή ήταν και η υπόθεση μίας μελέτης ότι τα HT-29 κύτταρα έχουν μία υπολογίσιμη βασική έκφραση του VEGF. Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10% ορό μόσχου(Calf serum) και τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα δικά μας όταν περιλαμβάναμε στο θρεπτικό υλικό FBS^[67].

Μία τελική παρατήρησή στο αρχικό μας ερώτημα είναι ότι η βασική έκφραση σε σκέτο θρεπτικό υλικό McCoys στα HT-29 παρουσιάζει μία διακύμανση των τιμών προϊόντος του χρόνου. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, διαφορετικά για κάθε χημειοκίνη παρατηρείται μία αύξηση της έκκρισης. Το εύρημα αυτό αντίθετα δεν παρατηρείται στα Caco2 όπου η έκφραση είναι λίγο πολύ σταθερή με την πάροδο του χρόνου.

2) Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ΗΤ-29 και Caco2;

Τα δεδομένα από μελέτες για τις δύο αυτές κυτταρικές σειρές είναι λίγα. Η έκφραση του CXCL8 είναι διαφορετική σε κυτταρικές σειρές με διαφορετική μεταστατική ικανότητα. Η σειρά KM12L4 για παράδειγμα που έχει υψηλή μεταστατική ικανότητα εκφράζει υψηλά επίπεδα του CXCL8 ενώ κύτταρα με χαμηλή μεταστατική ικανότητα όπως τα Caco2 εμφάνιζαν τα χαμηλότερα ποσοστά^[85].

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην δική μας μελέτη. Τα ΗΤ-29 παρήγαγαν σημαντικά ψηλότερα επίπεδα CXCL8 σε σχέση με τα Caco2 σε κάθε χρονικό σημείο. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα μας και για τον VEGF καθώς όπως και στον CXCL8 η έκφραση ήταν σημαντικά υψηλότερη στα HT-29 σε κάθε χρονικό σημείο. Όσον αφορά την αιτία για αυτή την διαφοροποίηση μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν καθώς ο ορός της επίδρασης (είτε είναι ανθρώπινος είτε είναι FBS) περιέχει πλήθος διαφορετικών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων κάποιοι από τους οποίους προφανώς ενεργοποιούν τα HT-29 αλλά όχι τα Caco2. Αυτό είναι ένα πεδίο όπου απαιτείται περισσότερη μελέτη προκειμένου να έχουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Οι διαφορές αυτές μπορούν ακόμα να εξηγηθούν και από τον διαφορετικό βαθμό μεθυλίωσης των εκκινητών των γονιδίων των χημειοκινών καθώς τα Caco2 εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό εμφάνισής της σε σχέση με τα HT-29 όπου είναι πιο επικρατές ένα μοτίβο υπομεθυλίωσης. Το πρότυπο αυτό συμβαδίζει με την έκφραση της CXCL8 που παρατηρήσαμε^[18].

Μία ακόμα πιθανή εξήγηση τουλάχιστον για τα αποτελέσματα του VEGF μπορεί να είναι ότι τα HT-29 κύτταρα εκφράζουν COX-2 σε αντίθεση με τα Caco2. Το γονίδιο του VEGF αποτελεί στόχο για την Προσταγλαδίνη Ε2^[84]. Όμως η σελεκοξίμπη που είναι αναστολέας της COX-2 αυξάνει τα επίπεδα του VEGF με παρόμοιο τρόπο με την COX-2 κυρίως ενεργοποιώντας το ενδοπλασματικό δίκτυο^[86].

Η κατάσταση ήταν τελείως αντίθετη με την CXCL6 και ιδιαίτερα με την CXCL4. Τα Caco2 εξέφραζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις των δύο αυτών χημειοκινών σε σχέση με τα HT-29, με το αποτέλεσμα αυτό να περιγράφεται για πρώτη φορά.

Διαφορές έχουν επιπλέον αναφερθεί και για τις CC χημειοκίνες. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας τα HT-29 και Caco2 έχουν βρεθεί να εκφράζουν διαφορετικές ποσότητες των CC χημειοκινών MIG, i-TAC και IP-10 ως απόκριση στην ενεργοποίηση από διάφορες κυτταροκίνες. Τα HT-29 εξέφραζαν CC χημειοκίνες μετά την επίδραση με IL-4, IL-10 και IL-13 ενώ για να υπάρξει απόκριση στα Caco2 έπρεπε να επιδράσουν και οι 3 αυτές χημειοκίνες συγχρόνως. Επιπλέον τα HT-29 εξέφραζαν σταθερά IP-10 και i-TAC χημειοκίνες εν αντιθέσει με τα Caco2^[87].

Άλλες διαφορές μεταξύ των δύο αυτών κυτταρικών σειρών έχουν επίσης παρατηρηθεί. Ο TGF-b1 ανέστελλε τον πολλαπλασιασμό των HT-29 ενώ φαινόταν να μην έχει καμία επίδραση στα Caco2, αποτέλεσμα που εξηγείται καθώς εν αντιθέσει με τα Caco2 τα HT-29 εξέφραζαν μεγαλύτερες ποσότητες των δύο κύριων υποδοχέων του TGF-b1, των RI και RII. Σε συνέχεια του προηγούμενου τα Caco2 εξέφραζαν τον υποδοχέα στην επιφάνεια πρόσδεσης τους στην βάση της καλλιέργειας^[88]. Μία μελέτη τη ίδιας ομάδας στην επίδραση της σιπροφλοξασίνης στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση έδειξε ότι η τελευταία μπορεί να αναστείλει τον

Είναι βέβαιο ότι οι διαφορές ανάμεσα στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές είναι ακόμα πιο εκτεταμένες. Μία πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε το διαφορετικό προφίλ έκφρασης ανάμεσα στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές, και υπολόγισες ότι διαφέρουν σε 1795 γονίδια, 168

πρωτεΐνες και 160 miRNAs, η λειτουργική σημασία των οποίων είναι ακόμα στις περισσότερες περιπτώσεις άγνωστη^[90].

 Υπάρχει διαφορά στην απόκριση στα διαφορά χρονικά σημεία ανάμεσα στις επιδράσεις με ορούς καρκινοπαθών και υγιών;

Σε προηγούμενη μελέτη για την παραγωγή CXCL8 από τα εντερικά ενδοθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν οι εντερικές αδενοκαρκινικές κυτταρικές σειρές Caco2 και HT-29. Τα HT-29 παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες CXCL8 όταν είχαν διεγερθεί με IL-1 a, TNF-a ή IFN-γ, ενώ τα Caco2 βρέθηκαν να αποκρίνονται μόνο στην IL-1 β. Οι βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ήταν επίσης ένας αποτελεσματικός διεγέρτης στα HT-29 για την παραγωγή CXCL8 ενώ τα Caco2 δεν επέδειξαν καμία απολύτως απόκριση. Η μεγαλύτερη παραγωγή του CXCL8 μετρήθηκε στις 4 hr μετά την διέγερση^[80].

Στα δικά μας χρονικά πειράματα η παραγωγή του CXCL8 βρέθηκε να είναι σταθερή στα Caco2 για 24 hr ανεξαρτήτως αν τα κύτταρα επωάστηκαν με ορό ασθενών ή ορό υγιών. Τα HT-29 από την άλλη πλευρά έδειξαν μία σημαντικά παρατεταμένη αύξηση επί 24 hr κατά την επώαση τόσο με ορό ασθενών όσο και με ορό υγιών. Η αύξηση και στους δύο αυτούς ορούς ήταν εμφανής ήδη από τις 4 hr, σε σύνδεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αλλά η μέγιστη συγκέντρωση επιτεύχθηκε στις 6 hr για τον ορό των υγιών και στις 12 hr για τον ορό των ασθενών με την επακόλουθη πτώση στον πρώτο να είναι ηπιότερη. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και από τις μελέτες επίδρασης των HT-29 με μείγμα IFN-γ και TNFα. Το μοτίβο ήταν παρόμοιο με την δική μας επώαση με ορό υγιών με την κορυφή να εμφανίζεται στις 4 hr και σταδιακά να μειώνεται στις 24 hr^[59].

Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά τον VEGF δίνουν παρόμοια εικόνα στα Caco2. Είναι τελείως ανεπηρέαστα ανεξαρτήτως της επίδρασης με ορό υγιών ή ασθενών. Τα HT-29

231

αποκρίνονται στην επίδραση από την άλλη και με τους δύο αυτούς ορούς αλλά φαίνεται ο ορός των ασθενών να προκαλεί γρηγορότερη απόκριση. Τα αποτελέσματα είναι τελείως διαφορετικά όσον αφορά την CXCL6 και ιδιαίτερα την CXCL4. Έτσι η παραγωγή της CXCL6 είναι συστηματικά υψηλότερα στα Caco2 κύτταρα και σχετικά σταθερή μέχρι τις 24 hr ανεξαρτήτως της επίδρασης με το είδος του ορού. Σε αντίθεση με τις άλλες χημειοκίνες τα HT-29 για αυτές τις δύο δεν επέδειξαν καμία κορυφή υψηλότερης συγκέντρωσης στις 4 και 12 hr.

Η έκκριση της CXCL4 είναι υψηλότερη στα Caco2 για τις 24 hr. Τρεις κορυφές υψηλότερης συγκέντρωσης στις 2, 6 και 24 hr αναγνωρίστηκαν κατά την επώαση των κυττάρων με ορό ασθενών. Παρόμοιες κορυφές βρέθηκαν ωστόσο και στα HT-29 σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης όμως. Στην επώαση με ορό υγιών συνολικά βρέθηκε ότι τα HT-29 μάλλον δεν αποκρίνονται ενώ κορυφές στα Caco2 βρέθηκαν στις 2, 6 και 24 hr.

4) Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων

Έχουμε ήδη δει ότι οι εντερικές καρκινικές σειρές εκκρίνουν χημειοκίνες. Τα ΗΤ-29, αλλά όχι τα Caco2 αποκρίνονται στην επίδραση με ορό (ανθρώπινο ή FBS) αυξάνοντας την παραγωγή των CXCL8 και VEGF. Τα δύο αυτά μόρια είναι αγγειογενή και η παρουσία τους αυξάνει την νεοαγγειογένεση και την εξέλιξη του όγκου^[91].

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει κυτταρικές σειρές με χαμηλό δυναμικό μετάστασης, όπως τα Caco2, εκκρίνουν πολύ χαμηλά επίπεδα της CXCL8 σε αντίθεση με τις σειρές με υψηλότερο δυναμικό μετάστασης. Επιπλέον έχει ήδη βρεθεί ότι η προσθήκη εξωγενούς CXCL8 στις καλλιέργειες των εντερικών κυτταρικών σειρών αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων υποδεικνύοντας και έναν αυτοκρινή τροφικό ρόλο για την εν λόγω χημειοκίνη, ο οποίος πιθανόν να συνεισφέρει στο μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων αυτών^[85]. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα CXCR2 (ένας απ' τους υποδοχείς της CXCL8) στο μικροπεριβάλλον του όγκου συνδέεται με ενισχυμένη ανάπτυξη για τα εντερικά καρκινικά κύτταρα, αποτέλεσμα εμφανές τόσο σε ανθρώπινα κύτταρα όσο και σε αντίστοιχα ποντικού. Επιπλέον συνδέεται με αυξημένη περιογκική αγγειογένεση και ενισχυμένη ανάπτυξη του δικτύου των αγγείων στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και του ήπατος *in vivo*^[21].

Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι εντερικές κυτταρικές σειρές μπορούν να απωλέσουν την έκφραση του CXCR2 καθώς μεταμορφώνονται σε κακοήθεις. Έτσι δεν είναι περίεργο που υψηλά διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές όπως οι HT-29 και Caco2 δεν εκφράζουν καθόλου τον υποδοχέα CXCR2^[92].

Σε αρμονία με τα παραπάνω ευρήματα προέκυψε στην μελέτη μας, όπως έχουμε ήδη αναφέρει ότι υψηλά επίπεδα της CXCL8 στον καρκινικό ιστό συνδέονται με μειωμένη 5ετή επιβίωση των ασθενών. Παρ όλα αυτά σε μία πρόσφατη μελέτη περιγράφεται και ένας εναλλακτικός επιβαρυντικός μηχανισμός επίδρασης της CXCL8, που μπορεί να επηρεάζει την επιβίωση. Με βάση την μελέτη αυτή η CXCL8 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα συνεισφέρει στην χημειοτακτική στρατολόγηση των μυελοειδών ανασταλτικών κυττάρων (MDSC) και στον έλεγχο ενεργοποίησής τους. Μονοκυτταρικά, αλλά όχι κοκκιοκυτταρικά MDSCs ασκούν μία κατασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων που έχουν απομονωθεί από την περιοχή του όγκου, και μ αυτό τον τρόπο δημιουργούν ένα προκαρκινικό λευκοκυτταρικό μικροπεριβάλλον εντός του όγκου. Μονοκυτταρικά MCSCs μπορούν επίσης να προσελκυσθούν από υπερκείμενα καλλιεργειών HT-29 που περιέχουν CXCL8 καθώς και ορό ασθενών που περιέχει την εν λόγω χημειοκίνη^[93].

Αυξημένη έκκριση του VEGF από τα HT-29 αλλά όχι από τα Caco2 μετά την επίδραση με ορό (ασθενών, υγιών και FBS) μπορεί να υποδεικνύει ότι μία από τις λειτουργίες του είναι να δρα ως παράγοντας επιβίωσης στα εντερικά καρκινικά κύτταρα, δηλώνοντας τον διακριτό της ρόλο στην επιβίωση του καρκίνου σε συμφωνία και με την προηγούμενη βιβλιογραφία^[94,95].

Έτσι τα ευρήματα μας μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν γιατί τα Caco2 έχουν περιορισμένο μεταστατικό δυναμικό σε σχέση με τα HT-29.

Αυτό ενισχύεται περαιτέρω και από μία πρόσφατη έρευνα σχετικά με την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών στο αντικαρκινικό σκεύασμα της μπεβασιζουμάμπης. Μόνο η κυτταρική σειρά DLD-1 βρέθηκε να είναι ευαίσθητη στο σκεύασμα αυτό και μάλιστα η εφαρμογή του συνδέθηκε με πτωτική ρύθμιση του άξονα HIF-VEGF-VEGFR ενώ η ίδια εφαρμογή οδήγησε σε αύξηση της ενεργοποίησης του αυτοκρινούς μηχανισμού σηματοδότησης του VEGF. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι εσωτερική ανθεκτικότητα έναντι της μπεβασιζουμάμπης συνδέεται ξεκάθαρα με αυξημένα επίπεδα του VEGF στο περιβάλλον του όγκου που καθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα επίσης πιο ανθεκτικά^[96].

Μία ακόμα μελέτη προσθέτει μία ακόμα εξήγηση για την έλλειψη μεταστατικού δυναμικού για τα Caco2 κύτταρα και η οποία αναφέρει ότι αναστολή της εσωτερικής σηματοδότησης του VEGF ισχυρά αναστέλλει την δυνατότητα μετακίνησης και εισβολής των εντερικών καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική κίνηση^[97].

Τα αποτελέσματα των δύο αυτών προαγγειογενών παραγόντων δεν είναι ανεξάρτητα. Η υποξία προκαλεί την παραγωγή του VEGF μέσω του HIF-1a ρυθμιστή. Σε καρκινικά κύτταρα DLD-1 που έχει απενεργοποιηθεί ο εν λόγω ρυθμιστής, η επαγωγή της έκφρασης του VEGF από την υποξία μπλοκαρίστηκε μόνο μερικώς. Σε αντίθεση όμως με την διατήρηση της έκφρασης του VEGF, είχαμε επαγωγή της παραγωγής της CXCL8 στα μεταλλαγμένα DLD-1 κύτταρα αλλά όχι στα αρχέγονου τύπου. Αντίστροφα αντίσωμα έναντι της CXCL8 στις καλλιέργειες των πρώτων ανέστειλε την αγγειογένεση και την καρκινική ανάπτυξη, επίδραση που δεν εμφανίστηκε στα δεύτερα. Έτσι είναι πλέον εμφανές ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν εναλλακτικά μονοπάτια προκειμένου να διατηρήσουν την αγγειογενή τους δραστηριότητα^[98].

Λειτουργικά δεδομένα που να συνδέονται με τα ευρήματά μας δεν υπάρχουν ακόμα αρκετά. Έχουμε ήδη δει ότι αυξημένα επίπεδα της CXCL4 σε καρκινικούς ιστούς συνδέονται με

234

χαμηλότερη 5ετή επιβίωση, γεγονός που δείχνει αντιφατικό με την αγγειοστατική δράση της χημειοκίνης αυτής.

Παρ όλα αυτά ένας νέος ρόλος για την CXCL4 έχει πλέον περιγραφεί και ο οποίος εξηγεί την ανάπτυξη των εντερικών καρκίνων *in vivo*. Η νεοπεριγραφόμενη αυτή προ-αγγειογενής λειτουργία της CXCL4 έχει να κάνει με την απόκριση στην 5-FU χημειοθεραπεία και έτσι αποκτά πιθανή κλινική σημασία στην ογκολογία^[99].

Σύμφωνα με την μελέτη αυτή ο πολλαπλασιασμός των T-reg κυττάρων ενισχύθηκε ενώ αντίθετα επιβαρύνθηκε η λειτουργία τους από την CXCL4^[100].

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η CXCL4 που απελευθερώνεται από τα καρκινικά κύτταρα μειώνει την αντι-ογκική ανοσία, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη εκ νέου των εντερικών καρκινικών κυττάρων που έχουν αποδράσει της περιοχής του όγκου (πιθανόν και ως αποτέλεσμα της χειρουργικής αντιμετώπισης) και να οδηγήσουν στην εμφάνιση μεταστάσεων.

Από την άλλη πλευρά τα δεδομένα σχετικά με την CXCL6 είναι ακόμα πιο σπάνια. Η CXCL6 είναι μία χημειοκίνη η οποία λειτουργικά χρησιμοποιεί τους υποδοχείς της CXCL8 με σκοπό να έλξει χημειοτακτικά τα ουδετερόφιλα. Στην μελέτη μας βρήκαμε ότι το μοτίβο της έκφρασης της είναι διαφορετικό από των CXCL8 και VEGF και ότι τα Caco2 εκφράζουν μεγαλύτερες ποσότητες της από τα HT-29.

Σε συμφωνία με τα δεδομένα μας διαφορετική ρύθμιση για τις CXCL8 και CXCL6 έχει περιγραφεί και σε άλλα κυτταρικά συστήματα. Η IL-1β ήταν ο κύριος επαγωγός της CXCL6 στους ινοβλάστες, τα χονδροκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η CXCL8 επαγόταν στα κύτταρα αυτά από τον TNFα. Η κινητική της επαγωγής της CXCL6 από του ινοβλάστες ήταν διαφορετική από την αντίστοιχη της CXCL8. Ακόμα απομονωμένα περιφερικά μονοπυρηνικά λευκοκύτταρα, τα οποία είναι καλοί παραγωγοί της CXCL8 αδυνατούν να παράγουν CXCL6. Ποσοτικά η παραγωγή της CXCL6 πάντα παρέμενε χαμηλότερη της αντίστοιχης της CXCL8 όπως έχει προκύψει και στις δικές μας μετρήσεις.

Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό όπως και η σημασία του γεγονότος αυτού παραμένουν εν πολλοίς άγνωστα^[101].

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι τα εντερικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πιθανοί παραγωγοί των αγγειοδραστικών χημειοκινών. Τα HT-29 και τα Caco2 παράγουν και τις 4 χημειοκίνες κάτω από βασικές συνθήκες καλλιέργειας όσο και κάτω από την επίδραση με ανθρώπινο ορό και FBS. Παρ όλα αυτά η παραγωγή δεν είναι ομοιόμορφη για τις χημειοκίνες αυτές. Η εκκριτική απόκριση των δύο αυτών κυτταρικών σειρών στις επιδράσεις που δοκιμάσαμε εμφανίστηκε τελείως διαφοροποιημένη. Τα HT-29 παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες των CXCL8 και VEGF ανεξάρτητα της επίδρασης με ορό ενώ τα Caco2 φαίνεται να μην αντιδρούν. Το αντίθετο συμβαίνει για τις CXCL6 και CXCL4. Επιπλέον τα HT-29 παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες των CXCL8 και VEGF συνολικά στις 24 ώρες όταν επιδρούμε με ορό καρκινοπαθών. Από την άλλη πλευρά τα Caco2 παράγουν περισσότερη CXCL4 όταν επωάζονται με ορό ασθενών.

4.8 Βιβλιογραφία

- 1. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson et al., "Measurement of protein using bicinchoninic acid," Analytical Biochemistry, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, 1985.
- G. D. Ayiomamitis, G. Notas, A. Zaravinos et al., "Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer," Canadian Journal of Surgery, vol. 57, no. 3, pp. 199–208, 2014
- 3. D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," Cell, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- 4. Hemmings C," Is carcinoma a mesenchymal disease? The role of the stromal microenvironment in carcinogenesis." Pathology (2013); 45 (4): 371-381
- 5. C. Twelves, A. Wong, M. P. Nowacki et al., "Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer," New England Journal of Medicine, vol. 352, no. 26, pp. 2696–2704, 2005.

- T. André, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf et al., "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer," New England Journal of Medicine, vol. 350, no. 23, pp. 2343–2351, 2004.
- 7. T. André, C. Boni, M. Navarro et al., "Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial," Journal of Clinical Oncology, vol. 27, no. 19, pp. 3109–3116, 2009.
- G. Lazennec and A. Richmond, "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer related inflammation," Trends in Molecular Medicine, vol. 16, no. 3, pp. 133–144, 2010.
- 9. B. N. Gomperts and R. M. Strieter, "Chemokine-directed metastasis," Contributions to Microbiology, vol. 13, pp. 170–190, 2006.
- R. Brew, S. A. Southern, B. F. Flanagan, I. W. McDicken, and S. E. Christmas, "Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells," European Journal of Cancer, vol. 32, no. 12, pp. 2142–2147, 1996.
- G. Cui, A. Yuan, R. Goll, B. Vonen, and J. Florholmen, "Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma–carcinoma sequence," Cancer Immunology, Immunotherapy, vol. 58, no. 11, pp. 1897–1905, 2009.
- 12. C. Rubie, V. O. Frick, S. Pfeil et al., "Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer," World Journal of Gastroenterology, vol. 13, no. 37, pp. 4996–5002, 2007.
- D. Doll, L. Keller, M. Maak et al., "Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival," International Journal of Colorectal Disease, vol. 25, no. 5, pp. 573–581, 2010.
- A. Nastase, L. Paslaru, V. Herlea et al., "Expression of interleukine-8 as an independent prognostic factor for sporadic colon cancer dissemination," Journal of Medicine and Life, vol. 7, no. 2, pp. 215–219, 2014.
- R. M. Strieter, M. D. Burdick, B. N. Gomperts, J. A. Belperio, and M. P. Keane, "CXC chemokines in angiogenesis," Cytokine & Growth Factor Reviews, vol. 16, no. 6, pp. 593–609, 2005
- D. D. Alexander, J. Waterbor, T. Hughes, E. Funkhouser, W. Grizzle, and U. Manne, "African-American and Caucasian disparities in colorectal cancer mortality and survival by data source: an epidemiologic review," Cancer Biomarkers, vol. 3, no. 6, pp. 301–313, 2007.
- H. Terada, T. Urano, and H. Konno, "Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer," European Surgical Research, vol. 37, no. 3, pp. 166–172, 2005.
- J. Dimberg, K. Strom, S. Lofgren, N. Zar, M. Lindh, and A. Matussek, "DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas," International Journal of Colorectal Disease, vol. 27, no. 6, pp. 709–714, 2012.
- 19. Q. Liu, A. Li, Y. Tian et al., "The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer," Cytokine & Growth Factor Reviews, vol. 31, pp. 61–71, 2016.
- 20. W. Xia, W. Chen, Z. Zhang et al., "Prognostic value, clinicopathologic features and diagnostic accuracy of interleukin-8 in colorectal cancer: a meta-analysis," PLoS One, vol. 10, no. 4, article e0123484, 2015.

- Y. S. Lee, I. Choi, Y. Ning et al., "Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis," British Journal of Cancer, vol. 106, no. 11, pp. 1833–1841, 2012.
- M. Luca, S. Huang, J. E. Gershenwald, R. K. Singh, R. Reich, and M. Bar-Eli, "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis," The American Journal of Pathology, vol. 151, no. 4, pp. 1105–1113, 1997
- O. Oladipo, S. Conlon, A. O'Grady et al., "The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue," British Journal of Cancer, vol. 104, no. 3, pp. 480–487, 2011
- A. Li, S. Dubey, M. L. Varney, B. J. Dave, and R. K. Singh, "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis," The Journal of Immunology, vol. 170, no. 6, pp. 3369– 3376, 2003.
- 25. S. Tazzyman, C. E. Lewis, and C. Murdoch, "Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis," International Journal of Experimental Pathology, vol. 90, no. 3, pp. 222–231, 2009.
- 26. S. Gurzu, J. Jung, L. Azamfirei, T. Mezei, A. M. Cîmpean, and Z. Szentirmay, "The angiogenesis in colorectal carcinomas with and without lymph node metastases," Romanian Journal of Morphology and Embryology, vol. 49, no. 2, pp. 149–152, 2008.
- F. Graziano and S. Cascinu, "Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough?," Annals of Oncology, vol. 14, no. 7, pp. 1026–1038, 2003.
- 28. R. W. C. Pang and R. T. P. Poon, "Clinical implications of angiogenesis in cancers," Vascular Health and Risk Management, vol. 2, no. 2, pp. 97–108, 2006
- 29. J. E. Nör, J. Christensen, J. Liu et al., "Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth," Cancer Research, vol. 61, no. 5, pp. 2183–2188, 2001
- R. Schruefer, N. Lutze, J. Schymeinsky, and B. Walzog, "Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8," American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, vol. 288, no. 3, pp. H1186–H1192, 2005.
- S. Zheng, M. Y. Han, Z. X. Xiao, J. P. Peng, and Q. Dong, "Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma," World Journal of Gastroenterology, vol. 9, no. 6, pp. 1227–1230, 2003.
- 32. D. Cao, M. Hou, Y. S. Guan, M. Jiang, Y. Yang, and H. F. Gou, "Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications," BMC Cancer, vol. 9, no. 1, p. 432, 2009.
- 33. J. F. Liang, H. K. Wang, H. Xiao et al., "Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer," Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, vol. 29, no. 1, p. 71, 2010.
- 34. H. Verbeke, G.DeHertogh, S. Li et al., "Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer," Human Pathology, vol. 41, no. 7, pp. 990–1001, 2010.
- 35. K. Gijsbers, M. Gouwy, S. Struyf et al., "GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated

with angiogenesis in gastrointestinal tumors," Experimental Cell Research, vol. 303, no. 2, pp. 331–342, 2005.

- 36. C. Rubie, V. O. Frick, M. Wagner et al., "ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions," BMC Cancer, vol. 8, no. 1, p. 178, 2008.
- 37. A. Giatromanolaki, G. P. Stathopoulos, E. Tsiobanou et al., "Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma," Cancer, vol. 86, no. 8, pp. 1421–1430, 1999.
- A. Torsello, C. Garufi, M. Cosimelli et al., "P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance," European Journal of Cancer, vol. 44, no. 9, pp. 1217–1222, 2008.
- 39. U. Manne, R. B. Myers, C. Moron et al., "Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma," International Journal of Cancer, vol. 74, no. 3, pp. 346–358, 1997.
- H. Zavrides, A. Zizi-Sermpetzoglou, I. Elemenoglou et al., "Immunohistochemical expression of bcl-2 in Dukes' stage B and C colorectal carcinoma patients: correlation with p53 and ki-67 in evaluating prognostic significance," Polish Journal of Pathology, vol. 56, no. 4, pp. 179–185, 2005.
- 41. L. Poincloux, X. Durando, J. F. Seitz et al., "Loss of Bcl-2 expression in colon cancer: a prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer," Surgical Oncology, vol. 18, no. 4,pp. 357–365, 2009.
- 42. A. C. Tsamandas, D. Kardamakis, T. Petsas et al., "Bcl-2, bax and p53 expression in rectal adenocarcinoma. Correlation with classic pathologic prognostic factors and patients' outcome," In Vivo, vol. 21, no. 1, pp. 113–118, 2007.
- 43. T. Abbas and A. Dutta, "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities," Nature Reviews Cancer, vol. 9, no. 6, pp. 400–414, 2009
- 44. H. Mitomi, Y. Ohkura, N. Fukui et al., "P21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinomas is related to Kras mutations and prognosis," European Journal of Gastroenterology & Hepatology, vol. 19, no. 10, pp. 883–889, 2007.
- 45. F. Prall, C. Ostwald, H. Nizze, and M. Barten, "Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis," Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, vol. 12, no. 2, pp. 111–121, 2004.
- 46. M. S. Lyall, S. R. Dundas, S. Curran, and G. I. Murray, "Profiling markers of prognosis in colorectal cancer," Clinical Cancer Research, vol. 12, no. 4, pp. 1184–1191, 2006.
- L. Tornillo, A. Lugli, I. Zlobec et al., "Prognostic value of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in mismatch repairproficient colorectal cancer: a tissue microarray-based approach," American Journal of Clinical Pathology, vol. 127, no. 1, pp. 114–123, 2007.
- S. Ogino, K. Nosho, K. Shima et al., "p21 expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis," Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, vol. 18, no. 9, pp. 2513–2521, 2009
- 49. S. Koskensalo, J. Louhimo, J. Hagström, M. Lundin, U.-H. Stenman, and C. Haglund, "Concomitant tumor expression of EGFR and TATI/SPINK1 associates with better prognosis in colorectal cancer," PLoS One, vol. 8, no. 10, article e76906, 2013.

- 50. M. E. Salem, B. A. Weinberg, J. Xiu et al., "Comparative molecular analyses of leftsided colon, right-sided colon, and rectal cancers," Oncotarget, vol. 8, no. 49, pp. 86356–86368, 2017
- Y. Itoh, T. Joh, S. Tanida et al., "IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells," Cytokine, vol. 29, no. 6, pp. 275–282, 2005.
- 52. C. R. Boland and A. Goel, "Microsatellite instability in colorectal cancer," Gastroenterology, vol. 138, no. 6, pp. 2073–2087.e3, 2010.
- 53. P. J. Cuyle and H. Prenen, "Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer," Acta Clinica Belgica, vol. 72, no. 2, pp. 103–115, 2016.
- 54. G. Lanza, R. Gafà, I. Maestri, A. Santini, M. Matteuzzi, and L. Cavazzini, "Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability," Modern Pathology, vol. 15, no. 7, pp. 741–749, 2002.
- 55. Y. Niv, "Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer," World Journal of Gastroenterology, vol. 13, no. 12, pp. 1767–1769, 2007.
- 56. S. Popat, R. Hubner, and R. S. Houlston, "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis," Journal of Clinical Oncology, vol. 23, no. 3, pp. 609–618, 2005.
- 57. S. B. Lim, S. Y. Jeong, M. R. Lee et al., "Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer," International Journal of Colorectal Disease, vol. 19, no. 6, pp. 533–537, 2004.
- J. Qu, Y. Jiang, H. Liu et al., "Prognostic value of E-cadherin-, CD44-, and MSH2associated nomograms in patients with stage II and III colorectal cancer" Translational Oncology, vol. 10, no. 2, pp. 121–131, 2017
- 59. Kolios G, Wright KL, Jordan NJ et al, "C-X-C and C-C chemokine expression and secretion by the human colonic epithelial cell line, HT-29: differential effect of T lymphocyte-derived cytokines." European J of Immunol (1999); 29(2): 530-6
- 60. Kucharzik T, Hudson JT, Lügering A et al. "Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury", Gut (2005); 52(11): 1565-1572
- 61. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA et al." Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds", PLos Biol (2004); 2 (2) :E7
- 62. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB et al. "Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival." Proc Nat Adad Sci U S A (2005); 102 (10): 3738-43
- 63. Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C et al. "Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins." Clin Cancer Res (2014); 20 (22): 5697-707
- 64. Fogh J, Trempe G" New human tumor cell lines" (1975) 1st edition
- 65. Martine-maqueda D, Miralles B, Recio I,. "HT-29 Cell Line" Chapter 11, The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health (2015)
- Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E et al" Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation." J Cell Biol (1987); 105(1):345-57

- 67. Desai S, Kumar A, Laskar S et al." Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells." Cytokine (2013); 61 (1): 54-62
- 68. Lea T. "Caco2 Cell Line" Chapter 10, The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health, (2015)
- 69. Fogh J, Wright WC, Loveless JD." Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors" J Natl Cancer Inst (1997); 58: 209-214
- Rousset M, Laburthe M, Pinto M et al. "Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin", J Cell Physiol (1985); 123: 377-385
- 71. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G et al." The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics.", Cell Biol Toxicol (2005); 21:1-26
- 72. Shah P, Jogani V, Bagchi T et al. "Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption", Biotechnol Prog (2006); 22: 186-198
- Maoret JJ, Font J, Augeron C et al. "A mucus-secreting human colonic cancer cell line. Purification and partial characterization of the secreted mucins", Biochem (1989); 258: 793-799
- 74. Augeron C, Laboisse CL. "Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate", Cancer Res (1984); 44: 3961-3969
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E et al. "Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells" Cancer Res (1990); 50: 6334-6343
- 76. Chastre E, Emami S, Rosselin G et al. "Vasoactive intestinal peptide receptor activity and specificity during enterocyte-like differentiation and retrodifferentiation of the human colonic cancerous subclone HT29-18", FEBS Lett (1985); 188: 197-204
- 77. Mahler GJ, Shuler ML, Glahn RP. "Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability", J nutr Biochem (2009); 20: 494-502
- 78. Antunes F, Andrade F, Araújo F et al. "Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs" Eur J Pharm Biopharm (2013); 83: 427-435
- 79. Kelly CP, Keates S, Siegenberg D et al. "IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells", Am J Physiol (1994); 267: G 991-7
- Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF et al. "Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide" Immunology (1994); 81: 85-91
- Wang YL, Fang M, Wang XM et al. "Proinflammatory effects and molecular mechanisms of interleukin-17 in intestinal epithelial cell line HT-29", World J Gastroenterol (2014); 20 (47): 17924-31
- Zhang M, Wang G, Tao Y et al. "The proinflammatory effect and molecular mechanism of IL- 17 in the intestinal epithelial cell line HT-29" J Buon (2015); 20 (1): 120-7
- 83. Schaffner, P. Rhyn, G. Schoedon et al. "Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes-role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway", J Leukocyte Biol (2005); 78: 202-209

- Mauritz I, Westermayer S, Marian B et al. "Prostaglandin E(2) stimulates progression-related gene expression in early colorectal adenoma cells" Br J Cancer (2006); 94 (11): 1718-25
- 85. Aihua Li, Michelle L. Varney and Rakesh K. Singh "Expression of Interleukin 8 and Its Receptors in Human Colon Carcinoma Cells with Different Metastatic Potentials" Clin Cancer Res (2001):7 : 3298-3304
- 86. Xu B, Wang Y, Yang J et al. "Celecoxib induces apoptosis but up-regulates VEGF via endoplasmic reticulum stress in human colorectal cancer in vitro and in vivo" Cancer Chemother Pharmacol (2016); 77 (4): 797-806
- 87. Manousou P, Kolios G, Drygiannakis I et al "Expression of a splice variant of CXCR3 in Crohn's disease patients; Indication for a lymphocyte – epithelial cell interaction" J Gastroenterol Hepatol (2008); 23: 1823-33
- Biasi F, Tessitore L, Zanetti D et al. "Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta1 levels in human colon cancer during tumour progression" Gut (2002); 50 : 361-367
- 89. Zanetti D, Poli G, Vizio B et al. "4-hydroxynonenal and transforming growth factorbeta1 expressionin colon cancer" Mol Aspects Med (2003); 24: 273-280
- 90. O'Sullivan F, Keenan J, Aherne S et al. "Parallel mRNA, proteomics and miRNA expression analysis in cell line models of the intestine." World J Gastroenterol (2017); 23 (41): 7369-7386
- 91. Brew R, Erikson JS, West DC et al. "Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro.", Cytokine (2000); 12 (1): 78-85
- 92. Sturm A, Baumgart DC, d'Heureuse JH et al. "CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway" Cytokine (2005); 29 : 42-8
- 93. C. Alfaro, A. Teijeira, C. Onate et al. "Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)" Clin Cancer Res (2016); 22 (15): 3924-36
- Bhattacharya R, Ye XC, Wang R et al. "VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells" Cancer Res (2016); 76(10): 3014-24
- 95. Samuel S, Fan F, Dang LH et al. "Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells" Oncogene (2011); 30: 1205-12
- 96. Mésange P1, Poindessous V, Sabbah M et al. "Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome bynintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor" oncotarget (2014); 5 (13): 4709-21
- 97. Bhattacharya R, Fan F, Wang R et al. "Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion" Br J Cancer (2017); 117 (6): 848-855
- Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM et al. "Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells" Nat Med (2005); 11:992-7
- 99. Zhang Y, Gao J, Wang X et al. "CXCL4 mediates tumor regrowth after chemotherapy by suppression of antitumor immunity", Cancer Biol Ther (2015); 16 (12): 1775-83
- Liu CY, Battaglia M, Lee SH et al. "Platelet factor4 differentially modulates CD4CCD25C(regulatory) versus CD4CCD25i (nonregulatory) T cells" J Immunol (2005); 174: 2680-6

101. A. Wuyts, S. Struyf, K. Gijsbers et al. "The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1 β and is down-regulated by interferon- γ : comparison with interleukin-8/CXCL8.", Lab Invest (2003); 83:23-24

5. Εκτεταμένη Περίληψη

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου, μεταξύ των προκαλούμενων καρκινικών θανάτων στις Δυτικές χώρες. Περισσότεροι από τους μισούς θανάτους προκαλούνται από μεταστάσεις του που έχουν αναπτυχθεί μετά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου παρά την εφαρμογή επιπλέον χημειοθεραπείας. Στην ανάπτυξη, και την μετάσταση του αρχικού όγκου οι CXC χημειοκίνες είναι ίσως τα μόρια με την μεγαλύτερη σημασία στην εξέλιξη καθώς συμμετέχουν σ όλα τα στάδια του όγκου, από την ανοσοκαταστολή και την αγγειογένεση έως τον πολλαπλασιασμό και την μετάστασή τους. Στο πλαίσιο αυτή της γνώσης σκοπός της μελέτης μας ήταν η ποσοτικοποίηση της έκφρασης 3 αγγειοδραστικών χημειοκινών και μίας αγγειογενούς κυτταροκίνης σε καρκινικά και υγιή κύτταρα καθώς και σε 2 καρκινικές εντερικές κυτταρικές σειρές.

Οι 3 χημειοκίνες που επιλέξαμε να μελετήσουμε ανήκουν όλες στην ομάδα των CXC χημειοκινών και μάλιστα 2 εξ αυτών, οι CXCL8 και CXCL6 φέρουν το ELR αμινοξικό μοτίβο στην αλληλουχία τους και χαρακτηρίζονται από προ-καρκινικές και αγγειογενετικές ιδιότητες. Η τρίτη, η CXCL4, δεν φέρει το εν λόγω μοτίβο και χαρακτηρίζεται ως αγγειοστατική, αν και ο ρόλος της στην συνολική εξέλιξη του όγκου παραμένει σύμφωνα με διάφορες μελέτες αντιφατικός. Εκτός των τριών αυτών χημειοκινών μελετήσαμε και μία κυτταροκίνη, τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα (VEGF) ο οποίος είναι το μόριο με την μεγαλύτερη επίδραση στην αγγειογένεση και χαρακτηρίζεται από ξεκάθαρες προ-καρκινικές ιδιότητες.

Η ποσοτικοποίηση των 4 αυτών αγγειοδραστικών χημειοκινών έγινε αρχικά σε ομογενοποιήματα ιστών (καρκινικών και υγιών) προερχομένων εκ του ίδιου ασθενούς και ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των τιμών των δυο αυτών ιστών. Επιπλέον των χημειοκινών στους ασθενείς αυτούς μετρήθηκαν και οι γνωστότεροι κλινικοπαθολογοανατομικοί δείκτες (Ki67, p53, p21, bcl2, EGFR και MLH1) και μελετήθηκε πιθανή σύνδεση μεταξύ της έκφρασης των χημειοκινών, της επιβίωσης και των τιμών τους. Επιπλέον σε καλλιέργειες καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων του έντερου (οι κυτταρικές σειρές HT-29 και Caco2) πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με ορό ασθενών, υγιών και FBS ώστε να μελετηθεί η απόκριση τους αλλά και η βασική τους λειτουργία στα αδιέγερτα controls.

Αρχικά στα ιστοτεμάχια με την ανάλυση Western Blot επιβεβαιώσαμε την παρουσία των τεσσάρων αυτών χημειοκινών. Καθώς όμως η ποσοτικοιποίηση είναι εκτός των ορίων της μεθόδου για την επίτευξη της τελευταίας προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο των μετρήσεων.

Οι μετρήσεις των χημειοκινών στα ιστοτεμάχια έγιναν με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) ενώ οι κλινικοπαθολογοανατομικοί δείκτες ημιποσοτικοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικά. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήσαμε τα test Wilcoxon και X τετράγωνο.

Όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές σ αυτές πραγματοποιήθηκαν 4 διαφορετικές επιδράσεις, μία με ορό καρκινοπαθών, μία με ορό υγιών, μία με FBS και τέλος μία με μόνο θρεπτικό υλικό ώστε να δούμε και την βασική τους έκφραση. Οι επιδράσεις σ όλες τις περιπτώσεις έγιναν σε πλάκες καλλιέργειας και σε χρονικό διάστημα 24 hr με ενδιάμεσα χρονικά σημεία μέτρησης στις 2, 4, 6, 12 και 24 ώρες. Όπως και στα ιστοτεμάχια οι μετρήσεις των χημειοκινών στα υπερκείμενα των καλλιεργειών έγιναν με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την δοκιμασία one-way ΑΝΟVΑ και με Γενικό Γραμμικό μοντέλο για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

Στα ιστοτεμάχια τα αποτελέσματα μας έδειξαν σημαντική αύξηση των CXCL6 (p=0.005) και VEGF (p-0.003) στα καρκινικά ιστοτεμάχια σε σχέση με τον φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο. Επιπλέον ασθενείς με χαμηλότερες τιμές των CXCL4 και CXCL8 είχαν μεγαλύτερη επιβίωση. Οι ασθενείς με απώλεια της έκφρασης του EGFR βρέθηκαν να παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα CXCL8 ενώ η απώλεια της έκφρασης της p21 βρέθηκε να συνδέεται με υψηλότερη ποσότητα CXCL6. Όσον αφορά την κατηγοριοποίηση των καρκίνων κατά Duke's και TNM δεν προέκυψε κάποια σύνδεσή τους με την παραγωγή των χημειοκινών. Για την p53 ακόμα προέκυψε μειωμένη επιβίωση για τους ασθενής με υψηλή έκφρασή της.

Στις μελέτες των καλλιεργειών στις καρκινικές σειρές ΗΤ-29 και Caco2 βρέθηκε και για τις δύο έκφραση των αγγειοδραστικών αυτών χημειοκινών ακόμα και στην αδιέγερτη τους κατάσταση. Επιπλέον έκκριση των χημειοκινών αυτών μετρήθηκε και στις διεγερμένες καλλιέργειες τόσο με ανθρώπινο ορό όσο και με FBS. Παρ όλα αυτά η έκφραση των χημειοκινών όχι μόνο δεν ήταν ομοιόμορφη αλλά προέκυψε και ολότελα διαφορετική. Τα HT-29 παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα CXCL8 και VEGF ανεξάρτητα της επίδρασης με ορό που εφαρμόσαμε ενώ αντίθετα τα Caco2 φαίνονται να μην αποκρίνονται καθόλου στις επιδράσεις αυτές. Το αντίθετο αποτέλεσμα προέκυψε για τις CXCL6 και CXCL4. Επιπλέον τα HT-29 φαίνονται να παράγουν την μέγιστη ποσότητα CXCL8 στο 24ωρο κατά την επίδραση με ορό ασθενών, επίδραση που έχει το ίδιο αποτέλεσμα στα Caco2 για την CXCL4.

6. Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων μας στα καρκινικά ιστοτεμάχια και τις κυτταρικές σειρές μπορούμε να συνοψίσουμε τα συμπεράσματα μας ως εξής:

- Οι αγγειογενείς παράγοντες CXCL6 και VEGF είναι σημαντικά αυξημένοι στα εντερικά καρκινικά δείγματα χωρίς να συνδέονται με το κλινικό στάδιο του καρκίνου και την επιβίωση
- Τα υψηλά επίπεδα των CXCL4 και CXCL8 συνδέονται με επιβαρυμένη πρόγνωση επιβίωσης
- Η υψηλή έκφραση της p53 συνδέεται με χαμηλή επιβίωση
- Οι κυτταρικές σειρές ΗΤ-29 και Caco2 είναι πιθανοί παραγωγοί και των τεσσάρων χημειοκινών που εξετάσαμε αλλά η απόκρισή τους στις επιδράσεις είναι τελείως διαφορετική.
- Όταν στο θρεπτικό υλικό περιλαμβάνουμε FBS έχουμε σημαντική επίδραση στην παραγωγή χημειοκινών των κυττάρων αυτών.

7. Extended Summary

Abstract

Colorectal cancer is the second leading etiology of cancer death in Western countries as almost half of the patients die of metastatic disease after curative surgery despite adjunct chemotherapy. In the development and the metastasis of the tumor CXC chemokines are possibly the proteins with the most devastating influence upon these procedures. Following this statement the main goal of our study was to quantify the amount of 3 angiodrastic of these chemokines and one pro-angiogenic cytokine produced by cancer tissue compared to normal mucosa from the same patient. In addition we studied the same chemokine production by two well characterized colon adenocarcinoma cell lines.

The CXC chemokines we chose to study belong to the CXC family and two of them, CXCL8 and CXCL6, bear the ELR aminocid motif, the presence of which is considered to confer protumoral and angiogenic properties. The third CXC chemokine, CXCL4, without this ELR motif is believed to be angiostatic, although its role in the development of the tumor appears quite controversial in many studies.

Methods

The measurement of the quantity of these 4 angiodrastic cytokines was done in two separate tissue samples from cancer and normal tissue obtained from the same patient. Results were expressed as pg chemokine / ng tissue protein. In addition to these angiodrastic cytokines several other clinicopathological factors (Ki67, p53, p21, bcl2, EGFR and MLH1) were semi-quantified and the possible association of these parameters with chemokine levels was

investigated. Moreover the colon cancer cell lines, HT-29 and Caco2 were cultured for 24 hours in the presence of human serum, either from cancer patients or from healthy individuals. The effect of addition to the incubation medium Fetal Bovine Serum (FBS) was also investigated.

Tissue chemokines were detected by Western-Blot Analysis and quantified by ELISA. The clinicopathological indeces were detected and semi-quantified Immunohistochemically. The results were statistically analyzed by the Wilcoxon test.

Culture supernatants from five different culture experiments were studied. Cells were incubated with serum (human from five cancer patients and five healthy individuals and FBS. As controls incubations with only culture medium (McCoys for HT-29 and MEM for Caco2) were run so as their basal chemokine production could be identified. All cultures were run on six-well culture plates for 24 hours and the time points at which we measured the chemokine production were : 2, 4, 6, 12 and 24 hours. The quantification of chemokines in the supernatants was done by ELISA and statistical analysis was done using the one-way ANOVA and General Linear Model for repeated measures tests.

Results

There was a significant increase of CXCL6 (p=0.005) and VEGF (p=0.003) in cancerous tissue compared to normal. Patients with lower levels of CXCL4 and CXCL8 appeared to live significantly longer. Moreover patients with loss of EGFR expression showed higher levels of CXCL8 while p21 loss was associated with increased levels of CXCL6. Chemokine levels were not correlated with TNM or Duke's classification. A strong p53 expression was accompanied by decreased survival.

In the culture studies of HT-29 and Caco2 cell lines we demonstrated that colonic epithelial cells are potent producers of angiodrastic chemokines.HT29 and Caco2 cells produce all four chemokines under basal conditions and over 24 hours after incubation with human serum or FBS. However the production is not uniform for all chemokines .The secretion response of these two cell lines is completely different. HT29 produce more IL-8 and VEGF irrespective of serum incubation while Caco2 cells are relatively unresponsive. The opposite is true for CXCL6 and CXCL4. Moreover HT29 cells produce more IL-8 and VEGF over 24 hours when incubated with cancer serum. On the other hand Caco2 cells produce more CXCL4 when incubated with cancer serum.

Conclusions

- The angiogenic factors CXCL6 and VEGF are increased in colorectal cancer tissue with no association with the clinical stage of the disease or survival.
- 2) However increased levels of tissue CXCL8 and CXCL4 are associated with poor survival.
- 3) Strong expression of p53 is found in patients with poor survival.
- 4) Culture studies imply that cancer cells are producers of all four cytokines studied but the response of the two cell lines is different. CXCL8 and VEGF seem to be similarly regulated in a different way than CXCL4 and CXCL6.
- 5) Inclusion of Fetal Bovine Serum in the incubation medium strongly influences the results.