

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2573.

JÓSA VALÉRIA MÁRTA

Alapkutatások klinikai alkalmazása
című program

Programvezető: Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Baranyai Zsolt, egyetemi adjunktus

Vérlemezkeszám és IL-6, mint a kolorektális tumorok potenciális prognosztikai faktorai a túlélés szempontjából

Doktori értekezés

Dr. Jósa Valéria

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Baranyai Zsolt, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Tordai Attila, MTA doktora, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Igaz Iván, Ph.D., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Arató András, DSc., MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Szabó László, med.habil., Ph.D., főorvos

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1.	A vastag- és végbélrák klinikai jelentősége	6
2.1.1.	A CRC kialakulásában szerepet játszó tényezők	7
2.1.1.1.	A CRC kialakulását befolyásoló környezeti és életmódbeli hatások ..	8
2.1.1.2.	A CRC kialakulását befolyásoló genetikai és epigenetikai eltérések	10
2.1.2.	Diagnosztikai, prognosztikai és prediktív markerek vastag- és végbélrákban	16
2.1.2.1.	Diagnosztikai lehetőségek CRC-ben.....	17
2.1.2.2.	A kezelést befolyásoló tényezők	20
2.1.2.3.	Potenciális markerek	22
2.2.	Vérlemezkek.....	24
2.2.1.	A trombociták morfológiája és képződése.....	24
2.2.2.	A vérlemezkek szerepe	27
2.2.2.1.	Véralvadás.....	27
2.2.2.2.	Immundefekció	28
2.2.2.3.	Vérlemezkek és a daganat kapcsolata	30
2.3.	Interleukin-6.....	33
2.3.1.	Az IL-6 általános jellemzői.....	34
2.3.2.	Az IL-6 jelátvitel.....	36
2.3.3.	Az IL-6 termelés szabályozása	38
2.3.4.	Az IL-6 és a daganat kapcsolata	39
3.	CÉLKITŰZÉSEK	42
4.	MÓDSZEREK	43
5.	EREDMÉNYEK	51
5.1.	Az IL-6 és a gasztrointesztinális daganatokat kísérő trombocitózis közötti összefüggés.....	51
5.2.	A trombocitózis és az IL-6 KO hatásai kólitisz-asszociált daganatos modellben	57
5.3.	Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegeknél.....	53
6.	MEGBESZÉLÉS.....	70

6.1.	Az IL-6 és a gasztrointesztinális daganatokat kísérő trombocitózis közötti összefüggés.....	78
6.2.	Trombocitózis és az IL-6 KO hatásai kólitisz-asszociált daganatos modellben ...	80
6.3.	Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegeknél.....	79
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	82
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	85
9.	SUMMARY	86
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	87
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	111
11.1.	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	111
11.2.	A disszertációtól független közlemények.....	111
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	114

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADAM	egy dezintegrin és metalloproteáz
ADP	adenozin-difoszfát
ATP	adenozin-difoszfát
AOM	azoximetán
CEA	karcinoembrionális antigén
CI	konfidencia intervallum
CIMP	CpG sziget metilátor fenotípus
CIMP-H	magas CIMP fenotípusú
CIMP-L	alacsony CIMP fenotípusú
CIN	kromoszóma instabilitás
c-Mpl	trombopoetin receptor
CRC	vastag- és végbélrák
CRP	C-reaktív protein
DCC	vastagbélrákban kieső gén
DFS	betegségmentes túlélés
DSS	dextrán-nátrium-szulfát
EPO	eritropoetin
FC	változás nagysága
FDG	F-fluoro-dezoxi-glükóz
GDP	guanozin-difoszfát
GpIIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa
GITR	glükokortikoid indukálta tumor nekrosis faktor receptor
GITRL	glükokortikoid indukálta tumor nekrosis faktor receptor ligand
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
GTP	guanozin-trifoszfát
HE	hematoxin-eozin
HCC	hepatocelluláris karcinóma

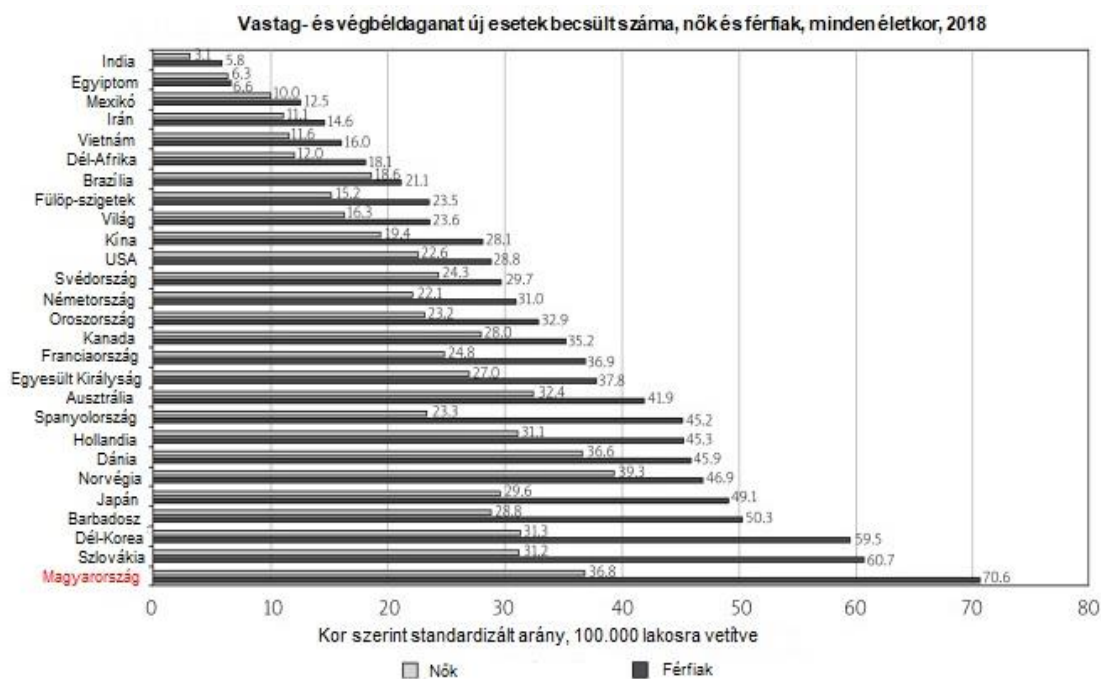
HNPCC	veleszületett, non-polipózis vastagbélbetegség
hMLH	humán Mut L homológok
hMSH	humán Mut S homológok
hPMS	humán posztmitotikus szegregáció, Mut L homológok
IBD	gyulladásos bélbetegségek
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor
INF-γ	interferon- γ
IL	interleukin
JAK	Janus kinázok
LIF	leukémia gátló faktor
LOH	heterozigótaság elvesztése
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MDR-1	multidrog-rezisztencia-1
MkP	megakariocitaképzés korai elkötelezett progenitor sejt
M2-PK	M2-piruvát kináz
MMP-2	mátrix-metalloproteáz-2
MMR	mismatch repair
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
MSI	mikroszatellita instabilitás
MSS	mikroszatellita stabil
NF-IL-6	nukleáris faktor – IL-6
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B
NK-sejt	természetes ölósejt
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentők
OLS	közönséges legkisebb négyzetek
OS	teljes túlélés
OSM	onkosztatin M
PDGF	trombocita eredetű növekedési faktor

PET	pozitron emissziós tomográfia
PF4	trombocita faktor 4
RT-PCR	valós idejű polimeráz-lánreakció
STAT3	szignál transzducer és transzkripció aktivátor 3
SUV_{max}	maximális standardizált felvételi érték
TACE	transzkatóéteres artériás kemoembolizáció
TAM	tumor-asszociált makrofágok
TCF	T-sejt faktor
TFPI	szöveti faktor útvonal gátló
TGF-β	transzformáló növekedési faktor β
Th17	T-helper 17 sejt
TME	tumor mikrokörnyezet
TNF	tumor nekrozis faktor
TPO	trombopoetin
THBS-1	tromboszpondin
TTV	teljes tumor volumen
Treg	szabályozó T-sejt
UTR	nem transzlálódó régió
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VWF	von Willebrand-faktor
WT	vad genotípus
5-HT	szerootonin

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A vastag- és végbélrák klinikai jelentősége

A vastag- és végbélrák (CRC) napjainkban a daganatos halálozások kb. 10%-ért felelős, ezzel a 3. legtöbb áldozatot szedő onkológiai betegségnek számít világviszonylatban. Évente 1,8 millió új esetet diagnosztizálnak, a nőknél a második, a férfiaknál a harmadik leggyakoribb daganat. A CRC gyakoriságában jelentős földrajzi eltérés figyelhető meg, jellemzően a nyugati, fejlett országokban fordul elő a legnagyobb mértékben. Európában évi 500.000 esettel a második leggyakoribb daganat. Sajnálatos módon a 2018-as adatok alapján Magyarország a lakosság kor szerinti megoszlásával korrigált, 100.000 lakosra jutó esetek számát tekintve férfiaknál az első helyen (70,6 / 100.000 lakos), nőknél a második helyen (36,8 / 100.000) áll a világ országai között (1. ábra)(1).



- 1. ábra:** A vastag- és végbéldaganatok incidenciája nemek szerint, kor szerint standardizálva, 100.000 lakosra vetítve, országokra lebontva 2018-ban (1). Magyarország kiemelkedik a CRC incidenciájában a világ országai közül mindkét nemből.

Évente közel 80.000 betegnél diagnosztizálnak daganatos megbetegedést hazánkban, melyből több, mint 10.000 eset CRC (2). A magyar adatok alapján ez a daganat a második helyen szerepel mind az incidenciát, mind a mortalitást tekintve. Ezzel évente több, mint 5000 ember hal meg Magyarországon. Az egyetlen pozitívum, hogy hazánkban az elmúlt 15 évben stagnálás figyelhető meg a betegség incidenciáját (1. táblázat) és mortalitását tekintve.

1. táblázat: *Hat nagy halálozási gyakoriságú daganat incidenciájának növekedése 1975 és 2014 között Magyarországon (2)*

Daganat	Esetszám		Növekmény (%)	Esetszám		Változás (%)	Esetszám		Változás (%)
	1975	1999		2004	2014				
Ajak- és szájüregi rák	462	1618	250	1690	+4	1460	-14		
Légcső-, hörgő-, tüdőrák	4169	7883	89	8260	+5	8733	+6		
Vastag- és végbélrák	3025	4912	62	4979	+1	5050	+1		
Hasnyálmirigyrák	1076	1562	45	1683	+8	1999	+19		
Emlőrák	1650	2381	44	2285	-4	2133	-7		
Prosztatarák	1196	1387	16	1275	-8	1280	0		

Korábban a gyakoriság növekedéséért elsősorban az öregedő társadalmat tették felelőssé, mivel a CRC incidenciája az életkor előrehaladtával nő. Azonban egyre nagyobb számban ismerik fel fiatal, azaz 50 év alatti betegeknél is (3). A világszerte észlelt jelentős, évente kb. 6%-os növekmény háttérében elsősorban a fejlődő országokban fokozódó incidenciák áll, amelynek háttérében leginkább az életmóddal összefüggő tényezőket és a várható élettartam növekedését feltételezik, míg a fejlett országokban inkább stagnálás vagy akár az incidenciák csökkenése figyelhető meg (4).

2.1.1. A CRC kialakulásában szerepet játszó tényezők

A CRC kialakulásában mind veleszületett, mind környezeti tényezők szerepet játszanak. A betegek 5-7%-nál ismert veleszületett kolorektális rák szindróma (Lynch-szindróma, familiáris adenomatózus polipózis, MUTYH-asszociált polipózis, polimeráz korrektúrával társult polipózis) (5), 10-20%-nál pozitív a családi anamnézis (6). A

fennmaradó 65-85%-ban, azaz az esetek döntő többségében azonban a daganat sporadikusan fordul elő. Az öröklődő esetekben jól azonosítható egy adott gén vagy géncsoport, amely felelős a daganat kialakulásáért. A sporadikusan kialakuló CRC esetén a genom stabilitásának felbomlását több, random módon szerzett szomatikus génmutáció okozza. Ezek kialakulásában döntő szerepet játszanak a környezeti és életmódbeli hatások.

2.1.1.1. A CRC kialakulását befolyásoló környezeti és életmódbeli hatások

Az életkor előrehaladtával 40 éves kortól fokozatosan nő a CRC kialakulásának lehetősége, amely 50 éves kor felett jelentősen megemelkedik, a diagnosztizált esetek 90%-a 50 év felettiiek körében fordul elő (1). A 60 és 79 éves korcsoportban a CRC előfordulási gyakorisága 50-szerese a 40 év alatti korcsoporthoz képest. Valószínűleg az életkor előrehaladtával az egyre nagyobb számban előforduló genetikai hibák felelősek a daganat kialakulásáért.

Számos vizsgálat alapján ma már jól ismert, hogy a genetikai hajlamon és a random génmutációkon kívül jelentős szerepet játszanak a környezeti hatások és az életmódbeli tényezők (2. ábra). A különféle élelmiszeripari feldolgozásokon átesett vagy vörös húsokat (sertés, marha, birka), nagy mennyiségben állati zsírt vagy koleszterint tartalmazó étrend esetén is emelkedett a CRC kockázata, különösen a bal kolonfélben (7). Feltételezések szerint az ilyen étrend kedvez olyan baktériumflóra kialakulásának, amely az epesókat potenciálisan karcinogén nitrózaminokká bontja.

Független prognosztikai tényezőnek bizonyult az obezitás önmagában is, 30 kg/m² vagy afeletti testtömegindexű betegeknél a kockázat 20%-kal magasabb (8). A jelenség hátterében az áll, hogy a táplálkozás során a szervezetbe jutó zsírok rendellenes bélhámsejt proliferációt indíthatnak el (9). Az összefüggés a férfiaknál kifejezettebben figyelhető meg.

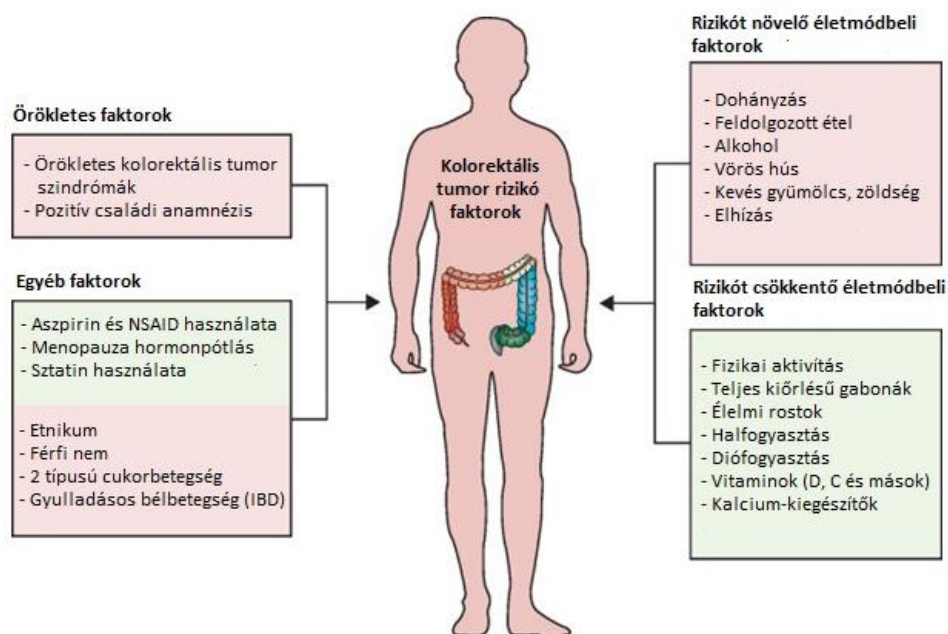
Mint számos más betegség esetén, a dohányzás és az alkoholfogyasztás itt is egyértelmű patogenetikai rizikótényezőnek bizonyult (10). Ezzel szemben a rostokban gazdag táplálék fogyasztása csökkenti a CRC kialakulásának valószínűségét. Feltételezik, hogy a rostok eliminálják a belekben képződő karcinogén anyagokat és gyorsítják az étel áthaladását a tápcsatornán, bár nagy betegszámú vizsgálatok ezt végül nem támasztották

alá (11). Hasonlóan, a rendszeres fizikai aktivitás, sportolás védő szerepe is jó ismert már, amely közel 25%-os rizikócsökkenést jelent mindkét nemben (12). Valószínűleg a prosztaglandin szint csökkentése, az étel bélesatornán való áthaladásának rövidebb tranzitideje és a jobb immunválasz is szerepet játszik ebben a pozitív hatásban (13).

A fentieken túl a hormonális tényezők szerepe sem elhanyagolható: férfiaknál nagyobb arányban fordul elő, nők esetében pedig fokozottabb a kockázat nulliparitás, idősebb életkorban kihordott első terhesség, valamint korai menopauza esetén (14). Ezzel szemben a posztmenopauzában alkalmazott hormonterápia csökkenti a CRC kockázatát. Valószínűleg az ösztrogén védő szerepe annak tulajdonítható, hogy csökkenti az epesavtermelést, valamint az inzulinszerű növekedési faktor (IGF-1) szintjét a szérumban, melyek a normál bélhám daganatos átalakulásának kezdeti lépéseiben fontos tényezők (15).

A nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID), elsősorban az acetil-szalicilsav protektív szerepét is többen vizsgálták (16, 17). Epidemiológiai adatok alapján nem csak az adenómák kialakulását, hanem az adenómák malignus transzformációját is csökkentik (18, 19). Ennek ellenére továbbra sincs meghatározva a minimális hatásos dózis, a kezelés szükséges időtartama, és a kemoprevenció célcsoportja. Az elsősorban gasztrointesztinális mellékhatásoktól való félelem miatt alkalmazása nem terjedt el.

A gyulladással járó bélbetegségek (IBD) hosszú ideje való fennállása is fokozza a CRC kialakulásának az esélyét, amely a diagnózis óta eltelt idővel és a betegség kiterjedésével egyértelmű összefüggést mutat (20). A Crohn-betegek 0,4-0,8%-ánál, a kólitisz ulcerózában szenvedő betegek 5-10%-ánál diagnosztizálnak CRC-t. Utóbbiaknál a betegség 10 éves fennállása esetén csak 2%, míg 30 éves fennállás esetén már 18% ez a kockázat (21). Ezeknek a daganatoknak a biológiai viselkedése és a morfológiája is eltérő: főleg a jobb kolonfélben fordulnak elő, gyakoriak a szinkron tumorok. Jellemzően fiatalabb életkorban alakulnak ki. A kezelésükben gyakori a teljes vastagbél eltávolítás a szinkron daganatok kialakulásának fokozott kockázata miatt.



2. ábra: A vastag- és végbéldaganatok kialakulását befolyásoló tényezők (22). Számos életmódbeli, örökletes és egyéb tényező befolyásolja a CRC kialakulását pozitív vagy negatív irányban.

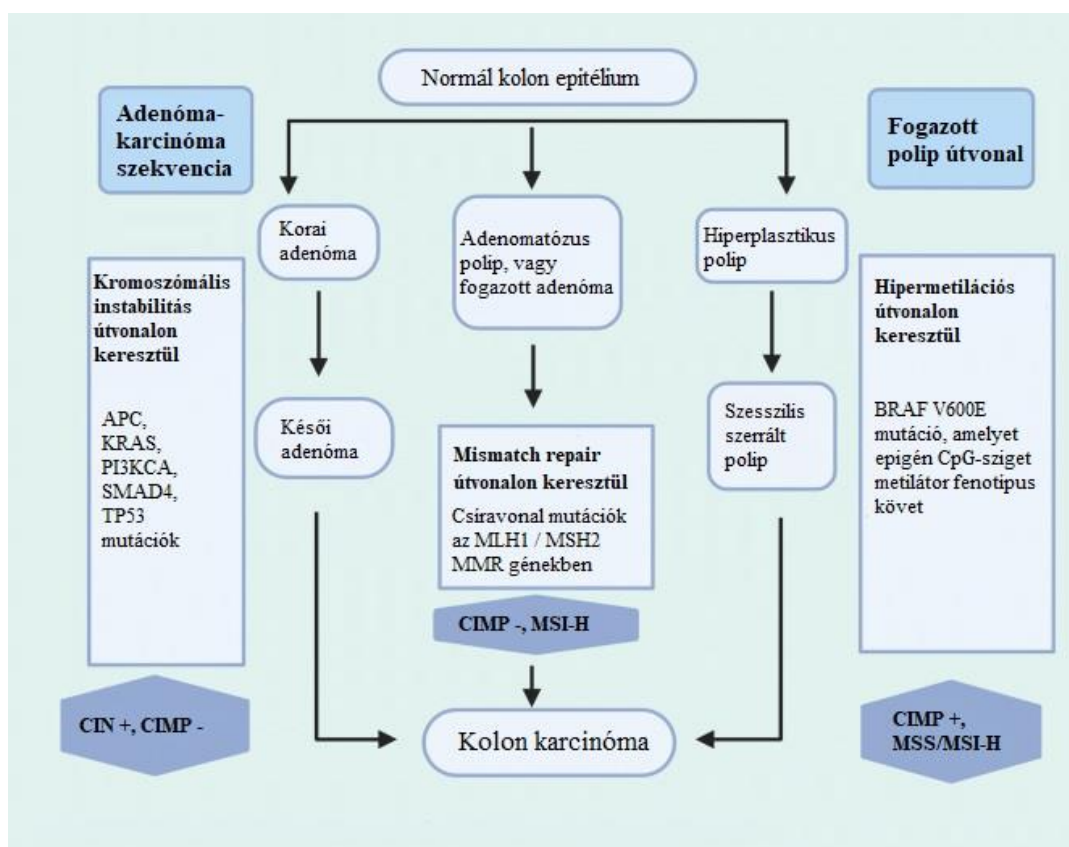
2.1.1.2. A CRC kialakulását befolyásoló genetikai és epigenetikai eltérések

Napjainkra a szövettani elváltozásokon túl sikerült azonosítani az ezekért felelős genetikai eltéréseket is. A folyamat kiindulási pontját jelentik a bélben található kripták mélyén lévő multipotens őssejtek, amelyek fiziológiás esetben a bélhámsejtek megújulásáért felelősek (23). Amennyiben ezekben az őssejtekben genetikai és epigenetikai változások halmozódnak fel, akkor meghatározott onkogének aktiválódnak, míg bizonyos tumorszuppresszor gének inaktiválódnak. Kezdetben csak egy malignus fenotípus alakul ki, amelyiknek mérsékelten nagyobb az osztódási üteme a normál sejthez képest. Azonban újabb és újabb mutációkkal már mutáns sejtvonalak jönnek létre, és megkezdődik a daganatsejtek tényleges proliferációja.

A vastagbél karcinogenezist megalapozó genomialis instabilitás alapján alapvetően három fő csoport különböztethető meg (3. ábra): a kromoszóma instabilitás

(CIN), a mikroszatellita instabilitás (MSI) és a CpG sziget metilátor fenotípus (CIMP) útvonalak (22, 24).

A daganatok 60-65%-a a klasszikus adenóma-karcinóma szekvencia során alakul ki, melynek kiinduló pontja az adenomatózus polipózis kóli (APC) gén mutációja. Ezt meghatározott sorrendben további mutációk követnek, amelyek végeredményben CIN-t mutató, de mikroszatellita stabil (MSS) tumorok kialakulásához vezetnek. A második kisebb csoportba tartozik a mismatch repair (MMR) gének mutációját magában foglaló útvonal: a gének mutációja lehetett veleszületett (2-5%), azonban sporadikusan is előfordul a CRC-k 15-20%-ában. Ebben a csoportban mikroszatellita instabilitás figyelhető meg. Az utolsó nagy csoport meglehetősen heterogén, a CRC esetek kb. 17-32%-át teszi ki a szesszilis-fogazott-metilációs útvonal.



3. ábra: A főbb molekuláris útvonalak a vastagbél-daganat kialakulásában (22)

Kromoszómális instabilitás

A vastagbél daganatok különösen alkalmasak a daganatképződés különböző stádiumainak demonstrálására, és ennek alapján született meg a Fearon és Vogelstein által javasolt ún. adenóma-karcinóma szekvencia modell (25). Ez egy hosszú, 15-20 éven át tartó, többlépcsős folyamat, mely során az ép nyálkahártyában a kezdeti hiperproliferáció után megjelenik egy jóindulatú daganat, az adenóma. A folyamat során a sejttípus egyre kifejezettebbé válik, az eredeti nyálkahártyastruktúra felbomlik, a jelentkező diszplázia egyre súlyosabbá válik, míg végül a fokozatosan növekvő adenómából először a bazálmembránt át nem törő in situ, majd azon túlterjedő invazív karcinóma lesz.

Az adenómaképződés első lépcsőjeként az első mutáció az APC génben történik, amely az 5. kromoszóma rövid karján (5q21) helyezkedik el (26). Ez indítja el az ún. diszplasztikus kripta kialakulását. Molekuláris szinten az APC gén mutációjával a Wnt jelátvitel gátlása megszűnik, így az azonnal aktiválódik, ami a sejtben a β -katenin akkumulációjához vezet. A szabad β -katenin bejut a sejtmagba, ahol a T-sejt faktor (TCF) család transzkripciós faktoraihoz kötődik, és olyan fontos gének transzkripcióját aktiválja, amelyek a sejtproliferációt szabályozzák (ciklin D1, c-Myc), az érépződést segítik elő (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)) vagy az apoptózist gátolják (multidrog-rezisztencia-1 (MDR1), survivin). Míg önmagában az APC gén kiesése „csak” a bélhámsejt differenciációs zavarát és adenóma kialakulását okozza, a második lépcsőhöz, az adenóma-karcinóma progresszióhoz már további gének mutációja is szükséges. A Ras családba tartozó K-ras (Kirstein rat sarcoma) onkogén mutációja miatt megváltozik az általa kódolt GTPáz aktivitású fehérje működése, amelynek egyébként a normális sejtproliferációban és differenciációban van szerepe (27). A mutációja következtében a kisméretű, enyhén diszplasztikus adenómából 1-2 cm-es, közepesen diszplasztikus tubulovillózus adenóma alakul ki.

A következő lépcsőfok során létrejövő mutációk a 18-as kromoszóma hosszú karját érintik. Itt található a vastagbélrákban kieső gén (DCC) elnevezésű tumorszuppresszor gén, amely egy olyan fehérjét kódol, amely az apoptózis indukciójában és a sejtproliferáció negatív szabályozásban játszik szerepet (28, 29). Ebben a régióban helyezkednek el a SMAD2 és SMAD4 tumorszuppresszor gének is. Az általuk kódolt fehérjék a TGF- β receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak

intracelluláris mediátorai. A sejtmagba jutva a sejtosztódást, a sejt differenciációt, a mátrix termelődést és az apoptózist befolyásolják. A vastagbél daganatok közel 70%-ban figyelhető meg a heterozigótaság elvesztése (LOH) a 18q régióban. Ezen folyamatok eredményeképpen az adenóma mérete jelentősen nő (>2 cm), és a diszplázia súlyos fokú lesz.

Az adenóma-karcinóma szekvencia utolsó lépcsője a 17. kromoszóma rövid karján található p53 tumorszuppresszor gén mutációja, amely végső soron a tényleges karcinóma kialakulásához szükséges (30). A daganatos progresszió egy jól ismert génje a p53, mivel mutációja az összes tumor 50%-ában kimutatható, a vastagbél rák esetében 50-75%-ban fordul elő (31). Egy olyan DNS-kötő fehérjét kódol, amely számos gén transzkripcióját szabályozza, és ezen keresztül befolyásolja a sejtproliferáció gátlását, a DNS-repair mechanizmusok indukcióját, és az apoptózist is. DNS károsodás esetén leállítja a sejtciklust a G1 fázisban, hogy a DNS hibajavítás megtörténhessen (32). Ennek eredménytelensége esetén pedig apoptózist indukál. Épp emiatt a genom őrének is nevezik.

Mikroszatellita instabilitás

A mikroszatelliták különböző hosszúságú, általában 2-10 nukleotidból álló bázisisméltódásokat tartalmazó rövid DNS szakaszok, amelyek a teljes genomban megtalálhatóak, genetikailag instabilak. Az MSI során az MMR rendszer működése válik elégtelenné: ez a mechanizmus felelős a DNS-ben kialakuló hibás bázispárosodás kijavításáért (33). Ennek eredményeképpen nukleotid inzerciók vagy deléciók halmozódnak fel a genomban, amelyek érintik a mikroszatellitákat alkotó nukleotid szekvenciákat is, és rajtuk keresztül a karcinogenezisben kritikus szerepet játszó tumorszuppresszor gének (TGF- β II-R, IGF-II-R, BAX) mutációjához, és ezzel aktivitásuk megszűnéséhez vezethetnek. A sporadikusan előforduló CRC 15-20%-ban és Lynch-szindrómában észlelhető ilyen típusú genomiális instabilitás.

A hibajavító rendszernek legalább hét tagja van: a humán Mut L homológok (hMLH1 és hMLH3), a humán Mut S homológok (hMSH2, hMSH3 és hMSH6) és a humán posztmitotikus szegregáció, Mut L homológok (hPMS1 és hPMS2). A hMLH1 és a hMSH2 fehérjék alapvető szerepet játszanak a hibajavító rendszer megfelelő működésében.

A mikroszatellita státuszt 2 mononukleotid és 3 dinukleotid lókuszt vizsgálásával határozzák meg. Amennyiben a vizsgált lókusztok több, mint 40%-ában instabilitás észlelhető, akkor magas szintű (MSI-H), míg 40% alatt alacsony szintű (MSI-L) mikroszatellita instabilitásról beszélünk (34). Az MSI-H daganatokban általában a hMLH1 gén expressziója szenved zavart. Megfigyelések alapján ezek a daganatok patológiailag eltérnek a CIN talaján kialakuló CRC-től. Előbbiek általában a vastagbél proximális részén helyezkednek el, rosszul differenciáltak, mucinózusak, és peritumorálisan limfocita infiltráció figyelhető meg.

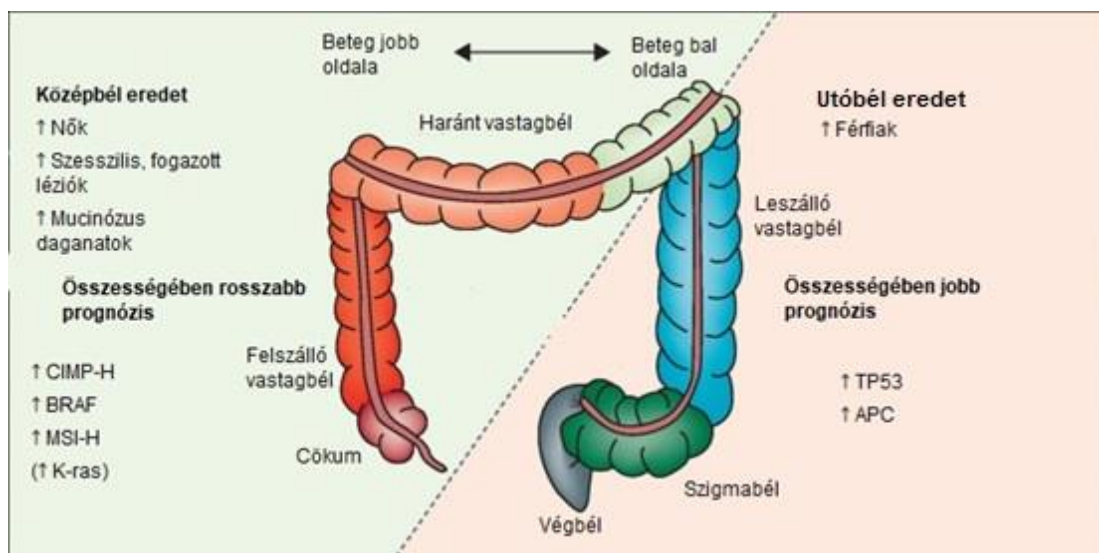
A Lynch-szindróma vagy más néven veleszületett, non-polipózis vastagbélbetegség (HNPCC) esetében, amely az öröklött esetek mintegy 80%-át, az összes CRC 3-5%-t teszi ki, a hMLH1, a hMSH2, a hMSH6 és a hPMS2 MMR gének egyikének vagy az EPCAM génnek a csírvonalbeli mutációja vezet MSI-hez (35). A betegség autoszómális dominánsan öröklődik. Ezeknél a betegeknél a vastagbélben csak kis számban előforduló, de daganatosan gyorsan (85-90%) elfajuló adenómák kialakulása jellemző átlagosan 45 éves életkor körül a vastagbél proximális részén. Emellett azonban más lokalizációban is megnő a malignus daganatok kialakulásának esélye, mint pl. az endometrium, a petefészek, az ureter, a vesemedence, a hasnyálmirigy, az epeutak, a gyomor és a vékonybél.

CpG sziget metilátor fenotípus

A DNS metiláció számos gén ki- és bekapcsolásában játszik szerepet mind az egészséges fejlődés, mind a daganatképződés során. A CpG sziget metilátor fenotípusban az epigenetikai mechanizmusok játszanak szerepet (36). A CpG szigetek jellemzően bizonyos gének promoter régiójában találhatóak, és fiziológiás esetben nem metiláltak. Ha azonban ezek a szigetek hipermetilálódnak, akkor az őket követő tumorszuppresszor gének transzkripciója zavart szenved. A CpG szigetek metilációs mintázata alapján két csoportot különböztetünk meg CRC-ben: a magas CIMP fenotípusú (CIMP-H) daganatokban számos marker metilációja megnő, jellemző a BRAF és hMLH1 mutáció, míg az alacsony CIMP fenotípusú (CIMP-L) daganatokban a K-ras mutációja gyakori (92%) és kevesebb gén metilációja ismert. A sporadikus CRC-k 15%-áért ez a genomális instabilitás felelős.

Jass és mtsai javaslata alapján egy 5 csoportot megkülönböztető beosztás készült, melyben a CIN-t, a MSI-t, a CIMP-H státuszt, a metil-guanin DNS metil-transzferáz 0-6 szigetének metilációs státuszát, továbbá a K-ras és a BRAF mutációját is figyelembe veszik, és ez alapján csoportosítják a CRC-t (4. ábra) (37).

- 1. CIMP-H és MSI-H tumorok (12%):** a BRAF mutáció és a hMLH1 hipermetilációja jellemzi ezeket a daganatokat, amelyek általában nőknél fordulnak elő a jobb kolonfélben, kromoszómáisan stabilak. Szövettanilag alacsony differenciáltságúak, gyakori a limfocitainfiltráció, a gócos nyáktermelés. A kialakulásuk a fogazott adenómákból történik.
- 2. CIMP-H és MSS vagy MSI-L daganatok (8%):** a hMLH1, p16 és tromboszpondin (THBS-1) részleges metilációja, valamint a BRAF mutációja figyelhető meg, kromoszómáisan stabilak. A fogazott adenómákból alakulnak ki. Jellemzően nőknél, a jobb kolonfélben fordulnak elő. Szövettanilag rosszul differenciált mucinózus daganatok, melyeket diploid sejtek jellemeznek.
- 3. CIMP-L és MSS vagy MSI-L tumorok (20%):** O-6-MGMT metiláció és K-ras mutáció jellemző. Kromoszómáisan instabilak. Adenómákból vagy hiperplasztikus polipokból alakulnak ki. Férfi dominancia figyelhető meg, elsősorban a bal kolonfélben alakulnak ki. Szövettanilag jól differenciáltak.
- 4. CIMP negatív és MSS daganatok (57%):** a K-ras, a p53 és az APC mutációja figyelhető meg. Ez a csoport tartozik a klasszikus adenóma-karcinóma szekvencia modellbe. Jellemzően férfiakban alakulnak ki a bal kolonfélben. Szövettanilag jól differenciált tumorok, amelyekben a szöveti limfocitainfiltráció alacsony.
- 5. CIMP negatív és MSI-H tumorok (3%):** a hMLH1, a hMLH2 és a hMSH6 gének mutációja jellemzi, ide tartoznak a Lynch-szindrómás betegek. Általában férfiaknál fordulnak elő a jobb kolonfélben, mucinózus daganatok. Szövettanilag rosszul differenciáltak, gyakori a diploidia és a szöveti limfocitainfiltráció.



4. ábra: A két kolonfélben kialakuló daganatok közötti alapvető molekuláris különbségek (22) A jobb és bal kolonfél – rektum között fennálló, az eltérő embrionális eredet következtében kialakult különbségek sematikus ábrája CRC-ben szenvedő betegeknél.

2.1.2. Diagnosztikai, prognosztikai és prediktív markerek vastag- és végbélrákban

Az elmúlt években robbanásszerűen megnőtt az elérhető információ mennyisége az egyes daganatok molekuláris biológiáját illetően. Az ún. prediktív markereket, melyek a megfelelő gyógyszeres kezelés meghatározásában segítenek, ma már széles körben alkalmazzuk a különböző daganatoknál. Ugyanakkor egyelőre nem született hasonló áttörés a diagnosztikai és prognosztikai tesztek területén. A prognosztikai markerek a kezeléstől független információkat szolgáltatnak a betegség kimenetelére, azaz pl. a betegségmentes (DFS) vagy a teljes túlélésre (OS) vonatkozóan.

A CRC-ben szenvedő beteg prognózisát napjainkban még mindig a klinikopatológiai jellemzők és a diagnózis idején észlelt daganatstádium alapján határozzák meg. Rosszabb prognózist jelent a perineuralis terjedés, nyirokérbetörés, alacsony differenciáltsági fok, bélelzáródás és bélperforáció, fiatal életkor, bizonytalan vagy pozitív reszekciós szél, emelkedett karcinoembrionális antigén (CEA) érték, valamint az előrehaladott tumor stádium. Amennyiben 12 nyirokcsomónál kevesebbet távolítottak el, a beteg egy fokozottal rosszabb stádiumbesorolást kap. A daganatstádium

előrehaladásával az 5-éves túlélés meredeken csökken: I. stádium esetén 90%, II. stádium esetén 70%, III. stádium esetén 58%, míg IV. stádium esetén pusztán 15% (38).

Éppen ezért kiemelkedő jelentősége van a korai diagnózisnak. Az ideális módszer azt jelentené, ha olyan markereket lehetne azonosítani a vérből, székletből vagy egyéb módon, amelyek már a klinikai tünetek megjelenése előtt, a betegség egész korai stádiumában jeleznék a daganat kialakulását, kellő információt szolgáltatnának a növekedés üteméről, az esetleges áttétképződésről és a kezelés sikerességéről. Sajnos azonban mind a mai napig nem rendelkezünk ilyen markerekkel, az eddig leírt molekulák pusztán a felismert daganatok követésére használhatóak.

2.1.2.1. Diagnosztikai lehetőségek CRC-ben

Szűrési céllal számos módszer áll a rendelkezésünkre, ezek szenzitivitás, specifitása nagyon változó (fokozott rizikót jelentő nagyobb adenómák, daganatok). A vizsgálatok egy része non-invazív, más része invazív. Utóbbiak elfogadottsága a lakosság körében alacsonyabb.

Székletvérteszt

A székletvérteszt azon alapul, hogy a vastagbélpolipok és daganatok gyakran véreznek (39). Ezen vizsgálatok előnye, hogy non-invazívak, fájdalommentesek és gyorsak, kisebb megterhelést jelentenek a betegre nézve. Hátrányuk, hogy a daganatok jellemzően csak intermittálóan véreznek, ezért az egyszeri vizsgálat nem elegendő. A fiziológiás vérvesztés széklettel 0,5-1,5 ml, a tesztek többsége 10 ml vérvesztés esetén már pozitív eredményt mutat (40).

A legelterjedtebb módszer a guajak alapú tesztek, amelyek a hemoglobin vagy a hem peroxidáz aktivitását mérik. Számos esetben álpozitív eredményt adnak, mint pl. peroxidázokban gazdag ételek (vörös húsok, egyes zöldségek) és bizonyos gyógyszerek (NSAID) esetén, ezért az alkalmazásuk előtt erről a betegeket tájékoztatni kell (41). Emellett álpozitív eredményt adnak a nem tumor eredetű, pl. aranyérből származó vérzések is. Az irodalomban jelentős szórás észlelhető, hogy milyen szenzitivitással mutatja ki a nagyobb adenómákat (12-41%) és tumorokat (26-64%), a specifitása azonban a vizsgálatok többségében magas (87-98%) (40, 42).

Az immunkémiai alapú székletvér vizsgálat előnye, hogy csak a humán hemoglobinnal lép reakcióba, ezért a beteg étrendje nem befolyásolja az eredményt. Ugyanakkor az NSAID alkalmazás ennél a tesztnél is álpozitív eredményt ad (42). Szenzitivitása a daganatok kimutatása tekintetében (81,8%) jelentősen jobb a guajak alapú vizsgálatéhoz képest, azonban a magasabb költsége miatt alkalmazása kevésbé terjedt el (43).

Enzimes vastag- és végbéldaganat szűrés

A teszt alapja, hogy a vastagbélben fiziológiásan előforduló enzim, az M2-piruvát kináz (M2-PK) a daganatos szövetben kevésbé aktív, dimer formában fordul elő a tetramer izoforma helyett, és mennyisége megnő. A bélfalról leválva a székletben ürül, mennyisége mérhető; a teszt szenzitivitása (73-92%) (44) és specifitása magas (90%) (45). Plazmaszintje szintén mérhető, ez a vizsgálat is alkalmas szűrésre, bár szenzitivitása alacsonyabb (57,3%) a széklet M2-PK teszthez képest. Álpozitív eredményt ad krónikus gyulladással járó bélbetegségek és hasmenés esetén.

Széklet DNS teszt

A széklet DNS teszt vizsgálat azon alapul, hogy a bélfalról folyamatosan válnak le sejtek, melyeknél az adenómákra és a tumorokra jellemző DNS eltéréseket vizsgálni lehet. Egyidejűleg általában több markert is néznek, így pl. a K-ras, a BRAF, az APC vagy a p53 gének mutációit, mikroszatellita instabilitást vagy DNS-metilációt. A módszer szenzitivitása mind az adenómák (44-86%), mind a daganatok (75-91%) esetében elég széles spektrumú, a specifitása magas (82-96%) (46, 47). Amennyiben csak egy metilációs markert vizsgáltak, akkor a teszt szenzitivitása jelentősen csökkent (adenómák: 21-69%, daganatok: 46-94%). A vizsgálat hátránya a magas költség, a csomagolási és szállítási előírások komplexitása.

Kettős kontrasztos irrigoszkópia

A vizsgálat során a vastagbélbe juttatott kontrasztanyag bevonja a bél falát, az egyidejűleg bejutott levegő hatására pedig a bélfalak kifestülnek, eltávolodnak egymástól. A kontrasztanyag hatására jól kirajzolódik a nyálkahártya redőzete és az azon látható eltérések. A vizsgálat hátránya, hogy hosszadalmas, hasonló előkészítést igényel,

mint a kolonoszkópia, a beteget sugárterhelés éri. Bármilyen eltérés esetén vastagbéltükrözés javasolt. Szenzitivitása a 7 mm-nél nagyobb adenómák esetében 73%, míg a daganatokra 85-97% (48). Jelentőségéből egyre inkább vesztít.

Virtuális kolonoszkópia

A vizsgálat során a vastagbelet levegővel töltik fel, majd vékonyszeletes CT vizsgálatot végeznek. Az így nyert képekből speciális számítógépes program segítségével a vastagbél belfelszíne ugyanúgy áttekinthető, mint vastagbéltükrözés során. Előnye, hogy az extralumináris eltéréseket is mutatja, szövődmény csak ritkán fordul elő. Hátránya, hogy a rekonstrukciós képeken nem lehet megjeleníteni a nyálkahártya finom részleteit, szerkezetbeli eltéréseit. Emellett sugárterheléssel jár, és ugyanolyan előkészítést igényel, mint a kolonoszkópia. Szenzitivitása és specifitása magas mind az adenómák (mérettől függően 70-93% és 83,1-94,6%), mind a daganatok tekintetében (96,1% és 100%) (49, 50).

Kolonoszkópia

A legmegbízhatóbb eredmény a béltükrözéssel nyerhető, ez a vastagbeldaganatok szűrésének gold standard-je. Mind a szenzitivitása (95%), mind a specifitása (99-100%) magas a daganatok kiszűrésére (51). Előnye, hogy a teljes vastagbél áttekinthető, lehetőség van szövettani mintavételre, továbbá az esetleges kisebb méretű polipusok el is távolíthatóak. Hátránya, hogy invazív beavatkozás, előkészítést és speciális szakszemélyeztetet igényel, illetve a szűrési módszerek közül itt a legnagyobb a szövődmények aránya.

Karcinoembrionális antigén

Jelenleg a CRC-ben szenvedő betegeknél a CEA-t alkalmazzák széles körben a betegség utánkövetése során. Ez egy 180 kDa súlyú, komplex, intracelluláris glikoprotein, amely sejtfelszíni antigénként a hasnyálmirigyben és az emésztőrendszerben termelődik az embrionális fejlődés idején (52). Felnőttkorban is megmarad a termelődése, normál értéke 0 és 5 ng / ml érték közé tehető. Számos egyéb daganatban is megemelkedik a szintje a CRC-n kívül, így hasnyálmirigy- (53), emlődaganatban (54), máj- (55) és tüdőtumorkban (56). Ráadásul más, nem malignus kórképekben is megemelkedhet a szintje, pl. dohányzás, krónikus gyulladás vagy májbetegség esetén is (57). Önmagában a magasabb CEA szint tehát nem feltétlenül jelent

rosszindulatú betegséget, diagnosztikai markerként alkalmazása nem javasolt. Prognosztikai szerepe vitatott. Felmerült, hogy a magas preoperatív CEA szint esetén a betegség kimenetele rosszabb (58), nagyobb a recidíva kockázata és rövidebb a túlélés (59).

2.1.2.2. A kezelést befolyásoló tényezők

A korai stádiumú és a lokálisan előrehaladott CRC elsődleges kezelése továbbra is a sebészi eltávolítás. A II. stádiumú betegek nagy többségénél az R0 reszekció elegendő, az adjuváns terápia alkalmazása túlkezelésnek minősül. Ugyanakkor a betegek 30%-nál lokoregionális recidíva alakul ki (38). Ezen magas kockázatú betegek azonosítására javasolják a mai nemzetközi ajánlások azokat a klinikai és patológiai kritériumokat (bélperforáció és bélelzáródás, perineurális terjedés és nyirokérbetörés stb.), amelyek teljesülése rosszabb prognózist jelent.

A jelenlegi ajánlások alapján nyirokcsomó áttét esetén (III. stádium) a szisztémás adjuváns kezelés javítja a túlélést és csökkenti a recidíva és az áttétképződés arányát. Azonban a standard kezelésnek számító oxiplatin-alapú kemoterápia fluoropirimidinnel kombinálva a III. stádiumú betegek csupán 20%-ánál befolyásolja ténylegesen a túlélést (60). Ezen betegek 50%-ánál a sebészi kezelés önmagában is elegendő, míg 30%-uknál a kemoterápiás kezelés ellenére is rekurál a betegség 2-3 éven belül. Ez alapján a betegek 80%-át felesleges toxicitásnak tesszük ki a kemoterápiával. Amennyiben rendelkezésre állna megfelelő marker, amellyel a fokozott kockázatú betegek kiszűrhetőek ezekben a betegcsoportokban, akkor a betegek egy jelentős részét megkímélnénk a kezelés okozta toxicitástól. Másrészt a megfelelő betegcsoport intenzívebb kezelést kaphatna, amellyel a túlélés javítható lenne.

Az elmúlt években egyre nagyobb jelentőségre tettek szert a daganatos szövetminták DNS vizsgálata, mely során meghatározott, a CRC karcinogenezisében fontos gének mutációját és az MSI státuszt vizsgálják.

MSI státusz

Az MSI státuszt kezdetben a Lynch-szindróma szűrésére használták. Azonban ezen betegek az MSI pozitív tumorok csupán 20%-át teszik ki. A többi MSI daganat sporadikusan alakul ki, és a hMLH1 gén promoterének hipermetilációja figyelhető meg.

A II/III. stádiumú daganatok 15%-ánál, míg a IV. stádiumú daganatok csupán 4-5%-nál mutatható ki, tehát az MSI prevalenciája bizonyos mértékben függ a stádiumtól. Bár fiatalabb életkorban megjelenő rosszul differenciált daganatok jellemzik, prognózisuk mégis jobb az MSS betegekhez képest. Ugyan prediktív markerként még nem egyértelmű a MSI szerepe, a nemzetközi irányelvek (ESMO, NCCN) javasolják meghatározását a magas kockázatú II. stádiumú betegeknél, mivel ezen betegek prognózisa jobb, és az 5-FU alapú kezelés nem jelent terápiás előnyt (61). Egyre több vizsgálat veti fel, hogy az MSI pozitív CRC-k jobban reagálnak az immunellenőrzőpont-gátló gyógyszerekre (62). Ez alapján az Amerikai Egyesült Államokban engedélyeztek egy monoklonális PD1-antitestet (pembrolizumab) MSI pozitív daganatokban, függetlenül a daganat típusától (63).

Ras mutációs státusz

Míg a korai stádiumú vastag-és végbéldaganatok 15%-ában, addig a metasztatizáló daganatok 45%-ában mutathatók ki a K-ras mutációi (64). Az MSS daganatokban gyakoribb az előfordulásuk. A K-ras 12 és 13 kodon mutációi rosszabb prognózist jelentenek: 1,5-szer nagyobb a recidíva és a mortalitás aránya mutáció esetén, mint a vad típusnál. A K-ras az EGFR downstream effektora. Ezért a K-ras mutációs státusz meghatározása segít megjósolni az anti-EGFR kezelés hatástalanságát mind a nem-metasztatizáló, korai stádiumú, mind a metasztatizáló, késői stádiumú CRC-ben (65). Fontos, hogy maga az anti-EGFR kezelés is a K-ras és a BRAF ektodomének mutációjához vezethet, ami a MAP kináz útvonal aktivációját eredményezi az EGFR gátlás ellenére, és így a daganat a kezeléssel szemben rezisztenssé válik (66).

BRAF mutációs státusz

A BRAF gén mutációja a CRC-k 10%-ában mutatható ki, 90%-ban a kodon 600-nak (p.V600) megfelelően. Ezeknél a betegeknél III. és IV. stádiumú tumorok esetén szignifikánsan rosszabb a recidíva-mentes (4,1 vs. 11,6 hónap) és a teljes túlélés (14 vs. 34,6 hónap), mint a vad típus esetén (67). Korai stádiumú daganatoknál azonban nem figyelhető meg ez az eltérés. Nagyobb arányban igazolódott a gén mutációja rosszabb performance státuszú betegeknél (ECOG), idősebb életkorban, rosszul differenciált és több szervbe távoli áttétet adó tumorokban (68). Számos vizsgálat azt igazolta, hogy BRAF mutáció esetén (ami egyben K-ras vad típust is jelent, és az anti-EGFR kezelés

hatásosságát vetítené előre) az anti-EGFR kezelés nem jelentett terápiás előnyt a standard kezeléshez képest (69, 70).

2.1.2.3. Potenciális markerek

Számos olyan biomarkert sikerült azonosítani az elmúlt években, amelyekkel az eredmények biztatóak, és klinikai alkalmazásuk a közeljövőben nagy valószínűséggel megkezdődik.

Folyékony biopszia (ctDNA, liquid biopszia)

Ezzel a vizsgálati módszerrel a vérben keringő vagy egyéb testnedvben megtalálható daganatsejteket, sejttől független DNS-t vagy daganatos eredetű exoszomális vezikulumokat gyűjtnek és elemezik, amelyek a primer daganatból vagy az áttétből jutnak a keringésbe. Míg korai stádiumban a ctDNA-k koncentrációja a teljes sejttől független DNS-ek 1%-át sem éri el, addig késői stádiumban ez akár 50% is lehet. Ez alapján érthető, hogy a diagnosztikában nem hozott áttörést, azonban a vizsgálatok alapján hasznosnak bizonyult a daganat eltávolításának megítélésben, a legmegfelelőbb célzott terápia kiválasztásában és a szisztémás kezelésekre adott válasz felmérésében (71).

Jobb és bal kolonfél

A daganat lokalizációjának a szerepe az egyik legmegosztóbb kérdés jelenleg. Régóta ismert, hogy a vastagbél két különböző embriológiai fejlődési úton alakul ki. A jobb kolonfélnak is nevezett proximális szakasz a középbélből alakul ki, míg a bal kolonfél, azaz a disztális bélszakasz endodermális eredetű. A különböző fejlődési eredettel összefügg, hogy a vérellátásuk különbözik, a bennük található mikrobiom populációk eltérőek. Az adjuváns kezelésekre adott válaszuk is különbözik: a CRYSTAL és FIRE-3 vizsgálatok alapján a jobb oldali K-ras vad-típus pozitív CRC-ben szenvedő betegeknél nincs terápiás előnye az anti-EGFR (cetuximab) terápiának (72). A bal kolonfél tumorai jobban reagálnak az egyéb kemoterápiás, így az 5-FU alapú kezelésekre, míg a jobb kolonfél tumoroknál főleg metasztázisok esetén van létjogosultsága az intenzív kemoterápiának. Ezzel szemben viszont az immuterpia inkább a jobb kolonfél

tumoraiban mutat biztató eredményeket, mivel ezeknek a daganatoknak magas az antigenitásuk (73).

Tumor mikrokoznyezetének (56) markerei

1. immunsejtes infiltráció

Az elmúlt években egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a daganat mikrokoznyezetének is szerepe van a betegség lefolyásában és az egyes rezisztenciák kialakulásában. Az alapján, hogy a daganatban megtalálhatóak-e CD3+ és CD8+ limfociták, „forró” vagy „hideg” tumorokra lehet felosztani az elváltozásokat (74). A „forró” daganatok esetén a recidíva-mentes túlélés jobbnak bizonyult. Érdekes módon az MSI tumorok többsége szintén „forró” daganat. A „hideg” tumorokat tovább csoportosítják az alapján, hogy a limfociták kimutathatóak-e a daganat invazív környezetében. Ez alapján határozzák meg a közepes rizikójú csoportot.

2. strómadenzítás

A daganatos stróma mennyisége prognosztikai jelentőségűnek bizonyult II. és III. stádiumú CRC-ben: magas százalékos arány esetén mind a teljes, mind a betegségmentes túlélés szignifikánsan alacsonyabb volt (75). Ezenkívül a strómát alkotó sejtek típusa is fontos lehet: a daganat-asszociált fibroblasztok jelenléte esetén nagyobb eséllyel alakul ki recidíva (76).

Összefoglalva, a CRC alapvetően egy heterogén betegség. A jövő valószínűleg a biomarkerek egy olyan kombinációja, amely segíti a daganat mutációs térképének, a daganat mikrokoznyezetének és a klinikopatológiai jellemzőknek a meghatározását, és ezáltal lehetővé teszi a korai stádiumú, mégis magas rizikójú betegek kiszűrését, akiknél személyre szabott és ezzel hatásosabb adjuváns kezelés válik lehetővé.

2.2. Vérlemezkék

2.2.1. A trombociták morfológiája és képződése

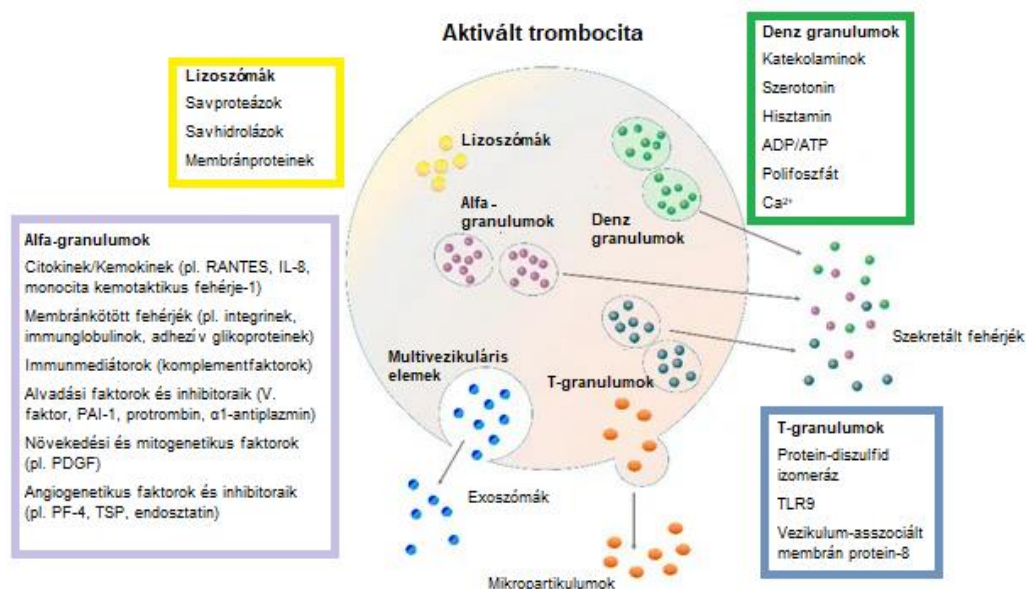
A vérlemezkék sejtmag nélküli szubcelluláris részecskék, melyek apró korongokként jutnak a keringésbe. Csak mitokondriális DNS-ük van, emellett tartalmaznak megakariocita eredetű mRNS-t is. A keringésbe jutott trombociták a sértetlen érpályát nem hagyják el. Fiziológias körülmények között azonban csak a vérlemezkék mintegy kétharmada van ténylegesen a keringésben, egyharmaduk a lép vörös pulpájában helyezkedik el. A lép kóros megnagyobbodása esetén ez a nem keringő hányad lényegesen nagyobb lehet, és a trombociták száma a vérben alacsonyabb a normálértéknél.

A vérlemezkék térfogata $7\pm 4,8$ fl (77). Jellegzetes diszkoid formájuk a plazmamembrán alatt található mikrotubulusokból álló orsónak köszönhető. Egészséges felnőtt ember vérének 1 μ l-ében 150-300.000 trombocita található. Állandó mennyiségük szigorú kontroll alatt áll. A képződés fő szabályozója elsősorban a májban, illetve kisebb mennyiségben a vesében és a csontvelő strómasejtjeiben keletkező trombopoetin (TPO). A keringő TPO mennyisége nő, ha a trombocitaszám csökken. A TPO a hatását a trombopoetin receptoron (c-Mpl) keresztül fejt ki: a csontvelői megakariociták száma, ploiditása, térfogata megnő, érésük és a trombocitalefűződés felgyorsul, az apoptóziskészségük pedig lecsökken (78). A megakariociták mellett a vérlemezkék is kifejeznek c-Mpl receptort, így meg tudják kötni a keringésben lévő TPO-t, csökkentik a szintjét, és ezáltal pedig negatív irányba befolyásolják saját képződésüket. Számos citokinnek és különböző interleukinnak is szerepe van a megakariocitopoézisben és a trombocita szintézisben. A citokinek inkább a folyamatok stimulálásáért felelősek, mint pl. az IL-1, az IL-3, az IL-6, az IL-11, a leukémia gátló faktor (LIF) és a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF). A TPO expresszió gátlásával ugyanakkor a THBS-1, a TGF- β 1 és a trombocita faktor 4 (PF4) a vérlemezkeképződést negatívan befolyásolják (79).

Ahhoz, hogy a képzés és a pusztulás egyensúlyban legyen, naponta kb. 15-45 G/l trombocitának kell termelődnie. A megakariocita-trombocita képzés az eritroid/megakariocita bipotenciális progenitor sejtől indul ki. A megakariocitaképzés

korai elkötelezett progenitor sejtje (MkP) már rendelkezik c-Mpl-lel. A MkP-ből keletkező promegakarioblast további sorsa egészen egyedi: már nem oszlik, hanem sorozatos endoreduplikáción megy keresztül. Ezek mindegyikében a maganyag megkétszereződik, a sejt azonban nem válik szét. Ezáltal a normálisan $2n$ kromoszómaállományú diploid sejtből $4n$, $8n$, $16n$ és $32n$ poliploid sejtek keletkeznek ennek megfelelő, egyre nagyobb DNS-tartalommal. A megakariocitaképzés első felismerhető sejtjében, a megakarioblastban még folyik az endoreduplikáció, de a sejt plazma érésének nincs jele. A megakariocitává érést a mag lebonyozottá válása és a sejt plazmaállomány jelentős növekedése jellemzi. A teljesen érett megakariocita átmérője a $60\ \mu\text{m}$ -t is elérheti, a csontvelő legjellegzetesebb, legkönnyebben felismerhető sejtje. A kromoszómagarnitúrák száma megszabja mind a mag lebonyozottak számát, mind pedig a citoplazma mennyiségét, így végső soron az egy megakariocitából lefűződő trombociták száma is a kromoszómagarnitúrák számának függvénye. A csontvelőben az érett megakariociták a szinuszoidokat bélelő endotelsejtek közötti hézagokon keresztül plazmamembránból és sejt plazmából álló nyúlványokat (állábakat, pszeudopodiumokat) bocsátanak a szinuszoidok lumenébe. Ezek a nyúlványok lefűződnek, és az önálló (mag nélküli) vérlemezkéket alkotják (80). Egy érett megakariocitából 2000-4000 trombocita képződhet. A folyamat végén a megakariociták programozott sejthalála következik be: a sejt plazma szétesik és a sejt magból egy izolált apoptotikus mag keletkezik. A promegakarioblast megjelenésétől a trombocita lefűződéséig eltelt tranzitidó mintegy 5 nap. Magában a csontvelőben a vérlemezkék nem raktározódnak, a vérben lévő számuk a folyamatos csontvelői utánpótláshoz van kötve (81). 7-10 napig életképesek, majd a máj Kupffer sejtjeiben és a lépben bomlanak.

A trombociták egymással és más sejtekkel számos bioaktív anyag szekréciója révén kommunikálnak, amely anyagok a vérlemezkék intracelluláris granulumaiból származnak. A főbb tároló granulumaik a denz és az alfa-granulumok, a lizoszómák és a peroxiszómák. A granulumokból több, mint 300 aktív anyagot képesek kibocsátani (5. ábra).



5. ábra: Aktivált vérlemezkéből felszabaduló különböző anyagok sematikus ábrája (82) A vérlemezkék aktiválódása során fontos fehérjék és faktorok, mint pl. adhéziós molekulák, citokinek, kemokinek, alvadási és angiogenetikus faktorok, lizoszomális enzimek szabadulnak fel, melyeket meghatározott granulomok tárolnak.

A **denz granulomok** számos hemosztatikusan aktív, nem fehérje jellegű anyagot tartalmaznak (83). Ezek közül a legfontosabbak az adenzin-difoszfát (ADP), adenzin-trifoszfát (ATP), guanozin-difoszfát (GDP), szerotonin (5-HT), pirofoszfát, magnézium és kalcium. Ezek az anyagok nemcsak a véralvadásban, illetve a stabil koagulátum kialakulásában vesznek részt (vazokonstriktió, aggregáció, vérlemezke aktivációja), de szerepet játszanak az áttétképzésben is.

Az **alfa-granulomok** száma kb. 10-szer nagyobb, mint a denz granulomoké, átlagosan 50-80 található egy vérlemezkében (84). Ezek fibrinogént, von Willebrand-faktort (VWF), vérlemezke faktor 4-t (PF-4), vérlemezke eredetű növekedési faktort (PDGF), β -tromboglobulint, THBS-1-et raktároznak. Ezen kívül számos adhézió receptor található bennük: a fibrinogén fő receptora, vagyis az $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (más néven glikoprotein IIB/IIA (GPIIB-IIIa)), a von Willebrand-faktor receptor (GP-Ib-IX-V), és a GPVI kollagén receptor is (84). Ezek a receptorok konstitutívan expresszálódnak a sejtmembránban. A GPIIB-IIIa és a GPVI egy része a vérlemezkék aktivációjakor helyeződik ki a sejtfelületre, és indul meg az expressziójuk (85). Az alvadási faktorok is

az alfa-granulumokban raktározódnak. Az V-ös faktor endocitózis révén kerül a plazmából az alfa-granulumokba, ott pedig komplexek formájában raktározódik, míg a XI-es és XIII-as faktorok endogén úton képződnek a megakariocitákban (86, 87). Az alfa-granulumok antikoaguláns anyagokat is tartalmaznak, mint pl. antitrombint, C1-inhibítort, plazminogént, plazmint, szöveti faktor útvonal gátlót, protein S-t, proteáz-nexin-2-t (84). Az innen felszabaduló anyagok nemcsak a véralvadásban, hanem számos egyéb folyamatban is részt vesznek: kemotaxisban, adhézióban, aggregációban, koagulációban, gyulladásban és sejtproliferációban.

A **lizoszómák** és **peroxiszómák** degradációs enzimeik révén a környezeti struktúrák bontásához és átépítéséhez járulnak hozzá. A lizoszómákban katepszinek, elasztáz és kollagenáz, a peroxiszómákban pedig kataláz található (88).

2.2.2. A vérlemezkék szerepe

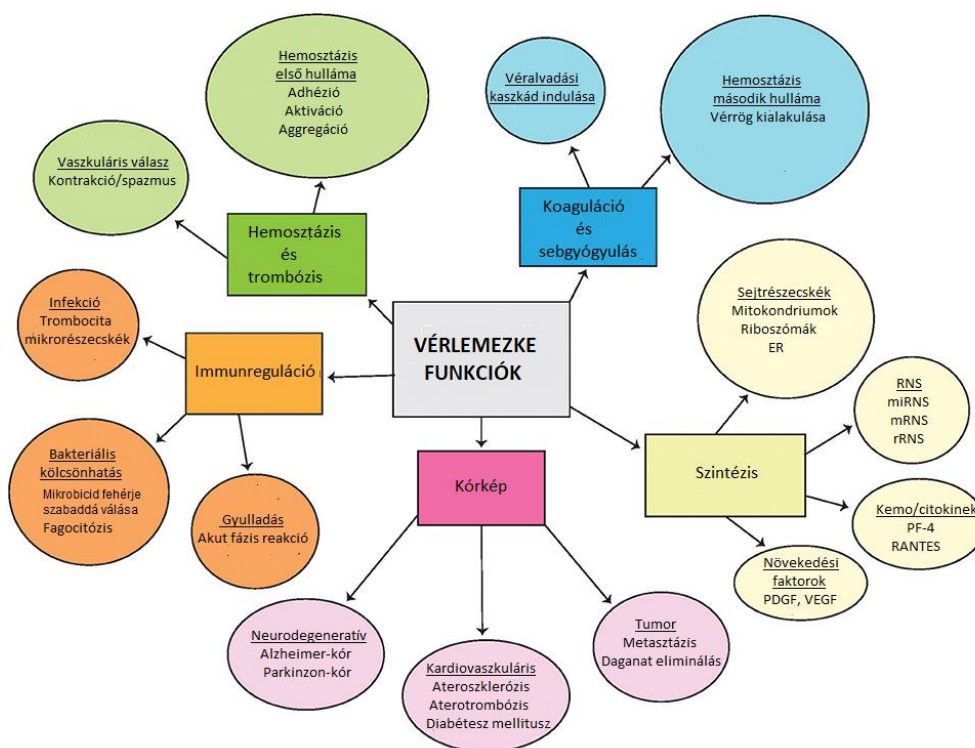
2.2.2.1. Véralvadás

A vérlemezkék a fiziológiás hemosztázis egyik kulcsszereplői. A vérzéscsillapítás során a szervezet arra törekszik, hogy az érfal sérülése esetén rögtön zárja a folytonossághiányt, a vért „folyékony” állapotban tartsa, és eltávolítsa a képződött véralvadékat, miután a vaszkuláris integritás helyreállt. A vérlemezkék fiziológiás körülmények között inaktív állapotban keringenek az érpályában. Amennyiben az érfal sérül, szinte azonnal két dolog történik: az endotélium sérülése miatt felszínre kerülő kollagén hatására a vérlemezkék kitapadnak a sérült felszínre, majd a belőlük felszabaduló vazoaktív anyagok (tromboxán-A₂, 5-HT) hatására vazokonstrikció lép fel, mely a sérült terület véráramlását csökkenti (89). A szabaddá vált szubendotéliumhoz a vérlemezkék egy sejtrétegben kitapadnak, majd aktiválódnak. Granulumaik tartalmának felszabadításával a környező trombocitákat is aktiválják, megindul az aggregáció, azaz a trombociták egymáshoz csapzódása, valamint ezzel párhuzamosan a koagulációs kaszkád is működésbe lép (77). Az aktivált trombociták számos koagulációs reakcióhoz biztosítják azt a katalitikus felszínt, mely a koagulációs folyamat kulcsát jelentő trombin keletkezéséhez szükséges, mely később a szolubilis fibrinogént fibrinné alakítja. Az érfal sérülése két nagy rendszer működését indítja el szinte egy időben: a trombociták

aggregációját, valamint a véralvadási kaszkádot, melyek végül közösen hozzák létre az alvadékot, ami fiziológias körülmények között csökkenti, illetve megszünteti a vérzést.

2.2.2.2. Immunfunkció

Az elmúlt években nyilvánvalóvá vált, hogy a vérlemezkéknek nemcsak a véralvadásban, hanem az immunválaszban is fontos szerepük van (6. ábra). Alig 20 évvel ezelőtt azonosították a CD44L-t, amelyet a T-sejtek használnak fel a B-limfociták aktivációja során. Ezt követte számos további molekula, receptor és ligand azonosítása a vérlemezkék felszínén és granulumaiban, amelyek különböző immunfolyamatokban vesznek részt: MMP-1, -2, -9, CXCL-7 derivátumok (PBP, TAP-III, béta-tromboglobulin, trombocidin-1, -2), humán P-szelektin, C3 és C4 prekursorok, C1 inhibitor, TIMP-1, -4, toll-like receptorok, scavenger receptorok, siglecs, komplement receptorok, Fc- ϵ a-RI és az Fc-gamma-RIII (90).



6. ábra: A vérlemezkék sokrétű funkciói (91).

A vérlemezkék felszínén található adhéziós molekulák és receptorok elősegítik az interakciójukat más sejtekkel: a P-szelektin a leukocitákon elhelyezkedő PSGL-1-gyel (CD162) képes ezen adhéziós interakció kialakítására, ezáltal elősegíti a fehérvérsejt kitapadását és az érfalon keresztüli migrációját (92). A differenciációs klaszter ligand 40 (CD40L) – amely nem csak helper T-sejteken, hanem az aktivált trombociták felszínén is fellelhető fehérje – a differenciációs klaszter 40-nel (CD40) egy hálózatot alkot a dendritikus sejteken, így fokozva érésüket. Ugyanezen hálózat a B-limfocitáknál affinitásérést és immunglobulin izotípusváltást idéz elő - IgM helyett IgG lesz az antitest izotípus. A PF-4 elősegíti a monociták differenciációját, aktivációját és endotéliumhoz történő adhézióját, illetve a neutrofilek adhézióját.

A trombociták direkt módon is képesek részt venni az immunitásban úgy, hogy elpusztítják a target molekulájukat. Mediátorok széles repertoárját képesek szekretálni, melyek egy része letális a patogénekre: ilyen antimikrobiális faktorok például a PF4, a CCL5, proteázok és elasztázok (93).

A vérlemezkéknek számos, diverz funkciója van az immunrendszer működésében:

- a mieloid sejtek és a trombociták kapcsolódása a fehérvérsejtek proinflammatorikus aktivációját eredményezi,
- ko-stimuláns szignálokat szállítanak a dendritikus sejtekhez,
- akut és krónikus gyulladásos betegségekben neutrofil-trombocita komplexek jöhetnek létre. Amennyiben a komplex kialakulását antitesttel gátolják, az akut gyulladás súlyossága csökken.
- krónikus gyulladás talaján a trombocita-monocita interakció révén szerepük van az ateroszklerotikus plakk kialakulásában.
- szepszisben az endotoxinok által aktivált vérlemezkék a neutrofilekhez kapcsolódva részt vesznek az ún. „neutrofil extracelluláris csapdák” kialakításában, és hálót alkotva intravazálisan segítik elő a baktériumok eliminációját.

2.2.2.3. Vérlemezkék és a daganat kapcsolata

Először 1964-ben írták le, hogy valamilyen kapcsolat lehet a magasabb trombocitaszám és a daganatos betegségek között: trombocitózisos betegek több, mint harmadánál valamilyen daganatos megbetegedést igazoltak (94). Klinikailag az emelkedett vérlemezkeshám hónapokkal vagy akár évekkel megelőzheti a daganatos betegség diagnózisát. Emellett a diagnózis idején észlelt trombocitózis rövidebb túléléssel és/vagy a kezelésre, kemoterápiára adott rosszabb válasszal is jár (95).

Egyre több adat támasztja alá, hogy a daganat növekedését és metasztatizálását a vérlemezkék pozitívan befolyásolják (96-99). Ugyanakkor a növekvő tumor fokozhatja a vérlemezkék képződését és aktiválását, és ezáltal egy pozitív visszacsatolás alakul ki. Döntő momentumnak tűnik, hogy a daganatsejtek aktiválni tudják a vérlemezkéket, amelyekből számos, a granulumban raktározott mediátor felszabadul. Ezek hatására gyulladásszerű, proliferatív és a proangiogenetikus folyamatok aktiválódnak, amelyek a tumor növekedését, a szöveti inváziót és az áttétképződést segítik. Az áttétképződés folyamán az invazív daganatsejteknek a keringésbe kell jutniuk, a vérben a nyírőerőket, egyéb mechanikai behatásokat és az immunrendszer védekező mechanizmusait túl kell élniük, majd az érpálya elhagyása után egy távoli helyen meg kell tapadniuk és növekedésnek kell indulniuk. Az áttétképződés nem egy hatékony folyamat: a primer tumor által a keringésbe bocsátott sejteknek csak 0,01%-a alakít ki valamilyen távoli metasztatikus gócot (100).

Több hipotézis is ismert, hogy a vérlemezkék milyen módon segítik a daganat progresszióját. A daganatsejtek a trombinon keresztül aktiválják a vérlemezkéket: ez történhet a tumorsejtek által termelt trombin révén, amelyet a vérlemezkével történt direkt kapcsolat során kezdenek termelni, vagy indirekt módon a szöveti faktor által mediált útvonalon aktiválva a véralvadási rendszert, amely a TME-ben a trombin képződését eredményezi (101). In vitro vizsgálatokkal petefészekrákban a daganatsejtek által termelt ADP (102), vastagbél daganatos sejtvonalakban ADP és mátrix-metalloproteáz-2 (MMP-2) aktiválja a vérlemezkéket (103).

A keringésbe jutó daganatsejtek körül az aktivált vérlemezkék mintegy védőburkot képeznek, és ezáltal nemcsak mechanikai védelmet jelentenek, hanem megvédik az immunrendszer válaszáétól, mivel a természetes ölősejtek (NK-sejtek) nem

ismerik fel a daganatsejteket. A folyamatot segíti a PDGF és a TGF- β (104, 105). Az ún. „vérelemzke-mimikri” révén a hematogén disszemináció szintén fokozódhat: ilyenkor a daganatsejtek fenotípusa a trombocitákéhoz válik hasonlóvá, a sejtfelszínükön γ Ib/ β 3-t, proteáz-aktivált receptorokat és trombocita-endotél sejtadhéziós molekula-1-t expresszálnak (106).

In vitro és in vivo vizsgálatok alapján a PDGF fokozza a daganatsejtek proliferációját (97), a vérelemzkekben termelődő TGF- β pedig elősegíti a daganatsejtek hám-mezenhima-szerű átalakulását, és ezáltal az extravazációjukat (96). Közvetlenül a P- és L-szelektinek révén nemcsak a vérelemzkek, hanem a fehérvérsejtek és az endotél sejtek is megkönnyítik a daganatsejtek számára az érpálya elhagyását (107). Emellett a vérelemzkek denz granulumjaiból felszabaduló adenin nukleotidok az endotél sejtek adenosin trifoszfát receptor P2Y₂-jének aktiválásával szintén a daganatsejtek extravazációját segítik (108).

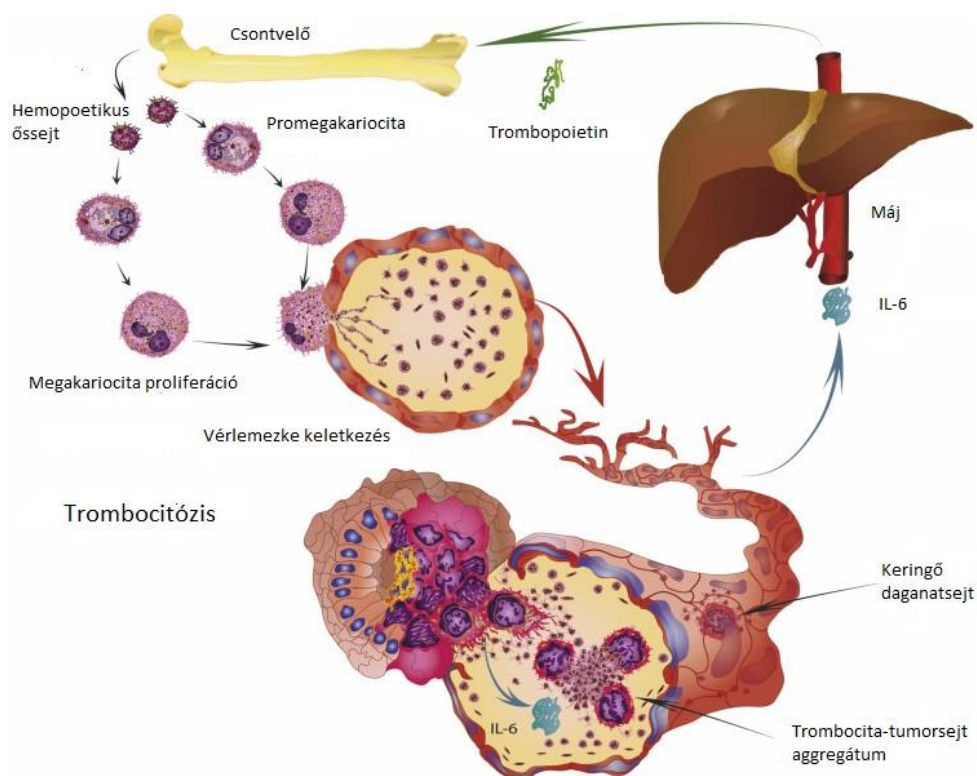
Amennyiben a daganat mérete meghaladja a 2 mm-t, saját vérellátás kialakítása is szükségessé válik. Ehhez nagyban hozzájárulnak az aktivált trombociták α -granulumjaiból felszabaduló proangiogenetikus anyagok, elsősorban a VEGF (109), a fibroblaszt növekedési faktorok, a PDGF és az endotélsejt eredetű növekedési faktor (110). Az angiogenezist többek között a THBS-1, a PF-4 és az angiosztatin gátolja (111).

A fiziológiás hemopoézis során a vérelemzkek képződése számos ponton stimulálható, leginkább azonban a TPO-n és a receptorán keresztül történik. Jól ismert, hogy krónikus gyulladás vagy akut fertőzés esetén a TPO szintje megemelkedik, és ez másodlagos trombocitózishoz vezet. A szolid daganatok esetében a TPO szint nem magas, ezzel szemben számos citokin, így az IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, LIF, a KitL és az onkosztatin M (112) nagy valószínűséggel szerepet játszanak abban, hogy a vérelemzkek száma megemelkedik. Ezek közül egyre nagyobb figyelem irányul az IL-6-ra, melynek szintje összefüggést mutat a trombocitaszámmal. Mérföldkőnek számít Stone és mtsai kutatása, mely során 619 epiteliális petefészekrákban szenvedő beteg adatait vizsgálták: szignifikánsan nagyobb arányban szenvedtek előrehaladott stádiumú betegségben, és szignifikánsan rövidebb volt a betegségmentes és a teljes túlélésük azon betegeknek, akiknél trombocitózis volt kimutatható a diagnózis idején (113). Ezeknél a betegeknél a

szérum TPO, a plazma és tumorszövetben mérhető IL-6 is szignifikánsan magasabb volt, mint azoknál a betegeknél, akiknek a vérlemezkeszáma normál tartományban volt.

Számos daganattípusban igazolták, hogy előrehaladott stádiumokban az IL-6 termelése fokozott, így pl. vesesejtes rákban (114), gasztrointesztinális tumorokban, hasnyálmirigyrákban, epitheliális petefészek daganatban, prosztatacarcinómában és tüdőrákban (115). A magasabb IL-6 szint pedig pozitívan befolyásolja a vérlemezkek termelődését, és ezáltal a számukat. Állatkísérletben azokban az egerekben, amelyeknek nem volt működőképes IL-6 receptoruk a májban, 33%-kal alacsonyabb volt a plazma TPO szint, és nem alakult ki trombocitózis (113). Emellett anti-IL-6 antitest kezeléssel (sziltuximab) kombinálva az epitheliális petefészekrákban használat kemoterápiás készítményt (paklitaxel), a daganat növekedése 90%-kal csökkent.

Mindezek alapján egy pozitív visszacsatolós mechanizmus alakulhat ki: a daganatban termelődő IL-6 fokozza a májban a TPO termelést, amely pozitívan befolyásolja a csontvelőben a trombopoézist. Ennek eredményeképpen megemelkedik a vérlemezkeszám: a keringésben lévő vérlemezkek aktiválódnak vagy a daganatsejttel való direkt kontaktus vagy a TME-ben termelődő trombin révén. Ennek következményeképpen egyrészt a daganatsejteket köpenyszerűen védik mind a mechanikai behatásoktól, mind az immunválasztól, másrészt elősegítik a daganatsejtek extravazációját. Emellett a granulumból felszabaduló mediátorok egy része proangiogenetikus hatású, és ez pozitív irányban befolyásolja a tumor angiogenezisét és növekedését. A részben a vérlemezkek számos hatása következtében növekvő tumortömeg nagyobb mennyiségű citokint termel, amely a vérlemezke termelést tovább fokozza, és ezzel a kör bezárul (7. ábra).



7. ábra: A tumor-asszociált tromboticózis feltételezett patomechanizmusa (116). A daganatsejtek által termelt IL-6 a májban TPO termelést indukál, amely a csontvelőben fokozott megakariocitopoézist eredményez. A keringésbe jutó, egyre nagyobb számú vérlemezkek aktiválódnak, a daganatsejteket köpenyszerűen beburkolják, elősegítik az extravazációjukat, és citokintermelésükkel elősegítik az angiogenezisüket. Az egyre nagyobb tumortömeg által termelt IL-6 a májban további TPO termelést okoz.

2.3. Interleukin-6

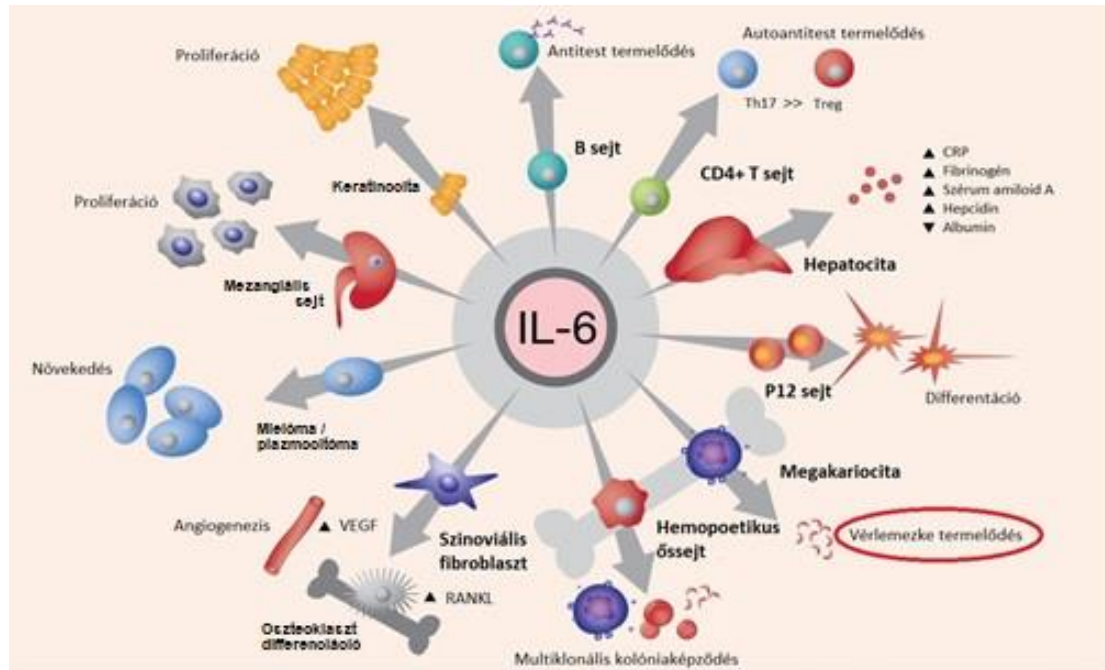
Az immunrendszer fejlődése, aktiválódása és működése során szolubilis anyagok, citokinek termelődnek. Ezek fehérjék vagy glikoproteinek, amelyeket nemcsak leukociták, hanem más sejtek is termelnek. Elsődleges feladatuk a sejtek közötti kommunikáció biztosítása. A legtöbb citokin szecernált molekula, de néhány citokin sejtek felszínén található, mások az extracelluláris mátrixban raktározódnak.

A citokinek specifikus receptorokhoz kapcsolódnak, a kötődés nyomán intracelluláris jelek, második „messengerek” jönnek létre. A legtöbb citokin hemopoetikus vagy egyéb sejtek növekedési és/vagy differenciálódási faktora. Részt vesznek az immunválasz és a gyulladás legtöbb folyamatának szabályozásában. A gyakran multifunkcionális citokinek autokrin, parakrin, illetve bizonyos esetekben endokrin úton hatnak. A citokinek a sejtek kommunikációját szabályozó tulajdonságaikon kívül egymás termelődését, receptorait és hatékonyságát is befolyásolják.

A citokinek csoportosítása nagyon nehéz feladat, az elnevezések nem fedik a funkciót. Az interleukin (IL) sorozat egyszerűen a felfedezés időbeli sorrendjét, semmint bármilyen tartalmi összetartozást fejez ki.

2.3.1. Az IL-6 általános jellemzői

Az IL-6 egy helikális szerkezetű glikoprotein, molekulásúlya 20-30 kDa attól függően, hogy melyik sejtípus termeli. A poszttranszlációs módosítások eredményezik ezt a különözöséget, amely azonban nem befolyásolja a citokin biológiai aktivitását. Nagyon sokféle sejtípus termeli, mint pl. monociták/makrofágok, endotélsejtek, fibroblasztok, keratinociták, aktivált T- és B-limfociták, mezangiális sejtek, gliasejtek, kondrociták, oszteoblasztok, zsírsejtek, simaizom sejtek, granulociták, hízósejtek és számos tumorsejt (117). Jól jellemzi az IL-6 sokrétű hatását, hogy 1986-ban történt klónozásáig több, különböző néven is leírták ezt a molekulát attól függően, milyen biológiai hatást igazoltak. Ennek megfelelően ismert volt, mint B-sejt stimuláló faktor 2 (118), melynek hatására az aktivált B-limfocita immunglobulint termelő sejté alakult, β_2 -interferon az antivirális hatása miatt, hepatocita stimuláló faktor, amely a májban akut fázis fehérjék termelését indukálta, hibridóma/plasmocitóma növekedési faktor, amely a plazmasejtek és a mielóma sejtek közötti fúziós sejtek növekedését fokozta. Később számos egyéb hatására is fény derült, a célsejt típusától függően lehet sejtosztódást serkentő vagy gátló, illetve differenciálódást és sejtaktivitást elősegítő hatása is (8. ábra).



8. ábra: Az *IL-6* pleiotrop hatásai (119)

A keringésben extrém alacsony koncentrációban mutatható ki (1-5 pg/ml), a féléletideje pedig az emberi szervezetben zajló fiziológias és patológias folyamatoktól függ, így 10 perctől 2-10 óráig terjedhet. Magasabb *IL-6* szint mérhető valamilyen stresszre, gyulladásra, fertőzésre, szöveti traumára adott válaszként, reaktív oxigéngyökök, UV- és ionizáló sugárzás hatására. Szerepet játszik az akut fázis válasz, a hematopoezis és az immunválasz stimulációjában a szervezet védekezése során. Mozgás során az összehúzódó izmokból is felszabadul *IL-6*, ami aktiválja az adozin-monofoszfát-aktivált kinázt, növeli a glükóz felvételt, a metabolizmust és a zsírsav oxidációt (120). Érdekes módon izomdisztrófia, denervált izmok esetén is megemelkedik a szérum *IL-6* szint. Normális menstruációs ciklus, terhesség során is megemelkedhet a szintje (121, 122), akárcsak akut hiperglikémia során (123).

Az *IL-6* az *IL-6* citokincsaládba tartozik, amelybe az interleukin-11-t, Kaposi szarkóma- asszociált humán herpesz vírus-8 interleukin-6-t, az interleukin-27-t, a LIF-t, az OSM-t, a ciliáris neurotróf faktort, a kardiotrofin-1-t és a kardiotrofinszerű új neurotrofin-1-t is sorolják (124). Közös jellemzőjük, hogy egy olyan sejtfelszíni receptor komplexhez kapcsolódnak, amelynek az α -receptora köti magát a ligandot, és egy közös β -receptor felelős a jelátvitelért. Az utóbbi egy 130 kDa méretű, 1-es típusú

transzmembrán glikoprotein, melyet glikoprotein 130-nak (gp130) hívnak. A gp130 szinte minden szervben expresszálódik, úgymint a tüdő, vese, agy, szív, lép, méhlepény, emellett kritikus szerepet játszik a fejlődésükben, növekedésükben, túlélésükben, homeosztázisukban. További bizonyíték a gp130 nélkülözhetetlenségére, hogy a gp130 knock-out egerek embrionális korukban elpusztulnak (125).

2.3.2. Az IL-6 jelátvitel

Az IL-6 az IL-6 receptorhoz (IL-6R) kötődik, amely egy 80 kDa méretű, 1-es típusú transzmembrán glikoprotein. A receptornak létezik egy szolubilis változata is (sIL-6R), melynek hiányzik a citoplazmatikus és a transzmembrán szakasza az IL-6R-hoz képest (126). A keringésben 25-35 ng/ml koncentrációban mutatható ki. Az IL-6 hasonló affinitással kötődik mind a szolubilis, mind a transzmembrán receptorához.

A sIL-6R 10%-ban alternatív splicing, 90%-ban ektodomén hasítás révén képződik. Az alternatív splicing során képződött sIL-6R mRNS-en a leolvasási keret eltolódik, és ezáltal egy új C-terminális fehérjeszekvencia képződik. Ez a változás nem befolyásolja a receptor ligandkötő tulajdonságait. A sIL-6R szintje cirkadián módon változik, illetve számos gyulladásozó állapotban is mérsékelten emelkedett (127, 128).

A másik keletkezési út során az ADAM (egy dezintegrin és metalloproteáz) géncsalád enzime átvágják az IL-6R-t a transzmembrán régió közelében, így az IL-6R ektodomén része az extracelluláris térbe kerül, míg egy rövid C-terminális szakasz a plazmamembránban marad (129). Az ADAM-10 a folyamatos, az ADAM-17 a stimulált proteolízisért felelős, ezért a patológiás folyamatok során megemelkedő szolubilis IL-6R szintért és fokozottabb transz típusú jelátvitelért nagyobb mértékben az ADAM-17 felelős.

Az IL-6R mindkét formája (transzmembrán és szolubilis) az IL-6 megkötése után két gp130 molekulához kötődik. A szabad IL-6 önmagában nem tud kötődni a gp130-hoz, először mindenképpen kapcsolódnia kell a receptorához. Az IL-6R csak meghatározott sejteken expresszálódik: monocitákon, makrofágokon, neutrofileken, B-sejteken, bizonyos T-sejteken és májsejteken.

Miután az IL-6/IL-6R komplex a gp130-hoz kötődik, két gp130 homodimerizálódik, és a Janus kinázok (130) aktiválódnak. Ezek aktiválhatják az src homológia régió-2 domént tartalmazó foszfatáz-2 mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat, vagy az esetek nagyobb hányadában foszforilálják a szignál transzducer és transzkripciós aktivátor 3-t (STAT3) (131). A STAT3 dimerizálódik, a sejtmagba transzlokálódik és számos gén promoter régiójához kötődve azok expresszióját szabályozza. Ezek a gének fontos szerepet játszanak a daganatsejtek túlélésében (Bcl2, survivin, Mcl-1), proliferációjában (c-myc, ciklin D1, ciklin-B) (132), az angiogenezisben (VEGF) (133), az áttétképződésben (MMP2, MMP9) (134), a sejtadhézióban (ICAM-1, TWIST1) és a gyulladásban (IL-6, IL-17, IL-23, Cox2) (112, 135). Az IL-6 kötődését követően az IL-6R-gp130 komplex internalizálódik és degradálódik, miközben a sejtmembránban található IL-6R-ok száma lecsökken, és ezzel a sejt az IL-6-tal szemben deszenzitizálódik (136).

Klasszikus jelátvitelnek nevezzük, amikor a transzmembrán IL-6R-hoz kötődő IL-6 aktiválja a jelátvitelt. Transz típusú jelátvitel esetén a szolubilis receptorhoz kötődik az IL-6, és ez a komplex kapcsolódik valamely sejten lévő gp130-hoz. Ezáltal olyan sejteket is aktiválni tud az IL-6, amelyek nem expresszálnak IL-6R-t.

Az IL-6R-hoz hasonlóan, a gp130-nak is van szolubilis formája (sgp130) a keringésben, amely alternatív splicing útján képződik, és koncentrációja relatív nagy a vérben (100-400 ng/ml) (137). A gp130 szolubilis formája is képes az IL-6-sIL-6R komplex megkötésére, ezért feltételezik, hogy gátolja az IL-6 transz típusú jelátvitelt, ezzel szemben nem befolyásolja a klasszikus IL-6 jelátvitelt.

A kétféle jelátvitel eltérő hatást eredményez. A klasszikus jelátvitel alapvetően anti-inflammatorikus folyamatokat indukál: a veleszületett immunreakciók közül a nonspecifikus, sejtmediált immunválaszban, mint pl. monociták vonzása és makrofággá való átalakulásukat. A szerzett immunválasz során a B-sejtek átalakulását szabályozza ellenanyag termelő plazmasejtekké. A klasszikus jelátvitel a fő mediátor a láz kiváltásában, illetve a májban zajló akut fázis reakció során is, melynek hatására megemelkedik a CRP, a fibrinogén, a haptoglobin és a szérum amiloid A szint, illetve egyidejűleg lecsökken a transzferrin és az albumintermelés (138). A hepcidin termelődésének fokozása révén gátolja a bélben a ferroportin-1 vastranszporter működését, és ezáltal csökken a vérben a vasszint. Az IL-6 hatására felgyorsul a

megakariociták érése a csontvelőben, amely a trombociták fokozott képződését és a véráramba való kiáramlását eredményezi (139). A mindennapi gyakorlatban használatosak ezek a laborvizsgálatok a gyulladás súlyosságának felmérésére.

A transz típusú jelátvitel során ettől eltérő folyamatok figyelhetők meg: az IL-6 a pro-inflammatorikus T-helper 17 (Th17) sejteket indukálja, gátolja a T-sejt apoptózist, valamint az anti-inflammatorikus hatású szabályozó T-sejtek (Treg) differenciálódását. A transz típusú jelátvitel dominanciája gyakran megfigyelhető krónikus gyulladásos kórképekben.

Tekintettel az IL-6 pleiotrop tulajdonságára, amennyiben az IL-6 termelés szabályozatlanná válik, különféle megbetegedéseket okozhat. IL-6 deficiencia esetén a szervezet védekezőképessége jelentősen romlik a fertőző betegségekkel szemben. A JAK/STAT3 mutációja esetén visszatérő fertőzések, elsősorban pneumónia jelentkezik (140). Az IL-6-hepcidin tengely révén krónikus gyulladásokban a szérum vasszint alacsonnyá válik, és anémia alakul ki (141). Folyamatos IL-6 termelődés hipergammaglobulinémiához és autoantitestek képződéséhez vezet. Reumatoid artritiszben magas szérum IL-6 szintet és a sIL-6R magasabb arányát mutatták ki. Az ízületi folyadékban mérhető magas szintjük korrelál az ízületi porcdestrukció mértékével. A betegek jól reagálnak az anti-IL-6R antitestre (tocilizumab) (142). Antigén indukált artritiszben a transz típusú jelátvitel a Th17 sejtekben a STAT3 fokozott foszforilációjához vezet, valamint a Th17 és neutrofil sejtek fokozott jelenlétét eredményezi az ízületi folyadékban. A transz útvonal szelektív gátlásával a betegség súlyossága jelentősen csökken (143).

2.3.3. Az IL-6 termelődés szabályozása

Az IL-6 számos esetben (fertőzés, szövetsérülés, gyulladás) vészjelzést közvetítő mediátorként szolgál. Az IL-6 szintjének azonnali, de egyben csak átmeneti emelkedése a szervezet védekező mechanizmusait aktiválja. Amennyiben a stresszforrás megszűnik, az IL-6 által mediált jelátviteli kaszkád aktivációja is megszűnik. Az IL-6 termelése szigorúan szabályozott folyamat. Az IL-6 promoter régiója akkor aktiválódik, amikor a funkcionális cisz-regulációs elemeket az IL-1, a tumor nekrozis faktor (TNF), toll-szerű receptorok (TLR) által mediált jel és a forszkolin aktiválják. A funkcionális cisz

regulációs elemek az IL-6 gén 5' végén találhatóak, számos kötőhely azonosítható itt: nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B), specifikus protein 1 (SP1), nukleáris faktor – IL-6 (NF-IL-6), aktivátor protein 1 és interferon szabályozó faktor 1 (144-146). Érdekes módon számos vírus esetében megfigyelték, hogy fokozzák az NF- κ B és az NF-IL-6 DNS-kötő aktivitását, és ezáltal fokozzák az IL-6 mRNS transzkripcióját; ezek közé tartozik a humán limfotropikus vírus 1, a humán immundeficiencia vírus 1 és a humán heptatitisz B vírus X fehérje (147-149). Ha az IL-6 gén -174 pozíciójában polimorfizmus található, -174 G esetén fokozódik az IL-6 transzkripció, és ilyenkor a juvenilis idiopátiás artritisz szisztémás megjelenését és a reumatoid artitiszre való fokozott hajlamot figyelték meg (150, 151). Ezzel szemben -174 C esetén sem az IL-1, sem a lipopoliszacharid (26) nem indítja meg a gén átírását.

Ellenben bizonyos transzkripciós faktorok csökkentik az IL-6 expresszióját: a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor α -t a fibrát tudja aktiválni, az ösztrogén receptorok, melyek hatása menopauzában vagy petefészek eltávolítást követően a szérum IL-6 szint emelkedés, vagy a glükokortikoid receptor aktivációja, amely a kortikoszteroidok gyulladáscsökkentő hatásának hátterében áll (152-154). Hasonlóan a retinoblasztóma fehérje és a p53 negatívan szabályozza az IL-6 transzkripcióját, azonban a p53 mutációja esetén ennek ellenkező a hatása, a promotor régió aktivációja figyelhető meg (155).

Az IL-6 gén expressziójára poszttranszkripciós faktorok is hatással vannak: a gén 3' végén található nem transzlálódó régió (UTR) befolyásolja a képződő mRNS stabilitását. A legfontosabbak a szabályozó az RNáz-1, amely az IL-6 mRNS destabilizálásáért felel, míg az AT-gazdag interaktív domént tartalmazó protein 5a az IL-6 szelektív stabilizálását biztosítja (156). A kettő közötti egyensúly befolyásolhatja az IL-6 szint kóros emelkedését bizonyos kórképekben.

2.3.4. Az IL-6 és a daganat kapcsolata

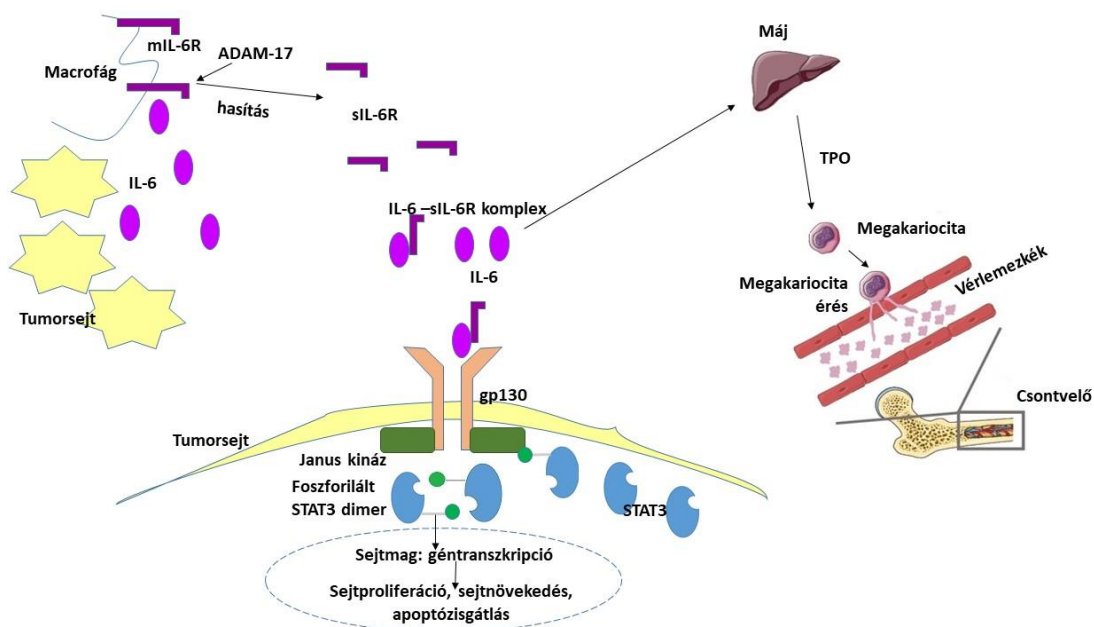
A daganattal összefüggő gyulladással szöveteket tumor-asszociált makrofágok (TAM) és fehérvérsejtek infiltrálják, emellett gyulladással citokinek mutathatók ki, mint pl. a TNF, az IL-1, az IL-6 és kemokinek (CCL-2 és CXCL-8), amelyek a szöveti remodellinget és az angiogenezist segítik elő (157). A tumor mikro környezetben (56) az

IL-6 az egyik legnagyobb mértékben expresszált citokin, amelyet mind a mononukleáris, mind a tumorsejtek termelnek. A TME-ben az IL-6-t legnagyobb mennyiségben a TAM-ok, a CD4+ T-sejtek, a mieloid-eredetű szuppresszor sejtek és a fibroblasztok termelik (158, 159). A daganat növekedésének szinte valamennyi folyamatának szabályozásában részt vesz, így pl. az apoptózis gátlásában (160), a sejtek túlélésének (161), proliferációjának (162, 163), az angiogenezis (164, 165), a tumoros invázió és az áttétképződés (166), illetve a daganatsejt metabolizmusának elősegítésében (159). (158, 167). A TME-ben az IL-6 közvetlenül segíti a tumorgenezist az intrinszik és extrinszik daganatsejt aktivitások modulálásával (168). Az IL-6 a daganatsejtek proliferációját és túlélését számos jelátviteli útvonal aktiválása révén stimulálja, így pl. a Ras/Raf/Mek/MAPK, a PI3K/AKT és a JAK/STAT útvonalak (162, 169). A gyulladásban bizonyos transzkripciós faktorok, mint pl. NF- κ B, STAT3 és primer gyulladásos citokinek (IL-1b, IL-6 és TNF- α) alapvető fontosságúak (170). Az NF- κ B a gyulladás fő szabályozója, amely számos daganattípusban kikerül a kontroll alól. Az IL-6 az NF- κ B aktiváció fő effektor molekulája a STAT3 útvonalon keresztül: a tumorgenezisben az NF- κ B/IL-6/STAT3 kaszkád fontos eleme az IL-6 (161). A STAT3-ra az NF- κ B aktivált állapotban tartásához szükség van a daganatokban (171), míg az IL-6 elősegíti a karcinogenezist a proinflammatorikus és sejtvédő hatása révén (172, 173). Ezek alapján tehát a STAT3 jelátviteli útvonal több ponton is szerepet játszik a daganatok progressziójában. Ezt bizonyítja, hogy ha az IL-6/STAT3 útvonal működését gátoljuk, - akár az IL-6, gp130 vagy a STAT3-on keresztül – egyúttal lelassítjuk a DNS károsodásnak kitett tumorsejt növekedését (174).

A bélhámsejtek expressziós elemzése azt mutatta, hogy az ADAM-17 erősen upregulált a tumorszövetben, míg az mIL-6R erősen downregulált (174, 175). Kólitisz-asszociált premalignus daganatos egérmodellben beszámoltak az ADAM-17, az IL-6, a gp130 és a sIL-6R expressziójának emelkedéséről a lamina propriában található makrofágokban (175). Mindez azt sugallja, hogy ezek a sejtek az IL-6R-t leválasztják a sejt felszínéről, és egyúttal az IL-6 forrásai is.

Az IL-6-nak a daganatsejtek túlélésére gyakorolt szisztematikusan pozitív hatásában az alábbi szempontokat kell figyelembe venni: az IL-6 kötődik az sIL-6R-hoz, amely kölcsönhatásba lép a gp130-mal a tumorsejteken. Ez aktiválja a Janus kinázokat, ami a STAT3 foszforilációját eredményezi. Ezt követően a foszforilált STAT3

homodimernek a tumorsejtek magjába történő transzlokációja a különböző gének transzkripcióját eredményezi, és ezáltal a tumorsejtek proliferációját, növekedését és az apoptózisának gátlását okozza. Amennyiben nemcsak petefészek daganatoknál áll fenn a parakrin mediált útvonal, akkor az IL-6 megemelkedett szintje TPO termelést indukál a májban, ami viszont aktiválja a megakariociták érését és a vérlemezkék termelését, ami megnövekedett vérlemezkeszámot eredményez. Mindez pozitívan befolyásolja a daganat fejlődését (9. ábra).



9. ábra: Az IL-6 hipotetikus szerepe az onkogenesisben és a tumor által kiváltott trombocitózisban (176). mIL-6R – membránhoz kötött IL-6 receptor, TPO – trombopoetin, ADAM-17 – egy dezintegrin és metalloproteáz 17; STAT3 — szignál transzducer és transzkripció aktivátor 3.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim során saját beteganyagon vizsgáltam a különböző gasztrointesztinális tumorokban a szérumban IL-6 szint és a vérlemezkeszám közötti összefüggést (I.). Humán kolorektális tumorban vizsgáltam az IL-6 expressziót, illetve az összefüggését a klinikopatológiai paraméterekkel (II.). Állatkísérlet során egy gyulladás-asszociált kolorektális daganatmodellben vizsgáltam az IL-6 szerepét a daganat kialakulásában és a vérlemezkeszám alakulásában (III).

- I. A szérumban IL-6 és a vérlemezkeszám közötti összefüggés vizsgálata:
 - a. Mutat-e összefüggést a szérumban IL-6 szint a vérlemezkeszámmal a különböző gasztrointesztinális tumorokban?
- II. Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális tumoros betegeknél:
 - a. A daganatsejtek és a strómasejtek IL-6 expressziója mutat-e eltérést?
 - b. Az IL-6 expresszió mutat-e összefüggést a daganat stádiumával, differenciáltsági fokával?
- III. Az IL-6 szerepének vizsgálata gyulladás-asszociált kolorektális daganatmodellben IL-6 génkiütéses és vad típusú egerekben:
 - a. Van-e különbség a két csoport között a CRC kialakulása és a daganat jellemzőinek tekintetében?
 - b. Van-e különbség a két csoport között a mortalitási rátát illetően?
 - c. Van-e különbség az egyes kezelt és kezelést nem kapó kontrollcsoportok között a vérlemezkeszám, a máj TPO és THBS-1 expressziója tekintetében?
 - d. In vivo képalkotó vizsgálatokkal (intralumináris endomikroszkópia, PET/MRI) van-e különbség a két csoport között?

4. MÓDSZEREK

Az IL-6 és a gasztrointesztinális daganatokat kísérő trombocitózis közötti összefüggés

A vizsgálatba 2015 március és 2017 március között, a Semmelweis Egyetem, I. számú Sebészeti Klinikán, különböző gasztrointesztinális tumor miatt műtéten átesett, 197 beteg került bevonásra. A kizárás kritériumai a következők voltak: gyulladásoos állapotok (tüdőgyulladás, sebgyulladás, tályog, epehólyag gyulladás, branül gyulladás, endokarditisz, húgyúti fertőzés, Crohn-betegség, kólitisz ulceróza) és szteroid terápia. Összesen 40 beteg került kizárásra. A trombocitaszámot és az IL-6 szintet a műtét előtti (4 héten belül) rutin vérvétel során határozta meg. Trombocitózisnak a 400 G /l feletti vérlemezkeszámot tekintetem. A szérum IL-6 szintet Cobas 601 készülékkel mértem elektrochemilumineszcenz (ECLIA) módszerrel.

A vérlemezkeszám prediktorainak meghatározására multivariáns lineáris regresszió alkalmaztunk. A koefficienst és a 95%-os konfidencia intervallumát (CI) minden változóra kiszámoltuk. Pearson-féle korrelációval elemeztük a skála változók közötti összefüggést páronként. Valamennyi statisztikai vizsgálat kétoldalú volt, a $p < 0,05$ -t tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat Rstudio programcsomaggal (1.0.143 verzió – ©2009-2016 Rstudio, Inc.) elemeztük.

A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság (ETT TUKEB) 5022-7/2013/EKU (39.214) számú engedély birtokában végeztem.

Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegeknél

Az IL-6 expresszió vizsgálata során az Uzsoki utcai Kórházban 2004 és 2011 között operált 95 kolorektális tumorban szenvedő beteg demográfiai, sebészeti és patológiai adatait gyűjtöttem össze. Vizsgálatomba szövettanilag igazolt adenocarcinomás betegeket válogattam be. A kizárás kritériumai a következők voltak: szinkron egyéb tumor, gyulladásoos állapotok (tüdőgyulladás, sebgyulladás, tályog, epehólyag gyulladás, branül gyulladás, endokarditisz, húgyúti fertőzés, Crohn-betegség,

kólitisz ulceróza) és szteroid terápia. A betegek stádiumait két, korai (I. és II. stádium) és előrehaladott (III. és IV. stádium) csoportra osztottam.

A szövettani metszeteket a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben Abcam® IL-6 antitesttel festettem meg, a sejtmagokat hematoxilinnel tettem láthatóvá. A szövettani metszeteket digitalizálás után a Panoramic Viewer (3DHitech) programmal értékeltem ki. Első lépésben metszetenként öt területet jelöltem ki, ügyelve arra, hogy a területeken a tumor- és a strómasejtek aránya megfeleljen az egész metszeten látott aránynak. Ezt követte maga az adenokarcinóma és a stróma sejtjeinek kijelölése. A tumorsejtek, illetve a strómasejtek festődési intenzitásának kiértékeléséhez a QuantCenter (3Dhitech) programot alkalmaztam. A program a színintenzitás alapján számszerűsítette a pozitivitást, és ezt erős, mérsékelt, gyenge és negatív csoportokba sorolta. Az első két csoportot „kifejezett”, a második kettőt pedig „nem kifejezett” IL-6 expresszióként határoztam meg.

A statisztikai számításokhoz deskriptív módszereket, keresztábrát Fisher-féle egzakt próbával, egyutas variancia-analízist (ANOVA), az adatok eloszlásától függően független mintás vagy páros t-próbát vagy Wilcoxon-féle előjeles rang tesztet, Spearman-féle korrelációt, a nem lineáris összefüggések vizsgálatához a prediktor változók másod- és harmadfokú polinomjait is tartalmazó többváltozós regressziót, valamint kevert hatás modelleket alkalmaztunk. A prediktor változók az életkor, nem, tumor stádium, differenciáltsági fok és a szövettani paraméterek voltak. A több kategóriát tartalmazó változók hatás szignifikanciáját (pl. tumor stádium) az egyes kategóriák szintjén és együttesen Wald-tesztel is vizsgáltuk.

A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásügyi Bizottság (ETT TUKEB) 5022-7/2013/EKU (39.214) számú engedély birtokában végeztem.

Trombocitózis és az IL-6 génkiütés (IL-6 KO) hatásai kólitisz-asszociált daganatos modellben

A vizsgálati állatok

Felnőtt (8-10 hetes), hím FVB/Ant és IL-6 KO FVB/Ant egereknél végeztem a vizsgálatokat, melyeket az MTA Kísérleti Orvostudományok Kutatóközpont Orvosi Géntechnológiai Részlegének (specifikus patogénmentes szint) helyi kolóniája bocsátotta rendelkezésemre. Az állatokat minimális betegség szinten, ketrecenként 3-5 állatot elhelyezve, kontrollált környezeti körülmények között tartottam: 21 ± 1 °C, 65%-os páratartalom, 12 óra világosság – 12 óra sötétség ciklus mellett (a lámpák reggel 7:00 órakor kapcsoltak be). Az állatok szabadon hozzáfértek a táplálékhoz és az ivóvízhez. A DSS oldatot az ivóvízhez adtam a kísérleti prokollnak megfelelően.

IL-6 génkiütés

Egy új IL-6 KO egérvonal létrehozása CRISPR/CAS9 módszerrel történt, melyhez egy homológ templát alkalmazására volt szükség. Néhány bázispár módosítása egy STOP kodon beillesztésével valósult meg. Emellett egy nagyobb hatékonyságú oligonukleotid donort is alkalmazni kellett, hogy módosítsa a gént és beillesszen egy STOP kodont.

Az IL-6 fehérje alternatív splicing révén keletkező összes transzkripciós variánsának lefedésére az IL-6 gén alternatív START kodonjától downstream történt a STOP kodon elhelyezése. Ehhez szükség volt a TAAxTAG szekvenciát inzerciójára a megfelelő leolvasási keretben. Ezt követően a régió szekvenálása igazolta ennek a kodonnak a megfelelő inzercióját. Alább találhatóak a célzott exonok, pozíció: 5. kromoszóma 30, 013, 114-30, 019, 981, forward szál. Az alternatív start kodonokat aláhúztam.

Az 1., 2. és 3. variánsmásodik exonja:

```
GAGACTTCCATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACGGCCTTCCCT
A
CTTCACAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTGTCTAT
A
CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCGTGAAATGAGA
A
AAGAG
```

A 4. variáns első exonja:

```
AGGCGCCCAACTGTGCTATCTGCTCACTTGCCGGTTTTCCCTTTTCTCCACGCAGGAGA
C
TTCCATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTACTTC
A
CAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTGTCTATACCAC
```

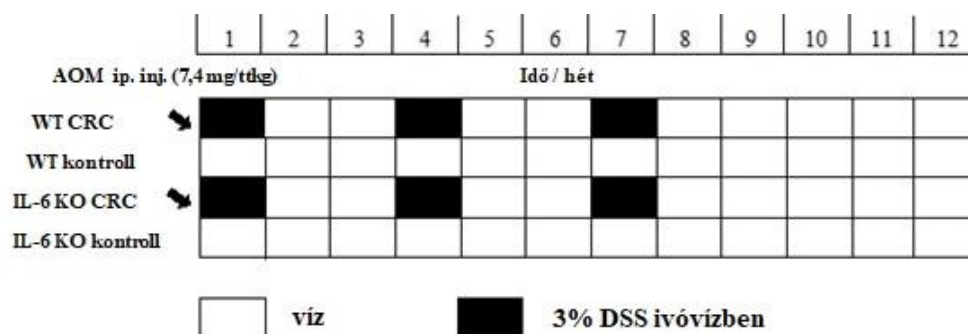
T
TCACAAGTCGGAGGCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCGTGGAATGAGAAAAGA
G

Az adatok az Ensembl adatbázisból származnak.

Az IL-6 génkiütést lipopoliszacharid (26) stimulációval igazoltam, amely rutinszerűen alkalmazott módszer az IL-6 gén funkcióvesztésének megállapítására. Az LPS egy, a Gram-negatív baktériumok sejtfalában jelenlévő endotoxin, amely IL-6 termelést okoz többek között a makrofágok stimulálása révén. A génkiütés igazolása során az állatokat vagy fiziológiás sóoldattal vagy fiziológiás sóoldatban oldott LPS-sel (2,5 mg/ttkg) kezeltem, mindkét oldatot intraperitoneálisan adtam be. Az IL-6 jelenlétét ELISA módszerrel mértem. Összesen 39 egeret vizsgáltam az alábbi négy csoportban: 1) IL-6 KO kontroll ($n=5$); 2) IL-6 kezelési csoport ($n=18$); 3) WT kontroll ($n=6$); és 4) WT kezelési csoport ($n=10$).

A kísérleti protokoll

Az azoximetán (AOM) / 3% dextrán-nátrium-szulfát (DSS) modellt alkalmaztam a gyulladás-asszociált kolorektális daganat kiváltása érdekében (177). Az AOM egy kémiai anyag, amely DNS-metiláció és következményes kóros bázispárok kialakulása révén daganatos transzformációt indukál. A DSS egy változó molekulásúlyú szulfatált poliszacharid, amely a humán kólitisz ulcerózához hasonló gyulladást vált ki (178, 179). A kísérlet kezdetén az egerek egy adag AOM-t (7,4 mg/ttkg) kaptak intraperitoneálisan. Ezt követte 3 ciklus 3,5%-os DSS tartalmú ivóvíz adása egy hétig, majd normál ivóvíz 2 hétig (10. ábra).



10. ábra: A kolorektális daganat indukciójának időbeli ábrája az AOM/DSS gyulladós modellben. AOM – azoxi-metán, DSS – dextrán-nátrium-szulfát. Fekete nyíl: AOM intraperitoneális adása.

A kilenc hetes kezelés során folyamatosan mértem az állatok testsúlyát, vízfogyasztását, vizsgáltam a széklet jellegét és a perianális tájékot. A gyulladás súlyosságának becslése ezen paraméterek alapján történt, és egy decimális pontrendszerben ábrázoltam.

A kísérlet végén az állatokat termináltuk, a vért előhűtött EDTA-csővekbe levettem, és a plazmát $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam felhasználásig. Az IL-6 szint meghatározását ELISA kittel végeztem (RAB0308, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a gyártó utasításainak megfelelően. Szövetteni vizsgálatra vastagbél- és májmintát vettem, melyek egy részét lefagyasztottam, és száraz jégen tároltam valós idejű polimeráz-lánreakció (RT-PCR) vizsgálathoz. Mindegyik állat esetében egy patológus megvizsgálta a teljes vastagbelet makroszkóposan és hematoxin-eozin (HE) festést követően mikroszkóposan is: ezzel fel lehetett mérni a gyulladás és a daganatképződés mértékét, illetve meg lehetett határozni a stádiumbeosztást.

Kvantitatív RT-PCR

A fagyasztott vér- és májmintákat homogenizáltam TRI reagens oldatban (Ambion, USA), és a teljes RNS-t izoláltam QIAGEN Mini Kit-tel (Qiagen, Valencia, CA, USA) a gyártó utasításainak megfelelően. A genomikus DNS-sel való kontamináció megszüntetésére DN-áz I kezelést (1 egység DN-áz) végeztem, és $100\ \mu\text{l}$ RN-áz-mentes DN-áz I oldatot (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) adtam hozzá. A minta minőségi ellenőrzését és a kvantitatív elemzést NanoDrop 2000-rel (Thermo Scientific) végeztem.

A cDNS szintézis a nagy kapacitású cDNS reverz transzkripcióval (Applied Biosynthesis, Waltham, MA, USA) történt. Az összehasonlító Ct kísérletekhez a primereket a Primer Express 3.0 programmal és a Primer Blast szoftverrel készítettem. A primereket (Microsynth, Balgach, Svájc) az RT-PCR reakcióban Fast EvaGreen® qPCR Master Mix-szel (Biotium, Fremont, CA, USA) ABI StepOnePlus készüléken használtam. A géexpressziót ABI Step One 2.3 programmal elemeztem. Az amplikont a Melt Curve Analysis-szel ABI StepOne Plus készüléken teszteltem. A kísérleteket *rplp1* expressziókhöz normalizáltam.

Az alábbi (forward („felső”) és reverse („alsó”)) primer párokat használtam:

rplp1 for TAAGGCCGCGTTGAGGTG
 rplp1 rev GATCTTATCCTCCGTGACCGT
 thbs1 for CAT GCC ATG GCC AAC AAA CA
 thbs1 rev TTG CAC TCA CAG CGG TAC AT
 thpo1 for CTT CTC CAC CCG GAC AGA GT
 thpo1 rev CTG GCC AGG GTG TCT AAC TG

In vivo képkalkotó vizsgálatok intralumináris fluoreszcens konfokális endomikroszkópiával és PET/MRI-vel

A vastagbél nyálkahártyát *in vivo* vizsgáltam intraluminális fluoreszcens konfokális endomikroszkóp segítségével. A vad genotípus (28) és az IL-6 KO egerekben a vastagbél nyálkahártya kripták eltéréseit a sejtmag ellenfestésével és a nyák autofluoreszcens festésével tettem láthatóvá. Egy WT és két IL-6 KO egeret 3% *v/v* izoflurán gázzal (Isofluran-KP, Medicus Partner Kft.) elaltattam, és melegített ágyra fektettem. Majd 1 ml fiziológiás sóoldatos beöntést követően mindegyik egernek 6% *m/v*, 0,5 ml vizes akriflavin oldatot (Sigma-Aldrich Kft.) injektáltam rektálisan. Az akriflavin egy zöld fluoreszcens DNS-kötő molekula, egy általános intravitális, sejtfestő anyag, mellyel a luminális nyálkahártyasejtek fluoreszcens kontrasztja érhető el. Ezután a Cellvizio Lab Dual Band képkalkotó rendszer (Mauna Kea Technologies Inc., Párizs, Franciaország) S1500 száloptikás endomikroszkóp szondájának végét (3,3 mikron felbontású, 600 mikron képátmérőjű) vezettem be a végbélen keresztül a kolon deszcendensbe, és a vastagbél faláról kétsávos (480 nm zöld és 660 nm vörös), élő mikroszkópos képeket készítettem. Az Euthasol injekcióval (Medicus Partner Kft.)

végzett végső eutanáziát követően ugyanezen állatok vastagbelét megnyitottam, és a nyálkahártya felszínét ex vivo is megvizsgáltam. A kriptákban található sejtek zölden fluoreszkáltak, melyeken belül a sejtmag kifejezettebben festődött. A kriptákban található nyák piros fluoreszkáló pontként (autofluoreszcencia miatt) volt látható.

A teljes testre kiterjedő daganatos és gyulladáshoz vezető érintettség tisztázására egy WT és két IL-6 KO egérenél további képalkotó vizsgálatokat végeztem. Először egy kisállatok vizsgálatára szolgáló, 3 Tesla nanoScan[®] PET/MRI rendszerrel (Mediso Kft.) szkenneltem az egereket, mely során F-fluoro-dezoxi-glükózt (FDG) használtam a daganatos és a gyulladáshoz vezető góccok kimutatására. Ennek alapját a daganatos és gyulladáshoz vezető sejtek fokozott glükóztranszportja és -felhasználása, továbbá a glükóztranszporter sejtek fokozott expressziója jelenti. Az MRI képszekvencia az ödémás, gyulladt szövetek fokozott vízkoncentrációjának megfelelően lett kiválasztva. A nyirokcsomókban és a bélfalban a vízjelek kevésbé fényes szürke színeként ábrázolódnak (a fényesebb zsírszövetek mellett).

A képek elkészítése előtt 60 perccel 3-4 MBq FDG oldatot (FDG-KEDO[®], Pet-Medicopus Kft.) adtam az egereknek intraperitoneálisan. Ezt követően 5%-os izofluránnal indukciós, majd 2%-os izofluránnal fenntartó inhalációs anesztéziát végeztem orvosi oxigénnel. Az egerek PET/MRI vizsgálatát MultiCell[™] melegíthető, pozicionálásra és monitorozásra alkalmas, több állat vizsgálatára alkalmas ágyon végeztem: egyidejűleg 3 egér tartható ugyanabban a vizsgálati helyzetben (Mediso Kft.). Az FDG injekció beadása után 90 perccel egy 20 perces, statikus PET CT felvételt végeztem, amit azonnal egy 2D spin echo MRI szekvencia követett, 0,3 mm-es szeletvastagsággal, hogy az anatómiai háttér megjeleníthető legyen. A kvantitatív radioaktivitás PET adatokat a Monte-Carlo alapú iteratív algoritmussal (Tera-Tomo[™], Medios Kft.) rekonstruáltam, mely során az MRI-t anatómiai és gyengülési prioritásként kezeltem, 0,3 mm-es voxel teljes test PET/MRI kép 1 mm-es felbontással.

Képalkotó vizsgálatok elemzése

A PET/MRI képeket radiológiai szempontból kvalitatívan értékeltem: a megnagyobbodott nyirokcsomókat és a bél intralumináris daganatait mind az MRI, mind a PET képekkel azonosítottam. Ezután a PET képeket kvantitatívan elemeztem a vivoQuant[™] szoftverrel (inviCRO Ltd., Boston, USA): ennek során meghatároztam a

teljes intesztinális volument egy vizsgált 3 dimenziós volumenben. Ezenkívül minden állatnál kiszámoltam a vizsgált volumenben a standardizált FDG felvételt és a radioaktivitás koncentráció százalékot a teljes test radioaktivitásához viszonyítva.

Statisztikai számítások

Az AOS/DSS kezeléssel CRC modellben összehasonlítottam a daganatok növekedését az IL-6 KO és a WT alcsoportokban a daganatos gócok száma és a teljes tumor volumen (TTV) tekintetében. A TTV-t úgy számoltam ki, hogy egy állaton belül az összes daganatos góc volumenét összeadtam. A normalitás eloszlásokat Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Normális eloszlás és egyenlő varianciák esetén az alcsoportokat Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Amennyiben nem normális eloszlást találtunk bármelyik alcsoportban, nem paraméteres próbát, pl. Kolmogorov-Szmirnov-próbát, Mann-Whitney U-próbát és a mediánok egyenlőség próbát alkalmaztunk. Adott esetben pontos módszerekkel határoztuk meg a p -értékeket. Az állatokat beosztottuk TTV kvartilisekbe, és összehasonlítottuk eloszlásukat az IL-6 KO és a WT alcsoportok között keresztábra elemzéssel és Fisher-féle egzakt próbával. Emellett a trombocita számot ANOVA-val hasonlítottuk össze. Az alcsoport párokat legkisebb négyzetek (OLS) regressziós koefficienseken Wald-próbával vetettük össze.

Az egy WT és a két IL-6 KO egéren végzett képalkotó vizsgálatok eredményeit számszerűsítettem: összehasonlítottam a három leginkább avid tumoros gócban az FDG felvételt, amellyel állatonként a legmagasabb maximális standardizált felvételi érték (SUVmax) volt megjelenítve. Egy kevert hatás modellt illesztettünk úgy, hogy a maximális valószínűségi becslést alkalmaztuk, feltételezve az IL-6 státusz változatlan hatását és a SUVmax random hatását minden állatban. A statisztika elemzéseket STATA 14.0 verzióval végeztük.

A kísérleti állatok tartása és kísérleteinkben való alkalmazásuk az Európai Közösségek Bizottságának irányelveivel (Európai Bizottság 86/609/EEC/2 és a 2010/63 jogszabályai) összhangban történtek. A vizsgálati protokollt az MTA Kísérleti Orvostudományok Kutatóközpont Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá (2013.05.08.), az engedély száma: PEI/001/29-4/2013.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az IL-6 és a gasztrointesztinális daganatokat kísérő trombocitózis közötti összefüggés

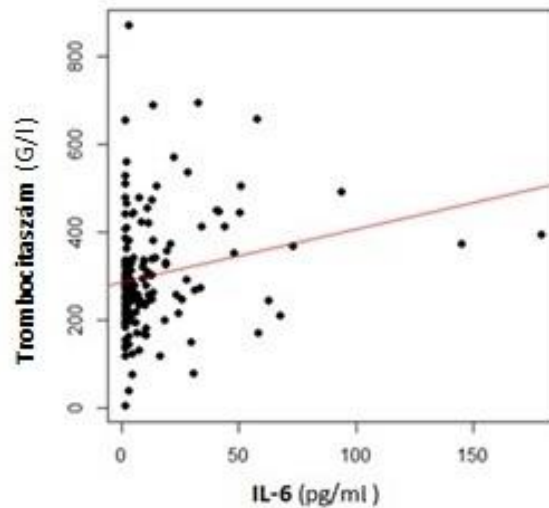
A vizsgált időintervallumban műtéten áteső betegeknél a lokalizáció és a daganatstádium tekintetében a gasztrointesztinális tumorok széles spektruma volt jellemző. Az egyes daganat típusoknak megfelelően vizsgáltam a trombocitaszám és a szérum IL-6 szint közötti összefüggést (2. táblázat). Mivel az alcsoportokban relatív alacsony volt a betegek száma, az összefüggés egyik daganatnál sem lett szignifikáns. Azonban a vastagbél és a nyelőcső daganatok esetében egy közepesen erős pozitív összefüggést tudtam kimutatni.

2.táblázat: Klinikopatológiai adatok

Szerv	Szám	férfi/nő	Stádium				Átlag tromb. (±SD) (G/l)	Átlag IL-6 (±SD) (pg/ml)	Tromb. x IL-6 korreláci ó
			1	2	3	4			
nyelőcső	14	14/0	0	4	4	6	250,52±86,44	8,90±5,64	0,419
primer máj*	10	6/4	2	2	4	2	170,20±70,85	5,29±4,71	0,153
gyomor	35	27/8	3	6	6	20	291,49±180,21	12,78±15,37	0,197
hasnyálmirigy	36	21/15	4	10	12	10	324,67±84,04	13,13±3,49	0,175
vastagbél	33	17/16	3	9	12	9	340,36±148,46	12,91±18,91	0,292
végbél	29	20/9	5	6	12	6	311,41±94,34	10,85±9,34	-0,006

*Barcelona kritériumok. 1=A, 2=B, 3=C, 4=D

Gyenge, de szignifikánsan pozitív összefüggés igazolódott az emelkedett vérlemezkeszám és a szérum IL-6 között (korrelációs koefficiens: $R=0,214$, $p = 0,006$) (11. ábra).



11. ábra: Az emelkedett vérlemezkeszám és a szérum IL-6 közötti összefüggés

A daganat differenciáltsági fokának nem volt szignifikáns hatása a vérlemezkeszámra és az IL-6 szintre. Ha azonban a betegeket a betegség stádiumának megfelelően két csoportra osztottam, korai (1. és 2. stádium) vagy előrehaladott (3. és 4. stádium) betegségként meghatározva, az IL-6 szignifikánsan magasabb volt az utóbbi csoportban (3. táblázat).

3. táblázat: A tumorstádiumok és átlag vérlemezkeszám, illetve az IL-6 szint közötti összefüggés

	Korai stádiumok	Késői stádiumok	<i>p</i>
Átlag trombocitaszám (G/l)	294,33	310,98	0,434
Átlag IL-6 (pg/ml)	5,4	16,2	0,0002

Hemoglobinra, fehérvérsejtszámra és előrehaladott stádiumú betegségekre korrigált multivariáns elemzéssel nem találtunk szignifikáns összefüggést az IL-6 szint és a trombocitózis között (4. táblázat). A hemoglobin negatív, a fehérvérsejtszám pozitív, szignifikáns összefüggést mutatott a vérlemezkeszámmal.

4. táblázat: *A vérlemezkeszám és a klinikai paraméterek közötti összefüggés multivariáns lineáris regressziós elemzéssel*

Paraméter	Koefficiens	95% CI	p
IL-6 (pg / ml)	-0,226	-0,927-0,476	0,526
Hemoglobin (g / l)	-2,213	-3,016- -1,411	< 0,001
Fehérvérsejtszám (G / l)	24,813	19,301-30,324	< 0,001
Előrehaladott stádium	19,958	-16,747-52,663	0,308

A betegek közül 12 esetben szerepelt tromboembóliás esemény az anamnézisben. Ezeknél a betegeknél alacsonyabb trombocitaszámot mértem (251 vs. 306 x 10³/μl), azonban a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,153$). Hasonlóan, ebben a betegcsoportban az IL-6 szint is alacsonyabb volt (10,3 vs. 12,8 pg / ml), de ez az eltérés sem volt szignifikáns ($p = 0,717$). Tizenöt beteget szedett rendszeresen acetil-szalicilsavat. Ezeknél a betegeknél az átlag trombocitaszám 293 G/l volt szemben a gyógyszert nem szedő betegeknél mért 303 G/l-rel. Ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,776$). Hasonlóan, az IL-6 szintben is volt különbség a két csoport között (10,8 vs. 12,8 pg / ml), de ez sem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,748$).

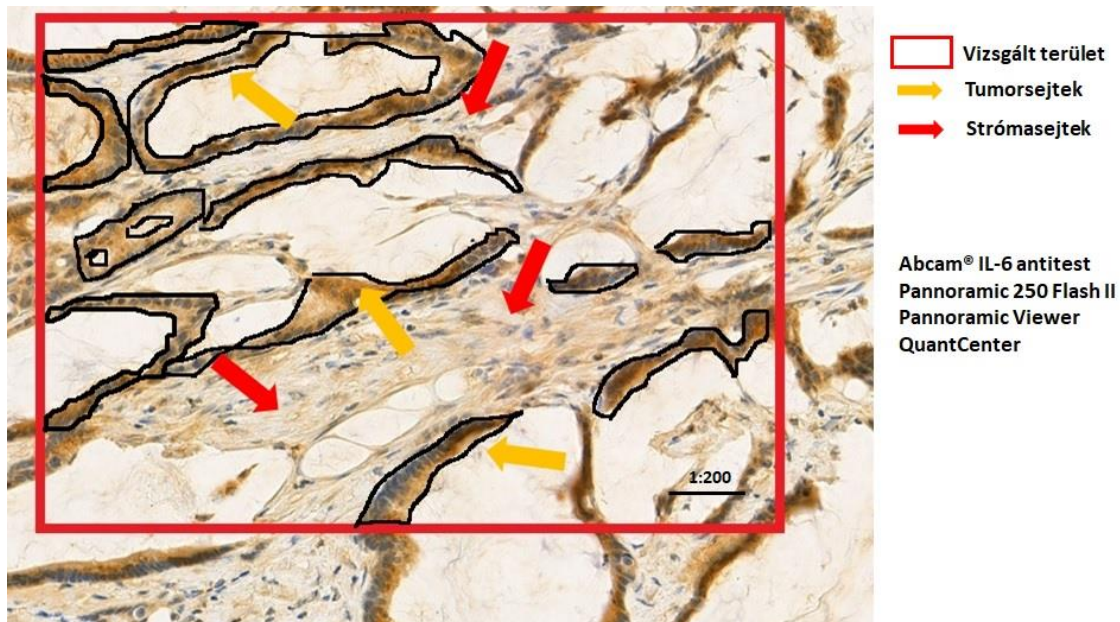
5.2. Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegeknél

A vizsgálatba összesen 64 beteg került bevonásra (5. táblázat). A betegek átlag életkora 64,2 év, közel kétharmaduk férfi volt. A vizsgálati csoportban a korai stádiumú betegek aránya mérsékelten nagyobb volt, mint az előrehaladott stádiumú betegeké (57,8% vs. 42,2%). A tumorok jelentős része közepesen differenciált volt, a jól és rosszul differenciált daganatok közel hasonló arányban voltak kimutathatóak.

5. táblázat: A betegek klinikopatológiai adatai

Kor	Átlag (\pm SD) év	64,2 (\pm 11,3)
Nem	Férfi	40 (62,5%)
	Nő	24 (37,5%)
Stádium	I (korai)	15 (23,4%)
	II (korai)	22 (34,4%)
	III (előrehaladott)	19 (29,7%)
	IV (előrehaladott)	8 (12,5%)
Differenciáltság (grade)	Jól differenciált	10 (15,6%)
	Közepesen differenciált	41 (64,1%)
	Rosszul differenciált	13 (20,3%)

A QuantCenter képanalízis platform segítségével kiszámoltam a tumor- és strómasejtek IL-6 pozitív területeinek százalékos eloszlását. A gyulladásos sejtek nem lettek kijelölve, részben azért, mert nem minden metszeten volt gyulladásos beszűrődés, illetve ahol volt, ott nem lehetett észlelni IL-6 pozitivitást (12. ábra).



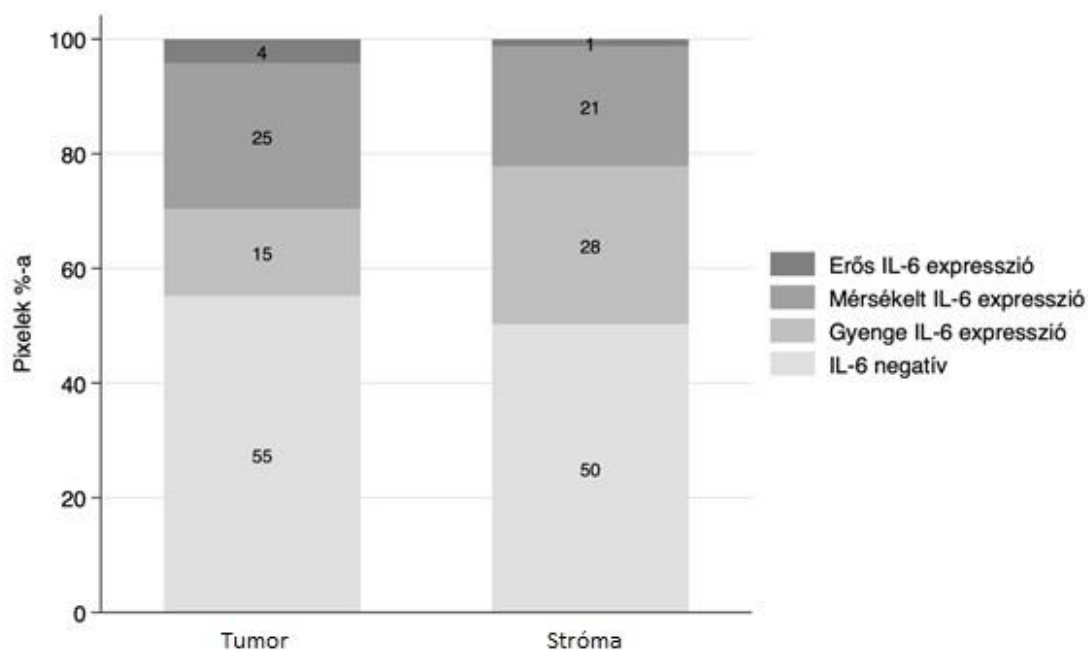
12. ábra: Digitalizált kolorektális tumorszövet a tumor- és a strómasejtek kijelölésével. Színelemzés a tumorsejtek és a strómasejtek anti-IL-6 pozitivitásának kiértékelésére.

A tumorstádiummal a nem (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,609$) és az életkor (független mintás t-teszt, $p = 0,546$) nem mutatott szignifikáns összefüggést (6. táblázat).

6. táblázat: *A betegek klinikopatológiai adatai a tumor stádium szerint*

Tumorstádium	Nem (férfi/nő)	Átlag (\pmSD) életkor (év)	Tumorsejt IL-6 pozitivitás (%\pmSD)	Strómasejt IL-6 pozitivitás (%\pmSD)
Összes	40/24	64,2 (\pm 11,3)	44,8 (\pm 22,9)	49,7 (\pm 20,0)
Korai (I-II.)	22/15	64,9	40,7 (\pm 21,1)	46,3 (\pm 19,5)
Előrehaladott (III-IV.)	18/9	63,1	50,4 (\pm 24,2)	54,5 (\pm 20,2)
Korai vs előrehaladott	Fisher egzakt teszt $p=0,609$	Független mintás t- teszt $p=0,546$	Független mintás t- teszt $p=0,094$	Független mintás t- teszt $p=0,107$

Különbségek mutatkoztak a tumorsejtek és a strómasejtek IL-6 kifejeződése között. A tumorsejtek ($44,8\pm 22,9\%$) és strómasejtek ($49,7\pm 20,0\%$) IL-6 expressziója között ugyan nem találtam szignifikáns összefüggést (páros t-teszt, $p = 0,057$), azonban a kifejezett (erős és mérsékelt színintenzitás) IL-6 expressziót mutató sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a tumorsejtekben ($29,5\pm 22,2\%$), mint a strómában ($22,1\pm 13,2\%$) (Wilcoxon próba, $p = 0,005$) (13. ábra).



13. ábra: Az IL-6 expresszió mértékének megoszlása a tumor- és a strómasejtekben.

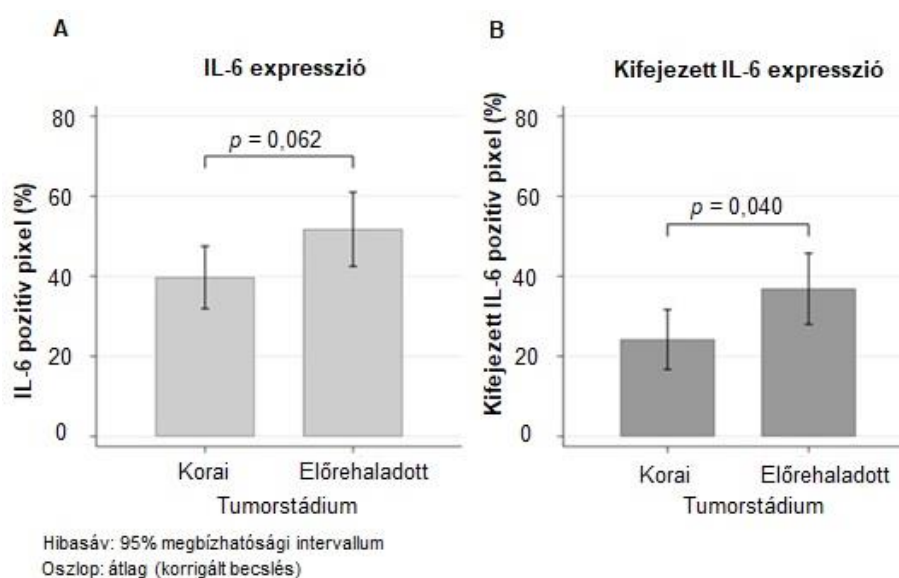
Előrehaladott stádiumú betegeknél a tumorsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult lineáris regresszióval. A strómasejtek IL-6 expressziója nem mutatott összefüggést a tumor stádiummal (7. táblázat).

7. táblázat: Az IL-6 expressziót befolyásoló tényezők vizsgálata lineáris regresszióval.

		Tumor	
		IL-6 pozitív pixel % (M ₁)	Kifejezett IL-6 pozitív pixel % (M ₂)
Kor		0,08	0,06
Nem ^a	Férfi	1,61	2,15
Stádium ^b	Előrehaladott	12,02	12,68*
Differenciáltság ^c	Közepesen differenciált	3,37	1,05
	Roszul differenciált	-0,17	-4,35

^abázis: női nem; ^bbázis: korai stádium; ^cbázis: jól differenciált

Több prediktor változó esetén nem igazolódott szignifikáns összefüggést. Az esélyhányados teszt egyik regresszió modellnél sem bizonyult szignifikánsnak ($M_1 p = 0,407$; $M_2 p = 0,272$; $M_3 p = 0,228$; $M_4 p = 0,126$), ami arra utal, hogy összességében a klinikopatológiai paraméterek nem mutattak összefüggést az IL-6 expresszióval. További regressziós modellekkel azt vizsgáltam, hogy a tumorstádium befolyásolja-e az egyes klinikopatológiai paraméterek és az IL-6 expresszió kapcsolatát, azonban nem sikerült ilyen összefüggést kimutatni. Előrehaladott tumorstádium (3. és 4. stádium) esetén azonban a kifejezett festődést mutató pixelek aránya alapján nagyobb mértékű IL-6 expresszió igazolódott a tumorszövetben (14. ábra).

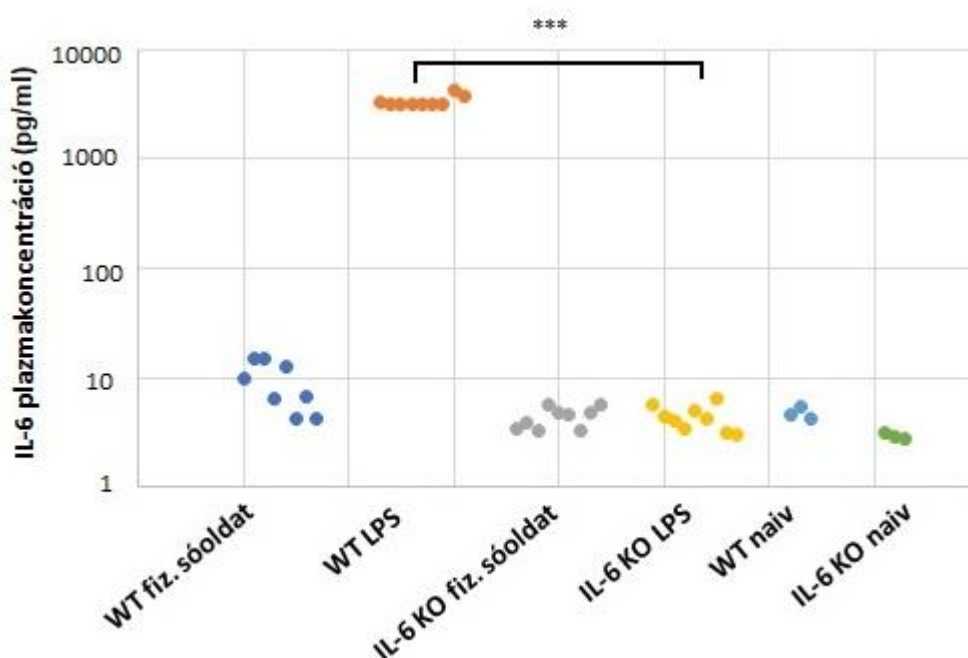


14. ábra: (A) Az összes és (B) a kifejezett IL-6 expresszió aránya korai és előrehaladott stádiumban

5.3. A trombocitózis és az IL-6 KO hatásai kólitisz-asszociált daganatos modellben

Az IL-6 génkiütés igazolása

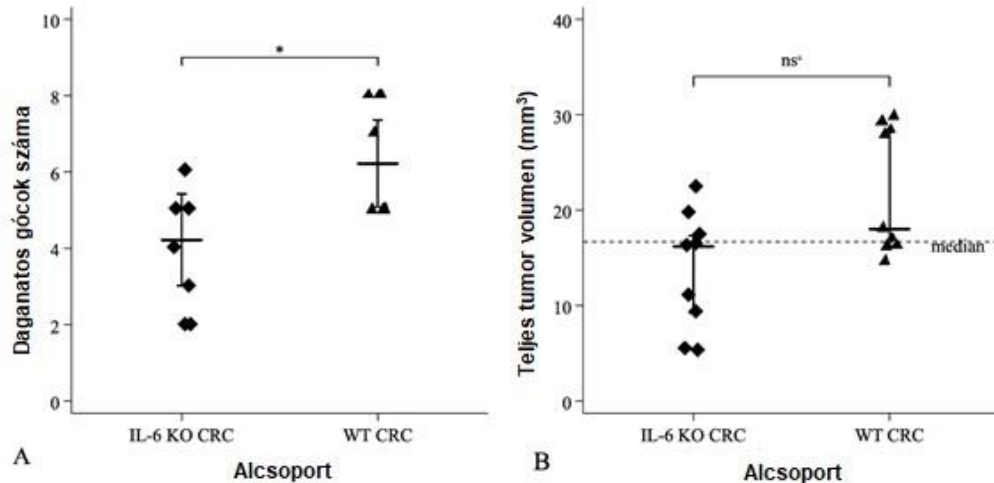
LPS adására az IL-6 KO csoportokban nem emelkedett meg a plazma IL-6 szint, míg a WT csoportban jelentős IL-6 koncentráció emelkedés volt kimutatható (15. ábra).



15. ábra: Az egyes alcsoportokban mért IL-6 koncentráció (pg/ml) ELISA-val. Az LPS indukálta plazma IL-6 szint mérése ELISA-val történt. Az adatok a középértéket jelentik (SD) *** $p < 0,001$.

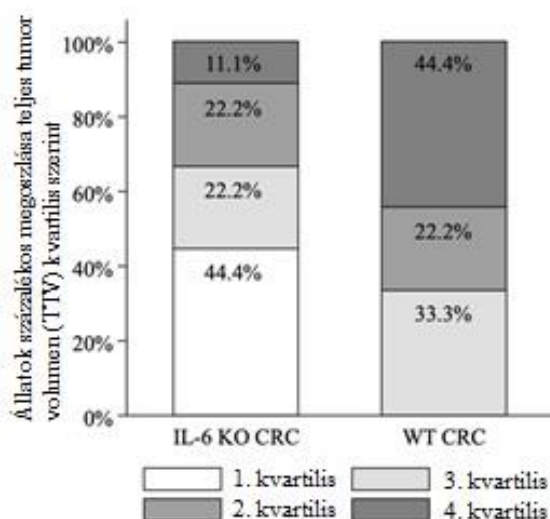
Hisztopatológiai és klinikai jellemzők

Az állatok terminálását követően multifokális, polipszerű megjelenésű daganatokat találtunk a kolon deszcendensben az AOM/DSS kezelésben részesülő egereknél. A daganatos góccok száma 2-től 8-ig terjedt, a varianciák egyenlőségét ($F_{8,8} = 1,11$, $p = 0,88$) és normális eloszlást mutatva az IL-6 KO és a WT alcsoportokban (Shapiro–Wilk teszt $p=0,88$ és $p=0,88$). A daganatos góccok átlagos (\pm SD) száma szignifikánsan nagyobb volt (Student-féle teszt, $t_{16}=-2,79$, $p=0,013$) a WT ($6,22\pm 0,52$), mint az IL-6 KO csoportban ($4,22\pm 0,49$) (16. A ábra). Az IL-6 KO csoportban az átlag (\pm SD) TTV $13,6 (\pm 6,2) \text{ mm}^3$ (medián $16,2$, IQR: $9,3-17,3$), míg a WT csoportban $21,9 (\pm 6,6) \text{ mm}^3$ (medián $18,1$, IQR: $16,2-28,3$) volt. A TTV eloszlása az IL-6 KO csoportban normális volt (Shapiro–Wilk teszt $p=0,475$), azonban a WT csoportban nem (Shapiro–Wilk teszt $p=0,014$). Bár az átlag TTV a WT állatokban nagyobb volt, a nem paraméteres próbák nem mutattak szignifikáns különbséget a két alcsoport között (Kolmogorov–Szmironov-féle teszt egzakt $p=0,352$, Mann-Whitney teszt $p=0,058$, a középértékek egyenlősége nem paraméteres próba egzakt $p=0,347$) (16. B ábra).



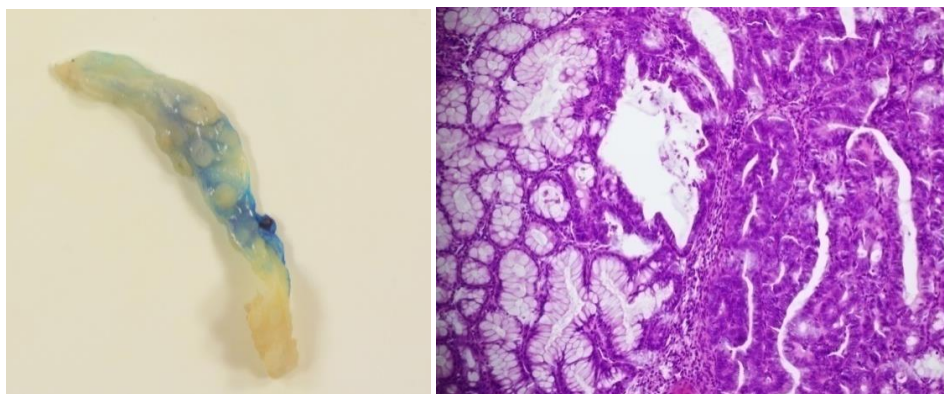
16. ábra: *A* (A) daganatos gócek és *B* (B) a teljes tumor volumen (TTV) eloszlása az IL-6 KO CRC és a WT CRC alcsoportokban. Az egerek száma mindkét csoportban $n = 9$ volt. **(A)** A daganatos gócek száma kétoldalas Student-féle teszttel; **(B)** TTV nem paraméteres próbákkal. -*kétoldalas Student-féle t-próba: $t_{16} = -2,79$, $p = 0,013$. -nsa (nem szignifikáns) Kolmogorov-Szmirnov-féle teszt egzakt $p = 0,352$, Mann-Whitney teszt $p = 0,058$, a középértékek egyenlősége nem paraméteres próba egzakt $p = 0,347$.

Az első TTV kvartilisbe 4 (TTV: 5,1–10,9 mm³), a másodikba 5 (TTV: 14,6–16,4 mm³), a harmadikba 4 (TTV: 17,0–19,6 mm³), míg a negyedikbe 5 (22,4–29,7 mm³) állat került. Az előző eredményekhez hasonlóan, bár a WT csoportban az eloszlás a nagyobb TTV kvartilisek felé tolódott (azaz nagyobb méretű daganatokat észleltünk több góccal) (1. kvart.: 0,0%, 2. kvart.: 33,3%, 3. kvart.: 22,2%, 4. kvart.: 44,4%) az IL-6 KO csoporthoz (1. kvart.: 44,4%, 2. kvart.: 22,2%, 3. kvart.: 22,2%, 4. kvart.: 11,1%) képest, a különbség statisztikailag mégsem volt szignifikáns (Fisher-féle egzakt $p = 0,157$) (17. ábra).



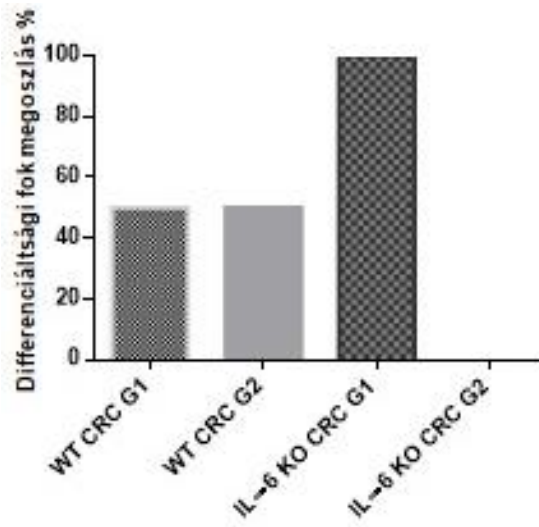
17. ábra: Teljes tumor volumen (TTV) kvartilisek az IL-6 státusznak (IL-6 KO CRC $n=9$, WT CRC $n=9$) megfelelően Fisher-féle egzakt teszttel.

A szövettani vizsgálat grade 1-2, pTis vagy pT1 tubuláris adenokarcinómát igazolt mindkét csoportban (18. ábra).



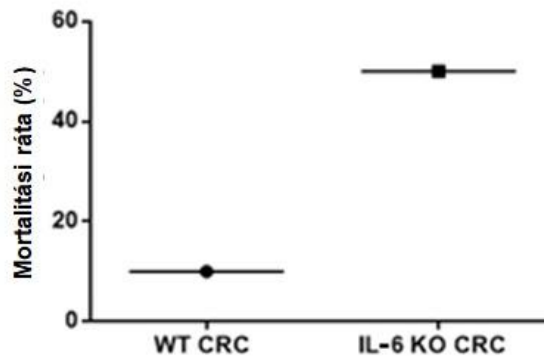
18. ábra: (A) WT egér vastagbél makroszkópos képe metilén-kék festéssel (B) WT egér vastagbélben kialakult pTis adenokarcinóma szövettani metszete (HE festés, 100x nagyítás). (A) A vastagbélben több gócú polipoid daganatok láthatóak; (B) A vastagbélnyálkahártyáról készült mikrofénykép, melyen egyidejűleg normális mirigyek (bal oldal) és daganatos transzformációt mutató mirigyek (jobb oldal) láthatóak.

Az IL-6 KO egereknél csak jól differenciált tumorokat azonosítottam, míg a WT egereknél a jól és a közepesen differenciált daganatok megoszlása egyenlő volt (19. ábra).



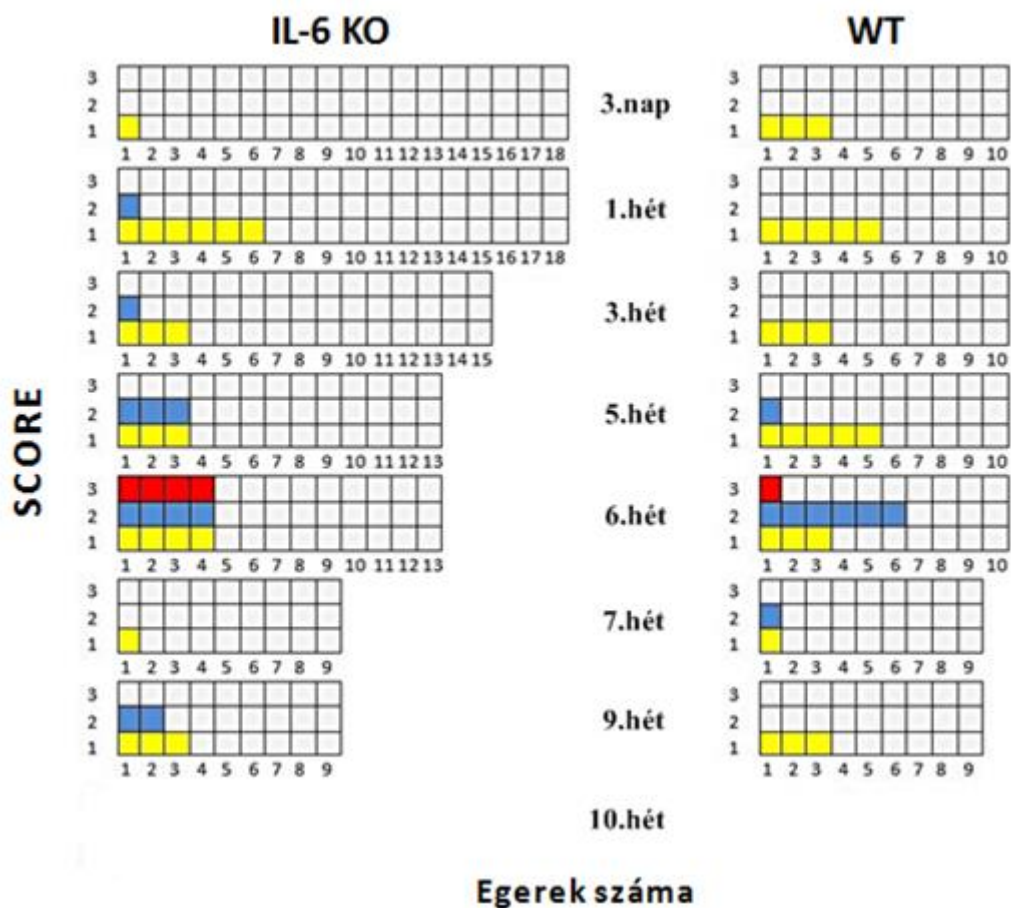
19. ábra: A daganatok megoszlása a differenciáltsági foknak megfelelően.

Az IL-6 KO egereknél a mortalitási ráta magasabb volt a WT csoporthoz képest (20. ábra).



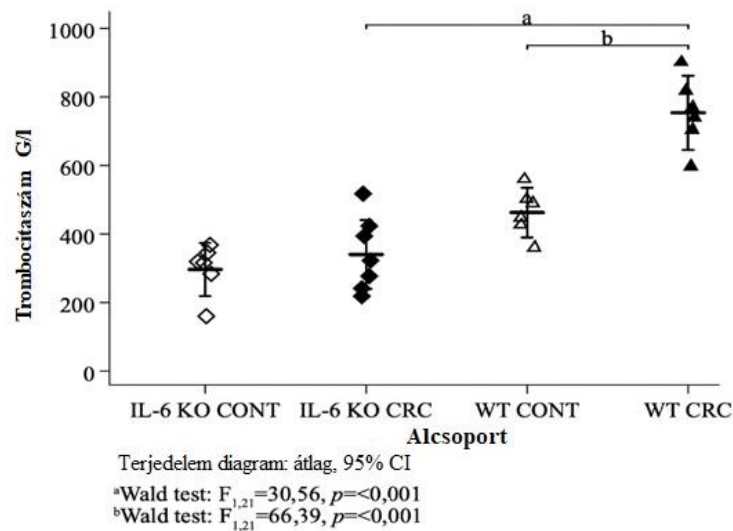
20. ábra: Mortalitási ráta a WT CRC és az IL-6 KO CRC alcsoportokban (mindkét alcsoportban $n=9$). A mortalitási ráta számolása: a 12. hétig elpusztult állatok számának osztása az 1. napon élő állatok számával.

Az IL-6 KO állatoknál a gyulladás súlyosabb volt az egyes kezelési ciklusokat követően a decimális pontrendszer alapján (21. ábra), ezért ebben a csoportban több állatot hullott el a végpont elérése előtt.



21. ábra: Decimális pontrendszer a gyulladás súlyosságának mérésére. Fehér – normális széklet, sárga – vizes/laza széklet, kék – vér a perianális régióban, piros – rektális prolapszus, granuláció, fisztula. A 9. hét után több állat nem pusztult el, a gyulladási jelek fokozatosan megszűntek.

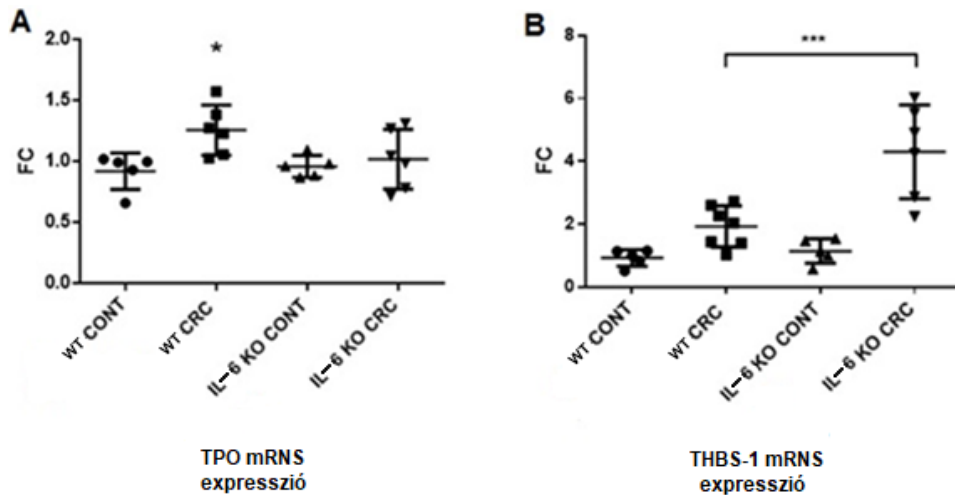
A vérlemezkeszám normális eloszlást mutatott (Shapiro-Wilk teszt $p = 0,14$, $p = 0,71$, $p = 0,98$, $p = 0,99$ az IL-6 KO kontrollban, IL-6 KO kezelt, WT kontroll és WT kezelt állatokban), egyenlő arányú variánsokkal az alcsoportokban (Bartlett-féle teszt $p = 0,68$). Az átlag vérlemezkeszám különbözött a négy alcsoportot összehasonlítva (ANOVA $F_{3,21} = 31,16$, $p < 0,001$). A kezelt csoportokat vizsgálva az átlag (\pm SD) trombocitaszám szignifikánsan magasabb volt (Wald-próba $F_{1,21} = 30,56$, $p < 0,001$) a WT csoportban (754 ± 103 G/l), mint az IL-6 KO állatoknál (340 ± 109 G/l). Mindkét genotípusban a vérlemezkeszám alacsonyabb volt a kontroll, mint a kezelt csoportokban, és ez a különbség szignifikáns volt (Wald-próba $F_{1,21} = 66,39$, $p < 0,001$) a vad genotípus esetén (22. ábra).



22. ábra: Vérlemezkeszám az alcsoportok szerint (G/l). (IL-6 KO CONT n=6, IL-6 KO CRC n=7, WT CONT n=6, WT CRC n=6). Közösleges legkisebb négyzetek (OLS) regresszió, Wald-teszt.

PCR eredmények

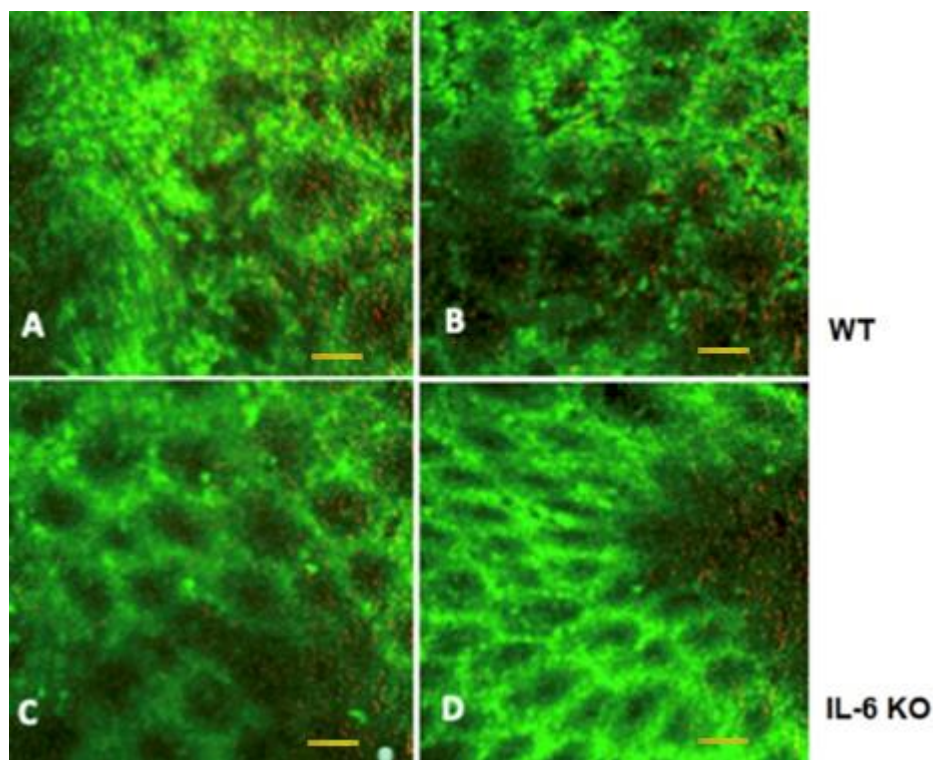
A máj TPO génexpressziója magasabb volt a WT CRC modellcsoportban, mint a többi csoportban (23. ábra). Az átlagos TPO szint hasonló volt a kontrollcsoportokban és az IL-6 KO CRC modellcsoportban, bár az IL-6 KO CRC állatoknál nagyobb volt az adattartomány. Ezzel szemben a THBS-1 gén expressziója a májban szignifikánsan emelkedett volt az IL-6 KO csoportban a többi csoporthoz képest. A kontrollcsoportok között nem volt különbség a THBS-1 expresszió tekintetében, míg a WT kezelt csoportba tartozó egereknél enyhén emelkedett expressziót találtam, amely nem érte el a szignifikanciát.



23. ábra: (A) *TPO* és (B) *THBS-1* mRNS expresszió a májban. Az mRNS expresszióját kvantitatív valós idejű PCR-rel mértük. (WT CONT $n = 5$, WT CRC $n = 6$, IL-6 KO CONT $n = 5$, IL-6 KO CRC $n = 6$) Az adatok az átlagot (SD) jelentik. (A) * $p < 0,05$ (B) *** $p < 0,001$ (FC = változás nagysága).

Intralumináris fluoreszcens endomikroszkópia

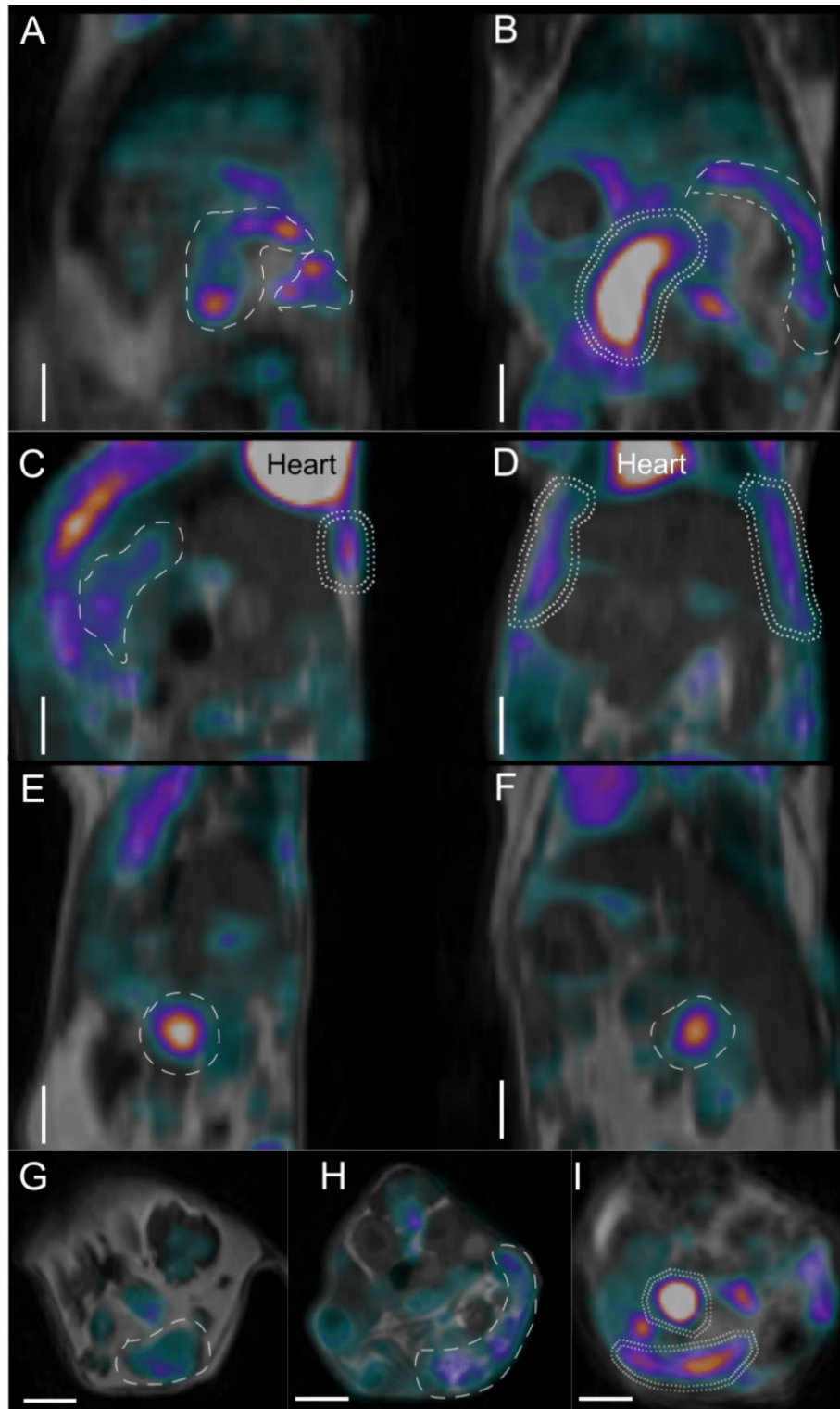
Az intraluminális endomikroszkópia jelentős különbség mutatkozott az állatok között. Akriflavin magfestés után a daganatos WT állatokban az nyálkahártya lumenális felszínéről készült in vivo képeken a kripták aszimmetrikus mintázata volt látható. A kripták nyílásának átmérője nagyobb volt, és alakjuk eltért a szokványos körkörös formától. Emellett a kripták falait látszólag nagyobb mértékben infiltrálták sejtek, és az összes sejtartalom magasabb volt. Vörös csatornával fokozott nyáktermelést lehetett kimutatni. Az IL-6 KO állatokban mind az in vivo, mind a terminálást követő vizsgálat során a kripták morfológiája a normálhoz hasonló volt, szabályos kriptamintázattal (24. ábra).



24. ábra: *WT és IL-6 KO egerek vastagbéléről készült intraluminális fluoreszcens endomikroszkópos képek. (A) in vivo intraluminális kép; (B) ex vivo kép a nyálkahártyafelszínről vastagbél tumoros WT egérben; (C) in vivo intraluminális kép; (D) ex vivo kép a nyálkahártyafelszínről IL-6 KO egérben, gyulladás-asszociált vastagbél daganatban. 488 nm (zöld) és 660 nm (piros) kétsávos fluoreszkáló Cellvizio endomikroszkópos képek. A méretjelző sáv 50 mikront jelent valamennyi képen.*

Képkalkotó vizsgálatok

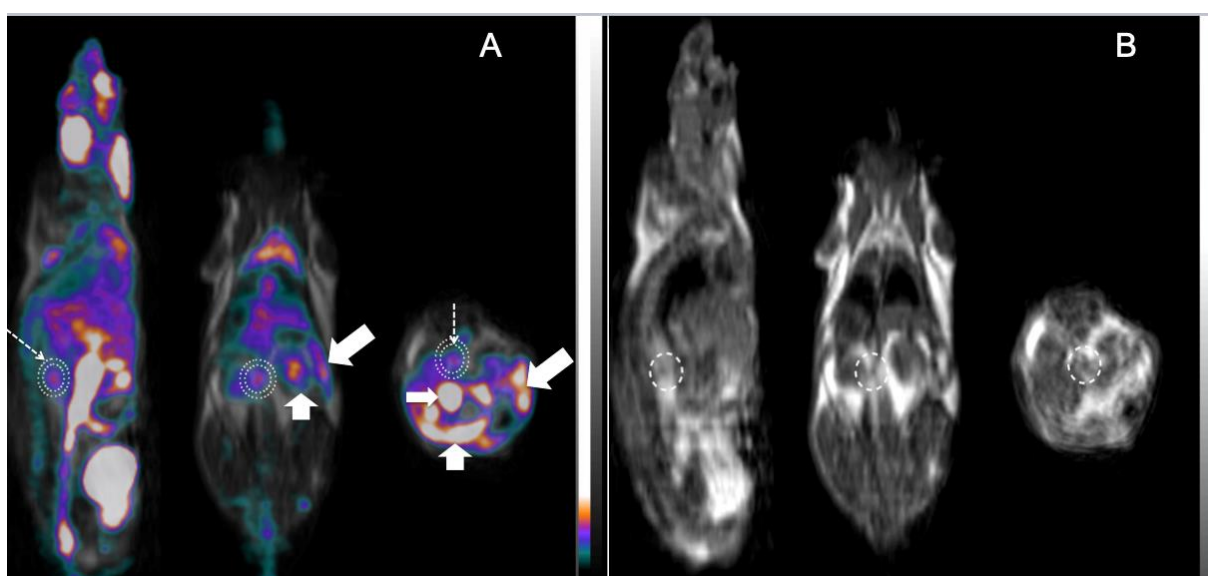
A PET/ MRI képek is egyértelmű különbségeket mutattak a WT és IL-6 KO állatok között (25. ábra). A WT egérben az FDG-felvétel a kolon deszcendensben és transzverzumban nagyon magas volt a tumoros gócnak megfelelően (25. ábra, A, B, I). Az IL-6 KO egerekben a vastagbélben az FDG-felvétel nem volt jelentős, a nyirokcsomók érintettsége nem volt kimutatható (25. ábra, C, D, G, H). Egyidejűleg azonban fokozott peritoneális FDG-felvételt figyeltem meg, és a vékonybélben is azonosítottam egy gócot (25. ábra, E, F).



25. ábra: PET/MRI képek WT (A, B, I) és IL-6 KO (C – H) egerek hasi régiójáról három síkban. (A) WT egér szagittális sík; (B) a WT egér koronális sík; (C, E) IL-6 KO egerek szagittális sík; (D, F) IL-6 KO egerek koronális sík; (G, H) IL-6 KO egerek axiális sík; (I) a WT egér axiális sík. A magas FDG-felvételt mutató területek (több mint 0,2 standardizált felvételi érték (SUV érték)) szaggatott vonallal vannak körülhatárolva. A kettős szaggatott vonal nagyon magas (0,4

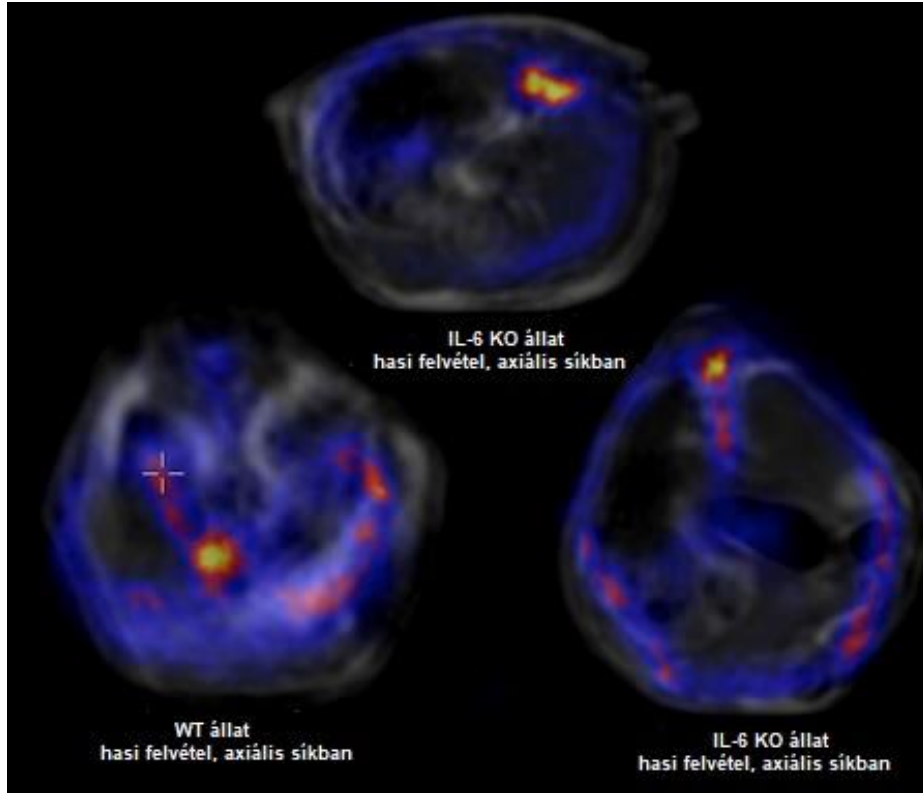
SUV érték feletti) FDG-felvételt mutató területet mutat. A színskálák szürke árnyalatúak a háttért biztosító anatómiai MRI képeknél, míg a PET komponens alacsony felvételt jelent a fekete (nincs felvétel) és a kék (alacsony felvétel), mérsékelt felvételt a lila és a vörös, és magasabb FDG-felvételt a vörös, a sárga és a fehér (a legnagyobb felvétel) színek esetében. A szív referenciaként a C és D panelen található. A fehér skála sávjai mindegyik panelen 500 mikronnak felelnek meg.

Az PET/MRI képeken a gyulladásos reakciók és a vízjel intenzitásfokozódása is jelentősebb volt a WT állatban. Az MRI-vel egy megnagyobbodott retroperitoneális nyirokcsomó volt kimutatható, melynek FDG-felvétele közepesen magas volt (26. ábra).



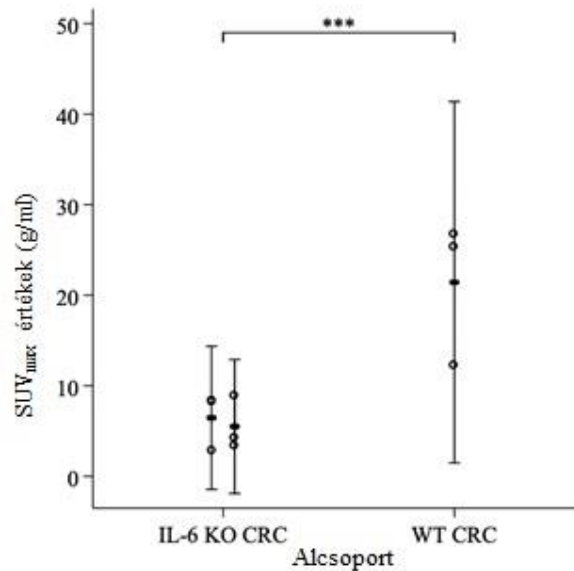
26. ábra: (A) WT állat PET/MRI képek. (B) WT állat MRI képek. (A) A gyulladásos reakciók és a vízjel intenzitásfokozódások jelentősek. Kettős körrel és szaggatott nyíllal jelölve egy közepes FDG-felvételt mutató, megnagyobbodott, retroperitoneális nyirokcsomó. (B) A PET/MRI képeken azonosított nyirokcsomó szaggatott körrel jelölve. Mindkét képen azonos sorrendben láthatóak az állatról készült 2D metszetek szaggitális (bal), koronális (középső) és axiális (jobb) síkban.

Az egerek elhelyezése a több állat egyidejű vizsgálatára alkalmas ágyban lehetővé tette a rekonstruált PET/MRI képek összehasonlító áttekintését a has axiális síkjában (27. ábra).



27. ábra: Két IL-6 KO és egy WT állat axiális hasi PET/MRI képe több állat egyidejű vizsgálatára alkalmas ágyon. A kereszt jelzés a vastagbél falában az FDG akkumulációt mutatja.

Összehasonlítottam az FDG-felvételt a WT állat és a két IL-6 KO állat magas aviditású tumoros gócaiban. Az FDG felvétel szignifikánsan nagyobb volt a WT állatban az IL-6 KO állatokhoz képest ($p < 0,001$) (28. ábra).



28. ábra: Az FDG-felvétel összehasonlítása a magas aviditású daganatos gócok területén a WT állatban és a két IL-6 KO állatban, kevert hatás modell. Körök: három legmagasabb aviditású terület SUV_{max} értékei. Tartomány-diagram: SUV_{max} átlag, 95% CI állatonként. *** Kevert hatás modell, az IL-6 státusz változatlan hatása (IL-6 KO vs. WT): $p < 0,001$.

Összességében a WT állat magasabb FDG-felvételt és -felhasználást mutatott, illetve egyidejűleg intenzívebb és nagyobb vastagbél FDG-felvételi gócokat lehetett kimutatni kvalitatív képanalízissel, mint ami az IL-6 KO állatoknál megfigyelhető volt (8. táblázat).

8. táblázat: Különbségek PET FDG-felvételben. A daganatos gócokat tartalmazó vizsgált vastagbél volumen területén mért PET FDG-felvétel különbségei a képalkotó vizsgálaton átesett egerekben.

Állat	Átlagos standardizált felvételi érték a vastagbélben (g/ml)	Vastagbél radioaktivitás tartalma vs. teljes test radioaktivitása
1 WT CRC egér	0,43	20,1%
2 IL-6 KO CRC egér	0,15	5,3%
3 IL-6 KO CRC egér	0,27	6,8%

6. MEGBESZÉLÉS

Preoperatív trombocitózis

A preoperatív vérlemezkeszám és a gasztrointesztinális szolid tumorok progressziója közötti kapcsolat vizsgálatával számos közlemény foglalkozik (9. táblázat). Azonban a szerzők egy része nem a laboratóriumi felső határérték (cut-off érték: 400 G/l) feletti szintnél határozza meg a trombocitózist. Nem meglepő módon, amennyiben a cut-off értéket lejjebb viszik, a prevalencia is nagyobb lesz. Ezzel ellentétes mindössze egyetlen vizsgálat eredménye: Cravioto-Villanueva 350 G/l feletti értékben határozta meg a trombocitózist, de csak a betegek 8%-nál fordult elő emelkedett vérlemezkeszám (180), szemben a többi közleményben megjelent 10-13%-os prevalenciával 400 G/l cut-off értéknél (130, 181-183). Azonban a betegszelekciót illetően számos probléma merül fel. A vizsgálatba bevontak 44 olyan beteget is, akiknek egyidejűleg legalább két daganata volt, 5 betegnél pedig perforáció miatt végeztek műtétet. Mindkét esetben rövidebb túlélés és magasabb vérlemezkeszám várható a nagyobb tumorterhelés, illetve a perforációt kísérő gyulladás miatt (184).

Nyelőcsődaganatokban három vizsgálat során a trombocitózisnak nem volt prognosztikai értéke. Ezekben a vizsgálatokban 400 G/l-t választottak vágóértéknek. Aminian nem csoportosította a betegeit a trombocitózis alapján, ezért nehéz értékelni az eredményeit (185). A másik vizsgálatban a betegek majdnem egyharmada neoadjuváns kemoterápiát kapott, amely befolyásolhatta a vérlemezkeszámot (186). Hasonlóan nagy arányban (152/292) kaptak a betegek kemoterápiát a műtét előtt Ling vizsgálatában is, aki viszont a Shimada által javasolt alacsonyabb vágóértéket alkalmazta (293 G/l) (187). A neoadjuváns kezelést a műtéti beavatkozás előtt 4-5 héttel fejezték be, és nem találtak szignifikáns különbséget a neoadjuváns kezelésben részesült (271 ± 94 G/l) és nem részesült (263 ± 78 G/l) betegek trombocitaszáma között. Figyelemreméltó, hogy a vérlemezkeszám és a túlélés közötti összefüggés közel-szignifikáns volt. Két másik vizsgálatban, melyekben a trombocitózis és a túlélés között szignifikáns összefüggést közöltek, az alkalmazott vágóérték alacsony volt. Feng és mtsai elkészítettek egy vevő működési karakterisztika (ROC) görbét a túlélésre vetített optimális cut-off pont meghatározása céljából (188). Azonban, amikor a Shimada által javasolt értéket alkalmazták, a trombocitózis prevalenciája 11,5%-ra csökkent, és a szignifikancia eltűnt.

Az átlag vérlemezkeszám általában relatív alacsony a nyelőcsődaganatos betegekkel végzett vizsgálatokban (Shimada: 249 ± 84 G/l, Aminian: 245 ± 76 G/l, Feng: 209 ± 71 G/l), amely indokolhat egy alacsonyabb cut-off értéket, melyet a szerzők egy része használt. Érdekes módon egyik vizsgálatban sem keresték az alacsony átlag vérlemezkeszám okát.

Gyomortumorban Hwang és mtsai univariáns analízissel azt találták, hogy a trombocitózis összefüggést mutat a rosszabb túléléssel, ami azonban multivariáns analízissel már nem igazolódott (189). Az eredményüket a vizsgálati kohorsz kis méretével magyarázták. Hu cut-off értéként nemcsak 400 G/l-t, hanem 300 G/l-t is használt, mivel a helyi laboratóriumban a vérlemezkeszám normál tartománya 100 G/l és 300 G/l között van (190). Természetesen több betegnél találtak trombocitózist, ha a cut-off értéket lejjebb vitték (12,08% vs. 4,03%), azonban a rosszabb prognózissal szignifikáns összefüggés csak a 400 G/l csoportban igazolódott.

Bár Sasaki szignifikáns összefüggést talált a trombocitózis és a túlélés között CRC-ben szenvedő betegeknél, azonban a szignifikancia eltűnt az 1. és 4. stádiumú betegeknél, amikor stádium szerint elemezték az adatokat (182). Ez azért is érdekes a 4. stádiumú betegek esetében, mivel a trombocitózis összefüggést mutatott a daganat méretével és az invázió mélységével, és ez az összefüggés erős volt a T-faktor progressziójával, különösen T3-T4 esetén multivariáns analízissel. A szerzők azzal magyarázták ezt a jelenséget, hogy ebben a két csoportban alacsony volt a betegek száma. A betegeket további alcsoportokra osztották a korábbi vizsgálatokban között vágóértékeknek megfelelően (370-400 G/l, 400-450 G/l és >450 G/l), de az alcsoportok között nem találtak szignifikáns különbséget a prognózis tekintetében a normál trombocitaszámú betegekkel összehasonlítva. Érdekes még megjegyezni, hogy 30 olyan beteget is bevontak a vizsgálatba, akiknek két vagy több primer CRC-je volt, azonban az adataikat nem elemezték külön. Wan és mtsai a műtét előtti 1 hónapban vizsgálták a trombocitaszámokat: az ebben az időszakban mért minimum, maximum és átlag vérlemezkeszámnak megfelelően értékelték a kimenetelt (183). Mindhárom érték elemzése hasonló eredményt hozott, de a legerősebb szignifikanciát a maximum értéknél találták. A 9. táblázatban az átlag vérlemezkeszám *p*-értéke található. Amikor a műtét előtti egy évben, különböző időpontokban történt laboratóriumi vizsgálatok eredményeit tanulmányozták, hasonló eredményeket kaptak. Elemezték a magasabb vérlemezkeszám hosszú távú hatásait is: a trombociták okozta fokozott halálozási rizikó kb. 3 évig volt

megfigyelhető a műtétet követően. Egyetlen olyan vizsgálatot találtam, amelyben nem mutattak ki szignifikáns prognosztikai összefüggést a CRC-ben szenvedő betegeknél (191). Ennek hátterében az valószínűsíthető, hogy Nyasavajjala magasabb cut-off értéket (450 G/l) alkalmazott, és a medián követési idő inkább rövidebb volt (22 hónap). A vizsgálat másik gyenge pontja az lehet, hogy 36 in situ karcinómában szenvedő beteget is bevontak. Az in situ karcinómát nem kíséri trombocitózis, ráadásul a túlélés gyakorlatilag 100%. Ennek ellenére, a szerzők azt a következtetést vonták le, hogy a preoperatív trombocitózisnak – függetlenül a patológiai stádiumoktól – nincs prognosztikai ereje a CRC túlélés tekintetében. Emellett a trombocitózis és a rövidebb túlélés közötti összefüggés a többi vizsgálatban pusztán a kis kohorszok következménye.

9. táblázat: *A preoperatív trombocitózis prevalenciája a különböző gasztrointesztinális tumorokban*

Tumor	Esetszám	Trombocitózis G/l	Trombocitózis prevalenciája	<i>p</i>	Hivatkozás	
Nyelőcső	374	>293	21,1%	0,009	Shimada ⁽¹⁰⁴⁾	
	381	>400	3,4%	n.a.	Aminian ⁽¹⁸⁵⁾	
	112	>400	4,46%	0,644	Dutta ⁽¹⁸⁶⁾	
	291	>293	19,9%	0,054	Ling ⁽¹⁸⁷⁾	
	425	>205	48,47%	< 0,001	Feng ⁽¹⁸⁸⁾	
Gyomor	369	>340	11,4%	0,015	Ikeda ⁽¹⁹²⁾	
	1593	> 400	6,4%	< 0,043	Hwang ⁽¹⁹³⁾	
	1596	>400	7,5%	< 0,01	Li ⁽¹⁹⁴⁾	
	1763	>400	16,9%	< 0,008	Hu ⁽¹⁹⁰⁾	
Vastagbél	490	> 300	49,8%	0,007	Ishizuka ⁽¹⁹⁵⁾	
	163	>350	8%	0,001	Cravioto-Villanueva ⁽¹⁸⁰⁾	
	198	> 400	12,1%	0,00001	Kandemir ⁽¹⁸¹⁾	
	336	>400	13,4%	< 0,001	Baranyai ⁽¹³⁰⁾	
	636	>370	12,1%	<0,001	Sasaki ⁽¹⁸²⁾	
	314	>370	22%	0,001	Kim* ⁽¹⁹⁶⁾	
	1513	>400	10,1%	0,00091	Wan ⁽¹⁸³⁾	
	630	> 450	8,1%	0,067	Nyasavajjala ⁽¹⁹¹⁾	
	Máj	1154	>400	2,7%	<0,001	Hwang ⁽¹⁹⁷⁾
		634	>400	8,2%	<0,0001	Carr ⁽¹⁹⁸⁾
Hasnyálmirigy	205	>300	27,3%	0.7	Domínguez ⁽¹⁹⁹⁾	

199	>300	16,6%	0,0002	Chadha ⁽²⁰⁰⁾
109	>300	26,6%	0,03	Brown ⁽²⁰¹⁾
105	>400	n.a.	0,043	Suzuki ⁽²⁰²⁾

n.a.: nincs adat

* Csak végbéltumoros betegek, neoadjuváns kemoirradiáció előtt

Hasnyálmirigy daganattal foglalkozó közleményekben a szerzők általában alacsonyabb, 300 G/l vágóértéket választottak. Domínguez vizsgálatában 355 G/l, míg Brown esetében 376 G/l volt a medián vérlemezkeszám az emelkedett vérlemezkeszámú betegcsoportban, miközben mindketten azonos gyakorisággal jelentettek trombocitózist (199, 201). Ugyanakkor Domínguez nem talált összefüggést a trombocitózis és a rosszabb onkológiai kimenetel között, szemben Brown eredményeivel. Nem adható egyértelmű magyarázat erre a különbségre. Nem található adat arra vonatkozóan, hogy milyen arányban volt azok aránya, akiknek a vérlemezkeszáma 400 G/l volt, illetve az milyen összefüggést mutatott a túléléssel. Chadha és mtsai irrezekábilis, előrehaladott stádiumú pankréasztumoros betegeket vizsgáltak a radiokemoterápia megkezdése előtt, és mind az univariáns, mind a multivariáns analízis igazolta a trombocitózis prognosztikai szerepét a teljes és a progressziómentes túlélés tekintetében is (203). Hasonló tendencia volt megfigyelhető, ha a vágóértéket felemelték (>350 G/l, >400 G/l, >450 G/l); azonban a minta mérete ezekben a csoportokban alacsony statisztikai erejű volt ahhoz, hogy szignifikanciát lehessen belőle számítani. Suzuki és mtsai 400 G/l cut-off érték mellett szignifikáns különbséget találtak az alacsony és a magas trombocitaszámú csoportok között (46,6 vs. 4,9 hónap) (202). Azonban nagyszámú beteget cenzoráltak a betegségmentes intervallum görbe alatt, mielőtt a mediánt elérték volna, ami miatt az eredményeik megkérdőjelezhetőek.

Ha tovább elemezzük a közleményeket, megállapítható, hogy közel azonos a prevalencia az egyes daganattípusokban, ha azonos cut-off értéket alkalmazunk. Másrészt a prevalencia eltér a különböző daganatokban, ha ugyanazt a cut-off értéket használjuk. Ez valószínűleg a különböző szervek eltérő tumorbiológiájával magyarázható. Több vizsgálatban is a 400 G/l-től eltérő cut-off értéket alkalmaztak, mivel a normál tartomány felső határa az adott laboratóriumban/országban ettől eltérő volt. Az egyes vizsgálatok összehasonlíthatóságát tovább nehezíti, hogy a trombocitaszámot számos tényező befolyásolja, úgymint az életkor, a nem vagy a rassz. Fontos lenne, hogy a betegek teljes

túlélése és a vérlemezkeszám közötti összefüggést olyan statisztikai módszerekkel elemezzék, amelyek ezeket a folyamatos változókat is figyelembe veszik.

A legtöbb vizsgálatban az eredmények azt mutatják, hogy a trombocitózis korrelál a daganat méretével, az invázió mélységével és a regionális nyirokcsomók érintettségével, azaz, minél előrehaladottabb a betegség, annál nagyobb eséllyel kíséri emelkedett vérlemezkeszám.

A pontosabb adatok elérése érdekében javasolt lenne a következő kizárási kritériumok bevezetése, mivel az alábbi tényezők jelentősen befolyásolják a trombocitaszámot vagy a túlélést: mieloproliferatív betegség, akut vagy krónikus gyulladás, autoimmun betegségek, kortikoszteroid kezelés, preoperatív trombocita aggregáció gátló terápia, kemoterápia, irradiáció, lépeltávolítás, tromboembóliás szövődmény, inkomplett tumorreszekció (R1 vagy R2), szinkron daganat vagy áttét jelenléte.

Mivel a különböző közleményekben eltérő vágóértékeket alkalmaznak, nehéz összehasonlítani az eredményeket. Ezért véleményem szerint a jövőbeni vizsgálatokban a trombocitózis meghatározásánál egységes vágóérték, pl. a laboratóriumi felső határérték alkalmazása (> 400 G/l) javasolt abban az esetben is, ha a szerzők egyébként ettől eltérő cut-off értékkel is szeretnék közölni az eredményeiket. Ezáltal a különböző vizsgálatok adatai összehasonlíthatóvá válnak, és a trombocitózis szerepe az egyes daganatokban könnyebben felismerhetővé válik.

Posztoperatív trombocitózis

Míg számos közlemény foglalkozik a preoperatív vérlemezkeszám prognosztikai értékével, addig csak néhány vizsgálat foglalkozik a posztoperatív vérlemezkeszám elemzésével. Amennyiben a trombocitózis és a daganat között valóban ok-okozati összefüggés van, akkor a trombocitaszám lecsökken a daganat reszekcióját követően, illetve ismét megemelkedik, ha a daganat rekurál. Az ilyen jellegű vizsgálatok kis számának háttérében az állhat, hogy nehéz kiválasztani az optimális időpontot a vérvételhez a műtéti beavatkozást követően, hogy kizárható legyen a műtét hatása, emellett számos tényezőt is figyelembe kell venni, mint pl. a sebgyógyulási zavart, a varratelégtelenséget, a transzfúziót, az adjuváns kezelés megkezdését, ezen belül is

elsősorban a kemoterápiát. Irodalmi adatok alapján a fehérvérsejtek és a vérlemezkék citosztatikus terápia utáni nadírja két hét (204).

Spence és mtsai nyelőcső daganatos betegeknél hasonlították össze a szérum és plazma VEGF szintet és a vérlemezkeszámot a műtét előtt és a műtét után 6 héttel (205). Hét esetben a méréseket elvégezték az 1., 5. és 10. posztoperatív napon is: a műtét után a szérum és a plazma VEGF szint többszörösére emelkedett, majd a 6. hétre a kiindulási szintre esett vissza. A vérlemezkeszám mindkét VEGF szinttel korrelált. A VEGF származhat mind az aktivált vérlemezkékből, mind a gyógyuló sebből: ezért a szerzők arra hívták fel a figyelmet, hogy a VEGF, és ezzel párhuzamosan a vérlemezkeszámot a korai posztoperatív időszakban óvatossággal kell kezelni.

Ling a trombocitaszám változását elemezte a műtét előtti időszaktól kezdve a posztoperatív 1., 10. és 30. napon 291 nyelőcsőtumoros betegnél (187). A vérlemezkeszámban egy jelentős esést találtak a preoperatív ($267 \text{ G/l} \pm 86$) és az 1. posztoperatív nap ($216 \text{ G/l} \pm 85$) között, amelyet egy nagymértékű emelkedés ($421 \text{ G/l} \pm 149$) követett (az 1. és a 10. posztoperatív nap között). Végül egy enyhe csökkenést észleltek a 30. napra ($393 \text{ G/l} \pm 164$). Szignifikáns túlélési előny ($p = 0,0027$) igazolódott azoknál a betegeknél, akiknél a 10. posztoperatív napon trombocitózist jelentkezett, de nem derült fény szignifikáns összefüggésre az 1. és a 30. posztoperatív nap értékei esetében.

Hu 71, preoperatív trombocitózist mutató gyomordaganatos betegnél elemezte a vérlemezkeszám változását 4 héttel a műtétet követően és az utánkövetés során (190). A 4. hétre a betegek 42,25%-nál csökkent vissza a normálértékre a trombocitaszám. Azoknál a betegeknél, akiknek a trombocitózisa nem szűnt meg, rosszabb túlélést találtak. Azoknak a betegeknél, akiknek a preoperatív emelkedett vérlemezkeszáma a műtét után normál tartományba csökkent, a recidívára való hajlama nagyobb volt, mint a normál preoperatív trombocitaszámú betegeknél ($70,8\%$ vs. $24,1\%$, $p = 0,004$).

Saját anyagunkban 336 CRC-ben szenvedő beteg pre- és posztoperatív vérlemezkeszámát hasonlítottuk össze (130). Műtét után 1 hónappal végzett laborvizsgálat eredményeit vettük figyelembe. Ezt az időintervallumot az alapján választottuk, mivel feltételeztük, hogy a fiziológiás sebgyógyulást kísérő gyulladás zavaró hatásai addigra elmúlnak, illetve az adjuváns onkológiai kezelést ekkor még nem kezdték meg. A trombocitaszám szignifikánsan csökkent a daganat eltávolítását

követően a preoperatív értékhez képest. Ennek ellenére a túlélés tekintetében a prognosztikai ereje nem változott. Sőt, a posztoperatív trombocitózis, ami 40 betegnél (11,9%) volt megfigyelhető, erősebb prediktív tényezőnek bizonyult, mint a preoperatív trombocitózis.

HCC esetében Hwang szintén a vérlemezkeszám jelentős csökkenéséről számolt be a daganat eltávolítását vagy a transzkatéteres artériás kemoembolizációját (TACE) követően (197). A vérvétel időpontja műtét után 3 és 6 héttel volt, a kemoterápia megkezdése előtt. A csökkenés a 6. héten jelentősebb volt. Az utánkövetés során a vérlemezkeszám ismét megemelkedett, amennyiben a daganat rekurált. Ha a trombocitózisos betegek nem kaptak kezelést, a vérlemezkeszám progresszív emelkedését figyelték meg. Az eredményeiket korlátozza az a tény, hogy csak kisszámú betegnél jelentkezett trombocitózis ($n = 31$), és közülük csak 10 betegnél végeztek műtétet vagy TACE kezelést.

Összességében ezeket az elemzéseket különböző daganattípusoknál végezték. Ling eredményei a 3 vizsgálat megfigyeléseitől eltérő trendet mutatnak. Spence eredményeit figyelembe véve a posztoperatív 10. napon észlelt vérlemezkeszám emelkedés a műtét következménye lehet; kérdés, hogy a szervezet jobb válaszkészsége fordítódik le jobb prognózisra. Megfelelő betegszámú vizsgálatokra van szükség, hogy a posztoperatív trombocitózis jelentőségét tisztázni lehessen.

Trombocitózis és áttétképződés

Akárcsak a posztoperatív trombocitózis esetében, csak néhány vizsgálat áll rendelkezésre, amelyekben a preoperatív trombocitózis és az áttétképződés kapcsolatát vizsgálják (10 táblázat). Gyomordaganatban Hwang arról számolt be, hogy a teljes recidíva ráta szignifikánsan magasabb volt az emelkedett, mint a normál vérlemezkeszámú csoportban (189). A további vizsgálatok azt igazolták, hogy ezt a jelenséget nem a lokoregionális recidíva, hanem a hematogén áttétképződés okozta. Li vizsgálatában a trombocitózis betegeknél nagyobb arányban fordult elő nyirokcsomó és távoli áttét (194). Ezzel szemben Hu nem talált szignifikáns összefüggést a magasabb trombocitaszám és a nyirokcsomó vagy távoli áttét között a diagnózis idején, függetlenül a cut-off érték meghatározásától (> 300 G/l vagy > 400 G/l) (190). Ugyanakkor a TNM beosztással szignifikáns volt az összefüggés. A betegek 42,25%-ánál a trombocitózisos

betegek trombocitaszáma a normál tartományba süllyedt a daganat eltávolítása után. Amennyiben a vérlemezkeszám ismét megemelkedett, úgy ez ebben a betegcsoportban érzékeny indikátora volt a recidíva megjelenésének a normál preoperatív vérlemezkeszámú betegekhez képest ($p = 0,01$). A vizsgálat adataiból nem derül ki, hogy ez a lokoregionális és a távoli áttétekre is igaz-e.

10. táblázat: *A trombocitózis és az áttétképződés prevalenciája közötti összefüggés*

Tumor	Esetszám	Trombocitózis szintje G/l	<i>p</i>	Hivatkozás
Gyomor	1593	>400	< 0,001	Hwang ⁽¹⁹³⁾
	1596	>400	< 0,01	Li ⁽¹⁹⁴⁾
	1763	>400	< 0,002	Hu ⁽¹⁹⁰⁾
Vastagbél	636	>370	< 0,003	Sasaki ⁽¹⁸²⁾
	779	>400	< 0,00011	Wan ⁽¹⁸³⁾

A vérlemezkeszám és a távoli áttétképződés/recidíva kialakulása közötti összefüggést elemző vizsgálatok alapján a távoli áttét kialakulása vagy jelenléte összefüggésbe hozható a trombocitózissal. Ez egybevágh azokkal az alap kutatásokkal, hogy a vérlemezkeknek fontos szerepük van az érpályában keringő daganatsejtek védelmében. További fontos megfigyelés, hogy recidíva kialakulásakor a trombocitaszám ismét megemelkedik. Ezzel felmerül annak a lehetősége, hogy egy olcsó, könnyen hozzáférhető vizsgálattal monitorozni lehessen a kórképet.

Tumor-indukálta trombopoézis

A szérum IL-6 szint és a túlélés közötti összefüggés vizsgálatáról kevés közlemény áll rendelkezésre (11. táblázat). Három gyomor-, két-két hasnyálmirigydaganattal, HCC-vel és CRC-vel foglalkozó vizsgálatban a betegek száma relatív alacsony, szemben a vérlemezkeszámmal foglalkozó vizsgálatokkal. Az egyes daganattípusok között, illetve a daganattípusokon belül is jelentős eltérés volt a szérum

IL-6 szintben, ennek ellenére valamennyi elemzés alapján az emelkedett szérum IL-6 szint összefüggést mutatott a rosszabb túléléssel.

11. táblázat: Szérum IL-6 szint és a túlélés különböző gasztrointesztinális daganatokban

Tumor	Esetszám	Szérum IL-6 pg/ml	<i>p</i>	Hivatkozás
Gyomor	60	1,97	0,05	Ashizawa ⁽²⁰⁶⁾
	115	6,77	0,010	Kim ⁽²⁰⁷⁾
	155	13	0,026	Liao ⁽²⁰⁸⁾
Hasnyálmirigy	51	5,2	0,05	Ebrahimi ⁽²⁰⁹⁾
	78	13,1	0,004	Mroczo ⁽²¹⁰⁾
HCC	110	10	0,05	Jang ⁽²¹¹⁾
	330	7,1	0,015	Nakagawa ⁽²¹²⁾
Vastagbél	40	32,8	0,05	Li ⁽²¹³⁾
	164	11,9	0,05	Chung ⁽²¹⁴⁾

6.1. Az IL-6 és a gasztrointesztinális daganatokat kísérő trombocitózis közötti összefüggés

Egyre több megfigyelés mutat abba az irányba, hogy a krónikus gyulladás elősegíti a sejtek és szövetek malignus transzformációját (215). A daganatok és a gyulladás közötti szoros kapcsolatot az is alátámasztja, hogy a gyulladáscsökkentő gyógyszerek alkalmazása segít a malignus betegségek megelőzésében. Számos gasztrointesztinális daganattípusban magasabb szérum IL-6 szintet észleltek (216, 217). A STAT3 –függő tumorgenezis összefüggésben van az IL-6 lokális szekréciójával CRC-ben (161). Emellett az M2 makrofágok által termelt IL-6 daganat kialakulásához vezet kólitisz ulcerózában (218). Mivel a gyulladás elősegíti a gasztrointesztinális daganat növekedését és progresszióját az IL-6 által mediált STAT3 útvonal aktiválásán keresztül, feltételezhető, hogy szoros összefüggés van az IL-6, a gyulladás és a daganatos progresszió között.

Stone és mtsai közleménye óta más vizsgálat nem támasztotta alá, de nem is cáfolta meg a teóriájukat. Vizsgálatommal univariáns analízissel összefüggést találtam a magasabb vérlemezkeszám és a szérum IL-6 szint között. Ha az összefüggést tumortípus szerint vizsgáltam, közepesen erős összefüggést találtam a nyelőcső- és a vastagbél-daganat tekintetében. Eredményeim szintén igazolták, hogy a szérum IL-6 szint magasabb volt előrehaladott stádiumban. A malignus betegségeket kísérő trombocitózist gyakran az anémia következményének tartják. Az általam vizsgált betegeknél negatív korrelációt találtam a hemoglobin szint és a trombocitózis között. Emellett a fehérvérsejtszám szignifikáns összefüggést mutatott az emelkedett vérlemezkeszámmal. Ez mindenképpen abba az irányba mutat, hogy gyulladásos folyamatok befolyásolják mindkét paramétert.

6.2. Az IL-6 expresszió vizsgálata kolorektális adenokarcinómában szenvedő betegeknél

Úgy tűnik, hogy az IL-6 jelentős hatással van a kolorektális tumorok sejtjeire. Kimutatták, hogy az IL-6 in vitro elősegíti a daganatos sejtek növekedését (163). Ezenkívül az IL-6 elősegíti a tumor progresszióját, mert bebizonyították, hogy dózisfüggő módon fokozza a daganatos sejtek kolóniaképződését (219). Hatására növekszik a kolorektális karcinóma sejtjeinek invazivitása (220). A tumorokban az IL-6-t leginkább maguk a tumorsejtek, tumor-asszociált makrofágok (TAM-ok), CD4 T-sejtek, fibroblasztok és mieloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) expresszálják (221, 222).

A vizsgálatom során a kifejezett IL-6 expressziót mutató sejtek maguk a tumorsejtek voltak. Eredményeim alapján az IL-6 expresszió mértékét nem befolyásolta a szövettani differenciáltsági foka. Ez ellentmond Brozek és munkatársai eredményeinek, akik kimutatták, hogy az IL-6 szint normál humán nyálkahártyában alacsony, adenómákban, illetve jól differenciált (G1, G2) tumorokban pedig csak kismértékben nő meg. Magas IL-6 szintet kizárólag a rosszul differenciált elváltozásoknál (G3, G4) figyeltek meg (223). A vizsgálat hátránya az alacsony esetszám, mely alapján a következtetéseiket levonták. Saját vizsgálatomban emellett összefüggést találtam az IL-6 expresszió és a daganatok stádiumai között. A rosszabb TNM stádiumokhoz fokozottabb

expresszió társult. Ezen eredményeim arra utalnak, hogy az IL-6 összefüggést mutat a kolorektális tumorok inváziójával és áttétképződésével.

A szérumban IL-6 szint emelkedésének mechanizmusa jelenleg nem ismert. Ennek egyik magyarázata a G/C polimorfizmus lehet az IL-6 gén promoter régiójának -174. pozíciójában. A -174C allélról kisebb hatékonysággal íródik át fehérje, mint a -174G allél esetében (150). Belluco megállapította, hogy szignifikánsan magasabb szérumban IL-6 szint mérhető azoknál a kolorektális tumoros betegeknél, akiknél az IL-6 génben -174G polimorfizmus mutatható ki, mint akiknél a -174C (224).

6.3. Trombocitózis és az IL-6 KO hatásai kólitisz-asszociált daganatos modellben

Emelkedett IL-6 szintet figyeltek meg különféle daganatokban, beleértve a gasztrointesztinális daganatokat is (115, 216). A trombocitózishoz hasonlóan az IL-6 is korrelál a tumor stádiumával, méretével, metasztázisával és a betegek túlélésével CRC-ben. Mind a tumorsejtek, mind a tumorszövetet infiltráló immunsejtek termelnek IL-6-ot (95, 225).

Stone és mtsai trombocitózisos, petefészekrákban szenvedő betegeket tanulmányoztak, és meghatározták számos trombopoetikus faktor (TPO, IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, G-CSF, M-CSF, SCF, Flt3-ligandum) plazmaszintjét (113). A TPO és az IL-6 plazmaszintje korrelált a vérlemezkeszámmal: a trombocitózisos betegeknél az IL-6 és a TPO plazma szintje szignifikánsan magasabb volt, ráadásul adott cut-off értékek mellett a plazma IL-6 szint és a trombocitózis egyaránt független prognosztikai tényezőnek bizonyult. Ezen eredmények alapján felvetették egy parakrin paraneoplasztikus út lehetőségét, melyben a petefészek tumor által expresszált és szekretált IL-6 fokozza a májban a TPO termelést. Ez a csontvelőben megakariopoezist indukál és megnöveli a vérlemezkeszámot, végeredményben a tumor által kiváltott trombocitózist eredményezve. Az AOM/DSS által kiváltott kólitisz-asszociált daganatos modellben szignifikánsan magasabb vérlemezkeszámot találtam a WT CRC csoportban, mint a WT kontroll vagy az IL-6 KO csoportokban. Egyidejűleg a WT CRC csoportban a májban fokozott TPO-1 expressziót mértem a többi csoporthoz képest.

Az IL-6 KO állatok esetében fokozott mortalitást észleltem a kísérlet során, mivel a bélgyulladás súlyosabb volt, mint a WT állatoknál. A harmadik ciklus DSS adása után

az IL-6 KO állatok 50%-a elpusztult ($n=9$), míg a gyulladás súlyossága miatt csak egy WT pusztult el. Hasonló megfigyelésről más szerzők is beszámoltak: ha az IL-6/gp130/STAT3 útvonal gátolt és az egereknek AOM/DSS-t adnak, akkor súlyosabb vastagbélgyulladás alakul ki, jelentősebb gyulladással és sejtes infiltráció figyelhető meg a hámsejtek kifejezettebb károsodásával és fekélyképződéssel, (161, 174, 225). Ha az IL-6 gátolt, a bél hámsejtjeinek regenerációja és proliferációja zavart szenved a sérülés típusától (fertőző vagy nem fertőző) függetlenül, és a gazdaszervezet hajlamosabb a nyálkahártya károsodásra (226, 227).

A végpontnál képzelt vizsgálatokat végeztem mindkét kezelési csoport állatainál. Az AOM/DSS okozta akut gyulladás ebben az időpontban már jelentősen alábbhagyott. Az IL-6 azonban fenntarthatja a krónikus gyulladást azáltal, hogy befolyásolja a patogén Th sejtek differenciálódását és túlélését. Ezért ebben az időpontban a WT állatnál egyidejűleg a megnövekedett tumorterhelés és a krónikus gyulladás jeleit is meg lehetett figyelni. A WT állatnál az endomikroszkópia során a nyálkahártya-gyulladásra jellemző eltéréseket találtam, míg PET/MRI vizsgálattal fokozott FDG-felvétel igazolódott a vastagbélben, a peritoneumban és a nyirokcsomóban. Ezenkívül a teljes FDG-felvétel szignifikánsan magasabb volt a WT állatban. Az IL-6 KO állatnál a vékonybélben igazolt fokálisan fokozott, illetve a peritoneumban észlelt mérsékelten fokozott FDG-felvétel nem gyógyuló gyulladással góccra és a peritoneum következményes irritációjára utalhat.

Összefoglalva, a WT állatokban szignifikánsan megemelkedett vérlemezkeszámot és TPO expressziót mutattam ki az IL-6 KO állatokkal való összehasonlítás során, ami alátámasztja a korábban felvetett parakrin paraneoplasztikus utat. Eredményeim alapján az IL-6-nak fontos szerepe van nemcsak a tumor kialakulásában, hanem a vastagbélgyulladás során fellépő antiinflammatorikus és reparatív folyamatokban is.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A következőkben pontokba szedve összefoglalom dolgozatom új megállapításait.

A különböző gasztrointesztinális tumoroknál a szérum IL-6 szint és a vérlemezkeszám összefüggésének vizsgálatakor a következőket állapítom meg:

1. A különböző gasztrointesztinális tumorokban összefüggés igazolódott a szérum IL-6 szint és a trombocitaszám között.

Gyenge, de pozitív korreláció igazolódott a különböző daganattípusokban a szérum IL-6 szint és a trombocitaszám között. Az összefüggés nyelőcső és vastagbél-daganat esetén közepesen erős volt, de a szignifikanciát nem érte el.

2. A hemoglobin és a fehérvérsejtszám szignifikáns összefüggést mutat a vérlemezkeszámmal a különböző gasztrointesztinális daganatokban.

Multivariáns lineáris regressziós analízissel a vérlemezkeszám és az egyes klinikai paraméterek közötti összefüggést vizsgáltuk. Ez alapján a hemoglobinnal negatív, a fehérvérsejtszámmal pozitív szignifikáns korreláció igazolódott. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a daganatot kísérő trombocitózis kialakulásában gyulladási folyamatok is szerepet játszanak.

3. Szignifikáns összefüggés áll fenn a szérum IL-6 szint és a daganat stádiuma között.

A daganat jellemzői közül a differenciáltsági fok nem mutatott összefüggést sem a szérum IL-6 szinttel, sem a vérlemezkeszámmal. A betegeket korai és előrehaladott stádiumú betegség szerint csoportosítva a vérlemezkeszámban nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. A szérum IL-6 szint viszont szignifikánsan magasabbnak bizonyult az előrehaladottabb stádium, azaz nagyobb tumorterhelés esetén. Ez alapján feltételezhető, hogy a fokozottabb IL-6 termelésért közvetlenül vagy közvetve a daganat a felelős.

Kolorektális daganatban az IL-6 expresszió vizsgálata alapján az alábbi következtéseket tudtam levonni:

1. A daganatsejtekben szignifikánsan nagyobb arányban van jelen fokozott IL-6 expresszió, mint a strómasejtekben.

Digitalizált szövettani metszeteken 3DHitech programmal számszerűsítettem a pozitivitást az IL-6 antitesttel történt festődés intenzitása alapján. Gyulladásos sejtes beszűrődés csak kis mennyiségben fordult elő a metszeteken, és ezek sem mutattak IL-6 expressziót, így az immunrendszer különböző sejtjei által történő IL-6 termelés kizárható volt. Amennyiben a daganatsejtek és a strómasejtek összesített IL-6 expresszióját vizsgáltam, a két csoport között nem volt szignifikáns különbség. Ha azonban az IL-6 expresszió mértékét is figyelembe vettem, akkor szignifikánsan nagyobb arányban voltak kifejezett IL-6 expressziót mutató sejtek a daganatsejtek között, mint a strómasejteknél.

2. A daganatsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan magasabb előrehaladott stádium esetén.

Vizsgálatomban előrehaladott stádium esetén a tumorsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan nagyobb volt, mint korai stádium esetén. Ennek hátterében a nagyobb tumortehelés állhat.

Gyulladás-asszociált kolorektális daganatmodellben az IL-6 szerepét és hatását vizsgáltam IL-6 KO és WT egerekben:

1. AOM / DSS kezelést követően a WT csoportban több gócú és nagyobb méretű, illetve alacsonyabban differenciált daganatok fordulnak elő.

A kezelést követően a WT és az IL-6 KO csoportban is vastagbél-daganatok jelentek meg, melyek szövettanilag tubuláris adenokarcinómának bizonyultak. A WT csoportban nagyobb méretű és nagyobb számú tumoros góc jelentkezett, ebből következik, hogy a teljes tumor volumen is nagyobb volt. Míg az IL-6 KO csoportban kizárólag G1 differenciáltságú tumorok fordultak elő, addig a WT csoportban a G1 és G2 daganatokat azonos arányban figyeltem meg.

2. Az IL-6 KO egereknél a mortalitási ráta magasabb

Az IL-6 KO egereknél az egyes kezelési ciklusok olyan súlyos fokú gyulladást okoztak, hogy az nagy számban a kimúlásukhoz vezetett. Ez alapján az IL-6-nak fontos szerepe lehet a súlyos gyulladás utáni regenerációban, melynek mértéke a géniütés miatt jelentősen lecsökkent. Valószínűleg ez áll a mortalitási rátában észlelt nem várt eredmény hátterében.

3. A kezelt WT egereknél a trombocitaszám szignifikánsan magasabb, a TPO expresszió pedig fokozott a többi csoporthoz képest. A THBS-1 expresszió a kezelt IL-6 KO egerekben volt szignifikánsan magasabb.

A trombocitaszám mind a kezelt IL-6 KO, mind a kezelt WT csoportban magasabb volt a kezelést nem kapó kontrollcsoportokhoz képest. A különbség azonban csak a WT egerek esetében volt szignifikáns. A trombocitaszám emelkedés a kezelt WT csoportban olyan mértékű volt, hogy mindhárom csoporthoz képest szignifikáns volt az eltérés. A májban a TPO expressziója a kezelt WT csoportban volt a legmagasabb, a másik három csoportban az átlag TPO expresszió közel azonos volt. Ezzel szemben a THBS-1 expresszió az IL-6 KO csoportban volt szignifikánsan emelkedett a többi csoporthoz képest.

4. Az in vivo képző vizsgálatok a kezelt WT egereknél elhúzódó gyulladást és súlyosabb daganatos érintettséget igazoltak

A kezelt WT állatnál intralumináris fluoreszcens endomikroszkópiával fokozott nyáktermelést mutató, szabálytalan morfológiájú, többmagvas kriptákat találtam, amelyek részben a krónikus gyulladás, részben a daganatos elfajulás következményei voltak. Ennek hátterében az IL-6 révén a patogén Th17 sejtek differenciációjának és túlélésének lehet szerepe. PET/MRI vizsgálattal intenzívebb és kiterjedtebb FDG felvétel igazolódott a kezelt IL-6 KO egerekhez képest.

Vizsgálataimmal igazoltam az IL-6 központi szerepét a daganatos progresszióban a gasztrointesztinális, ezen belül is a kolorektális daganatokban. Kimutattam, hogy a kolorektális daganatsejtek IL-6-t expresszálnak, amely nagyobb mértékű, mint ami a strómasejtekben megfigyelhető. A daganatsejtek IL-6 expressziójának mértéke összefüggést mutat a daganatstádiummal. Igazoltam, hogy a szérumban IL-6 szint szintén korrelál az előrehaladottabb stádiummal. Igazoltam, hogy amennyiben nem termelődik IL-6, akkor a daganatos terhelés és progresszió kisebb mértékű lesz, a TPO expresszió és ennek következményeként a trombocitaszám szignifikánsan alacsonyabb. Eredményeim alapján azonban nem tisztázott, csak feltételezhető, hogy hasonló mechanizmus zajlik, mint amit Stone vetett fel.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásom során a vérlemezkék és az IL-6 szerepét vizsgáltam mind állatkísérletben, mind embereknél gasztrointesztinális daganatokban és kolorektális daganatban. Gasztrointesztinális tumorok heterogén csoportjában a trombocitaszám és az IL-6 szint között gyenge pozitív összefüggés igazolódott. A vérlemezkeszám a hemoglobinnal negatív, a fehérvérsejtszámmal pozitív szignifikáns korrelációját mutattam ki. A szérumban az IL-6 szint előrehaladott stádiumban szignifikánsan magasabb volt. Vizsgálatom során egyértelmű eltérést találtunk a daganatsejtek és a strómasejtek IL-6 expressziója között: a daganatsejtekben szignifikánsan nagyobb arányban volt fokozott IL-6 expresszió, illetve előrehaladott stádiumban a daganatsejtek IL-6 expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Egerekben egy kólitisz-asszociált vastagbél-daganatos modellt hoztam létre IL-6 KO és WT állatokban úgy, hogy AOM / DSS adásával CRC kialakulását indukáltam. Igazoltam, hogy az IL-6 hiánya esetén a daganatok kialakulása kisebb számú és méretű, jobban differenciált daganatos góccal jelentkezik. Érdekes módon az IL-6 KO állatoknál a halálozási arány magasabb volt, ennek azonban nem a daganatos betegség, hanem a kialakult gyulladás súlyossága állt a háttérben. Az IL-6 hiánya ugyan kisebb tumorterhelést jelentett, de egyidejűleg a bélhám gyulladás utáni csökkent regenerációját is eredményezte. A CRC WT állatokban a trombocitaszám szignifikánsan magasabb volt a CRC IL-6 és a kontrollcsoportokhoz képest, a máj TPO expressziója pedig párhuzamosan mozgott a vérlemezkeszámmal. Fluoreszcens intralumináris endomikroszkópia a vastagbél kripták morfológiájának súlyosabb eltéréseit mutatta a WT állatokban. A PET/MRI is a jelentősebb daganat terhelésnek megfelelő képet igazolt: több góccal és intenzívebb volt az FDG felvétel, emellett szignifikánsan nagyobb volt a vizsgált területek SUV_{max}-ja is.

9. SUMMARY

I studied the role of platelets and IL-6 both in an animal study and in gastrointestinal cancer and colorectal tumor in human. In the heterogeneous group of gastrointestinal cancer I found weak, but positive correlation of platelets and IL-6. I found that platelet showed a significant negative correlation with hemoglobin and significant positive correlation with white blood cell counts. Serum IL-6 levels were significantly higher in advanced stage disease. I found clear-cut difference in the IL-6 expression of tumor cells and stromal cells: significantly higher rate of tumor cells showed increased IL-6 expression, and the IL-6 expression was significantly higher in advanced stage. I established an inflammation-induced CRC model in IL-6 KO and WT animals with the administration of AOM / DSS. I found that the lack of IL-6 leads to the development of smaller and fewer tumor foci with lower grade. Interestingly, the mortality rate was higher in IL-6 KO animals, however, this phenomenon resulted not from the tumor burden but the severity of inflammation induced. Although the lack of IL-6 lead to smaller tumor burden, but also to reduced regeneration of the intestinal epithelia after the inflammation, simultaneously. The platelet counts were significantly higher in the CRC WT animals compared to the CRC IL-6 and the control groups, and the hepatic expression of TPO followed the platelet counts in parallel. Fluorescent intraluminal endomicroscopy showed more severe abnormalities of crypt morphology in WT animals. PET/MRI also confirmed the picture of more pronounced tumor burden: FDG uptake was multifocal and more intense, and the SUVmax of the regions of interest was also significantly higher.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. (2019) Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 14: 89-103.
2. Kasler M, Otto S, Kenessey I. (2017) [The current situation of cancer morbidity and mortality in the light of the National Cancer Registry]. *Orv Hetil*, 158: 84-89.
3. Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Merchea A. (2019) Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 18: e87-e95.
4. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2017) Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66: 683-691.
5. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, American College of G. (2015) ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*, 110: 223-262; quiz 263.
6. Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA, Scrol A, Piper M, Williams MS, Zallen DT, Calonge N, Ganiats TG, Janssens AC, Zauber A, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Whitlock EP. (2015) Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med*, 17: 702-712.
7. Singh PN, Fraser GE. (1998) Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol*, 148: 761-774.
8. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. (2007) Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16: 2533-2547.
9. Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelleto R, Cornee J, Duffy S, Gallagher RP, Iscovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB, Peters RK, Potter JD, Riboli E, Slattery ML, Trichopoulos D, Tuyns A, Tzonou A, Watson LF, Whittemore AS, Shu Z, et al. (1997) The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control*, 8: 215-228.

10. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Kearney J, Willett WC. (1994) A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men. *J Natl Cancer Inst*, 86: 183-191.
11. Alberts DS, Martinez ME, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, Earnest DL, Sampliner RE. (2000) Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med*, 342: 1156-1162.
12. Wolin KY, Lee IM, Colditz GA, Glynn RJ, Fuchs C, Giovannucci E. (2007) Leisure-time physical activity patterns and risk of colon cancer in women. *Int J Cancer*, 121: 2776-2781.
13. Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA. (2005) A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 7: 204-213.
14. Jung Y. (2019) Female hormones and the risk of colorectal neoplasm. *Korean J Intern Med*, 34: 982-984.
15. Campagnoli C, Biglia N, Altare F, Lanza MG, Lesca L, Cantamessa C, Peris C, Fiorucci GC, Sismondi P. (1993) Differential effects of oral conjugated estrogens and transdermal estradiol on insulin-like growth factor 1, growth hormone and sex hormone binding globulin serum levels. *Gynecol Endocrinol*, 7: 251-258.
16. Algra AM, Rothwell PM. (2012) Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol*, 13: 518-527.
17. Manzano A, Perez-Segura P. (2012) Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention? *ScientificWorldJournal*, 2012: 327341.
18. Peleg, II, Maibach HT, Brown SH, Wilcox CM. (1994) Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer. *Arch Intern Med*, 154: 394-399.
19. Arber N. (2000) Do NSAIDs prevent colorectal cancer? *Can J Gastroenterol*, 14: 299-307.

20. Stidham RW, Higgins PDR. (2018) Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg*, 31: 168-178.
21. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48: 526-535.
22. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. (2019) Colorectal cancer. *Lancet*, 394: 1467-1480.
23. Nassar D, Blanpain C. (2016) Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*, 11: 47-76.
24. Testa U, Pelosi E, Castelli G. (2018) Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel)*, 6.
25. Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
26. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW, Jones DA. (2009) A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, 137: 623-634.
27. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. (2012) Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 27: 1423-1431.
28. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ. (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, 18: 1385-1390.
29. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. (1994) The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev*, 8: 1174-1183.
30. Caron de Fromental C, Soussi T. (1992) TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 4: 1-15.
31. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89: 845-860.
32. Adimoolam S, Ford JM. (2003) p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 2: 947-954.

33. Grady WM, Carethers JM. (2008) Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135: 1079-1099.
34. Worthley DL, Leggett BA. (2010) Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev*, 31: 31-38.
35. Lynch HT, de la Chapelle A. (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*, 36: 801-818.
36. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*, 2011: 902674.
37. Jass JR. (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50: 113-130.
38. Johnston PG. (2005) Stage II colorectal cancer: to treat or not to treat. *Oncologist*, 10: 332-334.
39. Rockey DC. (1999) Occult gastrointestinal bleeding. *N Engl J Med*, 341: 38-46.
40. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, Tucker JP, Tekawa IS, Cuff T, Pauly MP, Shlager L, Palitz AM, Zhao WK, Schwartz JS, Ransohoff DF, Selby JV. (2007) Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 99: 1462-1470.
41. Young GP, Symonds EL, Allison JE, Cole SR, Fraser CG, Halloran SP, Kuipers EJ, Seaman HE. (2015) Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution. *Dig Dis Sci*, 60: 609-622.
42. Ahlquist DA, Shuber AP. (2002) Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta*, 315: 157-168.
43. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Leshno M, Niv Y. (2007) A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*, 146: 244-255.
44. Kumar Y, Tapuria N, Kirmani N, Davidson BR. (2007) Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19: 265-276.
45. Mulder SA, van Leerdam ME, van Vuuren AJ, Francke J, van Toorenenbergen AW, Kuipers EJ, Ouwendijk RJ. (2007) Tumor pyruvate kinase isoenzyme type M2 and immunochemical fecal occult blood test: performance in screening for colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19: 878-882.

46. Ahlquist DA. (2010) Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 138: 2127-2139.
47. Carethers JM. (2020) Fecal DNA Testing for Colorectal Cancer Screening. *Annu Rev Med*, 71: 59-69.
48. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ, American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory G, Force USM-ST, American College of Radiology Colon Cancer C. (2008) Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, 134: 1570-1595.
49. Pineau BC, Paskett ED, Chen GJ, Espeland MA, Phillips K, Han JP, Mikulaninec C, Vining DJ. (2003) Virtual colonoscopy using oral contrast compared with colonoscopy for the detection of patients with colorectal polyps. *Gastroenterology*, 125: 304-310.
50. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. (2011) Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology*, 259: 393-405.
51. Forde KA. (2006) Colonoscopic screening for colon cancer. *Surg Endosc*, 20 Suppl 2: S471-474.
52. Accolla RS, Carrel S, Mach JP. (1980) Monoclonal antibodies specific for carcinoembryonic antigen and produced by two hybrid cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 563-566.
53. van Manen L, Groen JV, Putter H, Vahrmeijer AL, Swijnenburg RJ, Bonsing BA, Mieog JSD. (2020) Elevated CEA and CA19-9 serum levels independently predict advanced pancreatic cancer at diagnosis. *Biomarkers*, 25: 186-193.
54. Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. (2015) Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One*, 10: e0133830.
55. Edoe MIA, Chutturghoon VK, Wusu-Ansah GK, Zhu H, Zhen TY, Xie HY, Zheng SS. (2019) Serum Biomarkers AFP, CEA and CA19-9 Combined

- Detection for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Iran J Public Health*, 48: 314-322.
56. Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli NJ. (2003) Molecular prognostics in colorectal cancer. *Surg Oncol*, 12: 173-186.
 57. Loewenstein MS, Zamcheck N. (1978) Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. *Cancer*, 42: 1412-1418.
 58. Grande M, Milito G, Attina GM, Cadeddu F, Muzi MG, Nigro C, Rulli F, Farinon AM. (2008) Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World J Surg Oncol*, 6: 98.
 59. Wiggers T, Arends JW, Volovics A. (1988) Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum*, 31: 33-41.
 60. Auclin E, Zaanan A, Vernerey D, Douard R, Gallois C, Laurent-Puig P, Bonnetain F, Taieb J. (2017) Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy. *Ann Oncol*, 28: 958-968.
 61. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. (2016) The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*, 51: 19-26.
 62. Basile D, Garattini SK, Bonotto M, Ongaro E, Casagrande M, Cattaneo M, Fanotto V, De Carlo E, Loupakis F, Urbano F, Negri FV, Pella N, Russano M, Brunetti O, Scartozzi M, Santini D, Silvestris N, Casadei Gardini A, Puzzoni M, Calvetti L, Cardarelli N, Aprile G. (2017) Immunotherapy for colorectal cancer: where are we heading? *Expert Opin Biol Ther*, 17: 709-721.
 63. Bilgin B, Sendur MA, Bulent Akinci M, Sener Dede D, Yalcin B. (2017) Targeting the PD-1 pathway: a new hope for gastrointestinal cancers. *Curr Med Res Opin*, 33: 749-759.
 64. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, Stintzing S, Graeven U, Arnold D, von Weikersthal LF, Giessen-Jung C, Stahler A, Schmoll HJ, Jung A, Kirchner T, Tannapfel A, Reinacher-Schick A. (2016) Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic

- colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol*, 27: 1746-1753.
65. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, Nair SG, Thibodeau SN, Goldberg RM, Sargent DJ, Sinicrope FA, Alliance for Clinical Trials in O. (2014) KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res*, 20: 3033-3043.
 66. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 359: 1757-1765.
 67. Ulivi P, Capelli L, Valgiusti M, Zoli W, Scarpi E, Chiadini E, Rosetti P, Bravaccini S, Calistri D, Saragoni L, Casadei Gardini A, Ragazzini A, Frassinetti GL, Amadori D, Passardi A. (2012) Predictive role of multiple gene alterations in response to cetuximab in metastatic colorectal cancer: a single center study. *J Transl Med*, 10: 87.
 68. Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki C, Voutsina A, Kalykaki A, Messaritakis I, Mpananis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. (2013) BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. *PLoS One*, 8: e84604.
 69. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. (2008) Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26: 5705-5712.
 70. Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, Chen Q. (2011) BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 38: 2219-2223.
 71. Reece M, Saluja H, Hollington P, Karapetis CS, Vatandoust S, Young GP, Symonds EL. (2019) The Use of Circulating Tumor DNA to Monitor and Predict Response to Treatment in Colorectal Cancer. *Front Genet*, 10: 1118.

72. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, Esser R, Lenz HJ, Heinemann V. (2017) Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol*, 3: 194-201.
73. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. (2018) Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res*, 11: 264-273.
74. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Borger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grutzmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Leonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Petruzela L, Konopasek B, Dunder P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Musina AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J. (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*, 391: 2128-2139.
75. Danielsen HE, Hveem TS, Domingo E, Pradhan M, Kleppe A, Syvertsen RA, Kostolomov I, Nesheim JA, Askautrud HA, Nesbakken A, Lothe RA, Svindland A, Shepherd N, Novelli M, Johnstone E, Tomlinson I, Kerr R, Kerr DJ. (2018) Prognostic markers for colorectal cancer: estimating ploidy and stroma. *Ann Oncol*, 29: 616-623.

76. Berdiel-Acer M, Berenguer A, Sanz-Pamplona R, Cuadras D, Sanjuan X, Paules MJ, Santos C, Salazar R, Moreno V, Capella G, Villanueva A, Mollevi DG. (2014) A 5-gene classifier from the carcinoma-associated fibroblast transcriptomic profile and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*, 5: 6437-6452.
77. Ghoshal K, Bhattacharyya M. (2014) Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*, 2014: 781857.
78. Deutsch VR, Tomer A. (2013) Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol*, 161: 778-793.
79. Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, Khachigian LM, Tanaka Y, Chong BH. (2000) The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*, 95: 3094-3101.
80. Italiano JE, Jr., Shivdasani RA. (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*, 1: 1174-1182.
81. Schulze H, Shivdasani RA. (2005) Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*, 3: 1717-1724.
82. Gianazza E, Brioschi M, Baetta R, Mallia A, Banfi C, Tremoli E. (2020) Platelets in Healthy and Disease States: From Biomarkers Discovery to Drug Targets Identification by Proteomics. *Int J Mol Sci*, 21.
83. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. (1982) Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol*, 243: R454-461.
84. Blair P, Flaumenhaft R. (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23: 177-189.
85. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM. (1987) Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood*, 70: 475-483.
86. Hayward CP, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM, Moore JC, Bainton DF, Nesheim ME, Kelton JG, Cote G. (1995) Factor V is complexed with multimerin

- in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *J Biol Chem*, 270: 19217-19224.
87. Kiesselbach TH, Wagner RH. (1972) Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique. *Ann N Y Acad Sci*, 202: 318-328.
 88. Rendu F, Brohard-Bohn B. (2001) The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12: 261-273.
 89. Clemetson KJ. (2012) Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*, 129: 220-224.
 90. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. (2013) Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*, 35: 254-261.
 91. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. (2019) Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front Cardiovasc Med*, 6: 153.
 92. Duerschmied D, Bode C, Ahrens I. (2014) Immune functions of platelets. *Thromb Haemost*, 112: 678-691.
 93. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. (2017) Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp Med*, 214: 2193-2204.
 94. Levin J, Conley CL. (1964) Thrombocytosis Associated with Malignant Disease. *Arch Intern Med*, 114: 497-500.
 95. Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. (2012) Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*, 130: 2747-2760.
 96. Labelle M, Begum S, Hynes RO. (2011) Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*, 20: 576-590.
 97. Cho MS, Bottsford-Miller J, Vasquez HG, Stone R, Zand B, Kroll MH, Sood AK, Afshar-Kharghan V. (2012) Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood*, 120: 4869-4872.
 98. Gay LJ, Felding-Habermann B. (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11: 123-134.
 99. Erpenbeck L, Schon MP. (2010) Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood*, 115: 3427-3436.

100. Stracke ML, Liotta LA. (1992) Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo*, 6: 309-316.
101. Bambace NM, Holmes CE. (2011) The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost*, 9: 237-249.
102. Egan K, Crowley D, Smyth P, O'Toole S, Spillane C, Martin C, Gallagher M, Canney A, Norris L, Conlon N, McEvoy L, Ffrench B, Stordal B, Keegan H, Finn S, McEneaney V, Laios A, Ducree J, Dunne E, Smith L, Berndt M, Sheils O, Kenny D, O'Leary J. (2011) Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 6: e26125.
103. Medina C, Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Jeong SS, Mitsky T, Chen R, Radomski MW. (2006) Platelet aggregation-induced by caco-2 cells: regulation by matrix metalloproteinase-2 and adenosine diphosphate. *J Pharmacol Exp Ther*, 317: 739-745.
104. Gersuk GM, Westermark B, Mohabeer AJ, Challita PM, Pattamakom S, Pattengale PK. (1991) Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms. *Scand J Immunol*, 33: 521-532.
105. Kopp HG, Placke T, Salih HR. (2009) Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res*, 69: 7775-7783.
106. Timar J, Tovari J, Raso E, Meszaros L, Bereczky B, Lapis K. (2005) Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology*, 69: 185-201.
107. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. (2002) Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2193-2198.
108. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. (2013) Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell*, 24: 130-137.

109. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE, Jr. (2014) Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*, 123: 101-112.
110. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, Italiano JE, Wheatley E, Abou-Slaybi A, Bender E, Almog N, Kieran MW, Folkman J. (2009) Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*, 113: 2835-2842.
111. Rusnati M, Urbinati C, Bonifacio S, Presta M, Taraboletti G. (2010) Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3: 1241-1278.
112. Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. (2010) Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol Cancer Res*, 8: 232-245.
113. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, Rupairmoole R, Armaiz-Pena GN, Pecot CV, Coward J, Deavers MT, Vasquez HG, Urbauer D, Landen CN, Hu W, Gershenson H, Matsuo K, Shahzad MM, King ER, Tekedereli I, Ozpolat B, Ahn EH, Bond VK, Wang R, Drew AF, Gushiken F, Lamkin D, Collins K, DeGeest K, Lutgendorf SK, Chiu W, Lopez-Berestein G, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2012) Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 366: 610-618.
114. Gudbrandsdottir G, Aarstad HH, Bostad L, Hjelle KM, Aarstad HJ, Bruserud O, Tvedt THA, Beisland C. (2021) Serum levels of the IL-6 family of cytokines predict prognosis in renal cell carcinoma (RCC). *Cancer Immunol Immunother*, 70: 19-30.
115. Lippitz BE, Harris RA. (2016) Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology*, 5: e1093722.
116. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2018) The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell*, 33: 965-983.

117. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 878-888.
118. Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med*, 167: 332-344.
119. Tanaka T, Kishimoto T. (2014) The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*, 2: 288-294.
120. Reihmane D, Dela F. (2014) Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci*, 14: 242-250.
121. Angstwurm MW, Gartner R, Ziegler-Heitbrock HW. (1997) Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine*, 9: 370-374.
122. Keski-Nisula L, Hirvonen MR, Roponen M, Heinonen S, Pekkanen J. (2004) Spontaneous and stimulated interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production at delivery and three months after birth. *Eur Cytokine Netw*, 15: 67-72.
123. Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. (2005) Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and - β . *Diabetes*, 54: 85-91.
124. Taga T, Kishimoto T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15: 797-819.
125. Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. (2009) Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1793: 1623-1633.
126. Montero-Julian FA. (2001) The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47: 583-597.
127. Dimitrov S, Lange T, Benedict C, Nowell MA, Jones SA, Scheller J, Rose-John S, Born J. (2006) Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J*, 20: 2174-2176.
128. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seegert D. (2007) The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*, 11: 613-624.

129. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. (2011) The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, 90: 484-494.
130. Baranyai Z, Krzystanek M, Josa V, Dede K, Agoston E, Szasz AM, Sinko D, Szarvas V, Salamon F, Eklund AC, Szallasi Z, Jakab F. (2014) The comparison of thrombocytosis and platelet-lymphocyte ratio as potential prognostic markers in colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 111: 483-490.
131. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. (2015) The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol*, 34: 75-82.
132. Carpenter RL, Lo HW. (2014) STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 6: 897-925.
133. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 21: 2000-2008.
134. Zugowski C, Lieder F, Muller A, Gasch J, Corvinus FM, Moriggl R, Friedrich K. (2011) STAT3 controls matrix metalloproteinase-1 expression in colon carcinoma cells by both direct and AP-1-mediated interaction with the MMP-1 promoter. *Biol Chem*, 392: 449-459.
135. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2): 297-314.
136. Zohnhofer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E, Heinrich PC. (1992) The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett*, 306: 219-222.
137. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guilhot F, Lissilaa R, Ferlin WG, Grotzinger J, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. (2011) Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*, 286: 42959-42970.

138. Hunter CA, Jones SA. (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16: 448-457.
139. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y. (1989) Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*, 74: 1241-1244.
140. He J, Shi J, Xu X, Zhang W, Wang Y, Chen X, Du Y, Zhu N, Zhang J, Wang Q, Yang J. (2012) STAT3 mutations correlated with hyper-IgE syndrome lead to blockage of IL-6/STAT3 signalling pathway. *J Biosci*, 37: 243-257.
141. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 113: 1271-1276.
142. Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panayi GS. (2002) Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*, 46: 3143-3150.
143. Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Scheller J, Hayes AJ, Jones GW, Richards PJ, Slinn S, Ernst M, Jenkins BJ, Topley N, Rose-John S, Jones SA. (2009) Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol*, 182: 613-622.
144. Libermann TA, Baltimore D. (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*, 10: 2327-2334.
145. Akira S, Kishimoto T. (1992) IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev*, 127: 25-50.
146. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. (1993) Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10193-10197.
147. Ballard DW, Bohnlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR, Greene WC. (1988) HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science*, 241: 1652-1655.

148. Ambrosino C, Ruocco MR, Chen X, Mallardo M, Baudi F, Trematerra S, Quinto I, Venuta S, Scala G. (1997) HIV-1 Tat induces the expression of the interleukin-6 (IL6) gene by binding to the IL6 leader RNA and by interacting with CAAT enhancer-binding protein beta (NF-IL6) transcription factors. *J Biol Chem*, 272: 14883-14892.
149. Ohno H, Kaneko S, Lin Y, Kobayashi K, Murakami S. (1999) Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of nuclear factor for IL-6 through its basic-leucine zipper domain. *J Med Virol*, 58: 11-18.
150. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 102: 1369-1376.
151. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. (2012) The association between interleukin-6 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res*, 61: 665-671.
152. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257: 88-91.
153. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*, 274: 32048-32054.
154. Ray A, Prefontaine KE. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 752-756.
155. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB. (1991) Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7605-7609.
156. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a016295.

157. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30: 1073-1081.
158. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. (2014) Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*, 110: 469-478.
159. Mauer J, Denson JL, Bruning JC. (2015) Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*, 36: 92-101.
160. Lin MT, Juan CY, Chang KJ, Chen WJ, Kuo ML. (2001) IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene *mcl-1*. *Carcinogenesis*, 22: 1947-1953.
161. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. (2009) IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15: 103-113.
162. Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. (2008) Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer*, 122: 1521-1529.
163. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. (2018) Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 15: 234-248.
164. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY. (2003) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22: 1517-1527.
165. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. (1996) Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci*, 1: d340-357.
166. Oh K, Lee OY, Shon SY, Nam O, Ryu PM, Seo MW, Lee DS. (2013) A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast Cancer Res*, 15: R79.

167. Nolen BM, Marks JR, Ta'san S, Rand A, Luong TM, Wang Y, Blackwell K, Lokshin AE. (2008) Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res*, 10: R45.
168. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. (2014) The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*, 26: 38-47.
169. Leu CM, Wong FH, Chang C, Huang SF, Hu CP. (2003) Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*, 22: 7809-7818.
170. Bromberg J, Wang TC. (2009) Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*, 15: 79-80.
171. Kesanakurti D, Chetty C, Rajasekhar Maddirela D, Gujrati M, Rao JS. (2013) Essential role of cooperative NF-kappaB and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. *Oncogene*, 32: 5144-5155.
172. Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, Akhurst B, Payne C, Long S, Alexander W, Croker B, Grail D, Matthews VB. (2007) Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/ 2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology*, 45: 486-494.
173. Johnson C, Han Y, Hughart N, McCarra J, Alpini G, Meng F. (2012) Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl Gastrointest Cancer*, 1: 58-70.
174. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*, 21: 491-501.
175. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, Scheller J, Rose-John S, Kado S, Takada T. (2010) Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol*, 184: 1543-1551.

176. Josa V, Ferenczi S, Szalai R, Fuder E, Kuti D, Horvath K, Hegedus N, Kovacs T, Bagamery G, Juhasz B, Winkler Z, Veres DS, Zrubka Z, Mathe D, Baranyai Z. (2020) Thrombocytosis and Effects of IL-6 Knock-Out in a Colitis-Associated Cancer Model. *Int J Mol Sci*, 21.
177. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. (2016) Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*, 375: 1856-1867.
178. Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. (2005) In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut*, 54: 950-954.
179. Neufert C, Becker C, Neurath MF. (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*, 2: 1998-2004.
180. Cravioto-Villanueva A, Luna-Perez P, Gutierrez-de la Barrera M, Martinez-Gomez H, Maffuz A, Rojas-Garcia P, Perez-Alvarez C, Rodriguez-Ramirez S, Rodriguez-Antezana E, Ramirez-Ramirez L. (2012) Thrombocytosis as a predictor of distant recurrence in patients with rectal cancer. *Arch Med Res*, 43: 305-311.
181. Kandemir EG, Mayadagli A, Karagoz B, Bilgi O, Turken O, Yaylaci M. (2005) Prognostic significance of thrombocytosis in node-negative colon cancer. *J Int Med Res*, 33: 228-235.
182. Sasaki K, Kawai K, Tsuno NH, Sunami E, Kitayama J. (2012) Impact of preoperative thrombocytosis on the survival of patients with primary colorectal cancer. *World J Surg*, 36: 192-200.
183. Wan S, Lai Y, Myers RE, Li B, Hyslop T, London J, Chatterjee D, Palazzo JP, Burkart AL, Zhang K, Xing J, Yang H. (2013) Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients. *J Gastrointest Cancer*, 44: 293-304.
184. Liebman HA. (2014) Thrombocytopenia in cancer patients. *Thromb Res*, 133 Suppl 2: S63-69.

185. Aminian A, Karimian F, Mirsharifi R, Alibakhshi A, Dashti H, Jahangiri Y, Safari S, Ghaderi H, Noaparast M, Hasani SM, Mirsharifi A. (2011) Significance of platelet count in esophageal carcinomas. *Saudi J Gastroenterol*, 17: 134-137.
186. Dutta S, Crumley AB, Fullarton GM, Horgan PG, McMillan DC. (2011) Comparison of the prognostic value of tumour- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative resection of oesophageal cancer. *World J Surg*, 35: 1861-1866.
187. Ling FC, Vallbohmer D, Hoelscher AH, Schmidt D, Bollschweiler E, Schneider PM. (2010) Increased platelet counts after transthoracic en bloc resection for esophageal cancer is associated with significantly improved survival. *World J Surg*, 34: 2628-2634.
188. Feng JF, Huang Y, Lu WS, Chen QX. (2013) Preoperative platelet count in esophageal squamous cell carcinoma: is it a prognostic factor? *Langenbecks Arch Surg*, 398: 1115-1122.
189. Hwang SG, Kim KM, Cheong JH, Kim HI, An JY, Hyung WJ, Noh SH. (2012) Impact of pretreatment thrombocytosis on blood-borne metastasis and prognosis of gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*, 38: 562-567.
190. Hu C, Chen R, Chen W, Pang W, Xue X, Zhu G, Shen X. (2014) Thrombocytosis is a significant indicator of hypercoagulability, prognosis and recurrence in gastric cancer. *Exp Ther Med*, 8: 125-132.
191. Nyasavajjala SM, Runau F, Datta S, Annette H, Shaw AG, Lund JN. (2010) Is there a role for pre-operative thrombocytosis in the management of colorectal cancer? *Int J Surg*, 8: 436-438.
192. Ikeda M, Furukawa H, Imamura H, Shimizu J, Ishida H, Masutani S, Tatsuta M, Satomi T. (2002) Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 9: 287-291.
193. Corbeil J, Evans LA, Vasak E, Cooper DA, Penny R. (1991) Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma. *J Immunol*, 146: 2972-2976.
194. Li FX, Wei LJ, Zhang H, Li SX, Liu JT. (2014) Significance of thrombocytosis in clinicopathologic characteristics and prognosis of gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 6511-6517.

195. Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, Iwasaki Y, Kubota K. (2012) Preoperative thrombocytosis is associated with survival after surgery for colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 106: 887-891.
196. Kim HJ, Choi GS, Park JS, Park S, Kawai K, Watanabe T. (2015) Clinical significance of thrombocytosis before preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: predicting pathologic tumor response and oncologic outcome. *Ann Surg Oncol*, 22: 513-519.
197. Hwang SJ, Luo JC, Li CP, Chu CW, Wu JC, Lai CR, Chiang JH, Chau GY, Lui WY, Lee CC, Chang FY, Lee SD. (2004) Thrombocytosis: a paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 10: 2472-2477.
198. Carr BI, Guerra V. (2013) Thrombocytosis and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 58: 1790-1796.
199. Dominguez I, Crippa S, Thayer SP, Hung YP, Ferrone CR, Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. (2008) Preoperative platelet count and survival prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg*, 32: 1051-1056.
200. Chadha AS, Kocak-Uzel E, Das P, Minsky BD, Delclos ME, Mahmood U, Guha S, Ahmad M, Varadhachary GR, Javle M, Katz MH, Fleming JB, Wolff RA, Crane CH, Krishnan S. (2015) Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol*, doi:10.3109/0284186X.2014.1000466: 1-8.
201. Brown KM, Domin C, Aranha GV, Yong S, Shoup M. (2005) Increased preoperative platelet count is associated with decreased survival after resection for adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg*, 189: 278-282.
202. Suzuki K, Aiura K, Kitagou M, Hoshimoto S, Takahashi S, Ueda M, Kitajima M. (2004) Platelets counts closely correlate with the disease-free survival interval of pancreatic cancer patients. *Hepatogastroenterology*, 51: 847-853.
203. Chadha AS, Kocak-Uzel E, Das P, Minsky BD, Delclos ME, Mahmood U, Guha S, Ahmad M, Varadhachary GR, Javle M, Katz MH, Fleming JB, Wolff RA, Crane CH, Krishnan S. (2015) Paraneoplastic thrombocytosis independently

- predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol*, 54: 971-978.
204. Canellos GP, Demetri GD. (1993) Myelosuppression and "conventional" chemotherapy: what price, what benefit? *J Clin Oncol*, 11: 1-2.
 205. Spence GM, Graham AN, Mulholland K, McAllister I, Sloan JM, Armstrong MA, Campbell FC, McGuigan JA. (2002) Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma following esophageal cancer resection--relationship to platelet count. *Int J Biol Markers*, 17: 119-124.
 206. Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, Aoki T, Ohnuma S, Aoki T. (2005) Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer*, 8: 124-131.
 207. Kim DK, Oh SY, Kwon HC, Lee S, Kwon KA, Kim BG, Kim SG, Kim SH, Jang JS, Kim MC, Kim KH, Han JY, Kim HJ. (2009) Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. *BMC Cancer*, 9: 155.
 208. Liao WC, Lin JT, Wu CY, Huang SP, Lin MT, Wu AS, Huang YJ, Wu MS. (2008) Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 14: 428-434.
 209. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. (2004) Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer*, 101: 2727-2736.
 210. Mroczko B, Groblewska M, Gryko M, Kedra B, Szmitkowski M. (2010) Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Clin Lab Anal*, 24: 256-261.
 211. Jang JW, Oh BS, Kwon JH, You CR, Chung KW, Kay CS, Jung HS. (2012) Serum interleukin-6 and C-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma. *Cytokine*, 60: 686-693.
 212. Nakagawa H, Maeda S, Yoshida H, Tateishi R, Masuzaki R, Ohki T, Hayakawa Y, Kinoshita H, Yamakado M, Kato N, Shiina S, Omata M. (2009) Serum IL-6

- levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: an analysis based on gender differences. *Int J Cancer*, 125: 2264-2269.
213. Li X, Wang Y, Han C, Li P, Zhang H. (2014) Colorectal cancer progression is associated with accumulation of Th17 lymphocytes in tumor tissues and increased serum levels of interleukin-6. *Tohoku J Exp Med*, 233: 175-182.
 214. Chung YC, Chang YF. (2003) Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 83: 222-226.
 215. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. (2014) Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*, 2014: 149185.
 216. De Vita F, Romano C, Orditura M, Galizia G, Martinelli E, Lieto E, Catalano G. (2001) Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J Interferon Cytokine Res*, 21: 45-52.
 217. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. (2012) Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci*, 8: 1248-1253.
 218. Schiechl G, Bauer B, Fuss I, Lang SA, Moser C, Ruemmele P, Rose-John S, Neurath MF, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W, Fichtner-Feigl S. (2011) Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *J Clin Invest*, 121: 1692-1708.
 219. Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H. (2000) Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett*, 151: 31-38.
 220. Hsu CP, Chung YC. (2006) Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res*, 26: 4607-4614.
 221. Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. (2013) The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 15: 848-862.

222. Weber R, Groth C, Lasser S, Arkhypov I, Petrova V, Altevogt P, Utikal J, Umansky V. (2021) IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cell Immunol*, 359: 104254.
223. Brozek W, Bises G, Girsch T, Cross HS, Kaiser HE, Peterlik M. (2005) Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur J Cancer*, 41: 2347-2354.
224. Belluco C, Olivieri F, Bonafe M, Giovagnetti S, Mammano E, Scalerta R, Ambrosi A, Franceschi C, Nitti D, Lise M. (2003) -174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 2173-2176.
225. Knupfer H, Preiss R. (2010) Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int J Colorectal Dis*, 25: 135-140.
226. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. (2014) IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One*, 9: e114195.
227. Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, Hanson E, Eckmann L. (2008) IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J Immunol*, 180: 6816-6826.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1.A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Jósa V**, Brodszky V, Zaránd A, Mezei T, Szilasi Z, Merkel K, Fehér A, Szállási Z, Baranyai Z. (2020) The relationship between IL-6 and thrombocytosis accompanying gastrointestinal tumours. *Prz Gastroenterol*, 15:215-219. **IF: 0,0**
2. **Josa V**, Ferenczi S, Szalai R, Fuder E, Kuti D, Horvath K, Hegedus N, Kovacs T, Bagamery G, Juhasz B, Winkler Z, Veres DS, Zrubka Z, Mathe D, Baranyai Z. (2020) Thrombocytosis and Effects of IL-6 Knock-Out in a Colitis-Associated Cancer Model. *Int J Mol Sci*, 21:6218. **IF: 4,556**
3. **Jósa V**, Federer K, Zrubka Z, Reiniger L, Baranyai Z. (2021) Az IL-6 expresszió vizsgálata colorectalis adenocarcinómában szenvedő betegeken. *Orv Hetil*, 162:1502-1507. **IF:0,417**

11.2.A disszertációtól független közlemények

Σ IF:14,392

1. Baranyai Z, **Jósa V**, Tóth A, Szilasi Z, Tihanyi B, Zaránd A, Harsanyi L, Szállási Z. (2016) Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets*, 27: 269-275. **IF: 2,465**
2. Szilasi Z, **Jósa V**, Zrubka Z, Mezei T, Vass T, Merkel K, Helfferich F, Baranyai Z. (2020) Neutrophil-To-Lymphocyte and Platelet-To-Lymphocyte Ratios as Prognostic Markers of Survival in Patients with Head and Neck Tumours-Results of a Retrospective Multicentric Study. *Int J Environ Res Public Health*, 17:1742. **IF: 2.849**
3. Baranyai Z, Répássy G Jr, Molnár V, Forgács G, Hacki T, **Jósa V**, Balázs Á, Vass T. (2020) Nyelőcső-perforatio miatt végzett oesophagusexstirpatio rekonstrukciója hypopharyngogastrostoma képzésével. *Orv Hetil*, 161:756-760. **IF: 0,417**

4. **Jósa V**, Krzystanek M, Vass T, Lang T, Juhász V, Szilágyi K, Tihanyi B, Harsányi L, Szállási Z, Salamon F, Baranyai Z. (2015) Thrombocytosis of Liver Metastasis from Colorectal Cancer as Predictive Factor. *Pathol Oncol Res*, 21:991-7. **IF: 1,940**
5. **Josa V**, Krzystanek M, Eklund AC, Salamon F, Zarand A, Szallasi Z, Baranyai Z. (2015) Relationship of postoperative thrombocytosis and survival of patients with colorectal cancer. *Int J Surg*, 18:1-6. **IF: 1,657**
6. Baranyai Z, Krzystanek M, **Jósa V**, Dede K, Agoston E, Szász AM, Sinkó D, Szarvas V, Salamon F, Eklund AC, Szállási Z, Jakab F. (2014) The comparison of thrombocytosis and platelet-lymphocyte ratio as potential prognostic markers in colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 111:483-90. **IF: 4,984**
7. Baranyai Z, **Jósa V**, Krzystanek M, Eklund AC, Szász AM, Szállási Z. (2013) A thrombocytosis mint prediktív faktor értékelese colorectalis tumorokban. *Magy Seb*, 66:331-7.
8. Baranyai Z, **Jósa V**, Merkel K, Zolnai Z. (2013) Carcinoid Tumor in Accidental, Asymptomatic Meckel's Diverticulum. *J Surg Tech Case Rep*, 5:56-7.
9. **Jósa V**, Császár J, Baranyai Z, El Khoffash A, Becske M. (2012) Antibiotikum és probiotikum együttes adásának előnyei *Otorhinolaryngologia Hungarica*, 58: 72-75.
10. Baranyai Z, Mersich T, Dede K, Besznyák I, Zaránd A, Teknos D, Nagy P, Salamon F, Nagy P, Nagy Z, Kótai Z, Szász M, Lukács L, Szállási Z, **Jósa V**, Jakab F. (2011) Projektalapú mintagyűjtéstől a biobankig. *Orv Hetil*, 152:606-9.
11. Baranyai Z, **Jósa V**, Kulin L. (2011) Az új sebészi eljárások és eszközök befogadása a betegbiztonság tükrében. *Orv Hetil*, 152:2091-5.
12. Baranyai Z, Kulin L, **Jósa V**, Mayer A. (2011) A sebészeti infekciók mint betegbiztonsági problémák. *Magy Seb*, 64:107-11.
13. **Jósa V**, Császár J, Nagy P, Baranyai Z, Becske M. (2011) Sialoblastoma, ritka gyermekkori nyálmirigydaganat (esetbemutató) *Otorhinolaryngologia Hungarica*, 57: 152-155.
14. Sinkó D, Baranyai Z, Nemeskéri C, Teknos D, **Jósa V**, Hegedus L, Mayer A. (2010) Sugárkezelés mellett fellépő bélgyulladások tünettana, diagnosztikája, terápiás lehetőségei. *Orv Hetil*, 151:1450-4.

15. Baranyai Z, **Jósa V.** (2011) A szövetbankok etikai kérdései. Magyar Orvos, 19:31-4.
16. Baranyai Z, **Jósa V,** Szász AM. (2009) A műtői hatékonyság javítása. IME, 8:15-21.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni a doktori munkám elkészítésével kapcsolatban dr. Zrubka Zsombornak, dr. Máthé Domokosnak, dr. Reiniger Lillának, dr. Szalai Ritának, dr. Ferenczi Szilamérnak, dr. Brodszky Valentinnek, dr. Fehér Adrienne-nek, dr. Szállási Zoltánnak, dr. Winkler Zsuzsannának, dr. Féderer Krisztinának, dr. Fuder Enikőnek, dr. Hegedűs Nikolettnek, dr. Veres S. Dánielnek, dr. Juhász Balázsnak, dr. Horváth Krisztinának, dr. Kuti Dánielnek és valamennyi, itt fel nem sorolt asszisztensnőnek és asszisztensnek, akik a munkánkat segítették.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek és férjemnek, dr. Baranyai Zsoltnak, aki nemcsak a kutatásokat vezette, hanem akkor is biztatott a munka folytatására, amikor nehézségekbe ütköztem. Köszönöm gyermekeimnek, hogy több-kevesebb türelemmel viselték, hogy nem velük, hanem a munkámmal foglalkoztam.

The relationship between IL-6 and thrombocytosis accompanying gastrointestinal tumours

Valéria Jósa¹, Valentin Brodszky², Attila Zaránd³, Tünde Mezei⁴, Zsuzsanna Szilasi⁵, Keresztély Merkel⁶, Adrienne Fehér⁷, Zoltán Szállási⁸, Zsolt Baranyai³

¹Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Flór Ferenc Hospital, Kistarcsa, Hungary

²Department of Health Economics, Corvinus University of Budapest, Budapest, Hungary

³1st Department of Surgery, Semmelweis University Budapest, Budapest, Hungary

⁴Department of Urology, Jahn Ferenc, Budapest, Hungary

⁵Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, HDF Medical Centre, Budapest, Hungary

⁶Department of Surgery, Szent Imre Hospital, Budapest, Hungary

⁷Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

⁸Computational Health Informatics Program (CHIP), Harvard Medical School, Boston, USA

Gastroenterology Rev 2020; 15 (3): 215–219
DOI: <https://doi.org/10.5114/pg.2020.98538>

Key words: thrombocytosis, IL-6, gastrointestinal tumours, paraneoplastic pathway.

Address for correspondence: Zsolt Baranyai MD, PhD, 1st Department of Surgery, Semmelweis University Budapest, Hungary, phone: +36 30/4500-388, e-mail: barazso@gmail.com

Abstract

Introduction: Several reports have stated that thrombocytosis is associated with worse survival and higher rate of metastasis in solid tumours. A study in ovarian tumours implicated IL-6 produced by tumour cells as a key mechanistic factor.

Aim: To evaluate the relevance of this paraneoplastic pathway in gastrointestinal cancer.

Material and methods: After excluding thromboembolic and inflammatory disorders, 161 patients were enrolled who had been operated due to various gastrointestinal cancer at the 1st Department of Surgery at the Semmelweis University between 2015 and 2017. Platelet counts and serum IL-6 levels were determined from preoperative blood samples. Thrombocytosis was defined as the upper limit of normal platelet count, e.g. $400 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Results: A weak but significantly positive correlation was found between elevated platelet counts and serum IL-6 (correlation coefficient: $R = 0.214$, $p = 0.006$), which became more pronounced in colon and oesophageal cancer if evaluated in the different tumour types ($R = 0.292$ and $R = 0.419$, respectively). However, using a multivariate linear regression model ($R^2 = 0.47$) corrected with haemoglobin, white blood cell count, and advanced disease stage, the analysis showed no significant correlation between serum IL-6 and platelet counts.

Conclusions: In gastrointestinal cancer our study did not support the paracrine-mediated paraneoplastic pathway described in ovarian tumours. Thrombocytosis showed significant correlation with white blood cells instead of serum IL-6, which implies that the inflammatory process may influence both parameters. Further studies are needed on larger patient cohorts.

Introduction

In recent decades several authors have reported that thrombocytosis was associated with higher incidence of metastases and worse prognosis in gastrointestinal tumours [1, 2]. Numerous studies have shown an association between platelets and tumours. In animal studies correlation was found between platelet inhibition [3] or depletion [4] and decreased metastasis formation. In thrombocyte-depleted animals the infusion of platelet concentrate restored the metastasising potential of tu-

mour cells administered intravenously [5]. It is assumed that a certain mechanistic link exists between tumour cells and platelets. The thrombocytes often adhere to tumour cells [6]. On the one hand, platelets protect them from mechanical insults, and on the other hand, platelets interfere with the cell-mediated immune response: they present large amount of MHC-I antigen on their surface, and the recognition of tumour cells is compromised by the immune system because the platelets covering the tumour cells imply normal phenotype of the host [7]. Despite numerous studies, the exact

Table I. Clinicopathological data

Organ	N	Male/female	Stage				Mean PLT [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	Mean IL-6 [pg/ml]	PLT \times IL-6 correlation
			1	2	3	4			
Oesophagus	14	14/0	0	4	4	6	250.52	8.90	0.419
Primary liver*	10	6/4	2	2	4	2	170.20	5.29	0.153
Stomach	35	27/8	3	6	6	20	291.49	12.78	0.197
Pancreas	36	21/15	4	10	12	10	324.67	13.13	0.175
Colon	33	17/16	3	9	12	9	340.36	12.91	0.292
Rectum	29	20/9	5	6	12	6	311.41	10.85	-0.006

*Barcelona criteria. 1 = A, 2 = B, 3 = C, 4 = D.

pathomechanism of the relationship between thrombocytosis and tumours is not clear. Stone *et al.* found significant correlation not only between elevated platelet counts and thrombopoietin (TPO), but also with serum interleukin-6 (IL-6) in patients with ovarian cancer [8]. Based on those results, they suggested a possible paracrine-mediated paraneoplastic pathway: the IL-6 expressed and secreted by the ovarian tumour induces TPO synthesis in the liver, which stimulates the bone marrow and increases the platelet count. The end-result of this process is tumour-induced thrombocytosis. This pathway has not been studied in other tumours.

Aim

Our aim was to uncover any correlation between thrombocytosis and serum IL-6 in gastrointestinal tumours.

Material and methods

Between March 2015 and March 2017, 192 patients with different gastrointestinal tumours undergoing sur-

gical intervention were evaluated in the 1st Department of Surgery of Semmelweis University. Exclusion criteria were any inflammatory disease (pneumonia, wound complication, abscess, cholecystitis, inflammation of the intravenous line, endocarditis, urological infection, Crohn's disease, ulcerative colitis), thromboembolic complications (deep vein thrombosis, pulmonary embolism, heart attack), and corticosteroid therapy. A total of 31 patients were excluded. Platelet count and IL-6 level were defined from blood samples drawn routinely before the operation (within 4 weeks). Thrombocytosis was defined as a platelet count exceeding $400 \times 10^3/\mu\text{l}$. Serum IL-6 was measured with an ADVIA 2120 Hematology Analyzer.

Statistical analysis

Multivariate linear regression was applied to determine predictors of the platelet count. The coefficient and its 95% confidence interval (CI) were calculated for each variable. Pairwise associations between scale variables were analysed by Pearson correlation. All the statistical tests were two-sided, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analysed by using RStudio program package (Version 1.0.143 – ©2009-2016 RStudio, Inc.).

Results

In the examined time interval patients undergoing surgery had a wide spectrum of gastrointestinal tumours regarding localisation and disease stage. We evaluated the correlation of platelet counts and serum IL-6 in each tumour type (Table I). Because the number of patients was relatively small in the subgroups, none of the correlations proved to be significant. However, a moderately strong positive correlation could be found in colon and oesophageal cancer.

We found weak but significantly positive correlation between elevated platelet counts and serum IL-6 (correlation coefficient: $R = 0.214$, $p = 0.006$) (Figure 1).

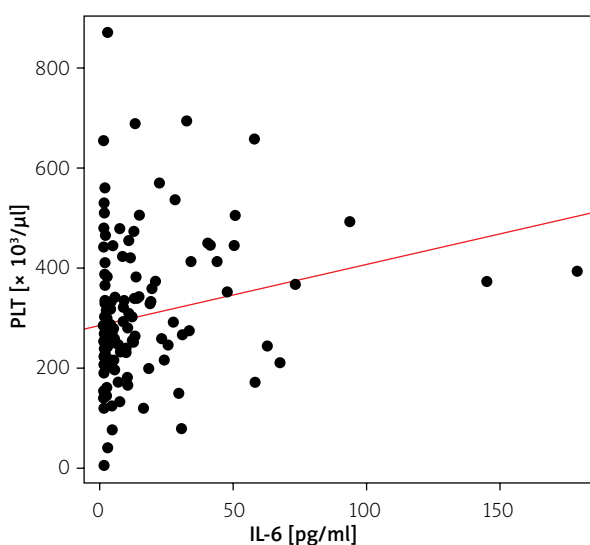


Figure 1. Correlation between elevated platelet counts and serum IL-6

Tumour grade did not show a significant effect on platelet counts and IL-6 level. However, if patients were divided in two groups according to disease stage – defined as early (stage 1 and 2) or advanced disease (stage 3 and 4) – IL-6 was significantly higher in the latter group (Table II).

Multivariate analysis corrected for haemoglobin, white blood cell counts, and advanced stages showed no significant correlation between IL-6 and thrombocytosis (Table III).

Haemoglobin showed negative, while white blood cell counts showed positive significant association with the platelet counts. A total of 12 patients had a history of thromboembolic event. We found lower platelet counts in patients with positive thromboembolic history (251 vs. $306 \times 10^3/\mu\text{l}$), but the difference was not significant ($p = 0.153$). Similarly, IL-6 was lower in this group of patients (10.3 vs. 12.8 pg/ml); however, the difference was not significant ($p = 0.717$). Fifteen patients took acetylsalicylic acid on a regular basis. The mean platelet count in patients on acetylsalicylic acid was $293 \times 10^3/\mu\text{l}$ compared to $303 \times 10^3/\mu\text{l}$ in patients without. The difference was not significant ($p = 0.776$). Similarly, the difference was not significant between the two groups (10.8 vs. 12.8 pg/ml) regarding the IL-6 level ($p = 0.748$).

Discussion

There are an increasing number of observations that chronic inflammation promotes malignant transformation of cells and tissues [9]. The strong relationship between tumour and inflammation is also supported by the fact that the use of anti-inflammatory drugs helps to prevent the development of malignant diseases.

In tumour-related inflammation tissues are infiltrated by tumour-associated macrophages (TAMs), white blood cells, and inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF), IL-1, IL-6, and chemokines (CCL2 and CXCL8), which facilitates tissue remodelling and angiogenesis [10]. IL-6 is one of the most expressed inflammatory mediators in the microenvironment of the tumour. It takes part in the regulation of almost every process of tumour growth, such as the inhibi-

Table II. Correlation between tumour stage and mean platelet counts or IL-6 levels

Parameter	Early stage	Advanced stage	P-value
PLT average [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	294.33	310.98	0.434
IL-6 average [pg/ml]	5.4	16.2	0.0002

tion of apoptosis [11], facilitation of cell survival [12], proliferation [13], angiogenesis [14], tumour invasion and metastasis formation [15], and metabolism of tumour cells [16]. In the microenvironment of the tumour the main source of IL-6 are the TAMs, the CD4+ T-cells, the myeloid-derived suppressor cells (MDSC), and the fibroblasts [17, 18]. In the microenvironment of the tumour IL-6 directly supports tumourigenesis with the modulation of intrinsic and extrinsic tumour cell activity [19]. IL-6 has a potential growth-stimulating effect in the tumour cells with the activation of several signalling pathways. IL-6 stimulates tumour cell proliferation and survival with the activation of Ras/Raf/MEK/MAPK, PI3K/AKT, and JAK/STAT pathways via the tyrosin phosphorylation of gp130 [13, 20]. In the inflammation transcriptional factors such as NF- κ B, STAT-3 and primary inflammatory cytokines (IL-1b, IL-6 and TNF- α) are essential [21]. NF- κ B is the main regulator of the inflammation that emerges from control in several tumour types. IL-6 is the main effector molecule in the NF- κ B activation through the STAT-3 pathway; IL-6 is an important element of the NF- κ B/IL-6/STAT-3 cascade in tumourigenesis [12]. STAT-3 is necessary to keep NF- κ B activated in tumours [22], while IL-6 promotes carcinogenesis with its proinflammatory and cell-proliferative effect [23, 24]. IL-6-induced thrombocytosis is accompanied both with the mRNA expression of hepatic TPO and the increase of plasma TPO [25].

In several types of gastrointestinal cancer, elevated serum IL-6 was detected [26, 27]. STAT-3-dependent tumourigenesis correlates with the local secretion of IL-6 in colorectal cancer [12]. Additionally, IL-6 produced by M2 macrophages induces tumour development in ulcerative colitis [28]. Because the inflammation promotes gastrointestinal tumour growth and progression via the

Table III. Correlation of platelet counts and clinical parameters with multivariate linear regression analysis

Parameter	Coefficient	95% CI	P-value
IL-6 [pg/ml]	-0.226	-0.927–0.476	0.526
Haemoglobin [g/l]	-2.213	-3.016 – -1.411	< 0.001
White blood cell count [g/l]	24.813	19.301–30.324	< 0.001
Advanced stage	19.958	-16.747–52.663	0.308

activation of IL-6-mediated STAT-3 pathway, it may be assumed that there is a strong correlation between IL-6, inflammation, and tumour progression.

Elevated serum IL-6 correlates clinically with advanced tumour stage in a variety of cancers, which implies that the inhibition of IL-6 signalling may result in therapeutic benefit. In tumours that are characterised by IL-6 overproduction, the inhibition of IL-6 signalling or the minimisation of serum IL-6 could be a therapeutic strategy.

Since the publication of Stone et al. no other study has supported or disproved their theory in other tumours. Our study does not support the paracrine-mediated paraneoplastic pathway in gastrointestinal tumours, in contrast to ovarian cancer. Although, univariate analysis showed correlation between elevated platelet counts and serum IL-6, multivariate analysis did not support this relationship. If the correlation was evaluated in the specific tumour types, a moderately strong correlation was found in colon and oesophageal cancer. Serum IL-6 was more elevated in more advanced disease, as described in the literature. The exact reason has not been elucidated yet. Thrombocytosis accompanying malignancies is often postulated as the result of anaemia. However, in our patient setting the ability of anaemia to cause reactive thrombocytosis could not be supported. Thrombocytosis showed significant correlation with white blood cell count instead of IL-6; therefore, it may be implied that inflammatory process influences both parameters.

The weakness of our study is that the study group was heterogenous and the subgroups were relatively small. Therefore, we think that a similar study on a larger group of patients is required to support our findings.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baranyai Z, Josa V, Toth A, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets* 2016; 27: 269-75.
- Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, et al. Preoperative thrombocytosis is associated with survival after surgery for colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2012; 106: 887-91.
- Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005; 105: 178-85.
- Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, et al. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999; 59: 1295-300.
- Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, et al. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest* 1988; 81: 1012-9.
- Borsig L, Wong R, Feramisco J, et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3352-7.
- Placke T, Kopp HG, Salih HR. Modulation of natural killer cell anti-tumor reactivity by platelets. *J Innate Immun* 2011; 3: 374-82.
- Stone RL, Nick AM, McNeish IA, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 610-8.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149185.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-81.
- Lin MT, Juan CY, Chang KJ, et al. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1947-53.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-13.
- Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, et al. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122: 1521-9.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003; 22: 1517-27.
- Oh K, Lee OY, Shon SY, et al. A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast Cancer Res* 2013; 15: R79.
- Mauer J, Denson JL, Bruning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol* 2015; 36: 92-101.
- Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer* 2014; 110: 469-78.
- Nolen BM, Marks JR, Ta'san S, et al. Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R45.
- Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol* 2014; 26: 38-47.
- Leu CM, Wong FH, Chang C, et al. Interleukin-6 acts as an anti-apoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene* 2003; 22: 7809-18.
- Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 2009; 15: 79-80.
- Kesanakurti D, Chetty C, Rajasekhar Maddirela D, et al. Essential role of cooperative NF-kappaB and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. *Oncogene* 2013; 32: 5144-55.
- Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, et al. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 486-94.

24. Johnson C, Han Y, Hughart N, et al. Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl Gastrointest Cancer* 2012; 1: 58-70.
25. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-5.
26. De Vita F, Romano C, Orditura M, et al. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 45-52.
27. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6: a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 1248-53.
28. Schiechl G, Bauer B, Fuss I, et al. Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *J Clin Invest* 2011; 121: 1692-708.

Received: 23.03.2019

Accepted: 27.08.2019

Az interleukin-6-expresszió vizsgálata colorectalis adenocarcinomában szenvedő betegeken

Jósa Valéria dr.¹ ■ Féderer Krisztina dr.² ■ Zrubka Zsombor dr.³
Reiniger Lilla dr.⁴ ■ Baranyai Zsolt dr.⁵

¹Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház és Rendelőintézet, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

³Óbudai Egyetem, HECON – Egészségügyi Közgazdaságtan Kutatóközpont, Budapest

⁴Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

⁵Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Sebészeti Klinika, Budapest

Bevezetés: A gyulladásos folyamatok és a tumorok kialakulása, illetve progressziója közötti összetett kapcsolat ismert. Az interleukin-6 (IL6) egy pleiotrop gyulladásos citokin, melynek tumorstimuláló és -gátló tulajdonsága is van.

Célkitűzés: Kutatásunk célja az IL6-expresszió vizsgálata volt colorectalis adenocarcinoma miatt reszekción átesett betegek szövettani metszetein.

Módszer: Az Uzsoki Utcai Kórházban 2004 és 2011 között reszekált 64, colorectalis tumoros beteg demográfiai, sebészeti és patológiai adatait gyűjtöttük össze. A betegek szövettani metszeteit IL6-antitesttel festettük. A digitalizált metszeteket kvantitatív színelemzéssel kiértékeljük, majd az eredményeket a betegek klinikai paramétereinek függvényében elemeztük.

Eredmények: Előrehaladott stádiumú betegeknél a tumorsejtek IL6-expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult lineáris regresszióval. A tumorsejtek IL6-expressziója azonban nem korrelált a nemmel, az életkorral vagy a tumor differenciáltságával.

Megbeszélés: Különbségek mutatkoztak a tumorsejtek és a stromasejtek IL6-kifejeződése között.

Következtetés: Az IL6 hasznos marker és potenciális terápiás cél lehet az előrehaladottabb stádiumú colorectalis tumoros betegeknél.

Orv Hetil. 2021; 162(37): 1499–1504.

Kulcsszavak: interleukin-6, colorectalis tumor, expresszió

Investigation of IL6 expression in patients with colorectal adenocarcinoma

Introduction: It is well known that there is a complex correlation between inflammation and tumor development and tumor progression. Interleukin-6 (IL6) is a pleiotropic inflammatory cytokine with both tumor stimulating and inhibiting effect.

Objective: The goal of our study was to evaluate the IL6 expression of histological slides from patients after resection of colorectal adenocarcinoma.

Method: Demographical, surgical, and pathological findings of 64 patients with colorectal cancer operated between 2004 and 2011 in Uzsoki Teaching Hospital were evaluated. Histopathological slides were stained with IL6 antibody. The digitalized slides were assessed with quantitative color analysis, and the results were evaluated according to patients' clinical parameters.

Results: Linear regression showed significantly higher IL6 expression in the tumor cells in patients with advanced stages. However, the IL6 expression of the tumor cells did not correlate with sex, age, or tumor grade.

Discussion: There were differences between the IL6 expression in tumor cells and stromal cells.

Conclusion: IL6 may be a useful marker and potential therapeutic target in patients with advanced colorectal cancer.

Keywords: interleukin-6, colorectal tumor, expression

Jósa V, Féderer K, Zrubka Zs, Reiniger L, Baranyai Zs. [Investigation of IL6 expression in patients with colorectal adenocarcinoma]. Orv Hetil. 2021; 162(37): 1499–1504.

(Beérkezett: 2021. február 9.; elfogadva: 2021. március 9.)

Rövidítések

ANOVA = (analysis of variance) varianciaanalízis; APC = adenomatosus polyposis coli gén; BRAF = (rapidly accelerated fibrosarcoma B) a rapidan gyorsuló fibrosarcomakináz-család B-tagja; CD4 = (cluster of differentiation 4) differenciációs klaszter-4; CpG = (cytosine-phosphate-guanine) citozin-foszfát-guanin; CTNNB1 = (catenin beta 1) katenin- β 1-kódoló gén; DNMT1 = (DNA methyltransferase) DNS-metil-transzferáz enzim; DNS = dezoxiribonukleinsav; ERBB2 = Erb-B2 receptor tirozin-protein kináz-2; ETT TUKEB = Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásügyi Bizottság; IL6 = interleukin-6; MDSC = (myeloid-derived suppressor cells) myeloid eredetű szuppresszor sejtek; miRNS = mikro-ribonukleinsav; mRNS = (messenger RNS) hírvívő ribonukleinsav; STAT3 = (signal transducer and activator of transcription 3) jelátvivő és transzkripció aktivátor-3; STK11 = szerin/treonin kináz-11; TAM = tumorasszociált macrophagok; TNM = tumor, nodus, metastasis; TP53 = tumorprotein-53

A vastag- és végbélrák világszerte élen áll a daganatos megbetegedések statisztikáit illetően. Európában a lakosság kor szerinti megoszlásával korrigált, 100 000 lakosra jutó esetek száma alapján a betegség incidenciája férfiaknál 12,3%, nőknél pedig 13,1% [1]. A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2015-ben hazánkban közel 5800 férfinél és mintegy 4700 nőnél diagnosztizálták ezt a daganattípust. A daganatos megbetegedések növekvő gyakorisága és az általuk okozott fokozódó népegészségügyi probléma miatt fontos az etiológia minél részletesebb megismerése, a kialakulás mechanizmusának akár molekuláris szinten történő feltérképezése. A patomechanizmus hátterében álló különféle jelátvivő folyamatok ismeretével olyan markerek azonosítására nyílnak lehetőségek, melyek segítségével sikeresebb lehet a kezelés. Számos tanulmány kimutatta, hogy a vastagbél-tumorsejtek, kemo- és citokinek a kísérletes és emberi tumorsejtek mikrokozonyzatában mindig felfedezhetők. A számos gyulladáscsökkentő citokin közül az utóbbi időben egyre több figyelem irányul az interleukin-6 (IL6)-ra. Az IL6 egy pleiotrop hatású citokin, melyet számos sejttípus termel [3, 4]. Fontos szerepet játszik az immunszabályozásban és a vércépzésben. Az egyik legfontosabb hatása, hogy részt vesz a daganatos sejtek osztódásában és differenciálódásában [4, 5]. Ám mivel az IL6 elősegíti a B- és T-lymphocyták érését, illetve aktivációját, a tumorellenes immunválasz kialakulásában is szerepet játszik. Az IL6 fokozott termelődését írták le myeloma multiplexben [6], endometriumtumorokban [7], tüdőrákban [8], vesesejtes carcinomákban [9], méhnyakrákban [10, 11] és emlőrákban [12]. Ezenkívül több tanulmány felvetette az IL6 szerepét a colorectalis tumorok kialakulásában és progressziójában is. Kimutatták, hogy emelkedett szérumszintű IL6-szint mérhető vastag- és végbélrákban [13, 14]. Kevés információ áll azonban rendelkezésre arról,

hogy az IL6-expresszióhoz milyen klinikopatológiai jellemzők társulnak ezekben a tumorokban. Vizsgálatunk ezen kérdés megválaszolására irányult.

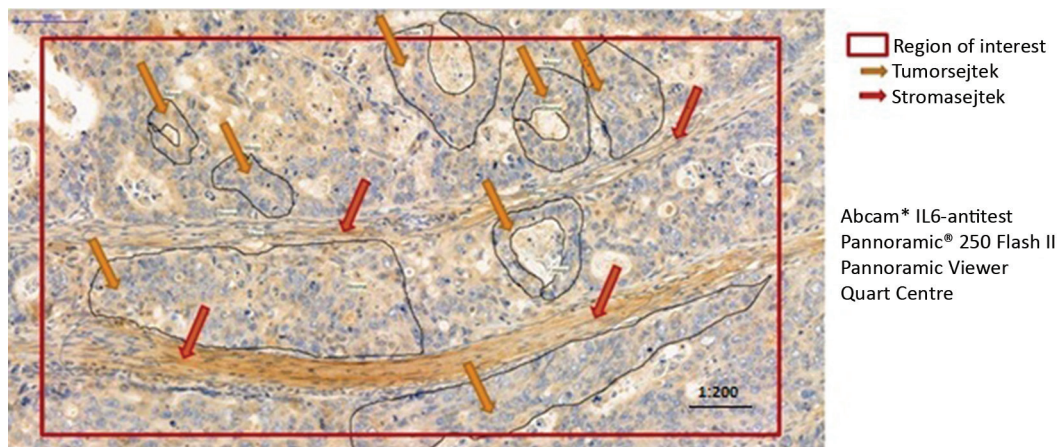
Módszer

Kutatásunkhoz az Uzsoki Utcai Kórházban 2004 és 2011 között operált 64, colorectalis tumoros beteg demográfiai, sebészeti és patológiai adatait gyűjtöttük össze. Vizsgálatunkba szövettanilag igazolt adenocarcinomas beteget válogattunk be. A kizárás kritériumai a következők voltak: szinkron egyéb tumor, gyulladáscsökkentő állapotok (tüdőgyulladás, sebgyulladás, tályog, epehólyag-gyulladás, branülgyulladás, endocarditis, húgyúti fertőzés, Crohn-betegség, colitis ulcerosa stb.) és szteroidterápia. A betegek stádiumait két, korai (I. és II. stádium) és előrehaladott (III. és IV. stádium) csoportra osztottuk. A szövettani metszeteket a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében Abcam® (Cambridge, Egyesült Királyság) IL6-antitesttel festettük meg, a sejtmagokat hematoxilinnel tettük láthatóvá. A szövettani metszeteket digitalizálás után a Panoramic Viewer (3DHitech, Budapest) nevű programmal értékeltük ki. Első lépésben metszetenként öt területet jelöltünk ki, ügyelve arra, hogy a területeken a tumor- és a stromasejtek aránya megfeleljen az egész metszeten látott aránynak. Ezt követte az adenocarcinoma és a stroma sejteinek kijelölése. A tumorsejtek, illetve a stromasejtek festődési intenzitásának kiértékeléséhez a QuantCenter (3DHitech) programot alkalmaztuk. A program a színintenzitás alapján számszerűsítette a pozitívítást, és ezt erős, mérsékelt, gyenge és negatív csoportokba sorolta. Az első két csoportot „kifejezett”, a második kettőt pedig „nem kifejezett” IL6-expresszióként határoztuk meg.

Statisztikai elemzés

A számításokhoz deskriptív módszereket, keresztábrát Fisher-féle egzakt próbával, egyutas varianciaanalízist (ANOVA), az adatok eloszlásától függően független mintás vagy páros t-próbát vagy Wilcoxon-féle előjeles rangtesztet, Spearman-féle korrelációt, a nemlineáris összefüggések vizsgálatához a prediktor változók másod- és harmadfokú polinomjait is tartalmazó többváltozós regressziót, valamint keverthatás-modelleket alkalmaztunk. A prediktor változók az életkor, a nem, a tumorstádium, a differenciáltsági fok és a szövettani paraméterek voltak. A több kategóriát tartalmazó változók hatásshignifikanciáját (például tumorstádium) az egyes kategóriák szintjén és együttesen Wald-tesztrel is vizsgáltuk.

A vizsgálatokat az ETT TUKEB 5022-7/2013/EKU (39.214) számú engedély birtokában végeztük.



1. ábra | Digitalizált IL6-festett metszeten a tumorsejtek láthatók kijelölve a ROI-n belül. A stromasejtek területeit piros nyilakkal jelöltük (színelemzéssel értékeltük ki a tumorsejtek és a stromasejtek IL6-pozitivitását)
IL6 = interleukin-6; ROI = (region of interest) vizsgálati régió

1. táblázat | A betegek klinikopatológiai adatai

Kor	Átlag (± SD) év	64,2 (± 11,3)
Nem	Férfi	40 (62,5%)
	Nő	24 (37,5%)
Stádium	I. (korai)	15 (23,4%)
	II. (korai)	22 (34,4%)
	III. (előrehaladott)	19 (29,7%)
	IV. (előrehaladott)	8 (12,5%)
Differenciáltság (grade)	Jól differenciált	10 (15,6%)
	Közepesen differenciált	41 (64,1%)
	Rosszul differenciált	13 (20,3%)

SD = standard deviáció

Eredmények

A vizsgálatba 64 beteg került bevonásra (1. táblázat). A betegek átlagéletkora 64,2 év volt. A betegek közel kétharmada férfi volt. A korai stádiumú betegek aránya mérsékeltén nagyobb volt a vizsgálati csoportban, mint az előrehaladott stádiumú betegeké (57,8% vs. 42,2%). A tumorok jelentős része közepesen differenciált volt,

a jól és rosszul differenciált daganatok közel hasonló arányban voltak kimutathatók.

A QuantCenter képanalízis-platform segítségével kiszámoltuk a tumor- és stromasejtek IL6-pozitív területeinek százalékos eloszlását. A gyulladással nem jelöltük ki, egyrészt azért, mert nem minden metszeten találtunk gyulladással besűrűsödést, másrészt ahol volt, ott nem észleltünk IL6-pozitivitást (1. ábra).

A betegek fő jellemzőit az egyes tumorstádiumok tekintetében a 2. táblázat mutatja. A tumorstádiummal a nem (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,609$) és az életkor (független mintás t-teszt, $p = 0,546$) nem mutatott szignifikáns összefüggést.

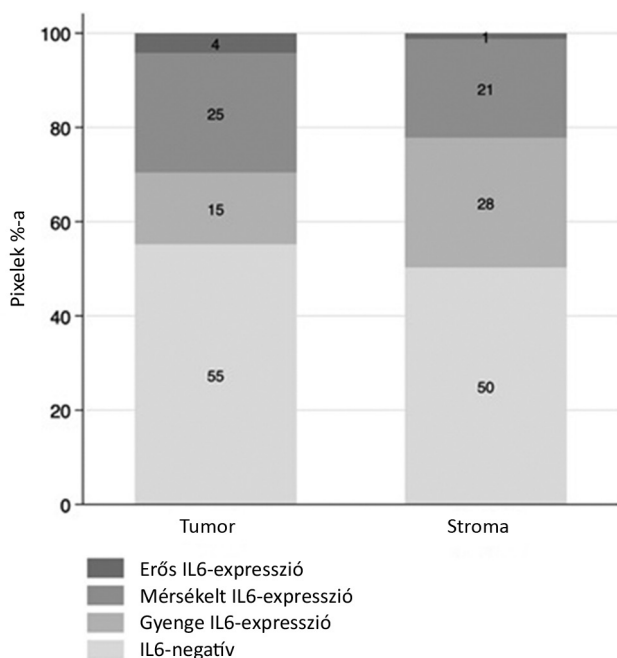
Különbségek mutatkoztak a tumor- és a stromasejtek IL6-kifejeződése között. A tumorsejtek ($44,8 \pm 22,9\%$) és a stromasejtek ($49,7 \pm 20,0\%$) IL6-expressziója között nem találtunk ugyan szignifikáns összefüggést (páros t-teszt, $p = 0,057$), azonban a kifejezett (erős és mérsékelt színintenzitás) IL6-expressziót mutató sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a tumorsejtekben ($29,5 \pm 22,2\%$), mint a stromasejtekben ($22,1 \pm 13,2\%$) (Wilcoxon-próba, $p = 0,005$) (2. ábra).

Előrehaladott stádiumú betegegekben a tumorsejtek IL6-expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult

2. táblázat | A betegek klinikopatológiai adatai a tumorstádium szerint

Tumorstádium	Nem (férfi/nő)	Átlagéletkor (év)	Tumorsejt IL6-pozitivitása (%)	Stromasejt IL6-pozitivitása (%)
Összes	40/24	64,2	44,8	49,7
Korai (I–II.)	15/22	64,9	40,7	46,3
Előrehaladott (III–IV.)	9/18	63,1	50,4	54,5
Korai vs. előrehaladott	Fisher-féle egzakt teszt $p = 0,609$	Független mintás t-teszt $p = 0,546$	Független mintás t-teszt $p = 0,094$	Független mintás t-teszt $p = 0,107$

IL6 = interleukin-6



2. ábra | A különböző IL6-expressziót mutató sejtek aránya a tumorban és a stromában
IL6 = interleukin-6

lineáris regresszióval. A stromasejtek IL6-expressziója nem mutatott összefüggést a tumorstádiummal (3. táblázat).

Több prediktor változó esetén nem találtunk szignifikáns összefüggést. Az esélyhányadoseszt egyik regressziós modellnél sem bizonyult szignifikánsnak (M_1 $p = 0,407$; M_2 $p = 0,272$; M_3 $p = 0,228$; M_4 $p = 0,126$), ami arra utal, hogy összességében a klinikopatológiai para-

3. táblázat | Az IL6-expressziót befolyásoló tényezők vizsgálata lineáris regresszióval

		Tumor	
		IL6-pozitív pixel % (M_1)	Kifejezett IL6-pozitív pixel % (M_2)
Kor		0,08	0,06
Nem ^a	Férfi	1,61	2,15
Stádium ^b	Előrehaladott	12,02	12,68*
Differenciáltság ^c	Közepesen differenciált	3,37	1,05
	Roszzul differenciált	-0,17	-4,35

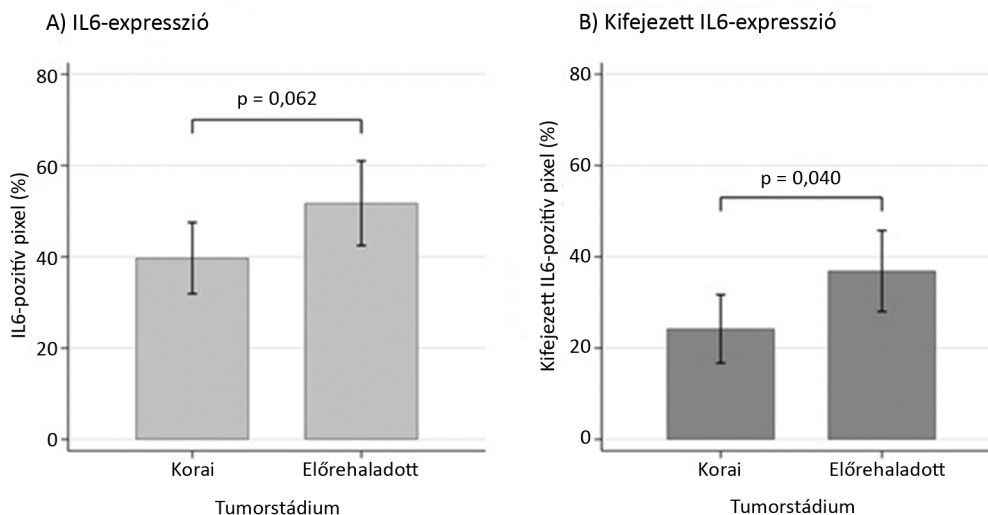
^abázis = női nem; ^bbázis = korai stádium; ^cbázis = jól differenciált

IL6 = interleukin-6

méterek nem mutattak összefüggést az IL6-expresszióval. További regressziós modellekkel azt vizsgáltuk, hogy a tumorstádium befolyásolja-e az egyes klinikopatológiai paraméterek és az IL6-expresszió kapcsolatát, azonban nem sikerült ilyen összefüggést kimutatnunk. Az előrehaladott (III–IV.) tumorstádium esetén azonban a kifejezett festődést mutató pixel aránya alapján nagyobb mértékű IL6-expressziót találtunk a tumorszövetben (3. ábra).

Megbeszélés

Az IL6 fontos szerepet játszik a tumorok kialakulásában, a sejtállandóságban, az invázióban, a proliferációban [15], az apoptózisban, a progresszióban [16, 17], az angioge-



Hibaszám: 95% megbízhatósági intervallum
Oszlop: átlag (korrigált becslés)

2. ábra | Az IL6-expresszió a tumorstádium függvényében
IL6 = interleukin-6

nezisben [15, 18] és a tumoros sejtek differenciálódásában [19]. Ahhoz, hogy a tumor korlátlanul osztódásnak induljon, ki kell kerülni a sejt szaporodását gátló tényezőket. Az IL6 által elindított jelátvitelnél a DNS-metiltransferáz enzim (DNA methyltransferase, DNMT1) szintje megemelkedik a sejtben [20]; ennek során a p53 tumorszuppresszor gén promoter részén a CpG-sziget hipermetilálódik, ezzel a sejt önregulációja zavart szenved [21]. DNS-károsodás felléptekor a daganatsejtekben az IL6-szekréció fokozódik, ami a STAT3-aktiváción keresztül nemcsak a DNS-károsodás ellen hat, hanem a tumor növekedését potenciózza [22]. Ezt bizonyítja, hogy ha az IL6/STAT3 útvonal működését gátoljuk – akár az IL6-on, gp130-on, akár a STAT3-on keresztül –, egyúttal lelassítjuk a DNS-károsodásnak kitett tumorsejt növekedését [23]. Úgy tűnik, hogy az IL6 jelentős hatással van a colorectalis tumorok sejtjeire is. Kimutatták, hogy az IL6 *in vitro* elősegíti a daganatos sejtek növekedését [15]. Ezenkívül az IL6 elősegíti a tumor progresszióját, mert bebizonyították, hogy dóziszfüggő módon fokozza a daganatos sejtek kolóniaképződését [24]. Hatására növekszik a colorectalis carcinoma sejtjeinek invazivitása [25]. A tumorokban az IL6-ot leginkább maguk a tumorsejtek, a tumorasszociált macrophagok (TAM-ok), a CD4 T-sejtek, a fibroblastok és a myeloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) expresszálják [26, 27].

Legjobb tudásunk szerint eddig nem közöltek olyan releváns tanulmányt, melyben az IL6-expresszió szintjét antitesttel festett reszekált colorectalis tumoros betegekben biostatistikai módszerekkel elemezték volna. Vizsgálatunk során a kifejezett IL6-expressziót mutató sejtek maguk a tumorsejtek voltak. Eredményeink alapján az IL6-expresszió mértékét nem befolyásolta szövettani differenciáltsági foka. Ez ellentmond *Brozek és mtsai* eredményeinek, akik kimutatták, hogy az IL6-szint normál humán nyálkahártyában alacsony mértékben, míg adenomákban, illetve jól differenciált (G1, G2) tumorokban csak kismértékben nő meg. Magas IL6-szintet kizárólag a rosszul differenciált elváltozásoknál (G3, G4) figyeltek meg [28]. A vizsgálat hátránya az alacsony esetszám, melynek alapján következtetéseiket levonták. Saját vizsgálatunkban emellett összefüggést találtunk az IL6-expresszió és a daganatok stádiumai között. A rosszabb TNM-stádiumokhoz fokozottabb expresszió társult. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az IL6 összefüggést mutat a colorectalis tumorok inváziójával és áttétképződésével. Napjainkban egyre nagyobb figyelem irányul az anatómiai lokalizáció szerepére, ez azonban nem képezte vizsgálatunk tárgyát. A colon és a rectum mRNS- és miRNS-expressziója között különbséget találtak [29]. A colonrákokban a BRAF, CTNNB1, PIK3R1 és SRC mutációi gyakoribbak, míg a rectumtumoroknál az APC, ERBB2, STK11 és TP53 mutációi fordulnak elő nagyobb arányban [30].

A szérumszint emelkedésének mechanizmusa jelenleg nem ismert. Ennek egyik magyarázata a G/C polimorfizmus lehet az IL6-gén promoter régiójának –174C-

pozíciójában. A –174C-allérről kisebb hatékonysággal íródik át fehérje, mint a –174G-allél esetében [31]. *Bel-luco* megállapította, hogy szignifikánsan magasabb szérumszint mérhető azoknál a colorectalis tumoros betegeknél, akiknél az IL6-génben a –174G-polimorfizmus mutatható ki, mint akiknél a –174C [32]. Egérkísérletekben az anti-IL6-receptor-antitest-kezelés csökkentette a colitisasszociált vastagbélrák incidenciáját, így felmerül az IL6 mint terápiás célpont lehetősége is [33].

Következtetés

Egyre növekvő számú bizonyítékok alapján az IL6 jelátvitel mind a sporadikus, mind a gyulladással összefüggő colorectalis tumorok progressziójában kritikus szerepet játszik. Hatása kiemelkedő a tumor inváziójában és metastasisképződésében. Különbségek mutatkoztak a tumorsejtek és a stromasejtek IL6-kifejeződése között. Az IL6 hasznos marker és potenciális terápiás célpont lehet az előrehaladott stádiumú vastag- és végbéltumoros betegek kezelésében.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: J. V.: A szakirodalom áttekintése, a cikk szövegezése, statisztika. F. K.: Adatgyűjtés, mérések. Z. Zs.: Statisztika. R. L.: A szövettani mérések tervezése és beállítása. B. Zs.: A kutatás tervezése, a korrektúra elvégzése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Kanavos P, Schurer W. The dynamics of colorectal cancer management in 17 countries. *Eur J Health Econ.* 2010; 10(Suppl 1): S115–S129.
- [2] Flores BM, O'Connor A, Moss AC. Impact of mucosal inflammation on risk of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2017; 86: 1006–1011.e8.
- [3] Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18: 773–789.
- [4] Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; 10: a028415.
- [5] Garbers C, Rose-John S. Dissecting interleukin-6 classic- and trans-signaling in inflammation and cancer. *Methods Mol Biol.* 2018; 1725: 127–140.
- [6] McNee G, Eales KL, Wei W, et al. Citrullination of histone H3 drives IL-6 production by bone marrow mesenchymal stem cells in MGUS and multiple myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 373–381.
- [7] Cronin JG, Kanamarlapudi V, Thornton CA, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 licenses Toll-like receptor 4-dependent interleukin (IL)-6 and IL-8 production via IL-6 receptor-positive feedback in endometrial cells. *Mucosal Immunol.* 2016; 9: 1125–1136.

- [8] Ogawa H, Koyanagi-Aoi M, Otani K, et al. Interleukin-6 blockade attenuates lung cancer tissue construction integrated by cancer stem cells. *Sci Rep.* 2017; 7: 12317.
- [9] Wang Y, Fu D, Chen Y, et al. G3BP1 promotes tumor progression and metastasis through IL-6/G3BP1/STAT3 signaling axis in renal cell carcinomas. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 501.
- [10] Song Z, Lin Y, Ye X, et al. Expression of IL-1alpha and IL-6 is associated with progression and prognosis of human cervical cancer. *Med Sci Monit.* 2016; 22: 4475–4481.
- [11] Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis *via* a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003; 22: 1517–1527.
- [12] Gyamfi J, Lee YH, Eom M, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci Rep.* 2018; 8: 8859. Erratum: *Sci Rep.* 2020; 10: 13049.
- [13] Zhang X, Hu F, Li G, et al. Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 25.
- [14] Galizia G, Orditura M, Romano C, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin Immunol.* 2002; 102: 169–178.
- [15] Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15: 234–248.
- [16] Remeniuk B, King T, Sukhtankar D, et al. Disease modifying actions of interleukin-6 blockade in a rat model of bone cancer pain. *Pain* 2018; 159: 684–698.
- [17] Suchi K, Fujiwara H, Okamura S, et al. Overexpression of interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2011; 31: 67–75.
- [18] Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1996; 1: d340–357.
- [19] Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, et al. Interleukin-6: molecule in the intersection of cancer, ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7937.
- [20] Liu CC, Lin JH, Hsu TW, et al. IL-6 enriched lung cancer stem-like cell population by inhibition of cell cycle regulators *via* DNMT1 upregulation. *Int J Cancer* 2015; 136: 547–559.
- [21] Hodge DR, Peng B, Cherry JC, et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 2005; 65: 4673–4682.
- [22] Zhang C, Xin H, Zhang W, et al. CD5 Binds to interleukin-6 and induces a feed-forward loop with the transcription factor STAT3 in B cells to promote cancer. *Immunity* 2016; 44: 913–923.
- [23] Yun UJ, Park SE, Jo YS, et al. DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors. *Cancer Lett.* 2012; 323: 155–160.
- [24] Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, et al. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000; 151: 31–38.
- [25] Hsu CP, Chung YC. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2006; 26: 4607–4614.
- [26] Chang Q, Bournazou E, Sansone P, et al. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia* 2013; 15: 848–862.
- [27] Weber R, Groth C, Lasser S, et al. IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cell Immunol.* 2021; 359: 104254.
- [28] Brozek W, Bises G, Girsch T, et al. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2347–2354.
- [29] Peng HW, Slattery M, Mann RS. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* 2009; 23: 2307–2319.
- [30] Hong TS, Clark JW, Haigis KM. Cancers of the colon and rectum: identical or fraternal twins? *Cancer Discov.* 2012; 2: 117–121.
- [31] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1369–1376.
- [32] Belluco C, Olivieri F, Bonafè M, et al. –174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 2173–2176.
- [33] Yang H, Qi H, Ren J, et al. Involvement of NF-kappaB/IL-6 pathway in the processing of colorectal carcinogenesis in colitis mice. *Int J Inflamm.* 2014; 2014: 130981.

(Baranyai Zsolt dr.,
Budapest, Üllői út 78., 1082
e-mail: baranyai.zsolt@med.semmelweis-univ.hu)



Article

Thrombocytosis and Effects of IL-6 Knock-Out in a Colitis-Associated Cancer Model

Valeria Josa ^{1,*}, Szilamer Ferenczi ^{2,†}, Rita Szalai ³, Eniko Fuder ⁴, Daniel Kuti ²,
Krisztina Horvath ², Nikolett Hegedus ^{5,6}, Tibor Kovacs ⁷, Gergo Bagamery ⁸, Balazs Juhasz ²,
Zsuzsanna Winkler ², Daniel S. Veres ⁵, Zsombor Zrubka ⁹, Domokos Mathe ^{5,6,10,‡} and
Zsolt Baranyai ^{11,‡}

¹ Jahn Ferenc Del-pesti Korház és Rendelőintézet, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1135 Budapest, Hungary

² Laboratory of Molecular Neuroendocrinology, Institute of Experimental Medicine, 1083 Budapest, Hungary; ferenczi.szilamer@koki.mta.hu (S.F.); kuti.daniel@koki.mta.hu (D.K.); horvath.krisztina@koki.mta.hu (K.H.); juhasz.balazs@koki.mta.hu (B.J.); winkler.zsuzsanna@koki.mta.hu (Z.W.)

³ Faculty of Medicine, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary; szrituska@gmail.com

⁴ Department of Pathology, Uzsoki utcai Hospital, 1145 Budapest, Hungary; fudereniko@gmail.com

⁵ Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, 1094 Budapest, Hungary; hegedus.nikolett@med.semmelweis-univ.hu (N.H.); veres.daniel@med.semmelweis-univ.hu (D.S.V.); mathe.domokos@med.semmelweis-univ.hu (D.M.)

⁶ CROMed Translational Research Ltd., 1094 Budapest, Hungary

⁷ Department of Biophysics and Radiation Biology, University of Pannonia, Institute of Radiochemistry and Radioecology, 8200 Veszprém, Hungary; kt@almos.uni-pannon.hu

⁸ Mediso Medical Imaging Systems Ltd., 1037 Budapest, Hungary; gergo.bagamery@mediso.hu

⁹ University Research, Innovation and Service Center, University of Óbuda, 1034 Budapest, Hungary; zsombor.zrubka@uni-corvinus.hu

¹⁰ Hungarian Center for Excellence in Molecular Medicine, 6723 Szeged, Hungary

¹¹ 1st Department of Surgery, Semmelweis University, 1082 Budapest, Hungary; barazso@gmail.com

* Correspondence: josavaleria@gmail.com

† These authors contributed equally to this work (equal first authors).

‡ These authors contributed equally to this work (equal last authors).

Received: 6 July 2020; Accepted: 22 August 2020; Published: 27 August 2020



Abstract: There is an increasing number of studies showing that thrombocytosis—accompanying a variety of solid tumors including colorectal cancer (CRC)—is associated with shorter survival and earlier development of metastases. The mechanisms of cancer-associated thrombocytosis are not completely understood yet. The aim of our study was to evaluate the role of IL-6 in tumor development and thrombocytosis in mice with inflammation-induced CRC, using a CRISPR/cas9 IL-6 knockout (KO) strain. Adult male FB/Ant mice ($n = 39$) were divided into four groups: (1) IL-6 KO controls ($n = 5$); (2) IL-6 KO CRC model group ($n = 18$); (3) Wild-type (WT) controls ($n = 6$); and (4) WT CRC model group ($n = 10$). CRC model animals in (2) and (4) received azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) treatment to induce inflammation-related CRC. Plasma and liver tissues were obtained to determine platelet counts, IL-6 and thrombopoietin-1 (TPO) levels. In 1 WT and 2 IL-6 KO mice in vivo confocal endomicroscopy and 18F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET/MRI examinations were performed to evaluate the inflammatory burden and neoplastic transformation. At the end of the study, tumorous foci could be observed macroscopically in both CRC model groups. Platelet counts were significantly elevated in the WT CRC group compared to the IL-6 KO CRC group. TPO levels moved parallelly with platelet counts. In vivo fluorescent microscopy showed signs of disordered and multi-nuclear crypt morphology with increased mucus production in a WT animal, while regular mucosal structure was prominent in the IL-6 KO animals. The WT animal presented more intense and larger colonic FDG uptake than IL-6 KO animals. Our study confirmed thrombocytosis accompanying inflammation-related CRC and the crucial role of IL-6 in this process.

Significantly higher platelet counts were found in the WT CRC group compared to both the control group and the IL-6 KO group. Concomitantly, the tumor burden of WT mice was also greater than that of IL-6 KO mice. Our findings are in line with earlier paraneoplastic IL-6 effect suggestions.

Keywords: thrombocytosis; colorectal cancer; interleukin-6; tumor model; colitis-associated cancer

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is among the most prevalent malignancies worldwide. With 1.65 million new cases and nearly 835 thousand deaths in the industrial world in 2015, CRC is the third most common form of neoplasia among males and the second most frequent one among females [1]. When discovered at an early stage, CRC is often curable. The mortality rate from CRC has been following a declining trend since the mid-eighties. This is attributable to screening, which often reveals large bowel lesions before they transform into a tumor and to advances in therapy. As shown by an increasing number of studies, thrombocytosis accompanying a variety of solid tumors including CRC is associated with shorter survival and an earlier development of metastases [2–4]. Thrombocytosis in early CRC has even been proposed as a predictive biomarker by one study [4]. However, the mechanisms between cancer-associated thrombocytosis and aggravating systemic CRC are not completely understood. According to some hypotheses, platelets contribute to the formation of metastases by cloaking circulating tumor cells and thereby protecting the latter from mechanical injuries [5,6], as well as from the immune defenses of the body [7,8]. At the same time platelets become activated while traveling through the blood vessels of the tumor. The activated platelets facilitate tumor cell proliferation by secreting a number of angiogenic tumor growth factors, such as thrombopoietin (TPO), platelet factor 4 (PF4), transforming growth factor beta (TGF β), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) [9–11]. Angiogenesis accelerates the growth of the tumor [12–14]. Activated platelets release microvesicles that enhance the invasive potential of cancer cells [7]. Recently, a paraneoplastic signaling pathway has attracted much attention, albeit in ovarian cancer. According to the hypothesis by Stone et al., tumors increase interleukin-6 (IL-6) levels which augments TPO production in the liver. This in turn stimulates megakaryocytes in the bone marrow and eventually leads to thrombocytosis [15]. The increase in TPO through IL-6, coupled with thrombocytosis has not yet been confirmed in CRC. We thus investigated the role of IL-6 in IL-6 gene knockout (KO) and in wild-type (WT) mice with inflammation-induced CRC. We decided to apply a widely used model of colitis-associated cancer (CAC) [16,17] whereby the cancer-inducing inflammatory stage is followed by progression of CRC. In this model, several interleukins including more prominently, IL-6 have been observed to drive progression and invasion [18,19].

2. Results

2.1. Verification of IL-6 Gene Knockout

We used the standard lipopolysaccharide (LPS)-provocation test which is routinely performed for ascertaining the loss of function of the IL-6 gene. Thirty-nine mice altogether were studied in the following four groups: (1) IL-6 KO controls ($n = 5$); (2) IL-6 KO treatment group ($n = 18$); (3) WT controls ($n = 6$); and (4) the WT treatment group ($n = 10$). In the IL-6 KO group, IL-6 concentration did not increase after LPS administration, whereas WT animals showed a significant elevation of plasma IL-6 (Figure S1).

2.2. Histopathological and Clinical Characteristics

After termination, multifocal tumors exhibiting polypoid growth were detected in azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-treated CRC model mice, mainly in the descendent colon.

The number of foci ranged from 2 to 8, with equal of variances ($F_{8,8} = 1.11$, $p = 0.88$) and normal distribution in the IL-6 KO and WT subgroups (Shapiro–Wilk test $p = 0.88$ and $p = 0.88$, respectively). Mean (\pm SD) number of tumor foci were significantly greater (Student’s t -test, $t_{16} = -2.79$, $p = 0.013$) in the WT (6.22 ± 0.52) than in the IL-6 KO subgroup (4.22 ± 0.49) (Figure 1A). Mean (\pm SD) total tumor volume (TTV) was $13.6 (\pm 6.2) \text{ mm}^3$ (median 16.2, IQR: 9.3–17.3) in the IL-6 KO, while it was $21.9 (\pm 6.6) \text{ mm}^3$ (median 18.1, IQR: 16.2–28.3) in the WT subgroup. The distribution of TTV was normal in the IL-6-KO subgroup (Shapiro–Wilk test $p = 0.475$), but not in the WT subgroup (Shapiro–Wilk test $p = 0.014$). Despite the greater mean TTV in the WT animals, the applied nonparametric tests did not demonstrate significant differences between the two subgroups (Kolmogorov–Smirnov test exact $p = 0.352$; Mann–Whitney $p = 0.058$, equality of medians test exact $p = 0.157$) (Figure 1B).

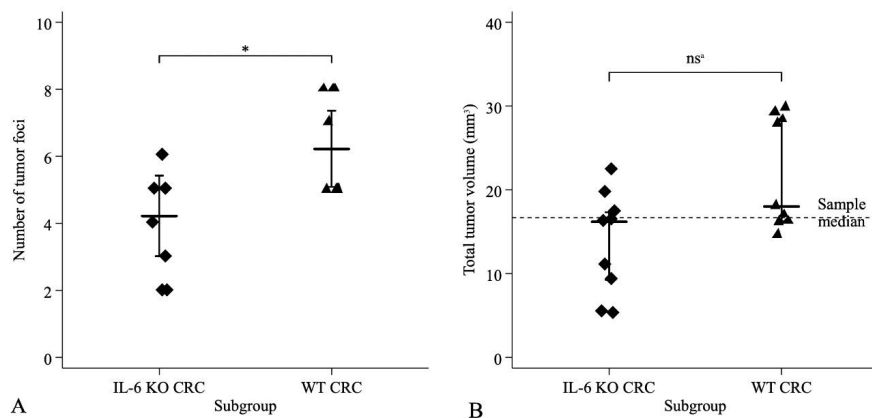


Figure 1. Distribution of (A) tumor foci and (B) total tumor volume (TTV) in IL-6 KO CRC model and WT CRC model groups. Total number in both groups was $n = 9$. A—number of tumor foci with two-sided Student– t -test; B—TTV with nonparametric tests. * Two-Sided Student’s t -test: $t_{16} = -2.79$, $p = 0.013$. ns^a (^a not significant) Kolmogorov–Smirnov test exact $p = 0.352$, Mann–Whitney test $p = 0.058$, non-parametric equality of medians test exact $p = 0.347$.

The 1st, 2nd, 3rd and 4th TTV quartiles comprised of 4 (TTV range $5.1\text{--}10.9 \text{ mm}^3$), 5 (TTV range $14.6\text{--}16.4 \text{ mm}^3$), 4 (TTV range $17.0\text{--}19.6 \text{ mm}^3$) and 5 (TTV range $22.4\text{--}29.7 \text{ mm}^3$) animals, respectively. Likewise, despite the shift of distribution towards greater TTV quartiles (e.g., larger tumors with more foci) in the WT subgroup (0.0%, 33.3%, 22.2%, 44.4% of animals in the 1st, 2nd, 3rd and 4th quartile, respectively) compared to the IL-6 KO subgroup (44.4%, 22.2%, 22.2% and 11.1% of animals in the 1st, 2nd, 3rd and 4th quartile, respectively), the difference was not statistically significant (Fischer’s exact $p = 0.157$) (Figure 2A).

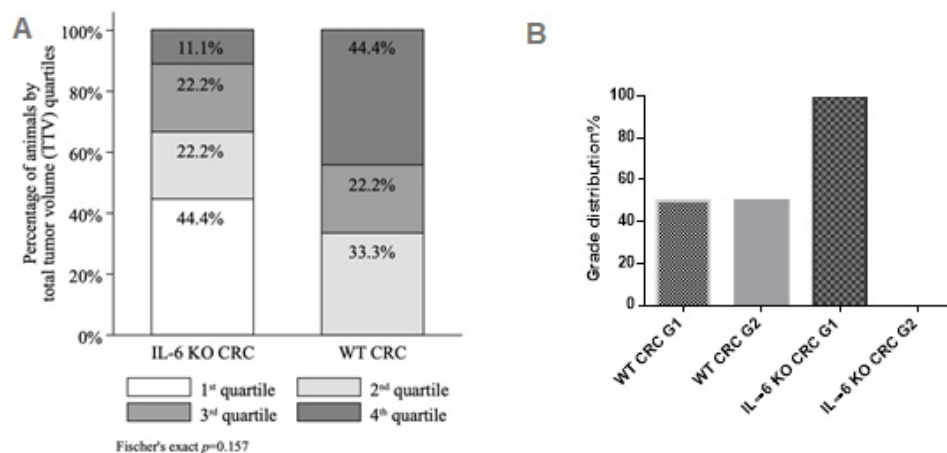


Figure 2. (A) Total tumor volume (TTV) quartiles by IL-6 status (IL-6 KO CRC $n = 9$, WT CRC $n = 9$) with Fischer’s exact test; (B) tumor grade distribution.

Histology confirmed Grade 1 to 2, Stage pTis or T1 tubular adenocarcinoma in both groups (Figure S2). Only low-grade tumors were found in IL-6 KO mice, whereas the distribution of low and moderate grade tumors was equal in the WT group (Figure 2B).

IL-6 KO mice exhibited an increased mortality rate compared to WT animals (Figure 3). The IL-6 KO animals showed more severe inflammation after each treatment cycle registered in the decimal scoring system and therefore more animals were lost during the study before reaching the end point (Figure S3).

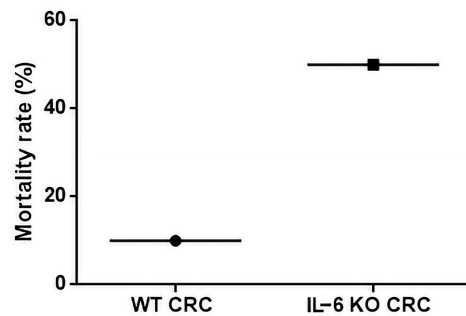


Figure 3. Mortality rate in WT CRC and IL-6 KO CRC groups (WT, IL-6 KO $n = 9$, respectively). Mortality rate was calculated as the number of dead animals at Week 12 divided by the total number of animals at Day 1.

Platelet counts were normally distributed (Shapiro–Wilk test $p = 0.14$, $p = 0.71$, $p = 0.98$, $p = 0.99$ in the IL-6 KO control, IL-6 KO treated, WT control and WT treated animals, respectively) with equal variances across subgroups (Bartlett's test $p = 0.68$). Mean platelet counts differed between the four subgroups (ANOVA $F_{3,21} = 31.16$, $p < 0.001$). Concerning the treatment groups, mean (\pm SD) platelet count was significantly higher (Wald test $F_{1,21} = 30.56$, $p < 0.001$) in the WT (754 ± 103 G/L) than in the IL-6 KO animals (340 ± 109 G/L). In both genotypes, platelet count was lower in the control than in the treatment groups and this difference was significant (Wald test $F_{1,21} = 66.39$, $p < 0.001$) with the wild genotype (Figure 4).

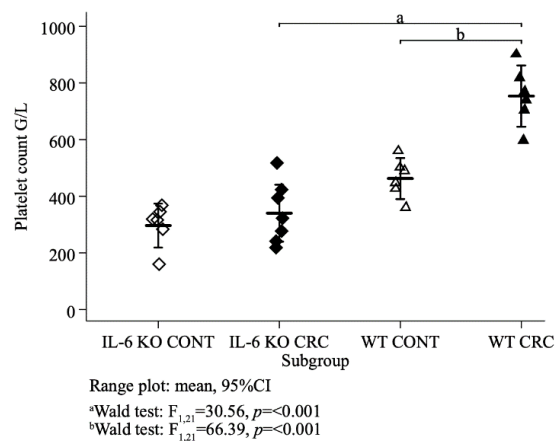


Figure 4. Mean platelet counts of all animal groups (G/L). (IL-6 KO CONT $n = 6$, IL-6 KO CRC $n = 7$, WT CONT $n = 6$, WT CRC $n = 6$), ordinary least squares (OLS) regression, Wald test.

2.3. PCR Results

Liver thrombopoietin-1 (TPO) gene expression was higher in the WT CRC model group than in the other groups (Figure 5). The mean TPO levels were similar in the control groups and the IL-6 KO CRC model group, although the data range was greater in the latter group. On the contrary, the expression of thrombospondin gene (THBS-1) in liver was significantly elevated in the IL-6 KO group compared to the other groups. There was no difference between the control groups regarding

THBS-1 expression, whereas mice in the WT treatment group showed slightly elevated expression that did not reach significance.

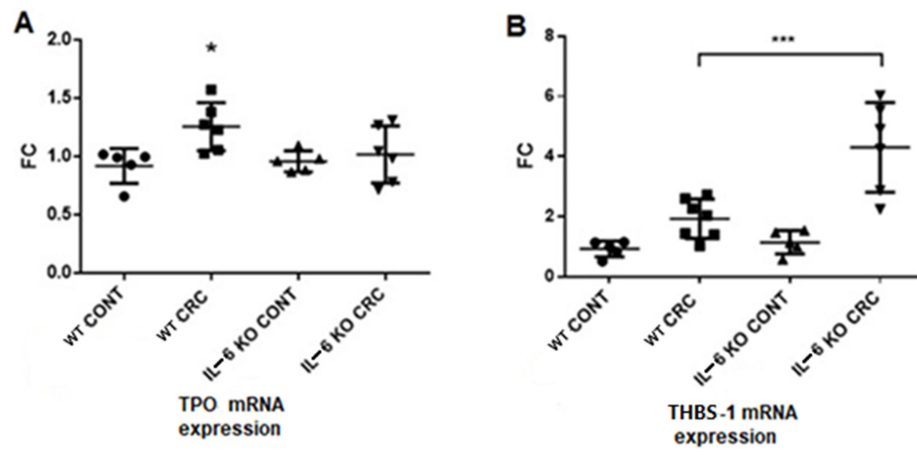


Figure 5. (A) TPO and (B) THBS-1 mRNA expressions in the liver. mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR. (WT CONT $n = 5$, WT CRC $n = 6$, IL-6 KO CONT $n = 5$, IL-6 KO CRC $n = 6$) Data represent the mean (SD). (A): * $p < 0.05$ (B): *** $p < 0.001$ (FC = fold change).

2.4. Intraluminal Fluorescent Endomicroscopy

Intraluminal endomicroscopy showed marked difference between the animals. In WT animals with tumors, after acriflavine nuclear staining, the mucosal luminal surface *in vivo* images showed asymmetric patterns of crypts. The opening of crypts was increased in diameter and their shape deflected from circular. Crypt walls were also seemingly more infiltrated with cells, and overall cell content was higher. Red channel revealed increased mucus production. In IL-6 KO animals, both *in vivo* and immediately post-harvesting crypt morphology was similar to normal with regular crypt pattern (Figure 6).

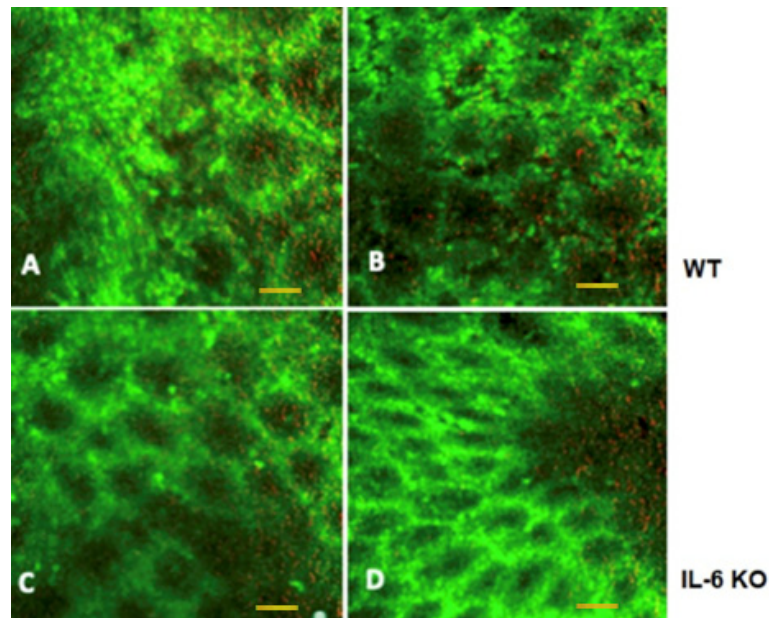


Figure 6. Intraluminal fluorescent endomicroscopic images of WT and IL-6 KO mouse colon. (A) *In vivo* intraluminal image; (B) *ex vivo* mucosal surface image in a WT mouse with colonic tumor; (C) *in vivo* intraluminal image; (D) *ex vivo* mucosal surface image in an IL-6 knockout mouse with inflammation-related colonic neoplasia. 488 nm (green) and 660 nm (red) dual band fluorescent Cellvizio endomicroscopic images. Scale bar represent 50 microns for all images.

2.5. Imaging Studies

Positron emission tomograph (PET)/magnetic resonance imaging (MRI) images also showed clear differences between the WT and IL-6 KO animals (Figure 7). In the WT mouse (^{18}F)-fluoro-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in the descendent colon and transverse colon was very high corresponding with tumor foci (Figure 7A,B,I). In the IL-6 KO mouse large intestinal uptake remained scarce, with no signs of lymph node involvement (Figure 7C,D,G,H). Interestingly, increased peritoneal FDG activity uptake was observed and a small bowel focus was also detected (Panel E, F).

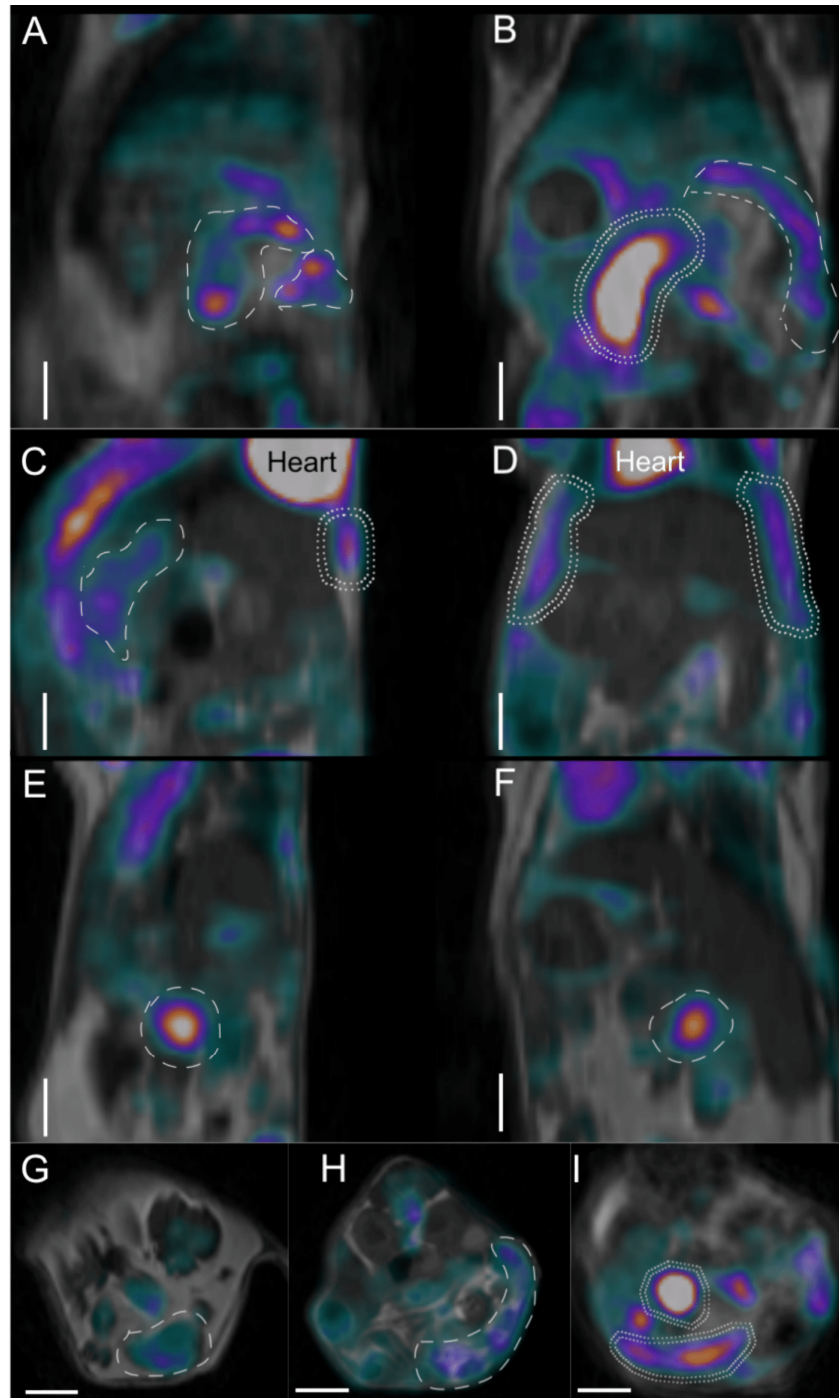


Figure 7. Positron emission tomograph (PET)/magnetic resonance imaging (MRI) imaging of WT (A,B,I) and IL-6 KO (C–H) mouse abdominal regions in three section planes. (A) Sagittal planes of WT

mouse; (B) horizontal section of WT mouse; (C,E) sagittal planes of IL-6 KO mice; (D,F) horizontal planes of IL-6 KO mice; (G,H) cross-sections of IL-6 KO mice; (I) cross-section of WT mouse abdomen. High [18F]-fluoro-deoxy-d-glucose (FDG) activity uptake regions (over 0.2 standardized uptake values (SUV values) are circumscribed with dashed lines. Double-dashed line shows very high (over 0.4 SUV value) FDG uptake regions. Color scales are grayscale for the background anatomic MRI images, while the PET component shows low uptake in black (no uptake) to blue (low uptake), moderate in purple to red and higher FDG uptake in red through yellow to white (highest uptake). Heart is annotated in panels C and D for reference. White scale bars in each panel equal 500 microns.

Inflammatory reactions and water signal enhancements in the WT animal were also more prominent in MRI and PET imaging, showing an enlarged retroperitoneal lymph node in MRI and its moderate–high FDG uptake (Figure S4). The simultaneous placement of mice in the multi-animal bed enabled to create an abdominal cross-sectional overview of the reconstructed PET/MRI images (Figure S5).

We compared the FDG uptake in the highly avid tumorous foci in the WT animal and the two IL-6 KO animals, by fitting a mixed effects model using a maximum-likelihood estimator, assuming fixed effect for IL-6 status and a random effect for maximal standardized uptake values (SUV_{max}) by each animal. FDG uptake was significantly greater in the WT animal compared to the IL-6 KO animals ($p < 0.001$) (Figure 8).

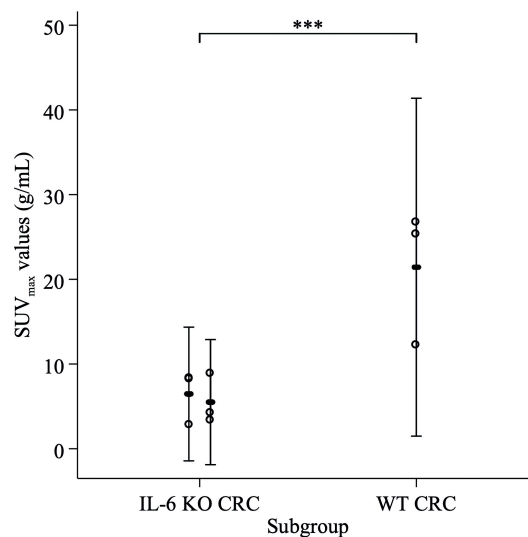


Figure 8. FDG uptake comparison in the highly avid tumor foci in the WT animal and the two IL-6 KO animals, mixed effects model. Hollow markers: SUV_{max} values of three most avid focal regions. Range plot: SUV_{max} mean, 95%CI by animal. *** Mixed effects model, fixed effect of IL-6 status (IL-6 KO vs. WT): $p < 0.001$.

All in all, the WT animal presented higher FDG uptake and use, concomitantly to qualitative image analysis showing more intense and larger colonic FDG uptake foci than observed in IL-6 KO animals (Table 1).

Table 1. PET FDG-uptake differences. PET FDG-uptake differences in the intestinal volume of interest containing tumorous foci in imaged mice.

Animal	Averaged Intestinal Standardized Uptake Value of Intestines (g/mL)	Radioactivity Content in Intestines vs. Whole-Body Radioactivity
Mouse 1 WT CRC	0.43	20.1%
Mouse 2 IL-6 KO CRC	0.15	5.3%
Mouse 3 IL-6 KO CRC	0.27	6.8%

3. Discussion

It has been previously established that in many solid tumors, a relationship exists between thrombocytosis detected at diagnosis and tumor spread or metastasis, as well as shorter patient survival [5,6].

The principal regulator of platelet production is TPO [20,21], which is mainly controlled by receptor-mediated uptake and destruction. The regulation of plasma TPO level is closely linked to platelet count [22]. When the latter is low, less TPO is absorbed, and the elevation of TPO level leads to enhanced thrombopoiesis. KASER et al. found in mice that thrombocytosis is accompanied by the simultaneous increase in the expression of thrombopoietin mRNA by the liver, leading to elevation of plasma TPO level [23].

IL-6 is a pleiotropic cytokine that plays a role in both normal hemostasis and immune responses. Under physiologic conditions it is almost undetectable. It binds with similar affinity to both transmembrane IL-6R (mIL-6R) which is expressed only on some lymphoid (monocytes, macrophages, neutrophils, B-cells, subpopulation of T-cells) and on non-lymphoid cells (hepatocytes) and to soluble IL-6R (sIL-6R), which is an isoform of mIL-6R without cytoplasmic and transmembrane domains and can be detected in the plasma. Ninety percent of sIL-6R are generated in a process called shedding: the ectodomain of the mIL-6R is released in the extracellular space by the A Disintegrin and Metalloproteinase 17 (ADAM17). If IL-6 binds to the mIL-6R during the classic signaling pathway, it exerts anti-inflammatory effects, including induction of fever, acute phase response and the differentiation of B-cells to plasma cells. However, if IL-6 binds to the sIL-6R, their complex can be bound to the transmembrane signal transducer protein gp130, which is ubiquitously expressed on all cell types, including tumor cells. This pathway is called trans-signaling, and it has proinflammatory effects, such as maintaining of Th17 phenotype in inflamed tissues, inhibition of lamina propria T-cell apoptosis and the malignant proliferation of epithelial cells.

Elevated IL-6 levels have been observed in a variety of tumors, including gastrointestinal cancer [24]. Similar to thrombocytosis, IL-6 was also found to correlate with tumor stage, size, metastasis and patient survival in CRC. Both tumor cells themselves and immune cells infiltrating tumor tissue produce IL-6 [25,26].

Stone et al. studied ovarian cancer patients with thrombocytosis [15] and determined the plasma levels of several thrombopoietic factors (TPO, IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, G-CSF, M-CSF, SCF and Flt3-ligand). The plasma levels of TPO and of IL-6 correlated significantly with platelet count: patients with thrombocytosis had significantly higher IL-6 and TPO plasma levels, moreover, at given cutoff values, plasma IL-6 level and thrombocytosis have both been found to be independent prognostic factors. Based on these results, a tentative, paracrine-mediated, paraneoplastic pathway has been postulated in which IL-6 expressed and secreted by the ovarian tumor would increase TPO production by the liver. This in turn would stimulate the bone marrow and eventually elevate platelet count with an end-result of tumor-induced thrombocytosis.

In our AOM-DSS-induced CAC model we found significantly higher platelet counts in the WT CRC group than in the WT control or the IL-6 KO groups. Parallely, increased liver TPO-1 expression was detected in the WT CRC group compared to the other groups.

Data obtained in our model are consistent with other reports presenting IL-6 KO mouse constructs and various roles of IL-6 in behavior, systemic inflammation, and most importantly, in the course of inflammation-related local tumor induction [27–29]. As in other reports, our results also show more homogenous and lower grade tumors in IL-6 KO animals than in WT animals. The systematically positive effect of IL-6 on tumor survival must be accounted for: IL-6 binds to soluble IL-6R (sIL-6R), which interacts with gp130 on tumor cells. This activates Janus kinases resulting in the phosphorylation of signal transducer and activator transcription 3 (STAT3). STAT3 induces target gene transcription in the nucleus leading to proliferation, cell growth and the inhibition of apoptosis [30]. What is unfavorable during tumor development is favorable in acute inflammation. Expression analysis of intestinal epithelial cells showed that ADAM17 was highly upregulated on tumor tissue while the

mIL-6R was strongly downregulated [27,31]. In a murine model of colitis-associated premalignant cancer, elevated expression of ADAM17, IL-6, gp130 and sIL-6R in lamina propria macrophages were reported [31]. It suggests that these cells shed the IL-6R from the cell surface, and at the same time they were the source of IL-6 (Figure 9).

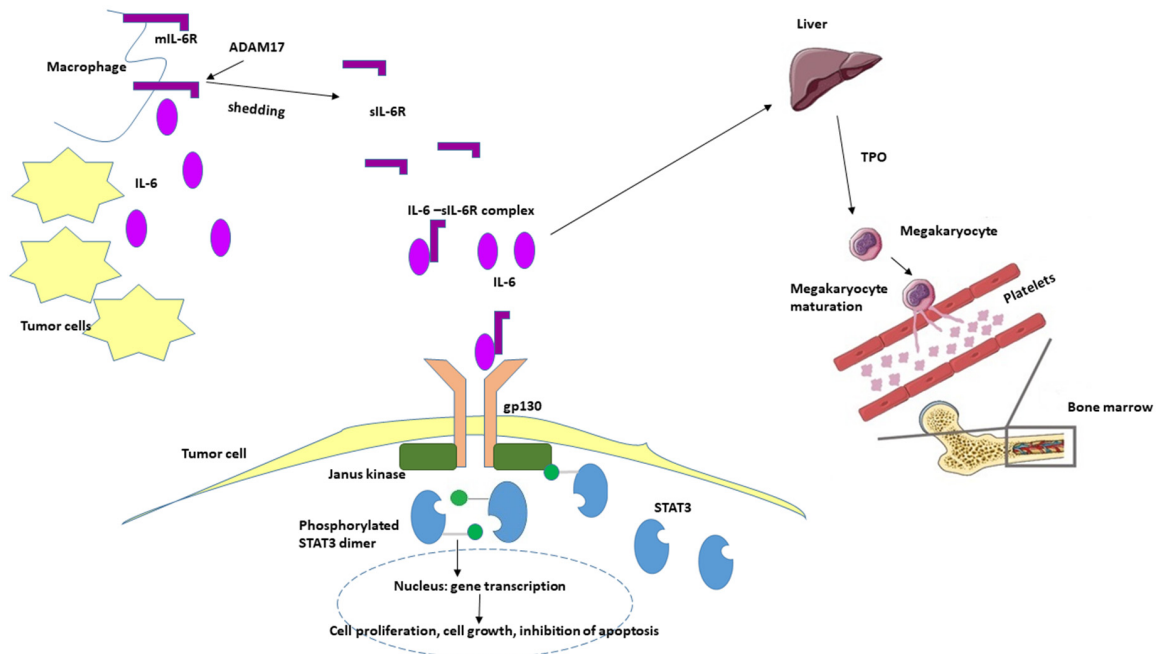


Figure 9. Hypothetical role of IL-6 in oncogenesis and tumor-associated thrombocytosis. IL-6 is produced in the tumor microenvironment both by mononuclear and tumor cells. Elevated levels of IL-6 induce thrombopoietin production in the liver, which in turn activates the maturation of megakaryocytes and the production of platelets resulting in elevated platelet count. Simultaneously, IL-6 binds to the soluble form of IL-6 receptor (sIL-6R) and activates the gp130/JAK/STAT3 pathway leading to the translocation of phosphorylated STAT3 homodimer to the nucleus in the tumor cells and to the transcription of different genes inducing proliferation, cell growth and the inhibition of apoptosis. mIL-6R—membrane-bound IL-6 receptor, TPO—thrombopoietin, ADAM17—a disintegrin and metalloproteinase 17; STAT3—signal transducer and activator transcription 3.

Surprisingly, the IL-6 KO animals had an increased mortality in our model due to intestinal inflammation being more severe than in WT animals. After the third cycle of DSS administration 50% of IL-6 KO animals were lost ($n = 9$), whereas only one WT mouse had lethal outcome due to the severity of the inflammation.

Several reports are in line with our results: if IL-6/gp130/STAT3 pathway is impaired and mice are exposed to AOM-DSS, more severe colitis with more pronounced epithelial damage and ulceration, more prominent infiltration with inflammatory cells can be observed, while tumor load is decreased due to a reduction in size and frequency [26–28]. Irrespective from the type of injury (infectious or non-infectious), epithelial proliferation and repair are impaired, and the host is more susceptible to mucosal damage if IL-6 is inhibited [32,33].

At the endpoint we performed imaging studies in animals from both treatment groups. By this time, the acute inflammation subsided significantly. However, IL-6 can maintain chronic inflammation by affecting the differentiation and survival of pathogenic T helper cells. Therefore, at this time point the WT animal showed signs of chronic inflammation and increased tumor burden simultaneously. The limitation of the findings during *in vivo* combined microscopy and PET/MRI imaging is, that only three animals were examined. The differences between the groups are marked, but it cannot be ruled out, that certain characteristics may be found only in the individual animal. The WT animal

showed characteristics of mucosal inflammation during endomicroscopy, whereas PET/MRI presented increased FDG uptake in the large intestines, peritoneum and lymph node. Furthermore, the overall FDG uptake was significantly higher in the WT animal. The increased focal small bowel uptake and slightly elevated peritoneal uptake in the IL-6 KO animal may refer to a non-healing inflammatory focus and the consecutive irritation of the peritoneum.

In conclusion, we demonstrated significantly elevated platelet counts and TPO expression in WT animals compared to IL-6 KO animals, which supports the previously proposed paracrine paraneoplastic pathway. We have also shown the importance of IL-6 not only in tumor development, but also in the anti-inflammatory and reparative processes during colitis.

4. Materials and Methods

4.1. IL-6 Gene Knockout

A new IL-6 knockout mouse strain was established using the CRISPR/CAS9 method. Further details on the applied molecular biologic techniques to produce this mouse strain are available in the Supplementary Information.

4.2. Animals Used in the Experiments

Adult (8–10-week-old) male FVB/Ant and IL-6 KO FVB/Ant mice were then obtained from the local colony bred at the Medical Gene Technology Unit (specific pathogen-free (SPF) level) at the Institute of Experimental Medicine in Budapest, Hungary. Animals were housed at the Minimal Disease (MD) level, 3–5/cage, under controlled environmental conditions: temperature, 21 °C ± 1 °C; humidity, 65%; light–dark cycle, 12-h light/12-h dark cycle, with the lights switched on at 07:00 a.m. Mice had free access to rodent food and drinking water. A DSS solution admixed to water was provided according to the experimental protocol. All procedures were conducted in accordance with the guidelines by the European Communities Council (86/609/EEC/2 and 2010/63 Directives of European Community) and the protocol of the experiment was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary (8 May 2013) with the permit number: PEI/001/29–4/2013.

4.3. Experimental Protocol

We used the AOM [34]/3% DSS model to induce inflammation-based colorectal cancer. AOM is a chemical agent, which initiates neoplastic transformation by DNA methylation and thereby facilitates base mispairing. DSS is a sulfated polysaccharide of variable molecular weight that induces inflammation, resembling ulcerative colitis in humans [35,36]. At baseline, the mice received a single AOM dose (7.4 mg/kg BW) by the intraperitoneal route. This was followed by 3 cycles of treatment with DSS-containing water for one week and then, administering normal drinking water for two weeks (Figure 10). During the 9-week treatment period the weight, water consumption, fecal consistency and condition of the perianal region of the animals were recorded regularly. The severity of the inflammation was estimated based on these measurements and it was presented in a decimal scoring system. At the end of the experiment, the animals were decapitated, their blood was collected in pre-cooled EDTA tubes, and the plasma was stored at –20 °C until analysis. Liver and colon tissue were obtained for histology, and some of the specimens were frozen on dry ice for RT-PCR. In each animal the complete colon was examined both macroscopically and under microscope with hematoxylin–eosin staining by a single pathologist to control inflammation, tumor formation and stage.

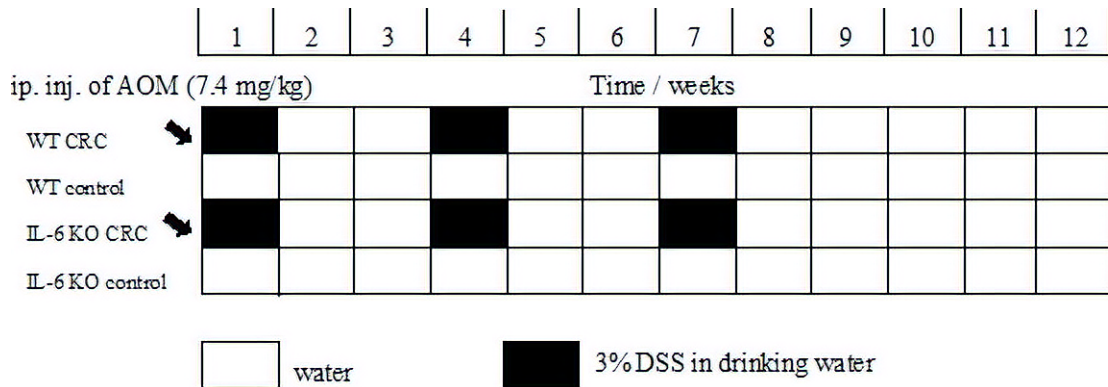


Figure 10. Timeline description of colorectal cancer induction using the AOM/DSS inflammation-related model. AOM—azoxymethane; DSS—dextran sodium sulfate; water—drinking water. Black arrow: administration of AOM intraperitoneally.

4.4. Quantitative Real-Time PCR

Frozen blood and liver tissue samples were homogenized in TRI Reagent Solution (Ambion, USA) and total RNA was isolated with QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To eliminate genomic DNA contamination, DNase I treatment was used and 100 μ L RNase-free DNase I (1 unit DNase) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) solution was added. Sample quality control and the quantitative analysis were carried out by NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Amplification was not detected in the RT-minus controls. The cDNA synthesis was performed with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Primers for the comparative Ct experiments were designed by Primer Express 3.0 Program and Primer Blast software. The primers (Microsynth, Balgach, Switzerland) were used in the real-time PCR reaction with Fast EvaGreen[®] qPCR Master Mix (Biotium, Fremont, CA, USA) on ABI StepOnePlus instrument. Gene expression was analyzed with the ABI Step One 2.3 program (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/technical-resources/software-downloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html>). The amplicon was tested by Melt Curve Analysis on ABI StepOne Plus Instrument (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/technical-resources/software-downloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html>). The experiments were normalized to *rplp1* expressions.

The following (forward and reverse) primer pairs were used:

rplp1 for TAAGGCCGCGTTGAGGTG
 rplp1 rev GATCTTATCCTCCGTGACCGT
 thbs1 for CAT GCC ATG GCC AAC AAA CA
 thbs1 rev TTG CAC TCA CAG CGG TAC AT
 thpo1 for CTT CTC CAC CCG GAC AGA GT
 thpo1 rev CTG GCC AGG GTG TCT AAC TG

4.5. In Vivo Imaging Using PET/MRI and Intraluminal Fluorescent Confocal Endomicroscopy

Colonic mucosal surface was imaged in vivo, using intraluminal fluorescence confocal endomicroscopy. Eventual differences in colonic mucosal crypts in WT and IL-6 KO mice were imaged with a nuclear counterstaining and mucus autofluorescence. One WT mouse and two KO mice were anesthetized using 3% *v/v* isoflurane gas (Isofluran-KP[®], Medicus Partner, Ltd., Budaörs, Hungary) and maintained on a heated bed. Then, after 1 mL of saline enema application, a 6% *m/v* acriflavine solution in water for injection (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) in 0.5 mL volume was rectally applied to each mouse. Acriflavine, a green fluorescent DNA-binding molecule is a general cell-staining intravital dye to obtain fluorescent contrast of luminal mucosal cells. Thereafter,

the S1500 fiberoptic microscope probe tip (resolution 3.3 microns, field-of-view diameter, 600 microns) of the Cellvizio Lab Dual Band imaging system (Mauna Kea Technologies, Inc., Paris, France) was intrarectally applied into the descending colon of the mice and dual band (480 nm green and 660 nm red) live microscopic images of the mucosal walls were collected. After terminal euthanasia of the same animals with Euthasol ad us. vet solution (Medicus Partner, Budaörs, Hungary) colons were opened, and mucosal surfaces were investigated ex vivo also within the same animals. Cells in crypts fluoresce in green, with an especially prominently stained nucleus. Mucus in the crypts can be present as red fluorescent dots (from autofluorescence).

To further assess whole-body tumor and inflammatory burden, one WT and two IL-6 KO mice were used in a series of imaging experiments.

Mice were first scanned with a dedicated nanoScan[®] PET/MRI system (Mediso, Ltd., Budapest, Hungary) for small animals with a 3 Tesla magnetic field, using FDG as probe for increased glucose transport and utilization rate and glucose transporter protein expression in cells of tumorous or inflamed tissue foci. The MRI imaging sequence was chosen with regards to increased water concentration of edematous inflamed tissues. Water signals in lymph nodes or intestinal walls are visualized as areas with lower brightness in gray (among brighter fat signals).

Sixty minutes prior to imaging mice were intraperitoneally injected with 3–4 MBq of FDG solution (FDG-KEDO[®], Pet-Medicopus, Ltd., Kaposvár, Hungary). Then, mice were anesthetized with 5% isoflurane as an induction and 2% as maintenance inhalation dose in medical oxygen. Mouse PET/MRI measurements were performed in a MultiCell[™] heating, positioning and monitoring multi-animal bed for simultaneously holding 3 mice in the same imaging session (Mediso, Ltd., Budapest, Hungary). Ninety minutes after FDG injection, a 20-minute static PET data acquisition was obtained, immediately followed by a 2D spin echo MRI sequence with 0.3 mm slice thickness to obtain anatomic background. Quantitative radioactivity PET data were reconstructed using a Monte-Carlo-based iterative algorithm (Tera-Tomo[™], Mediso, Ltd., Budapest, Hungary) using the MRI as anatomic and attenuation priors, with 0.3-mm voxel size for a whole-body PET/MRI image with a resolution of 1 mm.

4.6. Image Analysis

For the Cellvizio images, qualitative analysis of crypt forms (green channel) and red mucus dots were performed by three of the authors (N.H., D.S.V., D.M.) in a blinded fashion.

The PET/MRI images were qualitatively assessed from a radiologic point of view and enlarged lymph nodes or bowel luminal tumors were identified using both the MRI and PET images. PET images were then quantitatively analyzed with the vivoQuant[™] software (inviCRO, Ltd., Boston, USA) by defining the whole intestinal volume in a three-dimensional volume of interest and calculating the standardized FDG uptake value and the radioactivity concentration percentage to whole body radioactivity for each animal in the intestinal volume of interest.

4.7. Statistical Analysis

We compared tumor growth in the IL-6 KO and WT subgroups AOM/DSS-treated CRC model mice in terms of the number of tumor foci and TTV. TTV was calculated by adding the volume of all tumor foci within each animal. We tested the normality of distributions using the Shapiro–Wilk test. In case of normal distribution and equal variances, we compared subgroups via the Student's *t*-test. If we detected non-normal distribution in either subgroups, we performed nonparametric tests, such as the Kolmogorov–Smirnov test, the Mann–Whitney U test and the equality of medians test. When applicable, *p*-values were determined using exact methods. We also grouped animals into TTV quartiles and compared their distribution between IL-6 KO and WT subgroups using cross-tabulation and the Fischer's exact test. Furthermore, platelet count was compared via ANOVA. Pairs of subgroups were compared using Wald-tests on OLS regression coefficients.

We quantified the radiographic results of a WT and two IL-6 KO animals by comparing the FDG uptake in the three most avid tumorous foci displaying highest SUV_{max} per animal. We fitted

a mixed effects model using a maximum-likelihood estimator, assuming fixed effect for IL-6 status and a random effect for SUVmax by each animal. Statistical analysis was conducted using Stata version 14 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP. <https://www.stata.com/support/faqs/resources/citing-software-documentation-faqs/>)

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6218/s1>. IL-6 gene knock-out; Figure S1: LPS-induced IL-6 plasma concentrations (mol/L) measured in the individual groups with ELISA, Figure S2: Histology of pTis colon carcinoma in a WT mouse colon (H&E staining, 100x magnification), Figure S3: Decimal scoring system to measure the severity of inflammation, Figure S4: MRI and PET imaging, showing an enlarged retroperitoneal lymph node in MRI, with water signal enhancements and its moderate-high FDG uptake in a WT animal, Figure S5: ¹⁸F-FDG PET/MRI image of two IL-6 KO and one WT animals in an abdominal cross-sectional plane, placed in the multi-animal mouse holder bed. Supplementary Table S1: ¹⁸F-FDG uptake comparison in the highly avid tumorous foci in the WT animal and the two IL-6 KO animals.

Author Contributions: Conceptualization—S.F., K.H. and Z.B. Data curation—V.J., E.F., D.K., N.H. and Z.W. Formal analysis—E.F., Z.Z. and Z.W. Funding acquisition—Z.B. Investigation—S.F., R.S., D.K., N.H. and B.J. Methodology—S.F. Project administration—V.J., R.S., D.K., B.J. and D.S.V. Resources—T.K. and G.B. Software—T.K., G.B. and D.M. Supervision—S.F., K.H. and Z.B. Visualization—D.S.V., Z.Z. and D.M. Writing—original draft V.J., Writing—review & editing—V.J., D.M. and Z.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: T.K. acknowledges support from the Hungarian Government's Operative Program of Economics and Innovation Support, Grant Number GINOP 2.3.2-15-2016-00016. Part of the research was financed by the Thematic Excellence Program of the Ministry of Innovation and Technology of Hungary, within the framework of the BIOImaging Excellence program at Semmelweis University. We thank the In Vivo Imaging Advanced Core Facility staff of the Hungarian Center of Excellence for Molecular Medicine and Semmelweis University for help with their resources and support. HCEMM has received funding from the EU's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 739593.

Conflicts of Interest: Gergő Bagaméry is an employee of Mediso Medical Imaging Systems, Ltd. Nikolett Hegedűs is an employee and Domokos Máthé is a stakeholder in CROmed, Ltd. The other authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice, C.; Akinyemiju, T.F.; Al Lami, F.H.; Alam, T.; Alizadeh-Navaei, R.; Allen, C.; Alsharif, U.; Alvis-Guzman, N.; Amini, E.; et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 1553–1568. [[CrossRef](#)]
2. Sasaki, K.; Kawai, K.; Tsuno, N.H.; Sunami, E.; Kitayama, J. Impact of preoperative thrombocytosis on the survival of patients with primary colorectal cancer. *World J. Surg.* **2012**, *36*, 192–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zhu, X.; Cao, Y.; Lu, P.; Kang, Y.; Lin, Z.; Hao, T.; Song, Y. Evaluation of platelet indices as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rao, X.D.; Zhang, H.; Xu, Z.S.; Cheng, H.; Shen, W.; Wang, X.P. Poor prognostic role of the pretreatment platelet counts in colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine* **2018**, *97*, e10831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Erpenbeck, L.; Schon, M.P. Deadly allies: The fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* **2010**, *115*, 3427–3436. [[CrossRef](#)]
6. Gay, L.J.; Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 123–134. [[CrossRef](#)]
7. Nieswandt, B.; Hafner, M.; Echtenacher, B.; Mannel, D.N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1295–1300.
8. Palumbo, J.S.; Talmage, K.E.; Massari, J.V.; La Jeunesse, C.M.; Flick, M.J.; Kombrinck, K.W.; Jirouskova, M.; Degen, J.L. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **2005**, *105*, 178–185. [[CrossRef](#)]
9. Assoian, R.K.; Sporn, M.B. Type beta transforming growth factor in human platelets: Release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 1217–1223. [[CrossRef](#)]
10. Kaplan, K.L.; Broekman, M.J.; Chernoff, A.; Lesznik, G.R.; Drillings, M. Platelet alpha-granule proteins: Studies on release and subcellular localization. *Blood* **1979**, *53*, 604–618. [[CrossRef](#)]

11. Verheul, H.M.; Hoekman, K.; Lupu, F.; Broxterman, H.J.; van der Valk, P.; Kakkar, A.K.; Pinedo, H.M. Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 166–171.
12. Banks, R.E.; Forbes, M.A.; Kinsey, S.E.; Stanley, A.; Ingham, E.; Walters, C.; Selby, P.J. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: Significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 956–964. [[CrossRef](#)]
13. Gupta, G.P.; Massague, J. Platelets and metastasis revisited: A novel fatty link. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 1691–1693. [[CrossRef](#)]
14. Tsuruo, T.; Fujita, N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2008**, *84*, 189–198. [[CrossRef](#)]
15. Stone, R.L.; Nick, A.M.; McNeish, I.A.; Balkwill, F.; Han, H.D.; Bottsford-Miller, J.; Rupairmoole, R.; Armaiz-Pena, G.N.; Pecot, C.V.; Coward, J.; et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 610–618. [[CrossRef](#)]
16. Wang, C.; Li, P.; Xuan, J.; Zhu, C.; Liu, J.; Shan, L.; Du, Q.; Ren, Y.; Ye, J. Cholesterol enhances colorectal cancer progression via ROS elevation and MAPK signaling pathway activation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 729–742. [[CrossRef](#)]
17. Yassin, M.; Sadowska, Z.; Djurhuus, D.; Nielsen, B.; Tougaard, P.; Olsen, J.; Pedersen, A.E. Upregulation of PD-1 follows tumour development in the AOM/DSS model of inflammation-induced colorectal cancer in mice. *Immunology* **2019**, *158*, 35–46. [[CrossRef](#)]
18. Saleiro, D.; Murillo, G.; Benya, R.V.; Bissonnette, M.; Hart, J.; Mehta, R.G. Estrogen receptor-beta protects against colitis-associated neoplasia in mice. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 2553–2561. [[CrossRef](#)]
19. Ray, A.L.; Berggren, K.L.; Restrepo Cruz, S.; Gan, G.N.; Beswick, E.J. Inhibition of MK2 suppresses IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha-dependent colorectal cancer growth. *Int. J. Cancer* **2018**, *142*, 1702–1711. [[CrossRef](#)]
20. Kaushansky, K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1044*, 139–141. [[CrossRef](#)]
21. Deutsch, V.R.; Tomer, A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br. J. Haematol.* **2006**, *134*, 453–466. [[CrossRef](#)]
22. Fielder, P.J.; Gurney, A.L.; Stefanich, E.; Marian, M.; Moore, M.W.; Carver-Moore, K.; de Sauvage, F.J. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* **1996**, *87*, 2154–2161. [[CrossRef](#)]
23. Kaser, A.; Brandacher, G.; Steurer, W.; Kaser, S.; Offner, F.A.; Zoller, H.; Theurl, I.; Widder, W.; Molnar, C.; Ludwiczek, O.; et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: Role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* **2001**, *98*, 2720–2725. [[CrossRef](#)]
24. De Vita, F.; Romano, C.; Orditura, M.; Galizia, G.; Martinelli, E.; Lieto, E.; Catalano, G. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J. Interferon Cytokine Res.* **2001**, *21*, 45–52. [[CrossRef](#)]
25. Buergy, D.; Wenz, F.; Groden, C.; Brockmann, M.A. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2747–2760. [[CrossRef](#)]
26. Knupfer, H.; Preiss, R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients—A summary of published results. *Int. J. Colorectal Dis.* **2010**, *25*, 135–140. [[CrossRef](#)]
27. Becker, C.; Fantini, M.C.; Schramm, C.; Lehr, H.A.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Burg, J.; Strand, S.; Kiesslich, R.; Huber, S.; et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* **2004**, *21*, 491–501. [[CrossRef](#)]
28. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G.Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L.; et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 103–113. [[CrossRef](#)]
29. Bollrath, J.; Phesse, T.J.; von Burstin, V.A.; Putoczki, T.; Bennecke, M.; Bateman, T.; Nebelsiek, T.; Lundgren-May, T.; Canli, O.; Schwitalla, S.; et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 91–102. [[CrossRef](#)]
30. Waldner, M.J.; Wirtz, S.; Jefremow, A.; Warntjen, M.; Neufert, C.; Atreya, R.; Becker, C.; Weigmann, B.; Vieth, M.; Rose-John, S.; et al. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2855–2868. [[CrossRef](#)]

31. Matsumoto, S.; Hara, T.; Mitsuyama, K.; Yamamoto, M.; Tsuruta, O.; Sata, M.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Kado, S.; Takada, T. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1543–1551. [[CrossRef](#)]
32. Kuhn, K.A.; Manieri, N.A.; Liu, T.C.; Stappenbeck, T.S. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114195. [[CrossRef](#)]
33. Dann, S.M.; Spehlmann, M.E.; Hammond, D.C.; Iimura, M.; Hase, K.; Choi, L.J.; Hanson, E.; Eckmann, L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6816–6826. [[CrossRef](#)]
34. Ferris, R.L.; Blumenschein, G., Jr.; Fayette, J.; Guigay, J.; Colevas, A.D.; Licitra, L.; Harrington, K.; Kasper, S.; Vokes, E.E.; Even, C.; et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1856–1867. [[CrossRef](#)]
35. Becker, C.; Fantini, M.C.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Kiesslich, R.; Lehr, H.A.; Galle, P.R.; Neurath, M.F. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* **2005**, *54*, 950–954. [[CrossRef](#)]
36. Neufert, C.; Becker, C.; Neurath, M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1998–2004. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).