



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ Α2
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΦΑΛΙΔΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ Α2
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΦΑΛΙΔΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Φαλίδα Ευάγγελου: 05-12-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 773α/16-12-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Βλάχος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής

Μέλη:

Λέκκα Μαρία-Ελένη, Καθηγήτρια Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας

Μήτσης Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-01-2015

«Μελέτη έκφρασης του γονιδίου της υπεροξυ-οξειδοαναγωγάσης 6 (PRDX6) σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου»

Τροποποίηση θέματος: 970^α/29-06-2021

«Μελέτη της έκφρασης ισόμορφων φωσφολυπάσης A2 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1007α/04-05-2022

1. Βλάχος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Λέκκα Μαρία-Ελένη, Καθηγήτρια Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μήτσης Μιχαήλ, Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Χαρίσης Χαράλαμπος, Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μπαλή Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κατσάνος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 16-05-2022

Ιωάννινα 30-05-2022

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

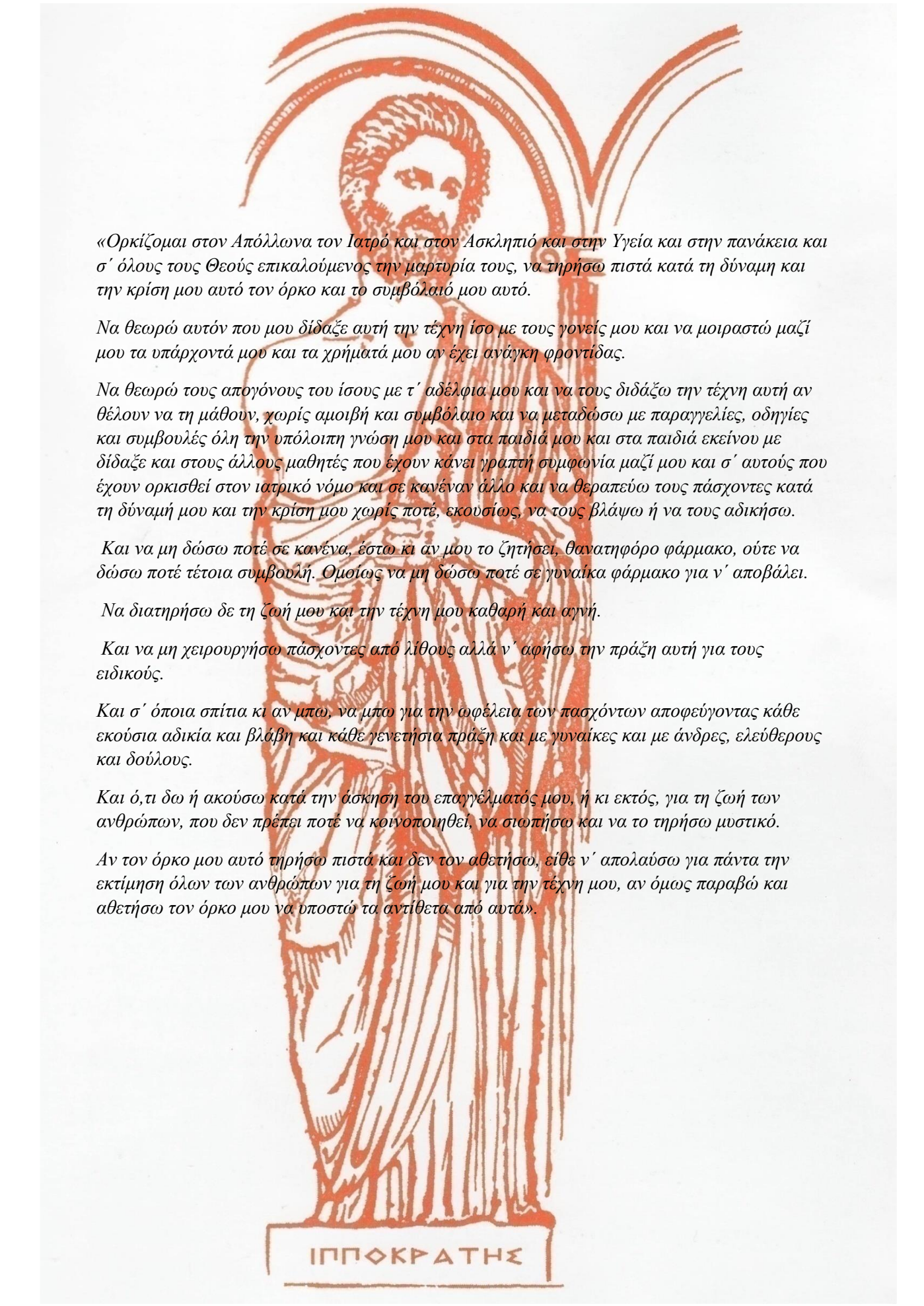
Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Στους γονείς μου Θάνο και Μερόπη που ήταν πάντα μαζί μου...

Στη γυναίκα μου Γιάννα και στα παιδιά μου Θάνο και Μαριάννα για την υπομονή τους και για το χρόνο που με στερήθηκαν...



«Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό.

Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστό μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανένα άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω.

Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει.

Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή.

Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς.

Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους.

Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό.

Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Ιατρικής, της Σχολής των Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων το χρονικό διάστημα μεταξύ Ιανουαρίου 2015 και Απριλίου 2022. Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Στις λίγες σειρές που ακολουθούν θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, το οποίο δεν θα ήταν εφικτό χωρίς την πολύτιμη αρωγή τους.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωνσταντίνο Βλάχο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου, επιβλέπον μέλος της διδακτορικής μου διατριβής, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργασθώ υπό την επίβλεψή του στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο και την καθοδήγηση του μέχρι την ολοκλήρωσή του. Οι εύστοχες παρατηρήσεις του και η διαρκής προσήλωση του στην παρούσα έρευνα ήταν καθοριστικής σημασίας για την περαίωσή της. Επιπλέον τον ευχαριστώ γιατί με τιμά με τη φιλία του πλέον της δεκαετίας και γιατί ήταν ο πρώτος που μου έδωσε ερεθίσματα και στήριξη στα πρώτα ερευνητικά και συγγραφικά μου βήματα.

Ευχαριστώ από καρδιάς για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν τους Καθηγητές κυρία Μαρία Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας και τον κύριο Μιχαήλ Μήτση, Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων που μου εμπιστεύτηκαν την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την καθοδήγηση τους και την καθοριστική συνεισφορά στην επιτυχή εκτέλεση του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την Δρ. Ειρήνη Κιτσιούλη και την εργαστηριακή ομάδα του Τμήματος Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την καθοριστική τους συμβολή στη διαμόρφωση της έρευνας και την ουσιαστική συμμετοχή τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, την κυρία Ασημίνα Καλογήρου, Παθολογοανατόμο του Γενικού Νοσοκομείου Χαλκίδας για την επιπλέον συμμετοχή στην έρευνα με υλικό και τεχνική υποστήριξη και τον φίλο Δρ. Ευάγγελο Τσιάμπα, Κυτταρολόγο για τις πολύτιμες συμβουλές του και την βοήθεια, ιδιαίτερα στο δύσκολο κομμάτι της ακαδημαϊκής παρουσίασης της δουλειάς μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους εργαζομένους των παραπάνω Εργαστηρίων χωρίς την τεχνογνωσία των οποίων, δε θα είχαν πραγματοποιηθεί με επιτυχία τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Falidas E**, Kitsioulis E, Tsounis D, Kalogirou A, Tsiambas E, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Vlachos K. **Impact of peroxiredoxin-6 expression on colon adenocarcinoma.** *J BUON*. 2021 Sep-Oct;26(5):1893-1897.
- **Falidas E**, Kitsioulis E, Spyropoulou D, Tsiambas E, Kalogirou A, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Mastronikoli S, Peschos D, Dimas O, Vlachos K. Secretory Phospholipase A2 Digital Expression Analysis in Colon Adenocarcinoma. *In Vivo*. 2022 Mar-Apr;36(2):738-742.
- **Falidas E**, Kitsioulis E, Tsounis D, Kalogirou A, Tsiambas E, Tziakou D, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Spyropoulou D, Vlachos K. **PLA2G3 phospholipase expression patterns in colon adenocarcinoma.** *JBUON* (manuscript ID: 1029207, Anticipated publication: vol 26, no.6,2021, 2018 issue.)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Φαλίδας E**, Παζίδης A, Παπαδόπουλος Σ, Μήτσης M, Λέκκα ME, Νάστος N, Κητσιούλη Eιρ, Βλάχος K. **Πρόδρομα αποτελέσματα μελέτης έκφρασης του γονιδίου της υπεροξυ-οξειδοαναγωγάσης 6 (prdx6) στον καρκίνο του παχέος εντέρου.** 31^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Φόρουμ, Αθήνα, 21.10-24.10.2018
- Παζίδης A, **Φαλίδας E**, Παπαδόπουλος Σ, Μήτσης M, Λέκκα ME, Νάστος Δ, Βλάχος K, Κητσιούλη Eιρ. **Πρόδρομα αποτελέσματα μελέτης έκφρασης του γονιδίου της Φωσφολιπάσης A2 τυπου Πα (pla2g2a) στον καρκίνο του παχέος εντέρου.** 31^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Φόρουμ, Αθήνα, 21.10-24.10.2018
- Papadopoulos S , **Falidas E** , Pazidis A , Mitsis M , Nastos D , Lekka ME, Vlahos K, Kitsioulis E. **Gene expression levels of phospholipases A2 isoforms in tissue samples of colon cancer patients.** 69^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Λάρισα, 23.11-25.11.20

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
Κεφάλαιο 1. Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας του παχέος εντέρου	9
1.1 Στοιχεία τοπογραφικής ανατομίας	9
1.2 Αιμάτωση του παχέος εντέρου	12
1.3 Λεμφική παροχέτευση	13
1.4 Νεύρωση του παχέος εντέρου	13
1.5 Φυσιολογία του παχέος εντέρου	13
Κεφάλαιο 2. Καρκίνος του παχέος εντέρου	17
2.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου	17
2.2. Παράγοντες κινδύνου	17
2.3 Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	18
2.4 Πολύποδες του παχέος εντέρου	19
2.5 Καρκίνος του παχέος εντέρου	20
2.6 Σταδιοποίηση κατά TNM	21
Κεφάλαιο 3. Βιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου	23
3.1. Γενετικό μοντέλο πολλαπλών σταδίων του καρκίνου παχέος εντέρου	23
3.2 Προγονικά κύτταρα και ο ρόλος τους στην καρκινογένεση	24
3.3 Ο ρόλος των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων	26
3.4 Ο ρόλος των γονιδίων APC και β-catenin.	27
3.5 Ο ρόλος του ογκογονιδίου K-RAS.	28
3.6 Ο ρόλος του γονιδίου p53	29
3.7 Απώλεια αλληλίων στο χρωμόσωμα 18q.	30
3.8 Ο ρόλος της Κυκλοξυγενάσης 2	30
3.9 Ο ρόλος της μικροδορυφορικής αστάθειας	31
3.10 Μοριακοί προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου	32
Κεφάλαιο 4. Η οικογένεια των εκκρινόμενων φωσφολιπασών PLA2	35
4.1 Εισαγωγή	35
4.2 Γενικά χαρακτηριστικά	36
4.3 Συμβατικές εκκρινόμενες PLA2	37
4.3.1 sPLA2-IB	37
4.3.2 sPLA2-IIID	37
4.3.3 sPLA2-IIIE και sPLA2-IIIF	37
4.3.4 sPLA2-V	37

4.3.5 sPLA2-X	38
4.3.6 Υποικογένεια PLA2G12/sPLA-XII	38
4.3.7 Υποδοχέας PLA2R1/sPLA2	38
4.3.8 Η οικογένεια cPLA2	39
4.3.9 Η οικογένεια iPLA2	39
Κεφάλαιο 5. Η φωσφολιπάση PLA2-IIA	41
5.1 Γενικά	41
5.2 Καταλυτικός μηχανισμός	41
5.3 Ειδικότητα υποστρώματος της sPLA-IIA	42
5.4 Ο καταρράκτης του αραχιδονικού οξέος	43
5.5 Μη καταλυτική δράση της sPLA-IIA	44
5.6 Υποδοχείς της sPLA-IIA	45
5.6.1 Υποδοχέας φωσφολιπάσης A2 τύπου M	45
5.6.2 Πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης	45
5.6.3 Ιντεγκρίνες	45
5.6.4 Βιμεντίνη	45
5.7 Ρόλος της sPLA-IIA	46
5.8 Παθολογικός ρόλος της sPLA-IIA	47
5.8.1 Φλεγμονή	47
5.8.2 sPLA2-IIA και νόσοι των αγγείων	48
5.8.3 Καρκίνος	48
5.9 Αναστολείς της sPLA-IIA	51
5.9.1 Αναστολείς κατάλυσης	52
5.9.2 Μη εκλεκτικοί αναστολείς	52
5.9.3 Εκλεκτικοί αναστολείς του μη καταλυτικού μηχανισμού	52
5.9.4 Χρήση αναστολέων στον καρκίνο	52
Κεφάλαιο 6. Η φωσφολιπάση sPLA2-III	55
6.1 Γενικά	55
6.2 Δομή	55
6.3 Ιστική κατανομή	55
6.4 Ρόλος της sPLA2-III	57
6.4.1 Ρόλος στην αναπαραγωγή	57
6.4.2 Η sPLA2-III στην αλλεργία και την αναφυλαξία	58
6.4.3 Η sPLA2-III στις νόσους των αγγείων	59
6.4.4 Η sPLA2-III στο νευρικό σύστημα	59

6.4.5 Φλεγμονή του παχέος εντέρου, καρκίνος και σχέση με άλλες PLA2	60
6.4.6 Ο ρόλος της sPLA2-III στη χημειοαντίσταση	62
Κεφάλαιο 7. Η οικογένεια των υπεροξοξειδοαναγωγασών	65
7.1 Οι ελεύθερες ρίζες και ο ρόλος τους στην κυτταρική βλάβη	65
7.1.1 Οι δραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου	65
7.1.2 Το υπεροξείδιο του υδρογόνου(H ₂ O ₂)	65
7.1.3 Αμυντικοί μηχανισμοί έναντι των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου	66
7.2 Η οικογένεια των υπεροξοξειδοαναγωγασών	67
7.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά	67
7.2.2 Δομή PRDXs	68
7.2.3 Γενικές ιδιότητες	69
7.2.4 Ρύθμιση της έκφρασης PRDX	69
7.2.5 Πρωτεΐνες PRDX	69
7.2.6 PRDX και καρκίνος	71
7.2.6.1 Σηματοδότηση PRDX στον καρκίνο	71
7.2.6.2 Έκφραση PRDX στον καρκίνο	73
7.2.7 PRDX και φλεγμονή	73
7.2.8 PRDXs στο νευρικό σύστημα	74
Κεφάλαιο 8. Η υπεροξοξειδοαναγωγή-6 (PRDX6)	75
8.1 Εισαγωγή	75
8.2 Ενζυματικές δραστηριότητες του PRDXs	76
8.2.1 Δραστηριότητα υπεροξειδάσης	76
8.2.2 Σχέσεις δομής λειτουργίας	76
8.2.3 Δραστικότητα υπεροξειδάσης GSH υδροϋπεροξειδίου του φωσφολιπιδίου	77
8.2.4 Δραστικότητα της φωσφολιπάσης A2	77
8.2.5 Δραστικότητα λυοφωσφολιπιδίου ακύλ τρανσφεράσης	77
8.2.6 Σύνδεση φωσφολιπιδίων και pH	78
8.3 Έκφραση πρωτεΐνης και δραστικότητας PRDX6	78
8.3.1 Κυτταρικός εντοπισμός	78
8.3.2 Ρύθμιση έκφρασης	78
8.3.3 Ρύθμιση δραστηριότητας	78
8.4 Φυσιολογικοί ρόλοι του PRDX6	79
8.4.1 Απάντηση στο οξειδωτικό στρες	79
8.4.2 Επιδιόρθωση υπεροξειδωμένων μεμβρανών	79
8.4.3 Μεταβολισμός φωσφολιπιδίων	80

8.5 Κυτταρική σηματοδότηση	80
8.5.1 Ενεργοποίηση του NOX2	80
8.5.2 Αγγειακή μηχανική μεταγωγή σημάτων και PRDX6	81
Κεφάλαιο 9. Φωσφολιπάση A2 (aiPLA2) δραστηριότητα της PRDX6	83
9.1 Γενικά	83
9.2 Δομή και δραστηριότητα της PRDX6	83
9.3 Ταξινόμηση της PRDX6-PLA2 στην οικογένεια PLA2	83
9.4 PLA2 δραστηριότητα της PRDX6	85
9.5 Αναστολείς της δραστηριότητας aiPLA2	85
9.6 Δράση aiPLA2	85
9.6.1 Μεταβολισμός φωσφολιπιδίων πνεύμονα	85
9.6.2 Επιδιόρθωση κυτταρικής μεμβράνης	86
9.6.3 Σηματοδότηση μέσω NOX	86
9.7 aiPLA στην Παθολογία	87
9.7.1 Οξεία βλάβη στους πνεύμονες και σήψη	87
9.7.2 Άλλη παθολογία	87
9.7.3 Καρκίνος και καρκινογένεση	87
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	89
Σκοπός της μελέτης	91
Υλικό και μέθοδοι	93
Αποτελέσματα	123
Συζήτηση	143
Συμπεράσματα	151
Περίληψη	153
Abstract	155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	157

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής εκτροπής διάφορες γονιδιακές, βιοχημικές και μεταβολικές απορρυθμίσεις λαμβάνουν χώρα στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Η ενεργοποίηση γονιδίων και η καταστολή άλλων καθώς και η επίδραση πολλαπλών επιγενετικών παραγόντων που μπορούν να δράσουν τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ογκογενετική διαδικασία άλλες φορές μέσω κοινών άλλες μέσω διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί έναν από τους συχνότερους καρκίνους του οποίου όμως η πρόγνωση βελτιώνεται με την εφαρμογή νεότερων θεραπευτικών πρωτοκόλλων που βασίζονται πλέον στην εξατομίκευση της θεραπείας. Η τελευταία σχετίζεται με την ανάδειξη νεότερων μοριακών μηχανισμών που επιδρούν στην ογκογένεση και που καθορίζουν το είδος αλλά και τους συνδυασμούς χημειοθεραπευτικών ή ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τις νεότερες μοριακές ταξινομήσεις όπως το Consensus Molecular Subtype (CMS) οι όγκοι του παχέος εντέρου αρχίζουν να προσεγγίζονται και να αντιμετωπίζονται με βάση γονιδιακά, τοπογραφικά ή μεταβολικά κριτήρια.

Ο μεταβολισμός αλλά και η απελευθέρωση τόσο λιπαρών οξέων όσο και παραγόντων του οξειδωτικού στρες φαίνεται πλέον να παίζουν βασικό ρόλο στην ογκογενετική διαδικασία. Σε μεταβολικό επίπεδο, ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων μέσω της υδρόλυσης γίνεται από τα ένζυμα φωσφολιπάσες τύπου A2. Αυτά οδηγούν στην απελευθέρωση αραχιδονικού και λυσοφωσφατιδικού οξέος και στη συνέχεια σε λευκοτριένια και προσταγλανδίνες που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Οι φωσφολιπάσες τύπου A2 εμπλέκονται ιδιαίτερα σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες στο επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος. Αν και τα αποτελέσματα των μελετών πάνω στη θέση που κατέχουν στην διαδικασία της ογκογένεσης είναι πολλές φορές αντικρουόμενα, τα δεδομένα συγκλίνουν στον σημαντικό ρόλο τους στη διαδικασία, που πιθανά εξαρτάται ή επηρεάζεται από παράγοντες όπως για παράδειγμα η χρονιότητα των φαινομένων ή η θέση των όγκων, η κατάσταση του εντέρου ή ακόμα και το μικροβίωμα. Η ποσοτικοποίηση αυτών των σχέσεων αποτελεί συχνά σκοπό των μελετών ώστε να γίνει μια ασφαλής και έγκυρη εξαγωγή συμπερασμάτων.

Οι φωσφολιπάσες A2 (PLA2) είναι ένζυμα με διαφορετικές ιδιότητες, με εξειδίκευση κατανομής στους ιστούς και κυρίως εξειδίκευση υποστρώματος της καταλυτικής τους δράσης. Μεταξύ αυτών οι PLA2-IIA και PLA2-III των οποίων η έκφραση διερευνάται

στην παρούσα μελέτη τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών σε ιστό και ορό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα σχετίζονται με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους και εξάγονται συμπεράσματα που συγκρίνονται με αποτελέσματα άλλων μελετών.

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διαδικασία της ογκογένεσης. Η σχέση του με το καρκινικό κύτταρο είναι πολλές φορές παράδοξη αν σκεφτεί κανείς ότι το στρες μπορεί μερικές φορές να ενεργοποιήσει ογκογενετικές οδούς ενώ άλλες φορές να καταστείλει τη διαδικασία βλάπτοντας το ίδιο το καρκινικό κύτταρο. Η προστασία από το στρες επιτυγχάνεται από ένζυμα που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή αζώτου και μεταξύ αυτών τα ένζυμα της οικογένειας υπεροξυοξειδοαναγωγασών (PRDXs). Ένα μέλος αυτής της οικογένειας, η υπεροξυοξειδοαναγωγή-6 (PRDX-6) παρουσιάζει πολλαπλές σημαντικές ιδιότητες τόσο αντιοξειδωτικές (δράση υπεροξυδάσης) όσο και περιέργως φωσφολιπάσης A2 (aiPLA). Η έκφραση της PRDX6 μελετάται στην παρούσα έρευνα σε επίπεδο γονιδίου και πρωτεϊνών. Συσχετισμοί γίνονται με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους ενώ τα αποτελέσματα συζητούνται σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Στοιχεία τοπογραφικής ανατομίας

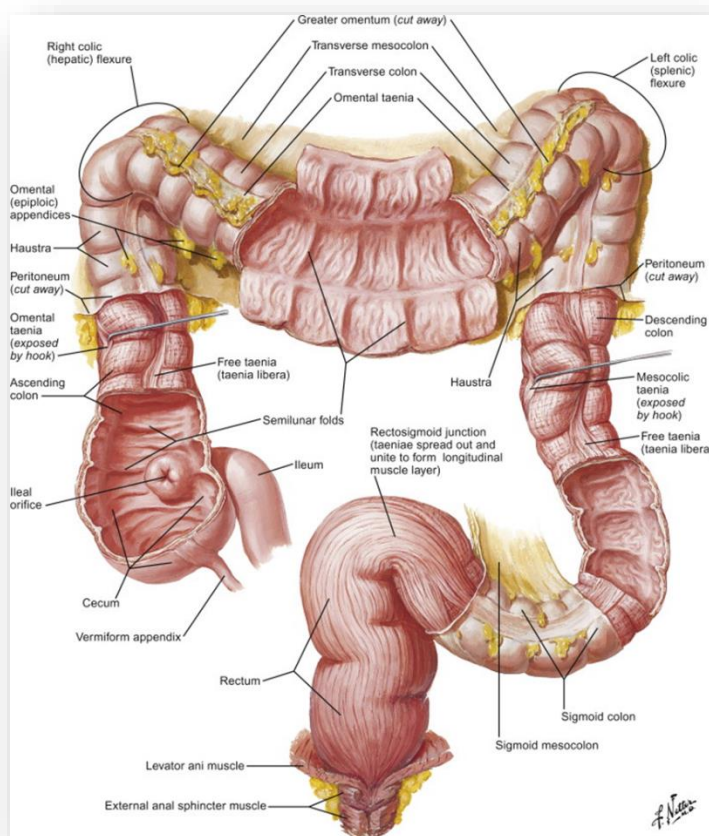
Το παχύ έντερο αποτελεί το κατώτερο τμήμα του πεπτικού σωλήνα. Το συνολικό μήκος του είναι περίπου 1,60 μέτρα, η διάμετρός του μειώνεται σταδιακά και διευρύνεται στο ορθό όπου σχηματίζει τη λήκυθο. Διακρίνεται σε 3 μοίρες, δηλαδή στο τυφλό έντερο, στο κόλον (ανιόν, εγκάρσιο με τις δύο κολικές καμπές, κατιόν, σιγμοειδές) και στο ορθό (από τον Ι3 σπόνδυλο έως τον αιμορροϊδικό δακτύλιο). Με την εξαίρεση του πρωκτικού σωλήνα ο οποίος προέρχεται από το εξώδερμα, ολόκληρο το παχύ έντερο προέρχεται από το ενδόδερμα.

Το ανιόν κόλον έχει μήκος περίπου 15cm και αποτελεί τη συνέχεια του τυφλού. Καλύπτεται από περιτόναιο κατά την πρόσθια και τις πλάγιες επιφάνειες, ενώ η οπίσθια επιφάνειά του βρίσκεται σε ανατομική συσχέτιση με τον ουρητήρα. Η δεξιά κολική καμπή επικαλύπτει συνήθως τον κάτω πόλο του δεξιού νεφρού.

Το εγκάρσιο κόλον αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του παχέος εντέρου με μήκος περίπου 45 cm. Περιβάλλεται από περιτόναιο σε όλες του τις επιφάνειες και εκτείνεται από τη δεξιά κολική καμπή ως το αριστερό υποχόνδριο, όπου στρέφεται απότομα προς τα κάτω και πίσω μεταπίπτοντας έτσι στο κατιόν κόλον. Προσφύεται σε τρεις πτυχές του περιτοναίου, το εγκάρσιο μεσόκολο και το γαστροκολικό σύνδεσμο. Είναι εξαιρετικά ευκίνητο και επομένως η θέση και το σχήμα του να εξαρτώνται από τη διάπλαση, την ηλικία και την θέση στην οποία βρίσκεται το σώμα του ατόμου.

Το κατιόν κόλον έχει τρεις κολικές ταινίες και δυο στίχους επιπλοϊκών αποφύσεων και εκτείνεται από τη σπληνική καμπή μέχρι την είσοδο της αληθούς πυέλου, έχοντας μήκος περίπου 25 cm. Καλύπτεται από περιτόναιο κατά την πρόσθια και τις δύο πλάγιες επιφάνειές του. Το σιγμοειδές κόλον είναι η συνέχεια του κατιόντος και βρίσκεται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και της μήτρας στις γυναίκες και μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του απευθυσμένου στους άνδρες και κρέμεται από πτυχή του περιτοναίου που λέγεται μεσοσιγμοειδές [1,2].

Το ορθό είναι το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου, όπου μαζί με τον πρωκτό αποθηκεύουν τα κόπρανα έως ότου αποβληθούν, φθάνει μέχρι τον αιμορροϊδικό δακτύλιο και εμφανίζει δυο μοίρες την ενδοπυελική και την περινεϊκή έχοντας μήκος 15cm. Στηρίζεται στο περίνεο, στο περιτόναιο και την περιτονία του απευθυσμένου.

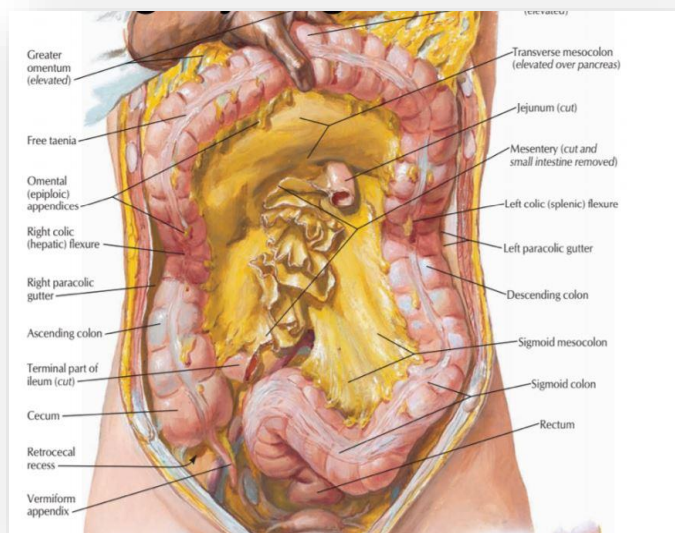


Εικόνα 1. Ανατομία παχέος εντέρου. Από: Netter's Κλινική Ανατομία, 2η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Βασιλειάδη [1].

Το ορθό καλύπτεται από ένα πέταλο της πυελικής περιτονίας, η οποία, αφού καλύψει την άνω επιφάνεια του ανελκτήρα μυός, ανακάμπτει και περιβάλλει τα εξωπεριτοναϊκά σπλάγχνα της πύελου. Έτσι, δημιουργείται η ίδια περιτονία του ορθού η οποία το περιβάλλει κυκλοτερώς το ορθό και μέσα σε εκσεσημασμένο κυτταρολιπώδη ιστό περικλείει τα άνω αιμορροϊδικά αγγεία, τα λεμφαγγεία, τους λεμφαδένες και τα νεύρα του ορθού, που αποτελούν το μεσοορθό.

Ο ιστός αυτός είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένος στο ραχιαίο τμήμα του ορθού και γύρω από τους κλάδους των άνω αιμορροϊδικών αγγείων, ενώ απουσιάζει στην πρόσθια επιφάνειά του, δίδοντας στο μεσοορθό την εικόνα δίλοβου λιπώματος. Ανάμεσα στην ίδια περιτονία του ορθού και την τοιχωματική πυελική περιτονία που καλύπτει το ιερό οστόν, και που αναφέρεται και σαν περιτονία του Waldayer, και στην οποία συνενώνεται η περιτονία του Todd, υπάρχει χαλαρός συνδετικός ιστός που επιτρέπει την ασφαλή κινητοποίηση του ορθού. Το περιτόναιο ανακάμπτει σε ύψος 7-9 εκατοστά

από τον πρωκτό, στην ουροδόχο κύστη στον άνδρα ή στη μήτρα στη γυναίκα δημιουργώντας την ευθυκυστική ή ευθυμητρική περιτοναϊκή ανάκαμψη αντίστοιχα, και χωρίζει το ορθό σε ενδοπεριτοναϊκή και σε εξωπεριτοναϊκή μοίρα.



Εικόνα 2. Χειρουργική απεικόνιση του παχέος εντέρου και του μεσοκόλου Από: Netter's Κλινική Ανατομία, 2η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Βασιλειάδη [1].

Στην πρόσθια επιφάνεια του εξωπεριτοναϊκού τμήματος του ορθού υπάρχει η περιτονοπερινεϊκή περιτονία που προέρχεται από την συγχώνευση των δύο πετάλων του περιτοναίου του ευθυκυστικού κολπώματος κατά την εμβρυική ζωή και εκτείνεται από την ανάκαμψη του περιτοναίου μέχρι το περίνεο. Στους άνδρες αυτή περιτονία ονομάζεται και περιτονία του Denonvillier, ενώ στις γυναίκες αποτελεί το ορθοκολπικό διάφραγμα. Ο πρωκτικός σωλήνας, μήκους 3-4 εκ, εκτείνεται από το πέρας της ληκύθου του ορθού (ορθοπρωκτική ένωση), μέχρι το τριχωτό κάτω πρωκτικό στόμιο ή δακτύλιο.

Ο εκούσιος έξω σφιγκτήρας περιβάλλει τον έσω σφιγκτήρα, από τον οποίο χωρίζεται με τον επιμήκη μυ. Διακρίνονται 3 μοίρες του έξω σφιγκτήρα, η υποδόρια, η επιπολής και η εν τω βάθει, που θεωρείται σαν ένας μυς με τον ηβοορθικό. Ο έσω, αποτελεί συνέχεια του κυκλοτερούς μυός του ορθού και έχει μήκος 25-40 mm και πάχος 5 mm. Το πυελικό έδαφος ολοκληρώνεται με τη συνένωση μυϊκών ινών του ηβοορθικού με ίνες που εκφύονται από την ηβική σύμφυση και τη θυροειδή περιτονία σχηματίζοντας

τον ηβοκοκκυγικό μυ ή την ισχιακή άκανθα, δηλαδή τον λαγονοκοκκυγικό μυ. Στο μέσον του πρωκτικού σωλήνα, 8-14 επιμήκεις πρωκτικές στήλες ή στήλες του Morgagni ενώνονται και σχηματίζουν τις πρωκτικές βαλβίδες (οδοντωτή γραμμή). Στις κρύπτες που σχηματίζονται εκβάλλουν οι πρωκτικοί αδένες, που έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη δημιουργία των περιεδρικών αποστημάτων.

Το επιθήλιο του πρωκτού διαιρείται σε 3 ζώνες, μία έξω, που καλύπτεται από τριχωτό δέρμα και συνεχίζει προς τα άνω με παχύτερο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, χωρίς τρίχες, μία μέση, πέριξ και πάνω από τις πρωκτικές βαλβίδες (πρωκτική μεταβατική ζώνη) και μία έσω, με μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο και μικρούς σωληνώδεις εντερικούς αδένες. [1-4]

1.2 Αιμάτωση του παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο δέχεται αίμα από την άνω μεσεντέριο αρτηρία, την κάτω μεσεντέριο αρτηρία και από τις έσω λαγόνιες αρτηρίες. Η άνω μεσεντέριος αρτηρία (AMA) κατανέμεται έως τα εγγύς 2/3 του εγκαρσίου (πρωτογενής εντερική αγκύλη), με κλάδους την ειλεοκολική, τη δεξιά κολική και τη μέση κολική αρτηρία. Η κάτω μεσεντέριος αρτηρία αιματώνει το παχύ έντερο από το αριστερό 1/3 του εγκαρσίου και πέραν, με την αριστερή κολική, τις σιγμοειδικές αρτηρίες και την άνω αιμορροϊδική αρτηρία. Οι έσω λαγόνιες αρτηρίες χορηγούν τις μέσες και κάτω αιμορροϊδικές αρτηρίες.

Μεταξύ της τελευταίας σιγμοειδικής και της άνω αιμορροϊδικής αρτηρία, δεν υπάρχουν αναστομωτικοί κλάδοι (κρίσιμο σημείο του Sudeck). Μεταξύ των κολικών αρτηριών σχηματίζεται το αναστομωτικό τόξο της επιχειλίου αρτηρίας του Drummond. Μεταξύ της μέσης και της αριστερής κολικής περιγράφεται το αναστομωτικό τόξο του Riolan. Η αιμάτωση του ορθού και του πρωκτικού σωλήνα γίνεται από την άνω αιμορροϊδική αρτηρία (κλάδο της κάτω μεσεντερίου), τη μέση και την κάτω αιμορροϊδική αρτηρία (κλάδοι της έσω αιδοϊκής) και τη μέση ιερά αρτηρία (κλάδο της αορτής) [5-7].

Η αποχέτευση του φλεβικού αίματος διενεργείται από την άνω μεσεντέρια φλέβα, την κάτω μεσεντέρια φλέβα και τις έσω λαγόνιες φλέβες. Η κάτω μεσεντέρια φλέβα αναστομώνεται με τη σπληνική και την άνω μεσεντέρια φλέβα, πίσω από το σώμα του παγκρέατος για το σχηματισμό της πυλαιάς φλέβας. Οι έσω λαγόνιες φλέβες δέχονται αίμα από το κάτω ορθό και τον πρωκτό με τις μέσες και κάτω αιμορροϊδικές φλέβες [8-10].

1.3 Λεμφική παροχέτευση

Η λεμφική παροχέτευση του παχέος εντέρου γίνεται με λεμφαγγεία, παράλληλα με το αρτηριακό δίκτυο, προς τους άνω και κάτω μεσεντέριους λεμφαδένες και με το εντερικό στέλεχος στη χυλοφόρο δεξαμενή. Διακρίνονται σε επικολικούς, παρακολικούς, διάμεσους και τελικούς. Από το κάτω ήμισυ του ορθού, η λέμφος κατευθύνεται με λεμφαγγεία που συνοδεύουν τα μέσα αιμορροϊδικά αγγεία προς τους έσω λαγόνιους λεμφαδένες. Από τον πρωκτικό σωλήνα φέρονται λεμφαγγεία προς τους άνω έσω επιπολής βουβωνικούς λεμφαδένες. [11,12]

1.4 Νεύρωση του παχέος εντέρου

Η νεύρωση του παχέος εντέρου διενεργείται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα που σχηματίζει στο εντερικό τοίχωμα, δύο πλέγματα, το μυεντερικό του Auerbach και το υποβλεννογόνο του Meissner. Η παρασυμπαθητική νεύρωσή του, μέχρι την αριστερή κολική καμπή, διενεργείται από ίνες του πνευμονογαστρικού νεύρου, ενώ το υπόλοιπο νευρώνεται από ίνες του ιερού παρασυμπαθητικού πυρήνα που συμμετέχει στο σχηματισμό του πλέγματος της πυέλου. Η συμπαθητική νεύρωση του διενεργείται από το πλέγμα της άνω και κάτω μεσεντέριας αρτηρίας και του πυελικού πλέγματος. Ο έξω σφιγκτήρας του πρωκτού και ο βλεννογόνος του πρωκτού, κάτω από την οδοντωτή γραμμή, λαμβάνουν νεύρωση από το αιδοϊκό νεύρο, κλάδο του ιερού πλέγματος [13].

1.5 Φυσιολογία του παχέος εντέρου

Στον πεπτικό σωλήνα εισέρχονται καθημερινά περίπου εννέα λίτρα υγρών. Δύο αποτελούν μέρος της διατροφής ενώ τα υπόλοιπα προέρχονται από τη σίελο και τις εκκρίσεις στομάχου, χολής, παγκρέατος και λεπτού εντέρου διευκολύνοντας τη λειτουργία της πέψης. Η απορρόφηση γίνεται κυρίως στο λεπτό έντερο ενώ περίπου ένα λίτρο (άπεπτα υπολείμματα τροφών και διασπασμένα κύτταρα), περνούν την ειλεοτυφλική βαλβίδα και εισέρχονται στο παχύ έντερο. Στο παχύ έντερο διακρίνουμε έναν χαρακτηριστικό τύπο κινητικότητας, το γαστροκολικό αντανακλαστικό (μαζικός περισταλτισμός μετά το γεύμα) με κυριότερο εκκριτικό προϊόν την βλέννα (σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών) καθώς και την παραγωγή και απορρόφηση βιταμίνης Κ. Απορροφά ενεργητικά νάτριο και παθητικά νερό, ιδιαίτερα στο δεξιό τμήμα του, ενώ το αριστερό τμήμα του και το ορθό λειτουργούν ως αποθήκη μέχρι την κένωση του. Το παχύ έντερο δεν λαμβάνει μέρος στην πέψη ή την απορρόφηση των τροφών. Όταν το περιεχόμενο του λεπτού εντέρου είναι υγρό, κατά τη διαδρομή στο κόλον απορροφάται το νερό και

το περιεχόμενο, τα κόπρανα, έχουν μια ημιστερεά σύνθεση. Η περίσταση είναι πολύ ήπια στο κόλον. Χρειάζονται περίπου 16 με 24 ώρες για να φθάσει το περιεχόμενο στη σιγμοειδική καμπή.

Απορρόφηση: Η απορροφητική ικανότητα του παχέος εντέρου αφορά κυρίως στο νερό, στους ηλεκτρολύτες και σε λίγες υδροδιαλυτές φαρμακευτικές και θρεπτικές ουσίες. Εντεροηπατικός κύκλος υφίσταται για την ουρία και την αμμωνία, για την οικονομία του αζώτου και για τα χολικά οξέα. Το παχύ έντερο μπορεί να απορροφήσει έως και 5 λίτρα νερό ημερησίως. Η απορρόφηση του νερού γίνεται παθητικά. Στο παχύ έντερο αποθηκεύεται προσωρινά το άπεπτο υλικό μέχρι να αποβληθεί. Στο διάστημα αυτό γίνεται απορρόφηση νερού, αλάτων και ορισμένων βιταμινών. Η απορρόφηση του νερού δημιουργεί τα κόπρανα μαζί με άπεπτα υπολείμματα των τροφών, χρωστικές της χολής και βακτήρια. Τα βακτήρια μεταβολίζουν τις άπεπτες ουσίες και παράγουν οξέα που δίνουν τη χαρακτηριστική οσμή των κοπράνων. Το παχύ έντερο εκκρίνει βλέννα που το προστατεύει από τα οξέα αυτά. Τα βακτήρια παράγουν βιταμίνες όπως η βιταμίνη Κ, η οποία συμμετέχει στη διαδικασία πήξης του αίματος [14].

Αποθήκευση: Η κύρια λειτουργία του παχέος εντέρου είναι η αποθήκευση των κοπράνων και η αφόδευση τους. Τα κόπρανα προωθούνται αργά μέχρι το σιγμοειδές όπου και παραμένουν μέχρι την αφόδευση. Φθάνουν στο ορθό και δίνουν την επιθυμία για αφόδευση. Οι νευρικοί υποδοχείς του ορθού είναι σε θέση να διακρίνουν εάν το προς αποβολή υλικό είναι στερεό, υγρό ή αέριο. Η κυτταρίνη και άλλα άπεπτα υλικά δίνουν όγκο στο περιεχόμενο του εντέρου και διευκολύνουν την διατήρηση των κινήσεων του εντέρου [15].

Κινητικότητα

Η κινητικότητα του παχέος εντέρου περιλαμβάνει την αντιπερισταλτική εξώθηση, τμηματικές μη προωθητικές κινήσεις και μαζικές εξωθητικές κινήσεις, όπως για την αφόδευση.

1. Προωθητικές Κινήσεις Ανάμιξης

Οι κινήσεις των κολικών κυψελών συντελούν στην ανάμιξη του περιεχομένου, είναι αργές και μη προωθητικές αλλά συμβάλλουν στις λειτουργίες αποθήκευσης. Για την μετακίνηση του υλικού από την ειλεοτυφλική βαλβίδα μέχρι το τέλος του εγκάρσιου

απαιτούνται 8-15 ώρες και το υλικό από ημίρρευστο μεταβάλλεται σε κοπρανώδες και ημιστέρεο υλικό.

2. Μαζικές Κινήσεις

Η μαζική κίνηση αποτελεί ένα πολύ ισχυρό περισταλτικό κύμα, το οποίο εμπλέκει την δράση των κολικών ταινιών. Κατά την διάρκεια της ημέρας, 3-4 φορές συνήθως μετά τα γεύματα αυξάνεται η κινητικότητα του εντέρου. Πραγματοποιούνται ταυτόχρονες συστολές του ανιόντος και του εγκάρσιου κόλου με αποτέλεσμα την μετακίνηση των κοπράνων από 1/3 προς 3/4 του μήκους του παχέος εντέρου σε ελάχιστα δευτερόλεπτα, οδηγώντας τα κόπρανα στο τελευταίο τμήμα του εντέρου προς αφόδευση. Η διαδικασία διαρκεί περίπου μισή ώρα και επαναλαμβάνεται μετά από 12-24 ώρες. Η προώθηση με τις κινήσεις προς το ορθό διεγείρει το αντανεκλαστικό της αφόδευσης.

Αφόδευση:

Η κύρια λειτουργία του ορθοπρωκτικού σωλήνα, είναι η συλλογή, σχηματοποίηση και αποθήκευση των κοπράνων, με τελικό στόχο την εγκράτεια και την αφόδευση. Καθώς το ορθό γεμίζει από κόπρανα οι λείες μυϊκές ίνες του ορθού ξεκινούν σύσπαση και ο έσω πρωκτικός σφικτήρας παρουσιάζει χαλάρωση, φαινόμενο που συνιστά το ορθοσφυκτηριακό αντανεκλαστικό. Όταν και ο εξωτερικός σφιγκτήρας του πρωκτού υποστεί χαλάρωση αρχίζει η αφόδευση καθώς οι λείες μυϊκές ίνες του ορθού υπόκεινται σύσπαση αυξάνοντας την ενδοαυλιακή πίεση και τα κόπρανα αποβάλλονται μέσω του πρωκτικού σωλήνα από τον οργανισμό [16,17].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

2.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) είναι ο τρίτος συχνότερος καρκίνος σε επίπτωση και σε θνητότητα και στα δύο φύλα, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη για τους άνδρες και του μαστού για τις γυναίκες. Είναι ο τρίτος σε συχνότητα επίπτωσης στους άνδρες και δεύτερος στις γυναίκες.

Εμφανίζει υψηλότερη συχνότητα σε ΗΠΑ, Καναδά, Αυστραλία ενώ είναι χαμηλότερη στην Ινδία, Νότια Αμερική και Αφρική. Στην Ευρώπη είναι δεύτερος σε συχνότητα και ευθύνεται για το 13% όλων των καρκίνων και για το 12,2% των θανάτων από καρκίνο το 2012 [18].

Η κορύφωση της συχνότητας του ΚΠΕ παρατηρείται στην ηλικία των 60-70 ετών ενώ λιγότερο από 20% των περιπτώσεων εμφανίζεται σε ηλικία κάτω των 50 ετών. Η επίπτωση και η θνητότητα έχουν μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και στα δύο φύλα [19,20]. Η θνητότητα μειώθηκε κατά 52% από το 1970 έως το 2015 λόγω της πρόωμης διάγνωσης και αφαίρεσης προκαρκινικών αλλοιώσεων και της βελτιωμένης αντιμετώπισής του ενώ αυξήθηκε σε αρκετές χώρες της Λατινικής Αμερικής [21,22].

2.2. Παράγοντες κινδύνου

Ηλικία: Η πλειονότητα των ΚΠΕ συμβαίνει σε ασθενείς άνω των 50 ετών λόγω πιθανότατα μιας σημαντικής αύξησης στον αριθμό των πολυπόδων μετά τα 50 έτη [23].

Φύλο: Οι γυναίκες έχουν μικρότερη επίπτωση (σε συνάρτηση με την ηλικία) σε σχέση με τους άνδρες αλλά έχουν περισσότερα αδενώματα και καρκινώματα στο δεξιό κόλον. Οι όγκοι στο δεξιό κόλον είναι συχνότεροι σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας και σε γυναίκες και σχετίζονται με χαμηλή διαφοροποίηση, προχωρημένο στάδιο και βλεννώδη ιστολογία [24].

Εθνικότητα: Οι Αμερικανοί αφρικανικής καταγωγής έχουν αυξημένο κίνδυνο ΚΠΕ και αδενώματα σε σχέση με τους Καυκάσιους, ιδιαίτερα στο εγγύς κόλον, ενώ οι Λατίνοι

έχουν μειωμένο κίνδυνο και προχωρημένα αδενώματα. Οι χώρες με χαμηλά εισοδήματα, ενώ έχουν χαμηλότερη επίπτωση καρκίνου του παχέος εντέρου, έχουν την υψηλότερη θνητότητα [25,26].

Γενετική προδιάθεση: Είναι παράγοντας κινδύνου μη μεταβλητός. Η παρουσία συγγενούς πρώτου βαθμού με ΚΠΕ πριν την ηλικία των 60 ετών, αυξάνει τον κίνδυνο στα συγγενικά μέλη κατά 2 φορές. Τα κληρονομικά σύνδρομα (Lynch και Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση) έχουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη ΚΠΕ.

Το σύνδρομο Lynch (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer), απαντάται σε έναν στους 300 ασθενείς με ΚΠΕ. Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP, Familial Adenomatous Polyposis) είναι σπανιότερη και παρατηρείται σε έναν στους 7000 ασθενείς ενώ η σχετιζόμενη με το ΜΥΗ (MAP, MYH-Associated Polyposis) σε έναν στους 18000 ασθενείς με ΚΠΕ. Όλες οι οικογενείς περιπτώσεις αποτελούν το 6% του ΚΠΕ. Αυξημένη συχνότητα για ΚΠΕ έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 (Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Protein 1 και 2) [27].

Διατροφή: Ο δυτικός τρόπος διατροφής (υψηλή πρόσληψη κόκκινου κρέατος, μικρή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ. Τα δεδομένα για τη πρόσληψη φυτικών ινών, φρούτων και λαχανικών είναι αμφιλεγόμενα. Σε μία μετα-ανάλυση υιοθετήθηκε η άποψη της συσχέτισης ανάμεσα στην πρόσληψη ινών και το μειωμένο κίνδυνο ΚΠΕ. Η μειωμένη πρόσληψη ινών συντελεί στην κατακράτηση κοπράνων στο έντερο, σε αύξηση οξειδωτικών από αποδόμηση υδατανθράκων από τα βακτήρια και στη παρατεταμένη επαφή με το βλεννογόνο του ευνοώντας την καρκινογένεση [28,29,30].

Άλλοι παράγοντες: Ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η κατανάλωση αλκοόλ, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου ευνοούν την καρκινογένεση [28,30-34].

2.3 Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Μη τροποποιήσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη ΚΠΕ. Ο κίνδυνος είναι τριπλάσιος, και αυξάνει με τη διάρκεια της νόσου (2% στα 10 χρόνια, 18% μέχρι 30 χρόνια) και με τη σοβαρότητα και την έκταση της φλεγμονής. Ο ΚΠΕ που σχετίζεται με την

φλεγμονώδη νόσο του εντέρου έχει πολλούς κοινούς μοριακούς μηχανισμούς με το σποραδικό καρκίνο και παρόμοιες συχνότητες χρωμοσωμικής και μικροδορυφορικής αστάθειας (85% και 15% αντίστοιχα) [35,36].

2.4 Πολύποδες του παχέος εντέρου

Οι πολύποδες είναι καλοήθεις ενδοαυλικές μάζες του εντέρου και διακρίνονται σε άμισχους ή έμισχους. Είναι κυρίως σποραδικοί και αυξάνονται με την ηλικία, το 90% είναι μη νεοπλασματικοί και οι περισσότεροι από αυτούς είναι υπερπλαστικοί. Οι υπερπλαστικοί είναι μικρές, λείες, ημισφαιρικές προεξοχές του βλεννογόνου και είναι συχνά πολλαπλοί. Εντοπίζονται στο σιγμοειδές και στο ορθό. Έχουν πολλές κρύπτες με καλά διαφοροποιημένα κυπελλοειδή ή απορροφητικά επιθηλιακά κύτταρα, διαχωριζόμενα από ένα υποτυπώδες χόριο [37].

Οι αμαρτωματώδεις (νεανικοί πολύποδες και πολύποδες Peutz-Jegher), οι φλεγμονώδεις και οι λεμφοειδείς πολύποδες είναι καλοήθεις πολύποδες. Οι νεανικοί πολύποδες είναι εκβλαστήσεις του χορίου και εντοπίζονται συχνότερα σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Οι πολύποδες Peutz-Jegher είναι σπάνιοι αμαρτωματώδεις πολύποδες και αποτελούν μέρος του συνδρόμου Peutz-Jegher, το οποίο χαρακτηρίζεται επιπλέον από υπερμελάγχρωση του βλεννογόνου και του δέρματος [38].

Οι αδενωματώδεις πολύποδες ή αδενώματα είναι αποτέλεσμα επιθηλιακού πολλαπλασιασμού και δυσπλασίας και μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήθεια. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 20%-30% πριν την ηλικία των 40 ετών και αυξάνεται στο 40%-50% μετά την ηλικία των 60 ετών. Φαίνεται ότι υπάρχει οικογενής προδιάθεση για τα σποραδικά αδενώματα.

Τα αδενώματα διακρίνονται με βάση την επιθηλιακή δομή σε σωληνώδη, σε θηλώδη και σε σωληνοθηλώδη. Η πλειονότητα των αδενωμάτων είναι σωληνώδη, 5%-10% είναι θηλώδη και το 1% είναι σωληνοθηλώδη. Ο καρκίνος είναι σπάνιος στα σωληνώδη αδενώματα κάτω του ενός εκατοστού ενώ είναι μεγάλος (περίπου 40%) στα άμισχα θηλώδη αδενώματα διαμέτρου άνω των 4 εκατοστών [39].

Τα σύνδρομα οικογενούς πολυποδίασης είναι σπάνιες αυτοσωματικές επικρατείς διαταραχές. Έχουν τάση για κακοήθη εξαλλαγή [40,41].

2.5. Καρκίνος του παχέος εντέρου

Η πλειονότητα των ΚΠΕ είναι αδενοκαρκινώματα (90%). Σπανιότερα αναγνωρίζονται το αδеноπλακώδες, το ατρακτοκυτταρικό, το πλακώδες και το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Ταξινομούνται σε κλασικού τύπου, ηθμοειδούς προτύπου, σε μυελοειδή καρκινώματα, σε μικροθηλώδη καρκινώματα, σε βλενώδη καρκινώματα, σε οδοντωτά αδενοκαρκινώματα και σε καρκινώματα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. Το μυελοειδές καρκίνωμα με μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) έχει καλή πρόγνωση ενώ οι όγκοι με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου έχουν κακή πρόγνωση [42].

Ο όρος βλενώδες αδενοκαρκίνωμα χρησιμοποιείται μόνο εάν πάνω από το 50% της βλάβης αποτελείται από λίμνες εξωκυττάριας βλέννης που περιέχουν κακοήθες επιθήλιο με αδενοκυψελιδική μορφή, στρώματα κακοήθων κυττάρων ή ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα που περιλαμβάνουν κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. Αρκετά όμως βλενώδη καρκινώματα είναι MSI-H και χαμηλής κακοήθειας.

Το αδενοκαρκίνωμα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου ορίζεται όταν πάνω από το 50% των καρκινικών κυττάρων παρουσιάζονται με έντονη ενδοκυττάρια βλέννη που εκτοπίζει και περιχαρακώνει τον πυρήνα. Μερικά είναι MSI-H και άρα χαμηλής κακοήθειας, ενώ εκείνα που δεν χαρακτηρίζονται από μικροδορυφορική αστάθεια είναι πολύ επιθετικά [43].

Πληθυσμοί με υψηλή συχνότητα αδενωμάτων έχουν και υψηλή συχνότητα ΚΠΕ και αντίστροφα. Η κατανομή των αδενωμάτων στο κόλον και στο ορθό είναι ίδια με αυτή του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η ανάπτυξη των αδενωμάτων προηγείται αυτής του ΚΠΕ. Πρακτικά ο κίνδυνος καρκίνου είναι ανάλογος με τον αριθμό των αδενωμάτων. Η αφαίρεση των αδενωμάτων ελαττώνει τη συχνότητα του καρκίνου.

Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου έχει ταξινομηθεί ως καλά, μέτρια, πτωχά διαφοροποιημένο και αδιαφοροποίητο. Τα καρκινώματα συχνά παρουσιάζουν ετερογένεια και ο βαθμός διαφοροποίησης καθορίζεται από το λιγότερο διαφοροποιημένο στοιχείο. Τα αδενοκαρκινώματα και τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα με MSI-H φαινότυπο συμπεριφέρονται ως χαμηλής κακοήθειας νεοπλάσματα [44].

2.6 Σταδιοποίηση κατά TNM

Η σταδιοποίηση γίνεται δύο φορές, μία φορά πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου και αφού έχουν ολοκληρωθεί οι απεικονιστικές εξετάσεις (κλινική σταδιοποίηση) και μία μετά την αφαίρεση και την παθολογοανατομική εκτίμηση του όγκου (παθολογοανατομική σταδιοποίηση) [45,46].

Η Διεθνής Ένωση για τον Έλεγχο του Καρκίνου (Union for International Cancer Control) εφαρμόζει τη λεγόμενη TNM σταδιοποίηση (Tumor Lymphnode Metastasis) όπου το «T» σημαίνει πρωτοπαθής όγκος, το «N» λεμφαδένες και το «M» μεταστάσεις. Η σταδιοποίηση κατά TNM σταδιακά τροποποιείται. Σήμερα χρησιμοποιείται πλέον η 8^η αναθεωρημένη μορφή της κατά την American Joint Committee on Cancer (AJCC) καθώς και η συνακόλουθη κατάταξη σε στάδια. Στους πίνακες (Πίνακας 1, Πίνακας 2) περιγράφεται η 7^η έκδοση καθώς και στη συνέχεια οι διαφορές με την 8^η έκδοση [47].

Primary tumour (T)	
Tx	Primary tumour cannot be assessed
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial or invasion of lamina propria
T1	Tumour invades submucosa
T2	Tumour invades muscularis propria
T3	Tumour invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues
T4a	Tumour penetrates to the surface of the visceral peritoneum
T4b	Tumour directly invades or is adherent to other organs or structures
Regional Lymph Nodes (N)	
Nx	Regional LN cannot be assessed
N0	No regional LN metastasis
N1a	Metastasis in one regional LN
N1b	Metastasis in 2-3 regional LN
N1c	Tumour deposit(s) in the subserosa, mesentery, or non-peritonealized pericolic or perirectal tissues without regional LN
N2a	Metastasis in 4-6 regional LN
N2b	Metastasis in seven or more regional LN
Distant metastases (M)	
M0	No distant metastasis
M1a	Metastases confined to one organ or site
M1b	Metastases in more than one organ or peritoneum

Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Any	Any	M1a
IVB	Any	Any	M1b

Πίνακας 1: Κατάταξη του ΚΠΕ κατά TNM 7^η έκδοση. **Πίνακας 2:** Σταδιοποίηση ΚΠΕ Από: Obrocea FL et al. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. Rom J Morphol Embryol. 2011;52(2):537-44. [47]

Για μια πληρέστερη εκτίμηση της νόσου ελέγχονται επίσης το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), οι καρκινικές εναποθέσεις (tumor deposits), η περινευρική διήθηση, η φλεγμονώδης διήθηση, η μικροδορυφορική αστάθεια, ο βαθμός υποστροφής του όγκου μετά θεραπεία όπως επίσης η διήθηση αγγείων και η εξωτοιχωματική διήθηση αγγείων [48].

Στην 8^η έκδοση της TNM, τα T και N μένουν χωρίς αλλαγές αλλά η M1 (απομακρυσμένες μεταστάσεις) αλλάζει σε M1a (μεταστάσεις σε ένα όργανο χωρίς περιτοναϊκές μεταστάσεις), M2b (μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα) και M1c (περιτοναϊκές μεταστάσεις με ή χωρίς μεταστάσεις σε άλλα όργανα). Το στάδιο παραμένει ίδιο εκτός από τα στάδια IV (οποιοδήποτε TN,M1), με αντίστοιχα στάδια IVA, IVB, IVC. Επιπλέον τονίζεται η ανάγκη για περιγραφή των tumor deposits που αλλάζει το στάδιο N1c σε αρνητικούς λεμφαδένες, η φλεβική διήθηση που περιγράφεται ως V1/2 και η περινευρική διήθηση που δίδεται ως Pn1 [47,48].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

3.1. Γενετικό μοντέλο πολλαπλών σταδίων στον καρκίνο παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες: α) τον σποραδικό καρκίνο (60%) με ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό ή κληρονομούμενη γενετική μετάλλαξη β) τον οικογενή καρκίνο (30%) σε άτομα με ένα συγγενή με καρκίνο ή αδένωμα, αλλά μετάλλαξη της βλαστικής σειράς ή σαφή κληρονομικότητα γ) τα διάφορα κληρονομικά σύνδρομα (10%) με κληρονομική μεταβίβαση μιας μονήρους γονιδιακής μετάλλαξης με υψηλή διεισδυτικότητα [49,50].

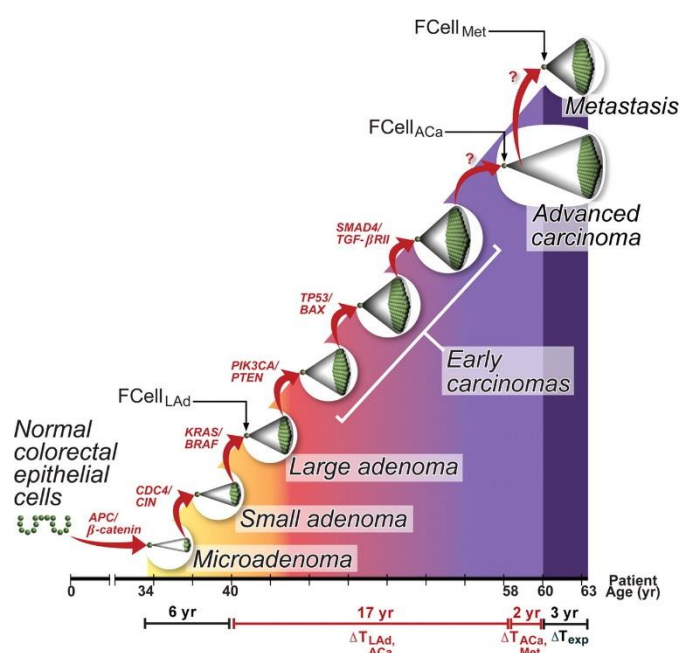
Ο καρκίνος είναι απόληξη της διαταραχής της κυτταρικής ανάπτυξης, δηλαδή του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της γήρανσης και της απόπτωσης των κυττάρων. Διάφορα ερεθίσματα, εισερχόμενα στον εντερικό αυλό επιδρούν με άλλους ενδοαυλικούς παράγοντες όπως τα χολικά οξέα ασκώντας βλαπτική δράση σε επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Τα κύτταρα οδηγούνται σε ένα ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό με αναστολή της διαδικασίας κυτταρικού θανάτου [51,52].

Η καρκινογένεση στο παχύ έντερο είναι μια εξελικτική διαδικασία που από απλό πολύποδα εξελίσσεται σε καρκίνο και ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία είναι κατά προσέγγιση από 8 έως 12 χρόνια. Χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση ογκογονιδίων, αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, άθροιση γενετικών μεταλλάξεων σε τουλάχιστον 4 ή 5 γονίδια, μετάλλαξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων και έκφραση των παραπάνω σε πολυποδίαση ή κληρονομικότητα.

Το μοντέλο που προτάθηκε το 1988 από τον Vogelstein et al [52,53] στηρίζεται στη διαδοχική φύση των γενετικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα. Το πρώτο βήμα για την δημιουργία ενός αδενώματος είναι μεταβολές στο APC γονίδιο (χρωμόσωμα 5q21-22) και η απώλεια της ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 5 (αδένωμα τάξης I).

Το δεύτερο βήμα γίνεται στο γονίδιο *ras* που ευνοεί την εξέλιξη από ένα μικρό αδένωμα χαμηλής κακοήθειας σε ένα αδένωμα τάξης II. Τα αδενώματα με μετάλλαξη *ras* πιθανόν να αναπτύσσονται και να εμφανίζουν δυσπλασία πιο γρήγορα σε σύγκριση με

εκείνα χωρίς μετάλλαξη. Μεταλλάξεις σε ένα ras γονίδιο (H-ras, K- ras, N- ras) βρίσκονται στους μισούς ασθενείς με ΚΠΕ, στο 50% των αδενωμάτων μεγαλύτερα του 1 εκ, στο 10% των αδενωμάτων με διάμετρο μικρότερη του 1 εκ, ενώ οι περισσότερες αφορούν στο γονίδιο K- ras. Στη συνέχεια εμφανίζονται μεταλλάξεις στα γονίδια του χρωμοσώματος 18q, η μικροδορυφορική αστάθεια (αδένωμα τάξης III) και μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο, που συμβάλλουν στην κακοήγη μετατροπή ενός αδενώματος κυρίως στο ορθό (Εικόνα 3) [53-56].



Εικόνα 3. Μετάβαση από αδένωμα σε ΚΠΕ και οι συχνότερες μεταλλάξεις. Από: <https://eclass.uoa.gr/modules/document/index.php?course=MED409&download=/4f8e691encof/58065ff9Q31h/56ab16b79EIE.pptx>, website [56]

3.2 Προγονικά κύτταρα και ο ρόλος τους στην καρκινογένεση

Το παχύ έντερο είναι ένα όργανο με σημαντική ικανότητα πολλαπλασιασμού του επιθηλίου του, το οποίο αλλάζει κάθε 5 ημέρες. Λαμβάνοντας υπόψιν το ρυθμό ανανέωσης των εντερικών κυττάρων, υπολογίζεται ότι παράγονται περίπου 6×10^{14} κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια ανθρώπινης ζωής [57,58]. Η υπόθεση ότι ο ΚΠΕ οφείλεται στον ταχύ ρυθμό ανανέωσης των κυττάρων δεν ευσταθεί αφού παρόμοιο ρυθμό κυτταρικής αλλαγής έχει και το λεπτό έντερο με μικρότερα ποσοστά ανάπτυξης καρκίνου.

Τα προγονικά κύτταρα είναι πολυδύναμα αδιαφοροποίητα κύτταρα που διατηρούν την ομοιόσταση σε επίπεδο ιστού. Τα θυγατρικά τους κύτταρα είναι διαφοροποιημένα, έχουν ταχύ ρυθμό διαίρεσης, αναπαραγωγής ιστών και διαφοροποίησης. Στο παχύ έντερο βρίσκονται στις βάσεις των κρυπτών και δίδουν δυο θυγατρικά κύτταρα, ένα όμοιο με το μητρικό πολυδύναμο και ένα διαφοροποιημένο. Το τελευταίο κινείται προς τις ανώτερες περιοχές των κρυπτών και δίνει το διαφοροποιημένο επιθηλιακό κύτταρο του βλεννογόνου.

Καθώς τα κύτταρα μετακινούνται προς ανώτερες περιοχές, ο αριθμός αυτών που συνεχίζουν να διαιρούνται μειώνεται. Όταν βρεθούν στην ανώτερη μοίρα, τα κύτταρα είναι πλήρως διαφοροποιημένα και σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο [58,59].

Το μικροπεριβάλλον των προγονικών κυττάρων (προσκείμενα κύτταρα, το εξωκυττάριο υγρό, διαλυτοί παράγοντες) είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Επιδρά στα κύτταρα μέσω επιγενετικών μηχανισμών οι οποίοι αναστέλλουν ή προάγουν την έκφραση γονιδίων χωρίς να μεταβάλλουν την αλληλουχία DNA.

Στο παχύ έντερο, οι δομές που αποτελούν το μικροπεριβάλλον σχηματίζονται από εντερικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (ISEMFs). Οι μυοϊνοβλάστες συμμετέχουν στην οργανογένεση, την προστασία καθώς και την επιδιόρθωση μετά από εντερική βλάβη. Επιπλέον ρυθμίζουν την ανανέωση και διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων. Για την τελευταία λειτουργία τους, εκκρίνουν πληθώρα παραγόντων όπως του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων, του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β και του αυξητικού παράγοντα των κερατινοκυττάρων, των οποίων οι υποδοχείς βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα [60]. Οι υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης (ErbB) συμμετέχουν στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος και την μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων κατά μήκος της κρύπτης ενώ στο βάθος των κρυπτών βρίσκονται οι Wnt πρωτεΐνες που επάγουν πυρηνικό πολλαπλασιασμό επαγόμενο από τη β-κατενίνη. Η τελευταία διεγείρει την έκφραση των υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης, που σε συνεργασία με ErbB λιγάσες σε υψηλότερα σημεία των κρυπτών επεκτείνει την περιοχή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [61]. Η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP), η πρωτεΐνη Notch και η πρωτεΐνη Sonic Hedgehog (Shh) είναι άλλα μονοπάτια μετάδοσης σήματος του μικροπεριβάλλοντος

που οριοθετούν το μικροπεριβάλλον πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων από το διαφοροποιημένο επιθήλιο. Αντίθετα στην κορυφή παρατηρείται υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών BMP1, BMP2, BMP5, BMP7, SMAD7 και του υποδοχέα BMP τύπου 2 ενώ στη βάση της κρύπτης φαίνεται υψηλή έκφραση των τριών BMP ανταγωνιστών δηλαδή της γκρεμλίνης-1 (GREM1), της γκρεμλίνης-2 (GREM2) και της ομοιάζουσας στη χορδίνη τύπου 1 που επίσης ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης Wnt.

Η διαταραχή της λειτουργίας αυτών των μονοπατιών μετάδοσης σήματος που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου εντός του εντερικού αυλού. Τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται κι άλλες μεταβολές που θα οδηγήσουν στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου [62].

3.3 Ο ρόλος των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Η διατύπωση της θεωρίας ότι η άθροιση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά σχετίζεται με την εξέλιξη της καρκινικής νόσου μαζί με το μοντέλο εξέλιξης από αδένωμα σε καρκίνωμα, οδήγησε τους Fearon και Vogelstein το 1990 στην διατύπωση του πολυσταδιακού γενετικού μοντέλου για την περιγραφή της καρκινογένεσης ενός συμπαγούς όγκου.

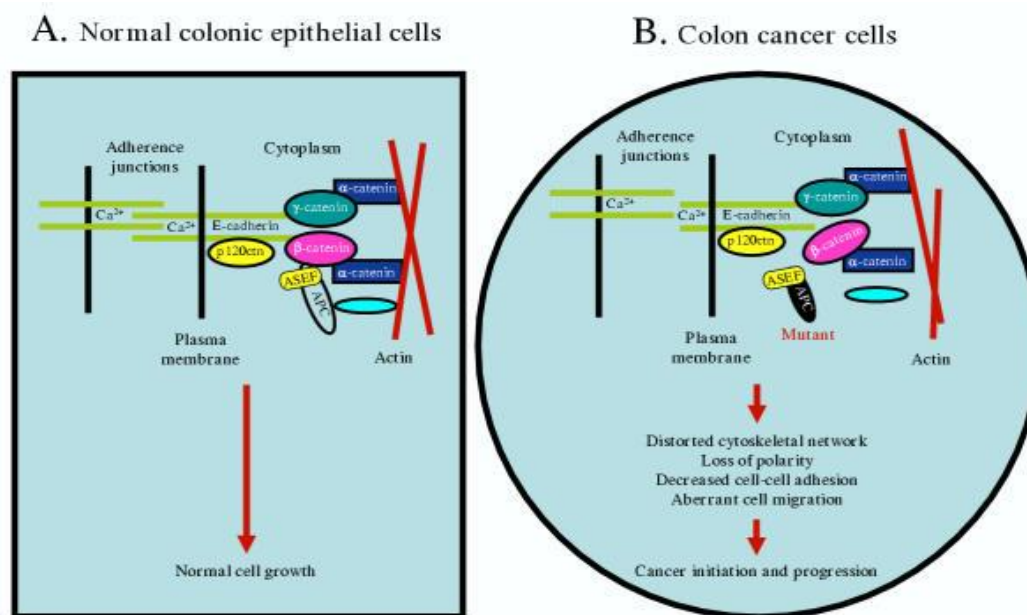
Η καρκινογένεση αρχίζει με μεταλλάξεις των γονιδίων APC (adenomatous polyposis coli) και β-catenin και επεκτείνεται και σε άλλα γονίδια (K-Ras, p53 κ.α.). Περίπου 80 μεταλλαγμένα γονίδια βρέθηκαν στον ορθοκολικό καρκίνο. Επιπλέον η αποσταθεροποίηση του γενετικού υλικού περιλαμβάνει την χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) που οδηγεί σε ενισχύσεις και μεταθέσεις και σε αυξημένο ρυθμό μεταλλάξεων με μικροδορυφορική αστάθεια, σε δημιουργία δηλαδή διπλά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA γνωστών και ως μικροδορυφόρων [63,64].

Η χρωμοσωμική αστάθεια (65% - 70% των σποραδικών ΚΠΕ) οδηγεί σε καρυοτυπική μεταβλητότητα από κύτταρο σε κύτταρο. Ελαττώματα στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA οδηγούν σε μία δεύτερη οδό γονιδιακής αστάθειας (αστάθεια μικροδορυφόρων DNA) ενώ μία τρίτη οδός είναι η δημιουργία σιωπηρών γονιδίων λόγω υπερμεθυλίωσης των CpG νησιδίων. Αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής αστάθειας είναι η ανευπλοειδία [65,66].

3.4 Ο ρόλος των γονιδίων APC και β-catenin.

Η ενεργοποίηση του Wnt μέσω μετάλλαξης του ογκοκατασταλτικού APC είναι το πρώτο γενετικό συμβάν στη διαδικασία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Σωματικές μεταλλάξεις του APC βρίσκονται στο 30-70% των σποραδικών αδενωμάτων και στο 72% περίπου των σποραδικών καρκινωμάτων. Κληρονομικές μεταλλάξεις του APC ευθύνονται για την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση [67].

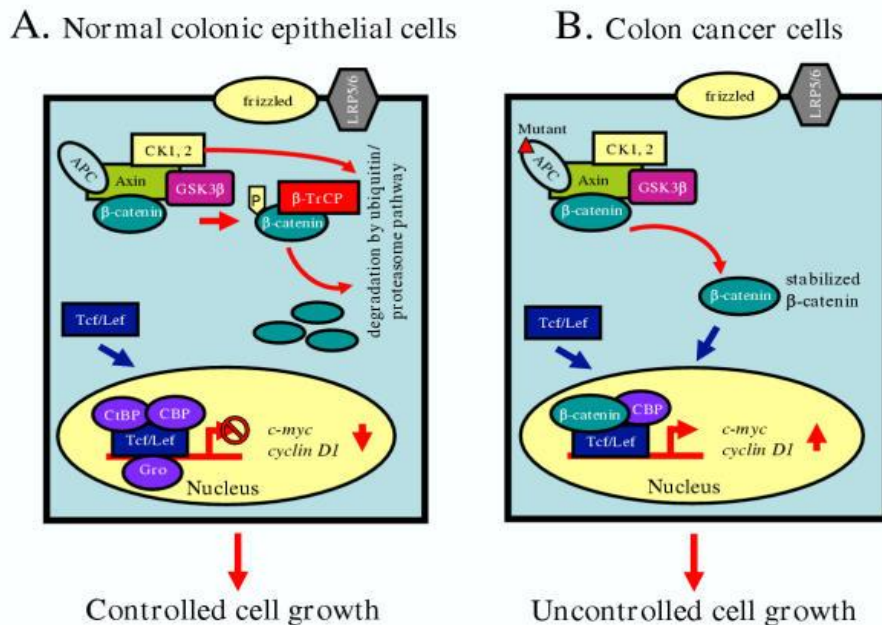
Το APC παράγει μια ευμεγέθη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση, στην πολικότητα, στη μετανάστευση και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η πρωτεΐνη δένεται στη β-κατενίνη, φωσφορυλιώνεται από μια γλυκογονική συνθετική κινάση, ευνοώντας την αποδόμηση και καταστολή της Wnt. Βασική λειτουργία της αποτελεί η αλληλεπίδρασή της με τη συνθετική κινάση-3β του γλυκογόνου και τη β-κατενίνη, θεμελιώδη ενδιάμεσα της οδού μετάδοσης σήματος μέσω των πρωτεϊνών Wingless/Wnt (Εικόνα 4, Εικόνα 5).



Εικόνα 4: Απενεργοποίηση του γονιδίου APC και συσσώρευση β-κατενίνης
Από: Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. Mol Cancer. 2003 Dec 12;2:41.[69]

Το προϊόν μετάφρασης του μεταλλαγμένου γονιδίου APC εμποδίζει τη δημιουργία του συμπλέγματος, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων β-κατενίνης στο

κυτταρόπλασμα. Με την σειρά της η β -κατενίνη περνά στον πυρήνα και διεγείρει τη μεταγραφή πολλαπλών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου και τη διείσδυσή του [67,68,69,70]. Τέλος, η υψηλή έκφραση της κυκλίνης-D1 ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων APC επίσης έχει συσχετιστεί με τη μετάβαση από φυσιολογικά κύτταρα σε μεταστατικό καρκίνωμα [70].



Εικόνα 5: Εναλλακτικοί τρόποι δράσης των μεταλλάξεων του APC (συσσώρευση cycline-D1). Από Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. Mol Cancer. 2003 Dec 12;2:41. [69]

3.5 Ο ρόλος του ογκογονιδίου K-RAS.

Η μη ενεργοποιημένη μορφή του ογκογονιδίου ονομάζεται πρωτοογκογονίδιο και σχετίζεται με τον έλεγχο των κυτταρικών σημάτων. Όλα τα κύτταρα θηλαστικών εκφράζουν τρεις μορφές της πρωτεΐνης Ras (H-Ras, K-Ras και N-Ras), οι οποίες επάγουν ογκογένεση όταν μεταλλαχθούν στα κωδικόνια 12, 13 ή 6 [67,71].

Οι πρωτεΐνες Ras είναι GTPάσες που βοηθούν στη μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου (κινάσες τυροσίνης) προς το εσωτερικό του.

Οι μεταλλάξεις των ras πρωτεϊνών προκαλούν συνήθως ενεργοποίηση της ras GTPάσης, που ενεργοποιεί με τη σειρά της σήματα ογκογένεσης [53].

Μεταλλάξεις σε K- ras γονίδια έχουν εντοπιστεί στον καρκίνο του πνεύμονα, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου. Η σημειακή μετάλλαξη στο K-ras καθιστά τα κύτταρα επιρρεπή στο να αποκτήσουν επιπλέον γενετικές τροποποιήσεις για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες του όγκου όπως την ικανότητα τοπικής διήθησης, την μετάσταση, την διαδικασία της αγγειογένεσης και την ανοσολογική απόκριση.

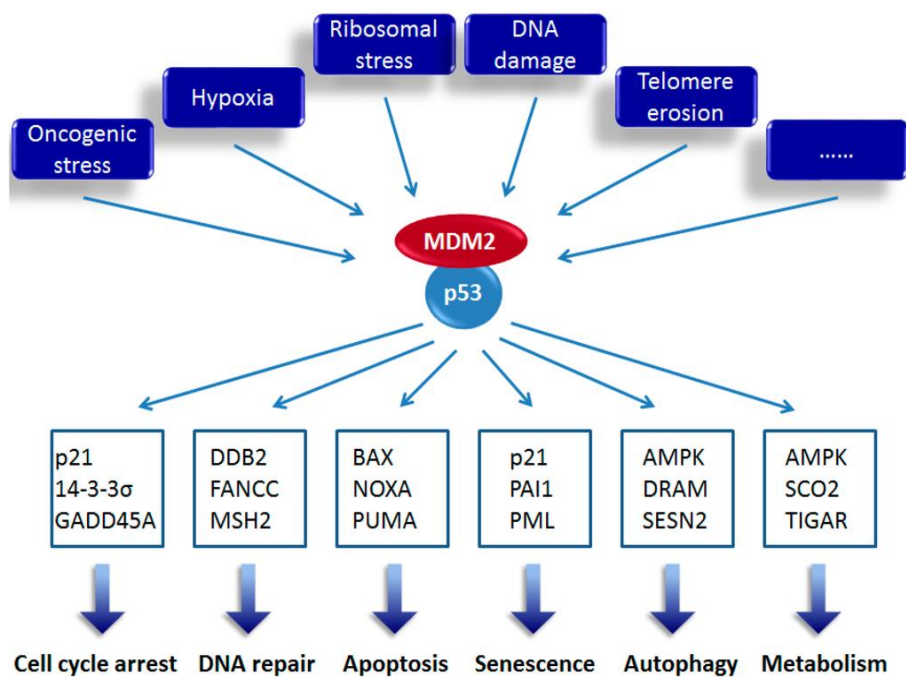
Επιπλέον, το μεταλλαγμένο K-ras οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, μέσω φωσφορυλίωσης της GATA-6, αυξάνοντας άμεσα την ογκογόνο ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS η οποία με τη σειρά της μεγαλώνει την δράση των MAP κινασών οδηγώντας σε βλάβες στο DNA και σε θραύσεις στη διπλή έλικά του [72,73].

3.6 Ο ρόλος του γονιδίου p53

Το γονίδιο p53, εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17. Κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός παράγοντα συντονισμού των κυτταρικών αποκρίσεων στο στρες συμπεριλαμβανομένων των βλαβών του DNA, του οξειδωτικού στρες και των σημάτων ανώμαλου πολλαπλασιασμού (Εικόνα 6). Ελέγχει τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων του μεταβολισμού του DNA, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, τη γήρανση, την κινητικότητα, την αγγειογένεση και τη κυτταρική μετανάστευση. Η πρωτεΐνη p53 επάγεται από άλλες ογκογόνες πρωτεΐνες, όπως η RAS και η cMyc [74,75,76].

Η μετάλλαξη p53 εμποδίζει την απόπτωση των κυττάρων. Η διαταραχή της λειτουργίας του αποτελεί χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των νεοπλασιών στον άνθρωπο. Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 εντοπίζονται στο 5% με 24% των αδενωμάτων, στο 50% των αδενωμάτων με διηθητικές εστίες και στο 50% με 75% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στην πλειοψηφία τους οι αλλαγές που συμβαίνουν στο συγκεκριμένο γονίδιο είναι μεταλλάξεις αλλαγής κωδικονίου (πχ. κωδικόνια 175, 245), με αποτέλεσμα να παράγεται μιας ανενεργός πρωτεΐνη με μεγάλη διάρκεια ζωής [76].



Εικόνα 6: Λειτουργίες του p53. Από: Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. J Mol Cell Biol. 2019 Apr 1;11(4):267-276. [74]

3.7 Απώλεια αλληλίων στο χρωμόσωμα 18q.

Η απώλεια αλληλίων στο χρωμόσωμα 18q ανευρίσκεται στο 70% των ασθενών με ΚΠΕ και σε προχωρημένα στάδια. Το γονίδιο διαγραφής είναι το DCC που παράγει έναν επιφανειακό υποδοχέα για την πρωτεΐνη netrin-1 των νευρώνων και τα SMAD2/SMAD4 που είναι ρυθμιστές κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Η απώλεια έκφρασης των γονιδίων cables που βρέθηκαν στο χρωμόσωμα 18q παρατηρείται στο 60% - 70% των ΚΠΕ. Μεταλλάξεις στο 18q σχετίζονται με την ανάπτυξη μεταστάσεων σε ασθενείς με ΚΠΕ [77].

3.8 Ο ρόλος της Κυκλοξυγενάσης 2.

Η υπερέκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) βρίσκεται στο 85% των ΚΠΕ. Επάγεται από κυτταροκίνες, από αυξητικούς παράγοντες και από μεσολαβητές φλεγμονής που ευνοούν την καρκινογένεση. Οι ογκογενετικές ιδιότητές της οφείλονται στην παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Υψηλή PGE2 βρίσκεται σε

αδενώματα και στον ΚΠΕ επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Η υπερέκφραση της COX-2 επάγει την παραγωγή παραγόντων αγγειογένεσης, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών της βασικής μεμβράνης και ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων. Οι αναστολείς της COX2 φαίνεται να προλαμβάνουν την εμφάνιση αδενωμάτων [78, 79].

3.9 Ο ρόλος της μικροδορυφορικής αστάθειας

Η μικροδορυφορική αστάθεια είναι μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MMR) όπως τα hMLH1, hPMS1, hPMS2 κ.α. Μειώνει την ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών κατά τη σύζευξη των ζευγών των βάσεων οδηγώντας σε σφάλματα αντιγραφής και μεταγραφής του DNA. Επιπλέον αυξάνει το ρυθμό δημιουργίας σφαλμάτων αντιγραφής από την πολυμεράση αλλοιώνοντας την αντιγραφή του DNA κυρίως στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται σε διάφορα γονίδια-κλειδιά όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας του μετατροπέα του αυξητικού παράγοντα β (TGFβRII, transforming growth factor-β) και που εμπλέκονται με σημαντικούς ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα των γονιδίων MMR στο DNA [63,80,81].

Η β-catenin, οι Bax και caspase 5 πρωτεΐνες της απόπτωσης, ο παράγοντας μεταγραφής E2F4 και οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA MSH3 και MSH6 επίσης σχετίζονται με το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας [81].

Το 20% - 25% των ΚΠΕ με μικροδορυφορική αστάθεια εμφανίζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch. [82]. Οι αλλοιώσεις των MMR γονιδίων οδηγούν σε συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων. Οι ΚΠΕ με μικροδορυφορική αστάθεια δεν κληρονομούνται αλλά προκύπτουν μέσω σποραδικής δημιουργίας σιωπηρού MLH1 [83]. Ανάλογες μεταλλάξεις ανευρίσκονται στο 10% με 15% των σποραδικών ΚΠΕ και των προκαρκινικών αλλοιώσεων και σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μικροδορυφορική αστάθεια έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση και διαφορετική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [84,85].

3.10 Μοριακοί προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η χρήση μοριακών βιοδεικτών στη σύγχρονη ογκολογία είναι απαραίτητη. Αν και η γνώση πάνω στα ογκογονίδια μεγαλώνει, λίγοι είναι οι δείκτες που μέχρι τώρα έχουν ευρεία χρήση. Οι αλλοιώσεις των KRAS, p53 και οι 18q είναι πάντα υπό συνεχή μελέτη αν και δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν είναι δείκτες πρόγνωσης. Κάποια στοιχεία έχουν δείξει αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου σε ασθενείς με μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου KRAS. Η p53 μετάλλαξη φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου μόνο στους ασθενείς IV σταδίου που έτσι και αλλιώς είχαν τη χειρότερη πρόγνωση [86,87].

Η χρωμοσωμική αστάθεια φαίνεται να συνδέεται με λιγότερο ευνοϊκή έκβαση στους ασθενείς με ΚΠΕ σε σύγκριση με εκείνους με μικροδορυφορική αστάθεια, με χαμηλά ποσοστά συνολικής και ελεύθερης νόσου επιβίωσης. Όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια είναι ανθεκτικοί στη θεραπεία με ταξάνες που δρουν στις οδούς διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Οι αναστολείς των κινασών Aurora, Plks, spindle motor, της πρωτεΐνης Eg5 και του γονιδίου CENP-E είναι υποσχόμενοι και βρίσκονται σε φάση μελέτης I και II. [86-88].

Η σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του ΚΠΕ συνδυάζει τόσο τη χειρουργική όσο και την χημειο-ακτινο-ανοσοθεραπεία. Στα αρχικά στάδια του ΚΠΕ η εκτομή είναι αρκετή. Στα στάδια II και III χορηγείται επικουρική χημειοθεραπεία. Στο στάδιο IV εκτός της αφαίρεσης προτείνεται επιπλέον συστηματική θεραπεία. Πολλές μοριακές σταδιοποιήσεις του ΚΠΕ ομαδοποιήθηκαν τελευταία σε 4 υποτύπους (Consensus Molecular Subtypes). Σε αυτή την κατηγοριοποίηση (CMS) συσχετίστηκαν επιγενετικά, γενετικά, μικροπεριβαλλοντικά και κλινικά χαρακτηριστικά του 87% των ΚΠΕ ενώ ενσωματώθηκαν διαφορές σε σχέση με το φύλο, τη θέση, τη διαφοροποίηση, τη περίοδο ελεύθερη υποτροπής και νόσου και επιβίωσης μετά την υποτροπή [89].

CMS1: Ανευρίσκεται στο δεξιό κόλον και σχετίζεται με οδοντωτά αδενώματα. Φέρει υψηλό βαθμό μεταλλάξεων BRAF, υπερμεθυλίωση νησιδίων, συνδέεται με το DNA MMR και έχει φλεγμονώδη διήθηση στο μικροπεριβάλλον. Οι καρκίνοι είναι σποραδικοί (12%) και κληρονομικοί (3%) [90]. Έχουν καλύτερη πρόγνωση αλλά κακή πρόγνωση στην υποτροπή και κακή ανταπόκριση στο 5-FU αλλά καλή στο σχήμα FOLFOX. Εκφράζουν υποδοχείς είτε επάνω τους (PDL-1) είτε στα T κύτταρα (PD-

1). Είναι στόχοι νεότερων φαρμάκων όπως των anti-PD-1 (nivolumab) ή των anti-PDL1 (durvalumab) [91].

CMS2: Φέρουν τις κλασσικές αλλοιώσεις των APC, KRAS και p53 με υψηλού βαθμού χρωμοσωμική αστάθεια, ανευπλοειδία και ενεργό το μονοπάτι Wnt-β-catenin και το MYC. Συχνότερα βρίσκονται σε III στάδιο, κυρίως αριστερά και έχουν καλύτερη 5ετή επιβίωση (77%). Ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία [91,92].

CMS3: Ο όγκος είναι υπερμεταβολικός. Μεταλλάξεις KRAS ανευρίσκονται στο 68%. Μεταβολικές αλλοιώσεις φαίνονται σε μονοπάτια γλουταμίνης, λιπαρών οξέων και μεταβολισμού φωσφολιπιδίων. Υπάρχει υψηλός βαθμός έκφρασης στο Human Epidermal Grow Factor receptor 2 (HER2) και κακή ανταπόκριση στο cetuximab. Θεωρητικά αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης (neratinib, dacomitinib) ή των μεταβολικών οδών (μεταφορείς γλυκόζης, γλυκολιτικά ένζυμα, φωσφολιπάσες κ.α.) θα μπορούσαν να είναι ωφέλιμοι στην μικρή αυτή κατηγορία ασθενών [91,93].

CMS4: Είναι γνωστός και ως μεσεγχυματικός τύπος ΚΠΕ με χαμηλό βαθμό υπερμεταλλάξεων. Έχει υπερδιεγερμένο στρώμα με έντονα φαινόμενα αγγειογένεσης, έκφρασης ιντεγγρινών, ινοβλαστών συνδεδεμένων με καρκίνωμα (carcinoma associated fibroblasts) μέσω διέγερσης με TGFβ. Έχει έντονη φλεγμονώδη διήθηση (Treg cells, T helper και μακροφάγα). Η υψηλή έκφραση IL-23 και IL-17 το συνδέει πιθανά με την colitis-derived carcinoma που έχει πρόιμη αδρανοποίηση το p53.

Βρίσκεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο, έχει την χειρότερη 5ετή επιβίωση σε σχέση με τους άλλους τύπους (62%) και κακή περίοδο ελεύθερη υποτροπής (60%). Ανταποκρίνεται στο σχήμα FOLFOX. Οι μεταστάσεις ανθίστανται στις anti-EGFR θεραπείες ανεξάρτητα από το KRAS. Το abrituzumab, μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της integrinανβ6 της επιφάνειας του όγκου φαίνεται πολλά υποσχόμενο για τους όγκους CMS4 [89,91,93].

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Alternate name	Microsatellite Instability Immune	Canonical	Metabolic	Mesenchymal
Primary characteristics	Hypermutated, microsatellite unstable and strong immune activation	Epithelial, marked WNT and MYC signaling activation	Epithelial and evident metabolic dysregulation	Prominent TGF- β activation, stromal invasion and angiogenesis. +/- WNT
Incidence	14%	37%	13%	23%
Genomic associations	MSI, high mutation count, low copy number	Chromosomal instability (CIN), low-moderate mutation count and copy number	CIN, moderate mutation count, low-moderate copy number	CIN, low mutation count, high copy number
Precursor lesions	Serrated (low TGF β microenvironment)	Tubular adenoma	Tubulovillous adenoma with serrated features (21)	Serrated (high TGF β microenvironment)
Epigenomic associations	High methylation	Low methylation	Moderate methylation	Low methylation
Transcriptomic pathways	Immune activation, JAK-STAT activation, Caspases	WNT targets, <i>MYC</i> activation, <i>EGFR</i> or <i>SRC</i> activation, <i>VEFG</i> or <i>VEGFR</i> activation, Integrin activation, <i>TGFβ</i> activation, <i>IGF</i> and <i>IRS2</i> activation, <i>HNF4a</i> , <i>HER2</i> and cyclin upregulation	DNA damage repair, Glutaminolysis, lipogenesis, cell cycle	Mesenchymal activation, complement activation, immunosuppression, integrins
Stroma-immune microenvironment	Few CAF, highly immunogenic, large immune infiltrate, tends towards adaptive immune response	Very few CAF, poorly immunogenic, tends toward innate immune response	Few CAF, highly immunogenic, tends toward adaptive immune response	Many CAF, inflamed, tends toward innate immune response, epithelial to mesenchymal transition
Associated mutations	<i>MSH6</i> , <i>RNF43</i> , <i>ATM</i> , <i>TGFBR2</i> , <i>BRAF</i> , <i>PTEN</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>
Clinical associations	Solid, trabecular, mucinous features	Tubular	Papillary	Prominent desmoplasia, stroma
Histopathologic associations				
Age (years)	69	66	67	64
Sex	44% M, 56% F	58% M, 42% F	53% M, 47% F	55% M, 45% F
Location	Proximal	Distal	Mixed	Distal
Stage at diagnosis (%)				
I	12	13	17	8
II	44	40	41	33
III	40	39	37	47
IV	4	8	5	12
Grade (%)				
1	15	22	20	9
2	40	73	68	72
3	45	5	12	19

Εικόνα 7. Μοριακοί υποτύποι καρκίνου παχέος εντέρου. Από: Guinney J, Dienstmann R et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015;21:1350-6. (88)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ PLA2

4.1 Εισαγωγή

Η οικογένεια PLA2 χωρίζεται σε πολλές μικρότερες ομάδες. Βρίσκονται ανάμεσά τους εκκρινόμενες PLA2 (sPLA2), κυτταροπλασματικές PLA2 (cPLA2), ανεξάρτητες του Ca^{+2} PLA2 (aiPLA2), φωσφολιπάσες τύπου patatin (μεταξύ αυτών και η PLA2 της PRDX-6), ο ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων ακετυλδωρολάσης (PAF-AH) και η λυσοσωμική PLA2 (LPLA2) [94].

Χαρακτηριστική είναι η ταξινόμηση των εκκρινόμενων PLA2 όπως περιγράφηκε από τους Kim RR et al. το 2020 [95].

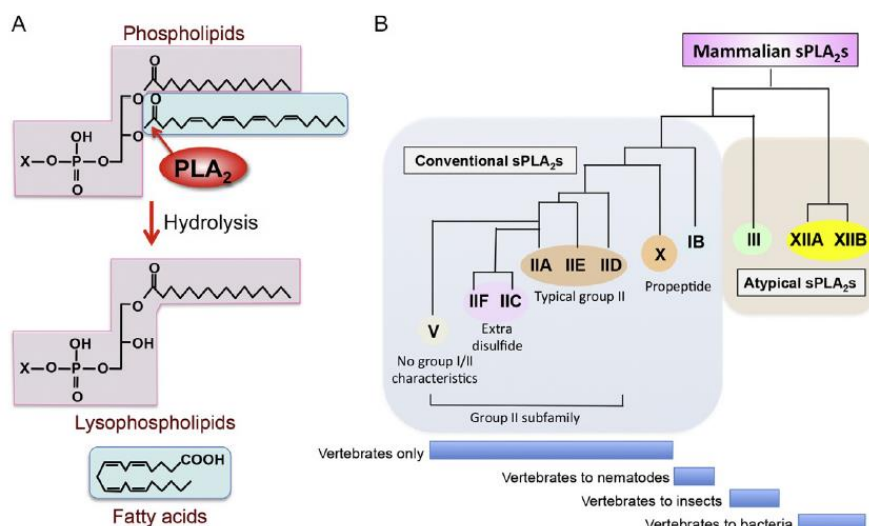
Official Name	Alternate Names	Disulfides (Number)	Molecular Mass (kDA)	Catalytic Amino Acids
PLA2G1B	sPLA2-1B, G1B PLA2, pancreatic PLA2	7	13-15	His/Asp
PLA2G2A	sPLA2-IIA, GIIA PLA2	7	13-15	His/Asp
PLA2G2C	sPLA2-IIC, GIIC PLA2	8	15	His/Asp
PLA2G2D	sPLA2-IIID, GIID PLA2	7	14-15	His/Asp
PLA2G2E	sPLA2-IIIE, GIIIE PLA2	7	14-15	His/Asp
PLA2G2F	sPLA2-IIIF, GIIF PLA2	7	16-17	His/Asp
PLA2G3	sPLA2-III, GIII PLA2	5	Lizard/Bee: 15-18 Human/Murine: 55	His/Asp
PLA2G5	sPLA2-V, GV PLA2	6	14	His/Asp
PLA2G10	sPLA2-X, GX PLA2	8	14	His/Asp
PLA2G12A	sPLA2-XIIA, GXIIA PLA2	7	19	His/Asp
PLA2G12B	sPLA2-XIIB, GXIIB PLA2	7	19	Leucine/Asp

Οι sPLA2 παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και λυσοφωσφολιπίδια από φωσφολιπίδια μεμβράνης που είναι μεσολαβητές λιπιδίων. Εξασφαλίζουν την ισορροπία της μεμβράνης μεσολαβώντας στη σύνθεση φωσφολιπιδίων και στην παραγωγή ενέργειας, δίνουν λιπαρά οξέα για β-οξείδωση και παραγωγή ενέργειας και διατηρούν την ισορροπία μεταξύ κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων. Πολλά PLA2 αντιδρούν με τμήματα λιπαρών ακυλίων ή φωσφολιπιδίων του υποστρώματος τους ενώ άλλα συμμετέχουν σε αντιδράσεις εκτός PLA2 (λυσοφωσφολιπάση, τρανσακυλάση κ.α.) [94].

4.2 Γενικά χαρακτηριστικά

Πρόκειται για ένζυμα χαμηλής μοριακής μάζας. Διαθέτουν μια συντηρημένη καταλυτική θέση τη δυάδα His-Asp και απαιτούν Ca^{+2} για τη λειτουργία τους. Έχουν αναγνωριστεί έντεκα sPLA₂s στα θηλαστικά (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIIB) ενώ επιπλέον υποδιαιρέσεις αφορούν τις ομάδες I, II, V, X, III, XII [95]. Οι διαφορετικές κατανομές τους σε ιστούς ή κύτταρα και οι διαφορετικές ενζυματικές ιδιότητες τους προσδίδουν ξεχωριστούς βιολογικούς ρόλους.

Χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση του υποστρώματος. Τα sPLA₂-III, -V και -X υδρολύουν αποτελεσματικά τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), ενώ τα sPLA₂s στην ομάδα II υδρολύουν φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE). Τα sPLA₂-IID, -IIF, -III και -X προτιμούν για υδρόλυση τα PUFAs όπως το ω6-αραχιδονικό οξύ. Αντίθετα, τα sPLA₂-IB, -IIA και -IIE δεν διακρίνουν είδος sn-2 λιπαρών οξέων ενώ το sPLA₂-V προτιμά αυτά που έχουν χαμηλότερο βαθμό μη κορεσμού (ελαϊκό οξύ και λινελαϊκό οξύ). Η πρωτεΐνη δέσμευσης sPLA₂-PLA₂R1 ρυθμίζει τις λειτουργίες τους [94]. Η δράση των PLA₂ και η θέση τους σε θηλαστικά και μη φαίνεται στη παρακάτω εικόνα [96].



Εικόνα 8. Δράση των PLA₂ και κατανομή τυπικών και μη τυπικών PLA₂. Από: Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. Annu. Rev. Biochem. 2008;77:495–520. [96]

4.3 Συμβατικές εκκρινόμενες PLA2

4.3.1 sPLA2-IB

Παράγεται ως ζυμογόνο στο πάγκρεας και διασπάται με θρυψίνη για να δώσει ενεργό ένζυμο στο έντερο. Εμπλέκεται στην πέψη των χολικών φωσφολιπιδίων στο έντερο. Η αναστολή του διευκολύνει την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και την αθηροσκλήρωση [94,97,98]. Έχει αντιπαρασιτικό και ανθελμινθικό ρόλο στο έντερο. Φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση των CD4+ T κυττάρων σε ασθενείς με ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) όπου επάγει CD4 + T αναιμία [99, 100].

4.3.2 sPLA2-IIID

Το sPLA2-IIID εκφράζεται σε δενδρικά κύτταρα. Μειώνει την άμυνα με την υδρόλυση της PE για την κινητοποίηση αντιφλεγμονωδών ω3-PUFA και των μεταβολιτών τους. Δρα ανοσοκατασταλτικά στις Th1, Th2 και Th17 κυτταρικές αντιδράσεις [101,102]. Ποντίκια γυμνά από Pla2g2d παρουσιάζουν αυξημένες αντιστάσεις έναντι του SARS-CoV, μειωμένη πνευμονική βλάβη και αυξημένη επιβίωση. Η αναστολή του θα μπορούσε να είναι θεραπευτική για την αποκατάσταση της ανοσοποιητικής λειτουργίας στους πνεύμονες ηλικιωμένων ασθενών με αναπνευστικές λοιμώξεις [103].

4.3.3 sPLA2-IIIE και sPLA2-IIIF

Το sPLA2-IIIE δύσκολα ανιχνεύεται σε ανθρώπινους ιστούς. Υδρολύει την PE χωρίς εμφανή επιλεκτικότητα λιπαρών οξέων σε λιποπρωτεΐνες. Το sPLA2-IIIF είναι ένα sPLA2 της επιδερμίδας. Ενεργοποιείται από κυτοκίνες IL-17A και IL-22 σε ψωριασικό δέρμα. Προάγει την επιδερμική υπερπλασία [94].

4.3.4. sPLA2-V

Η υπερέκφραση οδηγεί σε νεογνικό θάνατο λόγω υδρόλυσης του διπαλμιτοΐλ-PC του επιφανειοδραστικού του πνεύμονα [104]. Παράγεται στα λιποκύτταρα στη παχυσαρκία ως μεταβολικό sPLA2 και υδρολύει την PC των LDL [105]. Η καταστολή του

διαταράσσει τη λειτουργία των μακροφάγων M2 μειώνοντας τους την ικανότητα απελευθέρωσης φαγωμένων υλικών [106]. Είναι ένα sPLA2 του ενδοθηλίου που προστατεύει από τον διαχωρισμό της αορτής ενεργοποιώντας αγγειοπροστατευτικά λιπαρά οξέα [94].

4.3.5. sPLA2-X

Το sPLA2-X έχει την υψηλότερη δραστηριότητα στην PC. Βρίσκεται σε αφθονία στους όρχεις και στο γαστρεντερικό σωλήνα τουλάχιστον σε ποντίκια. Εκκρίνεται από τα ακροσώματα των σπερματοζωαρίων και υδρολύει τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του σπέρματος. Μαζί με το sPLA2-III του επιδιδυμικού επιθηλίου είναι οι αναπαραγωγικές φωσφολιπάσες στον άνδρα [107]. Ανευρίσκεται επίσης στο παχύ έντερο όπου κινητοποιεί τα αντιφλεγμονώδη ω3-PUFAs [108].

Το sPLA2-X εκφράζεται στους αεραγωγούς και αυξάνεται σε ασθενείς με άσθμα. Η μείωσή του οδηγεί σε μείωση συσσώρευσης ηωσινοφίλων και T κυττάρων, μείωση κυτοκινών και σύνθεσης λευκοτριενίων [109].

4.3.6 Υποοικογένεια PLA2G12/sPLA2-XII

Η άτυπη υποοικογένεια της ομάδας XII περιέχει δύο ισομορφές, sPLA2-XIIA και -XII B. Το sPLA2-XIIA είναι βακτηριοκτόνο για Gram - αρνητικά βακτήρια. Το sPLA2-XII B εκφράζεται στο ήπαρ ενώ η καταστολή του συνδέεται με στεατοηπατίτιδα [110].

4.3.7 Υποδοχέας PLA2R1/sPLA2

Το PLA2R1 (Clec13c) είναι λεκτίνη τύπου C. Είναι πρωτεΐνη μεμβράνης με μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή και μικρή κυτταροπλασματική. Γίνεται διαλυτή πρωτεΐνη μέσω συνένωσης ή απελευθέρωσης από τον δεσμευμένο υποδοχέα. Λειτουργεί ως απενεργοποιητής των sPLA2 ή ως υποδοχέας σηματοδότησης. Η αναστολή του σχετίζεται με μικρότερη φλεγμονή έναντι του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Εκφράζεται στα νεφρικά ποδοκύτταρα και είναι το κύριο αυτοαντιγόνο στη μεμβρανώδη νεφροπάθεια [110].

4.3.8. Η οικογένεια cPLA2

Οι κυτταροπλασματικές PLA2 (cPLA2) περιλαμβάνουν 6 ισομορφές (α-ζ). Ομοιάζουν με τις iPLA2. Η καταλυτική τους θέση χρησιμοποιεί μια καταλυτική δυάδα Ser/Asp. Σχετίζονται με το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή PGE. Εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη στεάτωση, στον καρκίνο και στο μεταβολισμό και στη σύνθεση των ενδοκαναβινοειδών [94].

4.3.9. Η οικογένεια iPLA2

Είναι γνωστές ως λιπάσες. Περιέχουν την περιοχή της φωσφολιπάσης τύπου πατατίνης (PNPLA1-9). Έχουν έναν τομέα πατατίνης, ο οποίος αρχικά ανακαλύφθηκε στην πατατίνη (iPLA2α), μια πρωτεΐνη πατάτας. Διακρίνονται σε 9 ένζυμα PLA2 (iPLA2) ανεξάρτητα από το Ca²⁺ [111]. Οι ισομορφές iPLA2/PNPLA είναι λιπιδικές υδρολάσες ή τρανσακυλάσες/ακυλοτρανσφεράσες με δράση σε διάφορα λιπίδια όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια κ.α. Η N-τερματική περιοχή προσδίδει την ειδικότητα της κάθε iPLA2. Η απουσία της στις PNPLA1-5 προσδίδει τη δράση σε ουδέτερα λιπίδια ως λιπάσες ή τρανσακυλάσες ενώ η παρουσία της στις PNPLA6-9 προσδίδει τη δράση σε φωσφολιπίδια.

Εμπλέκονται σε μια ευρεία παθολογία. Ενδεικτικά, η iPLAβ φαίνεται να σχετίζεται με νευροκφυλιστικές νόσους (N. Πάρκινσον), με παχυσαρκία και στεάτωση και η iPLAγ με μυϊκή ατροφία και παχυσαρκία. Στην ιχθίωση ανευρίσκονται αλλοιώσεις της PNPLA1. Λιπώδης εκφύλιση του καρδιακού ιστού και στεάτωση φαίνεται να σχετίζονται με γενετικές αλλοιώσεις της PNPLA 2/3 [94].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ PLA2-IIA

5.1 Γενικά

Οι εκκρινόμενες sPLA2 ανακαλύφθηκαν σε δηλητήριο φιδιών. Ανάλογα με το είδος των δισουλφιδικών δεσμών χαρακτηρίστηκαν σαν Τύπος I (από κόμπρες) και Τύπος II (από κροταλίες) [112]. Στα θηλαστικά, ο πρώτος υποτύπος IB απομονώθηκε στο χοίρο. Ένα άλλο sPLA2 βρέθηκε αργότερα στα αρθρικά υγρά και χαρακτηρίστηκε ως υποτύπος IIA (Τύπου II) γνωστό πλέον σαν sPLA2-IIA (hGIIA ή PLA2G2A) ή ως ανθρώπινο μη παγκρεατικό PLA2 [95]. Οι τύποι I και II sPLA2s διαφέρουν βασικά σε ένα δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα σε Cys 11 και Cys 77 στην ομάδα I και Cys 50 έως Cys 133 στην ομάδα II. Επιπλέον διαφέρουν για μια εισαγωγή βάσης της έλικας της ενεργού θέσης για την ομάδα I σε σχέση με μια C-τελική εισαγωγή για την ομάδα II [113].

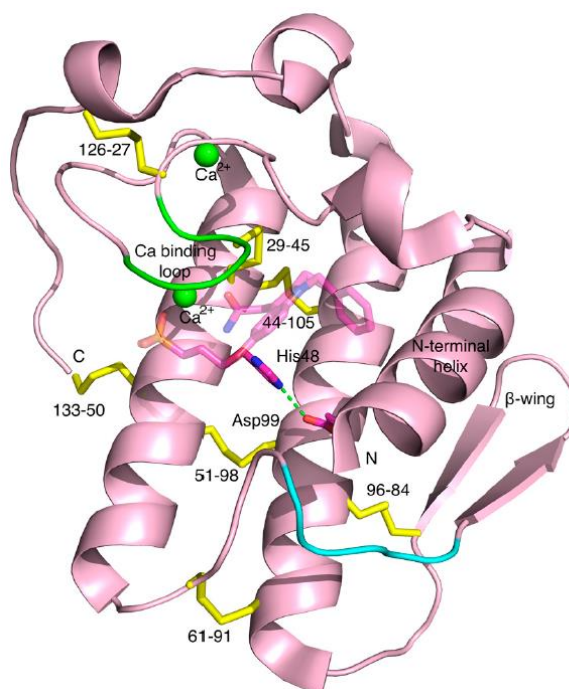
5.2 Καταλυτικός μηχανισμός

Φέρει μία καταλυτική δυάδα που χρησιμοποιείται για την υδρόλυση υποστρώματος. Πρόκειται για μια ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Το ένα είναι βασικό και το άλλο όξινο επιτυγχάνοντας μια ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του ατόμου δ του οξυγόνου του καρβοξυλίου του ασπαρτικού και του ε ατόμου του αζώτου του δακτυλίου ιστιδίνης (Εικόνα 9). Λειτουργούν σαν υδρολάσες σερίνης (ένα βασικό και ένα όξινο αμινοξύ), αλλά δεν έχουν σερίνη στο κέντρο για την υδρόλυση.

Το μοντέλο της τριάδας είναι ο καταλυτικός μηχανισμός της sPLA2-IIA. Το μόριο του νερού δεσμεύεται στο N της ιστιδίνης για να δράσει ως πυρηνόφιλο, στη θέση της σερίνης των υδρολάσεων της σερίνης. Δύο ασβέστια επίσης συμμετέχουν σε αυτόν τον μηχανισμό [95,114].

Για να γίνει η υδρόλυση, το ένζυμο συνδέεται με το φωσφολιπιδικό υπόστρωμα στα αρχικά στάδια της υδρόλυσης. Το ένζυμο είτε υδρολύει μόνο ένα μόνο μόριο του υποστρώματος και στη συνέχεια αφήνει την επιφάνεια πριν βρει το επόμενο μόριο

υποστρώματος προς υδρόλυση, είτε κάνει πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης χωρίς να αποδεσμευτεί [95,115].



Εικόνα 9. Τρισδιάστατη δομή της hGIIA. Από: Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules*. 2020 Oct 19;10(10):1457 [94]

Τα τμήματα των sPLA2 που συνδέονται με την επιφάνεια του φωσφολιπιδικού υποστρώματος σχηματίζουν μια επιφάνεια που ονομάζεται επιφάνεια δέσμευσης (i-face). Εκεί υπάρχουν αμινοξέα που σχηματίζουν την είσοδο στην ενεργό θέση αλληλοεπιδρούν με το υπόστρωμα ή τους αναστολείς [115].

5.3 Ειδικότητα υποστρώματος της sPLA2-IIA

Η δράση της sPLA2-IIA στην φωσφατιδύλχολίνη (PC) είναι πολύ χαμηλή αλλά υψηλή για το φωσφατιδικό οξύ (PA), τη φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) [95].

5.4 Ο καταρράκτης του αραχιδονικού οξέος

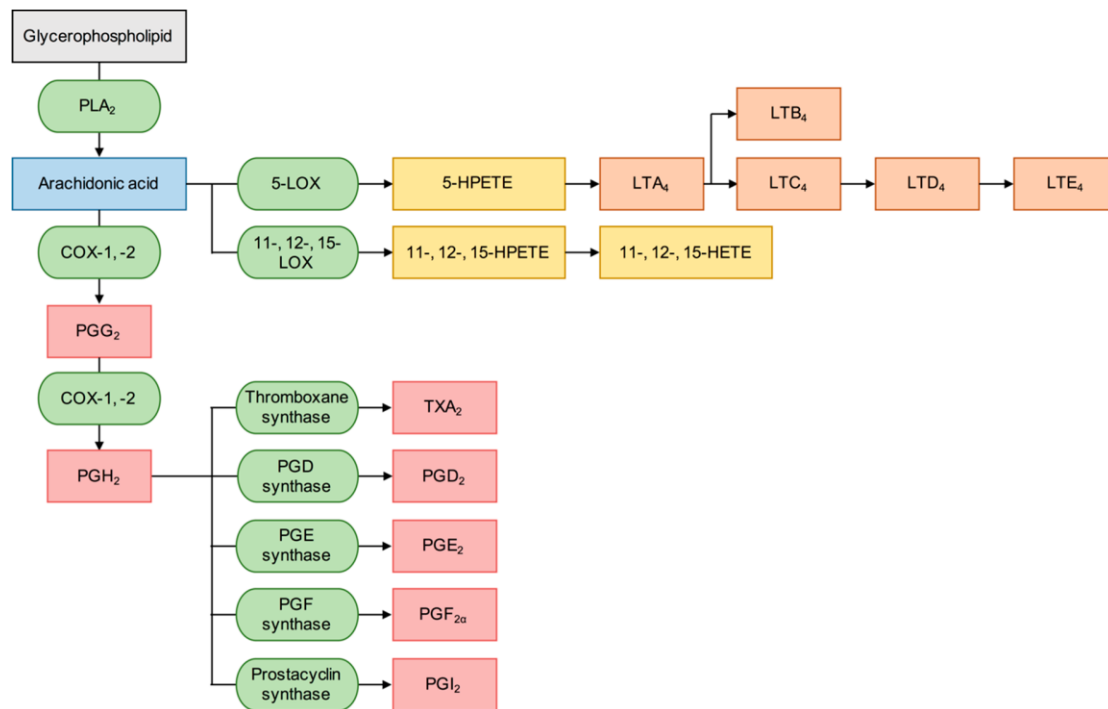
Η υδρόλυση στη θέση sn-2 των γλυκεροφωσφολιπιδίων μέσω sPLA2 παράγει λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια. Τα λυσοφωσφολιπίδια δίνουν τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Το αραχιδονικό οξύ (AA) παράγεται από αυτή τη διαδικασία. Το AA μέσω οξειδωσης μετατρέπεται σε εικοσανοειδή μέσω ενζύμων όπως η κυκλοοξυγενάση (COX) και η λιποξυγενάση (LOX). Από την COX παράγονται προστανοειδή, προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες ενώ από τη LOX υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα (HPETEs) και λευκοτριένια (Σχήμα 1).

Τα ένζυμα COX συμμετέχουν στον πόνο και στη φλεγμονή. Η COX-1 παράγει θρομβοξάνη A₂ (TXA₂) στα αιμοπετάλια. Η COX-2 επάγεται από κυτοκίνες. Ο παράγοντας 5-LOX εμπλέκεται ιδιαίτερα σε φλεγμονώδεις διαταραχές, δίνοντας λευκοτριένια και μεσολαβητές σηματοδότησης λιπιδίων στη φλεγμονή κυρίως του αναπνευστικού [95].

Η sPLA2-IIA υδρολύει τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και δίνει AA και μιτοχονδριακό DNA που αναγνωρίζεται ως μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με βλάβη (DAMP). Και τα δύο συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις οδούς [116]. Υπάρχει διασταυρούμενη σηματοδότηση μεταξύ PLA2 και LOX που ρυθμίζει την έκκριση της sPLA2-IIA μέσω 12-LOX, 15-LOX και cPLA2-α σε ινοβλάστες [117].

Η sPLA2-IIA που εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο έχει πρόσβαση μόνο στο πολύ εξωτερικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από PC και με χαμηλή ειδικότητα υποστρώματος. Άρα είναι δύσκολο η sPLA2-IIA να δρα τόσο έντονα σε αυτή την εξωτερική στοιβάδα. Πιθανά υδρολύει κυστίδια πλούσια σε PC απελευθερώνοντας έτσι AA στον εξωκυτταρικό χώρο [118]. Τονίζεται ότι το cPLA2-α είναι ο βασικός παράγοντας παραγωγής AA [117].

Η sPLA2-IIA έχει επομένως έμμεσο ρόλο στην απελευθέρωση AA. Καθώς η sPLA2-IIA δεν είναι σε θέση να απελευθερώσει αποτελεσματικά AA εντός ή εκτός του κυττάρου, μπορεί να διεγείρει ίσως την απελευθέρωση AA μέσω ενός καταλυτικά ανεξάρτητου μηχανισμού [119, 120].



Σχήμα 1. Ο καταρράκτης του αραχιδονικού οξέος. Από: Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules*. 2020 Oct 19;10(10):1457 [94]

5.5 Μη καταλυτική δράση της sPLA2-IIA

Η sPLA2-IIA μπορεί να δράσει με μη καταλυτικούς μηχανισμούς. Ορισμένες μεταλλάξεις στην ενεργή θέση της ιστιδίνης αλλάζουν την δράση της πρωτεΐνης, ελαχιστοποιώντας την καταλυτική δραστηριότητα αλλά διατηρούν την δομή της [121]. Πειραματικά, η εξωγενής προσθήκη μεταλλαγμένης sPLA2-IIA προάγει την παραγωγή PGE2 μέσω της οδού ERK MAPK και αυξάνει την COX-2 και την ενεργοποίηση ERK1/2 σε μονοκύτταρα [122, 123, 124].

Το sPLA2-IIA ρυθμίζει την ενεργοποίηση του cPLA2-α, ενώ το cPLA2-α εμπλέκεται άμεσα στην απελευθέρωση του AA [125]. Αν και το cPLA2-α είναι το ένζυμο που είναι τελικά υπεύθυνο για την απελευθέρωση του AA, το sPLA2-IIA αποτελεί βασικό συμμετέχο σε αυτή τη δράση. Θα μπορούσε να είναι θεραπευτικός στόχος για την ελαχιστοποίηση της παραγωγής εικοσανοειδών λόγω της αύξησης του σε παθολογικές καταστάσεις [126,127].

5.6 Υποδοχείς της sPLA2-IIA

Εκτός της κατάλυσης, η συμμετοχή σε άλλα μονοπάτια σηματοδότησης απαιτούν υποδοχείς. Η sPLA2-IIA πρέπει επομένως να αλληλοεπιδράσει με άλλα μόρια για να επιτύχει μια τέτοια σύνδεση και μεταφορά.

5.6.1 Υποδοχέας φωσφολιπάσης A2 τύπου M

Οι υποδοχείς φωσφολιπάσης A2 τύπου M (PLA2Rs) είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I που βρίσκονται κυρίως εξωκυτταρικά. Η κυτταροπλασματική περιοχή έχει ένα μοτίβο ενδοκυττάρωσης το οποίο ίσως βοηθά στην εσωτερίκευση του συμπλέγματος. Μπορεί να λειτουργεί ως ενδογενής αναστολέας του sPLA2 όταν βρίσκεται σε διαλυτή μορφή στην κυκλοφορία. [95].

5.6.2 Πρωτεογλυκάνες Θεϊκής ηπαρίνης

Οι πρωτεογλυκάνες θεϊκής ηπαρίνης (HSPGs) είναι γλυκοπρωτεΐνες επιφάνειας και ευνοούν την ενδοκυττάρωση, την κυτταρική προσκόλληση και τη σηματοδότηση [95]. Η εξωκυτταρική προσθήκη ηπαρίνης ή θεϊκής λυάσης ηπαρίνης εμποδίζει την sPLA2-IIA στο να παράγει PGE2 [128]. Γενικά, η εσωτερίκευση της γίνεται κυρίως μέσω κυστιδίων από την cPLA2-α, παρά από την sPLA2-IIA μόνο [95,129].

5.6.3 Ιντεγκρίνες

Είναι υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης και διαθέτουν μια εξωκυτταρική περιοχή κεφαλής [95]. Η sPLA2-IIA δεσμεύεται στην ιντεγκρίνη ανβ3 και α4β1 μεταφέροντας σήματα μέσω της οδού ERK1/2 [124].

5.6.4 Βιμεντίνη

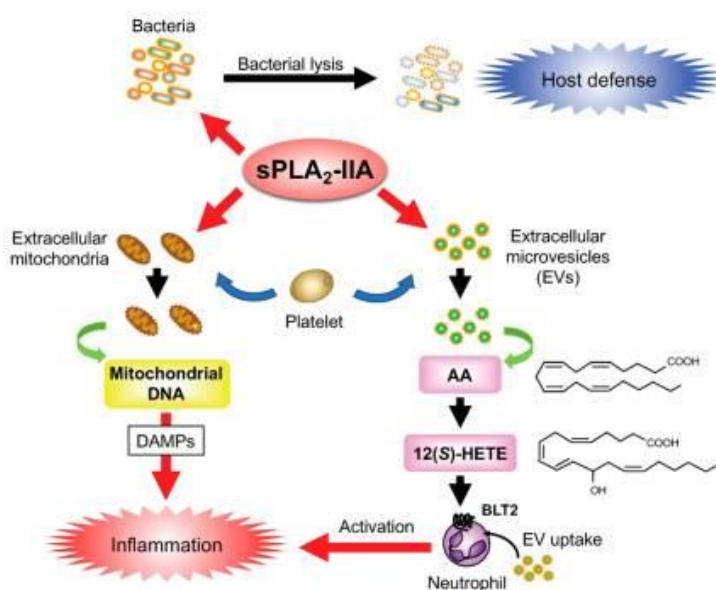
Η βιμεντίνη εκφράζεται κυρίως στα μεσεγχοματικά κύτταρα και διατηρεί τον κυτταροσκελετό αλληλοεπιδρώντας με μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια. Το δίκτυο βιμεντίνης εκτείνεται προς τα έξω και συνεχώς αναδιαμορφώνεται [95]. Δίνει σήματα στον ενδοκυτταρικό χώρο μέσω της οδού MAPK ERK1/2 και συμμετέχει στη κυτταρική μετανάστευση και την ενδοκυτταρική μεταφορά λιπιδίων [130].

Η χρήση αναστολέων της αλληλεπίδρασης μεταξύ sPLA2-IIA και βιμεντίνης μειώνει την παραγωγή PGE2 που εξαρτάται όμως περισσότερο από το cPLA2-α [122]. Η βιμεντίνη ίσως οδηγεί την εσωτερικευμένη sPLA2-IIA στο να ενεργοποιήσει το

sPLA2-α στον ενδοκυτταρικό χώρο για παραγωγή AA. Η βιμεντίνη συμμετέχει στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), το επίπεδο έκφρασής της συνδέεται στενά με το ρυθμό ανάπτυξης όγκων, τη διεισδυτικότητα και την κακή πρόγνωση. Η διακοπή αυτής της δράσης με την sPLA2-ΠA μπορεί να είναι θεραπευτική [131].

5.7 Ρόλος της sPLA2-ΠA

Ο κυρίαρχος ρόλος της sPLA2-ΠA είναι αντιβακτηριακός. Ελευθερώνεται από εκκριτικούς αδένες, κύτταρα Paneth στο έντερο, από κυστίδια μαστοκυττάρων ή αιμοπεταλίων (Εικόνα 10). Στον εξωκυτταρικό χώρο καταλύει τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, αποδομώντας έτσι τις βακτηριακές μεμβράνες. Είναι βακτηριοκτόνος έναντι της *E.coli* καθώς και των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*S.aureus*, *L.monocytogenes*) υδρολύοντας PE και PG που αφθονούν στις βακτηριακές μεμβράνες [95, 132].

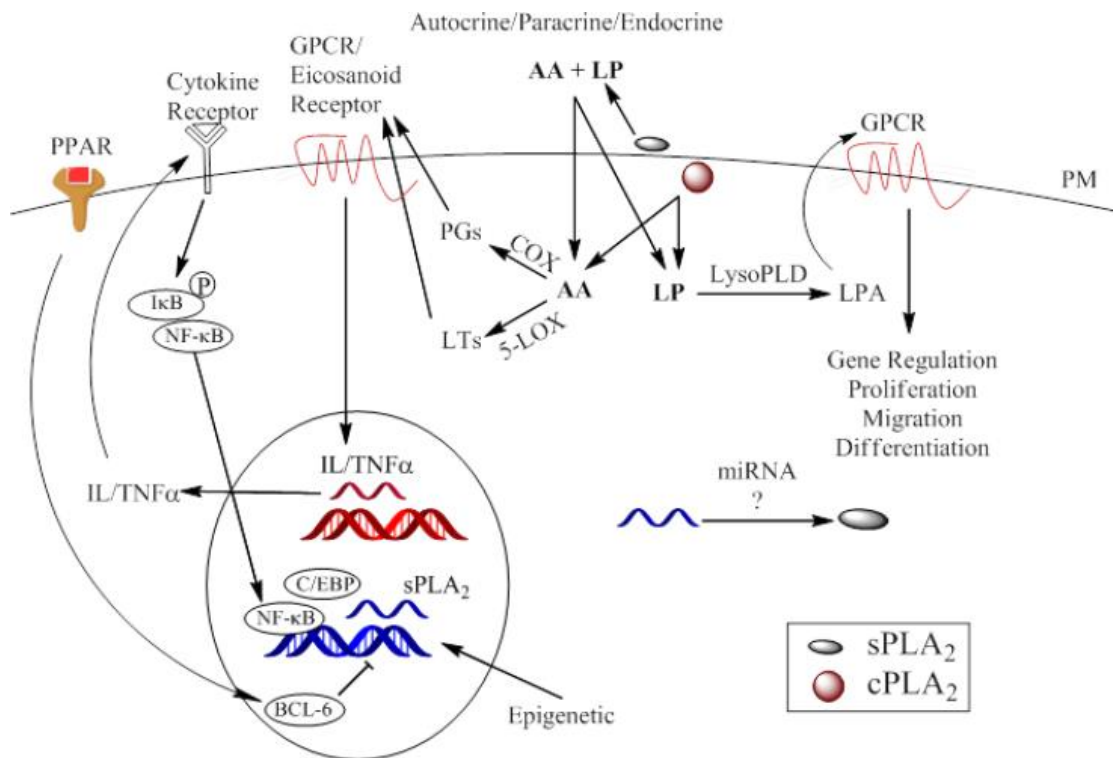


Εικόνα 10. Αντιβακτηριδιακή δράση του sPLA2-ΠA. Από: Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules*. 2020 Oct 19;10(10):1457 (94)

5.8 Παθολογικός Ρόλος της sPLA2-IIA

5.8.1 Φλεγμονή

Φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) αυξάνουν την έκκριση του ενζύμου [133]. Στην αρθρίτιδα είναι άφθονη στα αρθρικά υγρά [134]. Αυξημένα επίπεδα sPLA2-IIA αναγνωρίζονται σε καταστάσεις σήψης ενώ το επίπεδο της στο πλάσμα σχετίζεται αρνητικά με την επιβίωση [135]. Το επίπεδό της στο βρογχοκυψελιδικό υγρό είναι υψηλό σε ασθενείς με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και συνδέεται με την σοβαρότητα της νόσου [136,137].



Εικόνα 11. Μονοπάτια ρύθμισης της έκφρασης sPLA2. Από: Quach ND, Arnold RD, Cummings BS. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol.* 2014 Aug 15;90(4):338-48 [138]

Στη φλεγμονή η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων των εξωκυττάρων κυστίδιων από το sPLA2-IIA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεσολαβητών και DAMPs (Εικόνα 10) που συμβάλλουν στην ενίσχυση της φλεγμονής [94]. Η μεγάλη όμως απόκριση καθιστά τη φλεγμονή μεγαλύτερη δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο. Πολλοί επιπλέον παράγοντες αλλά και παράγωγα της δράσης των sPLA2, ιδιαίτερα δε της sPLA2-IIA, φαίνεται να συμμετέχουν στη μεταφορά σημάτων και στον έλεγχο της έκκρισης σε μεταγραφικό επίπεδο όπως φαίνεται στη Εικόνα 11 [138].

Η sPLA2-IIA έχει και ανθελονοσιακές ιδιότητες. Αν και σχεδόν δεν δρα σε φυσιολογικές λιποπρωτεΐνες, υδρολύει αλλοιωμένες λιποπρωτεΐνες προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης του *Plasmodium* [139].

5.8.2 sPLA2-IIA και νόσοι των αγγείων

Η αθηροσκλήρωση σχετίζεται με την sPLA2-IIA. Η sPLA2-IIA εκφράζεται στην αθηρωματική πλάκα ενώ υδρολύει και οξειδωμένες LDL [140]. Το επίπεδα ορού της sPLA2-IIA αυξάνονται απότομα κατά τις πρώτες ημέρες μετά το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου ενώ η παρουσία της στο πλάσμα σχετίζεται με την πιθανότητα υποτροπής του εμφράγματος και την σοβαρότητα της νόσου. Θα μπορούσε να είναι θεραπευτικός στόχος [95,141].

5.8.3 Καρκίνος

Ο ρόλος της sPLA2-IIA στον καρκίνο δεν είναι ξεκάθαρος. Διαφορετική έκφραση sPLA2-IIA βρίσκεται σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Αυτό πιθανά σχετίζεται με το τύπο των κυττάρων, τη θέση των όγκων, τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες ή διαφορετικούς υποδοχείς (βιμεντίνη, ιντεγγρίνη κ.α.) [138]. Αυξημένη sPLA2-IIA ορού υπάρχει σε νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου και σε αιματολογικούς όγκους (μυέλωμα, λέμφωμα non Hodgkin κ.α.) [142,143]. Στον καρκίνο του προστάτη το επίπεδο έκφρασης της sPLA2-IIA συσχετίστηκε με υψηλότερο βαθμό ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας [144]. Στον καρκίνο του στομάχου, η έκφρασή της σχετίζεται με καλή επιβίωση και λιγότερο συχνές μεταστάσεις [145].

Ο Πίνακας 1, προσαρμοσμένος από τους Brglez et al 2014 [145], περιγράφει τη συσχέτιση της sPLA2-IIA με την επιβίωση των ασθενών σε ορισμένα από τα πιο κοινά νεοπλάσματα στα οποία εμπλέκεται.

Η sPLA2-IIA εκκρίνεται ενεργά στο καρκίνο του προστάτη και η συγκέντρωσή της σε ιστό και σε σπερματικό πλάσμα είναι αυξημένη. Αυξάνεται με τη πρόοδο της νόσου αλλά και το Gleason score [95]. Γενικά, η συνολική δραστηριότητα της είναι διπλάσια στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα φυσιολογικά και συνοδεύεται από μεγάλη αύξηση των καρκινογόνων PGE2 [146].

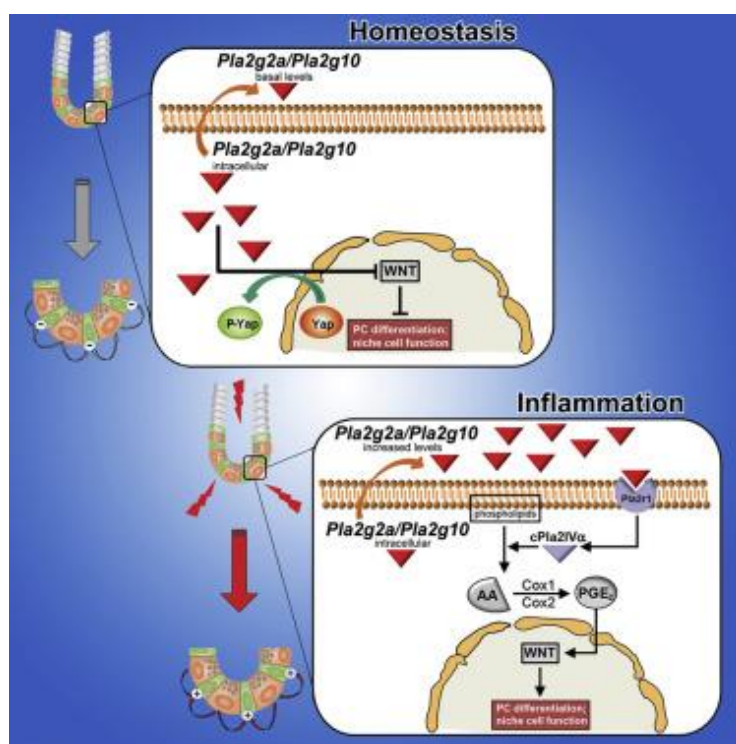
Νεόπλασμα	Ρόλος	Αποτέλεσμα in vitro	Επιβίωση ασθενών
Μαστός	Προ-καρκινογόνος	-	Μικρότερη
Παχύ έντερο	Προ/αντί-καρκινογόνος	Αύξηση πολλαπλασιασμού	-
Στόμαχος	Αντί-καρκινογόνος	Μείωση μετανάστευσης-διεισδυτικότητας	Μακρύτερη-μείωση μεταστάσεων
Πνεύμονας	Προ-καρκινογόνος	Αύξηση πολλαπλασιασμού-μείωση απόπτωσης	Μικρότερη
Οισοφάγος	Προ-καρκινογόνος	Αύξηση πολλαπλασιασμού	-
Προστάτης	Προ-καρκινογόνος	Αύξηση πολλαπλασιασμού	Μικρότερη

Πίνακας 1

Τα μονοπάτια EGFR/HER2-PI3K-Akt και NF-κB εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου sPLA2-IIA. Αναστολείς αυτών των μονοπατιών, όπως το Lapatinib και το Bortezomib, μειώνουν την έκφρασή της σε μεταγραφικό επίπεδο [126,147]. Στο καρκίνο του οισοφάγου, η αναστολή της sPLA2-IIA μειώνει την έκφραση EGFR και HER2 και καθυστερεί την ανάπτυξη του όγκου [148]. Στο καρκίνο του πνεύμονα υπερεκφράζεται, ενώ υψηλή συγκέντρωση ανευρίσκεται και στο πλάσμα και σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και μικρή ολική επιβίωση. Στο πνεύμονα φαίνεται ότι η υψηλή έκφραση HER/HER2-PI3K-akt-NF-κB ευνοεί την υπερέκφραση της sPLA2-IIA που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τα HER [149].

Το sPLA2-IIA είναι τροποποιητής της ογκογένεσης του εντέρου του ποντικού [94]. Επειδή εκφράζεται από κύτταρα Paneth στο λεπτό έντερο δρα κατασταλτικά αφού

αναστέλλει τη σηματοδότηση Wnt μέσω μιας ενδοκυτταρικής ενεργοποίησης του Yap1. Κατά τη φλεγμονή, εκκρίνεται στον εντερικό αυλό, όπου προάγει τη φλεγμονή μέσω της σύνθεσης προσταγλανδίνης PGE2 μέσω της οδού PLA2R1-cPLA2α και της σηματοδότησης Wnt. Η υπέρκφραση sPLA2-ΠΑ φαίνεται όμως να καθυστερεί την επιδιόρθωση του βλεννογόνου από τη φλεγμονή αλλά μειώνει την πιθανότητα για ΚΠΕ (Εικόνα 12). Έτσι η sPLA2-ΠΑ δρα ως γενετικός τροποποιητής φλεγμονής και καρκίνου του παχέος εντέρου αντισταθμίζοντας τη δράση του cPLA2α και της PGE2 που συμβάλλουν στη μείωση της κολίτιδας αλλά ευνοούν τον ΚΠΕ [94,150].



Εικόνα 12. Ρόλος του sPLA2ΠΑ στην κολίτιδα και την καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Από: Schewe M et al.. Secreted Phospholipases A2 Are Intestinal Stem Cell Niche Factors with Distinct Roles in Homeostasis, Inflammation, and Cancer. Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):38-51 [150]

Γενικά υψηλές συγκεντρώσεις ανευρίσκονται σε προχωρημένους καρκίνους στο ορό αλλά και σε ιστικό επίπεδο. Η υψηλή έκφραση σχετίζεται με λεμφαδενικές μεταστάσεις και μεγαλύτερη περίοδο ελεύθερης νόσου στο καρκίνο του μαστού. Στο γαστρικό καρκίνο τα επίπεδα mRNA είναι αυξημένα και σε αντίθεση με άλλα

νεοπλάσματα αυτό παραδόξως σχετίζεται με αύξηση της 5ετούς επιβίωσης των ασθενών [151].

Στον ΚΠΕ αναγνωρίστηκε υψηλή έκφραση sPLA2IIA πέριξ των όγκων και μικρή στο κέντρο του. Η αρνητική έκφραση σχετίζεται με 10ετή επιβίωση και με το Στάδιο II. Η έκφραση φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε ΚΠΕ αριστερού κόλου και λιγότερο δεξιά υποδεικνύοντας σημαντική ετερογένεια του έκφρασης με βάση τη θέση [151]. Γενικά στο καρκίνο του παχέος εντέρου τα αποτελέσματα είναι πολλές φορές αντικρουόμενα. Από τη μία φαίνεται ότι η δράση της sPLA2IIA εξαρτάται από το υπόστρωμα στο να καθυστερήσει την ανάπτυξη του όγκου και από την άλλη στον καρκίνο του ορθού φαίνεται να σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο, εμπλοκή λεμφαδένων και χαμηλότερη απόκριση στη θεραπεία. Φάνηκε να είναι κακός προγνωστικός παράγοντας στη ολική επιβίωση και στη περίοδο ελεύθερης νόσου [[152,153].

Η sPLA2-IIA είναι βασικός παράγοντας στη διαμόρφωση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος του όγκου επηρεάζοντας έμμεσα την εξωκυττάρια ουσία, ευνοώντας την ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs), πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Η πρωτεΐνη Αννεξίνη A1 (AnxA1) για παράδειγμα δεσμεύει τα φωσφολιπίδια και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και τύπους κυττάρων. Από τη μία η AnxA1 έχει αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες και αναστέλλει το sPLA2-IIA στο κυτταρόπλασμα [112]. Από την άλλη όμως προάγει την απελευθέρωση εξωσωμάτων εμπλουτισμένων με sPLA2-IIA από καρκινικά κύτταρα οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα PGE2 και έμμεσα στην αύξηση της φλεγμονώδους απόκρισης και ανοσοκαταστολής στο καρκινικό μικροπεριβάλλον εμποδίζοντας κυρίως τα αντικαρκινικά κύτταρα Τα [154].

5.9 Αναστολείς της sPLA2-IIA

Η ανάπτυξη αναστολέων του sPLA2 ξεκίνησε με τη σύνθεση αναλόγων των φωσφολιπιδικών υποστρωμάτων. Ο πρώτος αναστολέας των LOX και PGE2 ήταν το BMS-181162 με πολύ μικρή δραστηριότητα [138].

5.9.1 Αναστολείς κατάλυσης

Το p-Bromophenacyl bromide (BPB) είναι ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας της sPLA2-IIA. Το BPB αναστέλλει την κατάλυση αλλά όχι την ικανότητα μετάδοσης σημάτων [95].

5.9.2 Μη εκλεκτικοί αναστολείς

Δύο αναστολείς έχουν δοκιμαστεί ευρέως. Ο πρώτος, ο KH064 είναι ένας αναστολέας που αναπτύχθηκε ως παράγωγο D-τυροσίνης ενώ ο δεύτερος ο LY311727 είναι ένα σύμπλοκο sPLA2-IIA [138,155].

Ο πιο πολλά υποσχόμενος αναστολέας είναι το varespladib (A-001 ή S-5920) [95,138]. Δεν ξεπέρασε όμως τη φάση II κλινικών δοκιμών για τη σήψη και ούτε τη φάση III για την αθηροσκλήρωση λόγω καρδιαγγειακών παρενεργειών [95,138].

5.9.3 Εκλεκτικοί αναστολείς του μη καταλυτικού μηχανισμού

Το πενταπεπτίδιο FLSYK είναι ένα προϊόν διάσπασης της sPLA2-IIA. Αναστέλλει επιλεκτικά τον ανεξάρτητο από την κατάλυση μηχανισμό της sPLA2-IIA παραγωγής PGE2 [95].

5.9.4 Χρήση αναστολέων sPLA-IIA στον καρκίνο

Οι αναστολείς PLA2 είναι ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές θεραπευτικές στρατηγικές μέσω της αναστολής παραγωγής PGE2. Η τελευταία ενισχύει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης κυρίως στο καρκινικό μικροπεριβάλλον όπως το intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) που με τη σειρά του ενεργοποιεί τη STAT-3. Η αναστολή του sPLA στον πνεύμονα και τον οισοφάγο, τουλάχιστον πειραματικά φαίνεται πολλά υποσχόμενη [154].

Το αντιφλεγμονώδες Varespladib (LY315920) και η από του στόματος μορφή του methyl-varespladib (LY333013) είναι υποσχόμενοι αναστολείς PLA2-IIA. Το παρόμοιο S3319 στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μειώνει τα επίπεδα έκφρασης

του ICAM-1 και μειώνει την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων [154,156]. Τα πειραματικά cFLSYR και c(2Nap)LS(2Nap)R φάνηκαν αποτελεσματικά στην μείωση του πολλαπλασιασμού κυττάρων καρκίνου του προστάτη [154]. Η οχναφλαβόνη, ένας φυσικός αναστολέας του sPLA2-ΠΑ θα μπορούσε να είναι θεραπευτική επιλογή στις φλεγμονές και στον καρκίνο [157].

Ο παράγοντας γCdcPLI παράγεται από τον κροταλία και φαίνεται να εμποδίζει τις μεταστάσεις και την νεοαγγειογένεση των όγκων. Επιδρά σε μεσολαβητές της απόπτωσης και ελαττώνει την παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) [158]. Το μασλινικό οξύ και η σουλφοραφάνη δίνουν διαφορετικά αντικαρκινικά αποτελέσματα σε όγκους στο πάγκρεας, στους πνεύμονες και στο γαστρεντερικό [154].

Η AnxA1 είναι ένας ενδογενής αναστολέας PLA2 όταν βρίσκεται στην ακέραια μορφή της. Η διάσπασή της από πρωτεάσες (καθεψίνη D) μειώνει την ανασταλτική δράση στο PLA2. Αναστολείς της καθεψίνης D όπως η πεπστατίνη A, μειώνουν τη διάσπαση της AnxA1. Αυτό συνεπάγεται την επανέναρξη της αναστολής του PLA2-ΠΑ από την ακέραια AnxA1 με αύξηση της απόπτωσης και μείωση την εισβολής και της μετάστασης καρκινικών κυττάρων τουλάχιστον στο καρκίνο του μαστού [159].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Η ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ sPLA2-III

6.1 Γενικά

Το ανθρώπινο sPLA2-III (hGIII) αναγνωρίστηκε αρχικά από τον Lambeau το 2000. Είναι ένα άτυπο sPLA2 του οποίου η δομή είναι διαφορετική από τα συμβατικά sPLA2 της ομάδας I/II/V/X. Διαθέτει όμως μια καλά διατηρημένη καταλυτική θέση και ένα μοτίβο δέσμησης Ca²⁺ [160].

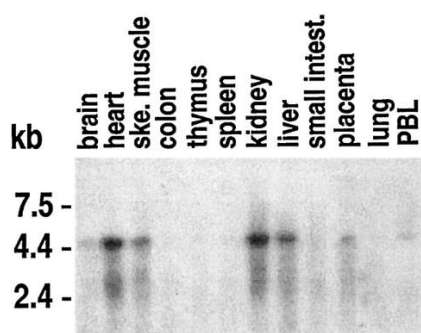
6.2 Δομή

Το ανθρώπινο sPLA2-III έχει 490 αμινοξέα. Έχει μια κεντρική περιοχή sPLA2 (141 υπολείμματα) που πλαισιώνεται από ιδιαίτερες N- και C-τερματικές περιοχές (130 και 219 υπολείμματα) που το διαφοροποιούν από άλλες sPLA. Η κωδικοποίηση γίνεται από το χρωμόσωμα 22q. Η κεντρική περιοχή sPLA2 είναι παρόμοια με το δηλητήριο της μέλισσας (κατά 31%) ενώ διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά των sPLA2 της ομάδας III, συμπεριλαμβανομένων 10 κυστεϊνών (Εικόνα 13). Σε αντίθεση με τα sPLA2-IB και -X, στα οποία το N-τερματικό προπεπτίδιο συμμετέχει στην κατάλυση, η παρουσία των N- και C-τερματικών δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του sPLA2-III [160]. Έχει ιδιαίτερη δομή σε σύγκριση με τα συμβατικά sPLA2 όπως για παράδειγμα ο μικρότερος όγκος του υδρόφοβου καναλιού που δεσμεύει το υπόστρωμα. Είναι ασβέστιο εξαρτώμενο ένζυμο με 11 φορές μεγαλύτερη θετικότητα για την PG σε σχέση με τη PC και ιδανικό pH δράσης 8. Ανευρίσκεται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα θηλαστικά [160,161].

6.3 Ιστική κατανομή

Η κατανομή του στους ιστούς μελετήθηκε με υβριδισμό με Northern blot (Εικόνα 14). Εκφράζεται ισχυρά στη καρδιά, στους νεφρούς, στο ήπαρ και στους μύες. Ελάχιστη έκφραση φάνηκε στο θύμο αδένα, στον εγκέφαλο, σπλήνα, λεπτό έντερο, στο κόλον και στον πνεύμονα.

Το sPLA2-III, έχει μοναδική δομή μεταξύ των sPLA2. Αυξάνει την PG σε διάφορα κύτταρα και ο τομέας S είναι αρκετός για αυτή τη λειτουργία. Το sPLA2-III είναι συχνά N-γλυκοζυλιωμένο.



Εικόνα 14. Ιστική κατανομή του hGIII. Από: Valentin E et al. Novel human secreted phospholipase A₂ with homology to the group III bee venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 2000;275:7492–7496. [160]

Στην ανθρώπινη παθολογία, το sPLA2-III εκφράζεται σε μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα καρκίνου. Ευνοεί την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και σχετίζεται με αυξημένη νεοαγγειογένεση [163]. Παράγει ισχυρά AA όπως το sPLA2-PIF και με ανώτερη ισχύ από αυτή του sPLA2-IIA [102]. Υδρολύει όλες τις κατηγορίες φωσφολιπιδίων συμπεριλαμβανομένων των PC, PE, PI και PG με προτίμηση τη θέση sn-2 των PUFAs [164]. Στα ποντίκια, έχει την υψηλότερη έκφραση στο κόλον, το δέρμα και τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα [102].

6.4 Ρόλος της sPLA2-III

6.4.1 Ρόλος στην αναπαραγωγή

Κατά τη διάρκεια της κίνησης των σπερματοζωαρίων από την επιδυδιμίδα, η μεμβρανική PC υπόκειται μια δραματική μετατόπιση στις ακυλικές ομάδες sn-2 από το ελαϊκό οξύ (OA) και το AA σε εικοσιδιεξανοϊκό οξύ (DHA) και εικοσιπεντανοϊκό οξύ (DPA). Η αυξημένη αναλογία DPA/DHA μεγαλώνει τη μεμβράνη του σπέρματος και τη ρευστότητα προωθώντας την ευελιξία των μαστιγίων και τη γονιμοποίηση των

ωαρίων [164]. Η υπογονιμότητα σε αρσενικά γυμνά ποντίκια Pla2g3 έχει αντίκτυπο κυρίως στον αριθμό των απογόνων [165].

Το sPLA2-III εκκρίνεται από το επιθήλιο της επιδιδυμίδας στον αυλό. Το sPLA2-III προκαλεί την αποακυλίωση της OA και της AA από φωσφολιπίδια σπέρματος. Η επαναακυλίωση με DHA και DPA από μια ορισμένη ακυλτρανσφεράση αυξάνει το DPA/DHA που είναι απαραίτητο για την ωριμότητα των κυττάρων [166].

Η έλλειψη sPLA2-X επίσης οδηγεί σε ανωμαλία της λειτουργίας του σπέρματος. Το sPLA2-X εκκρίνεται από το ακροσώμα του σπέρματος. Στα ποντίκια χωρίς PLA2-X η σπερματογένεση και η ωρίμανση σπέρματος γίνεται κανονικά, αλλά δυσλειτουργεί η ενεργοποίηση του σπέρματος και είναι μειωμένη η αντίδραση του ακροσωμίου [108]. Έτσι, το sPLA2-III προάγει την ωρίμανση του επιδιδυμικού σπέρματος ενώ το sPLA2-X δρα σε αυτά τα πλούσια σε DPA/DHA φωσφολιπίδια για να απελευθερώσει DPA και LPC για επιτυχημένη γονιμοποίηση [102,108].

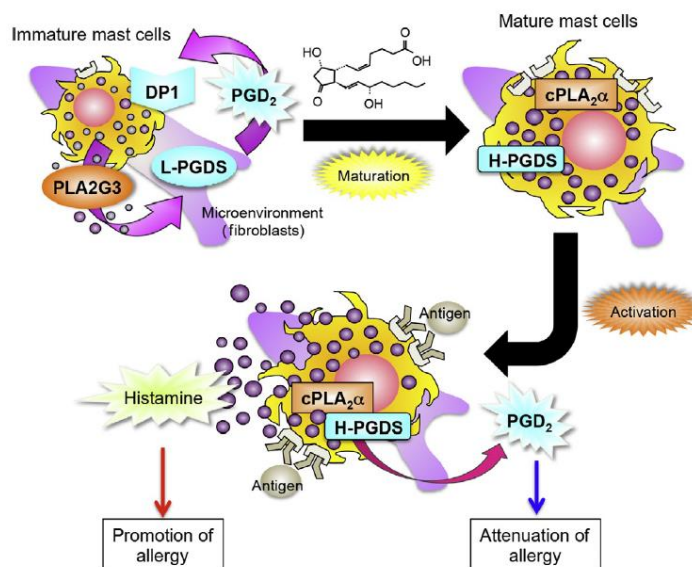
6.4.2. Η sPLA2-III στην αλλεργία και την αναφυλαξία

Λόγω της υψηλής ομολογίας ανάμεσα στο δηλητήριο της μέλισσας με το ανθρώπινο sPLA2-III, φαίνεται λογικός ο συσχετισμός της PLA2-III με τις αναφυλακτικές αντιδράσεις και την δράση των μαστοκυττάρων [160]. Πράγματι, το εξωγενές ανθρώπινο sPLA2-III προκαλεί ενεργοποίηση μαστοκυττάρων όταν εγχέεται σε δέρμα ποντικού [167]. Το ενδογενές sPLA2-III βρίσκεται σε εκκριτικούς κόκκους και εκκρίνεται κατά την κυτταρική ενεργοποίηση και ερεθίζει τα μαστοκύτταρα ή βοηθά την ωρίμανσή τους [97].

Στην αλλεργική αντίδραση, το ξεκίνημα εξαρτάται από την cPLA2 που παράγει AA μετά από ενεργοποίηση από MAPK κινάσες. Παράγονται έτσι PGD₂, LTB₄ και LTC₄ που συντηρούν την αντίδραση [97].

Στην έλλειψη PLA2-III, οι αναφυλακτικές απαντήσεις που εξαρτώνται από τα μαστοκύτταρα είναι μειωμένες [167]. Τα δερματικά ιστιοκύτταρα επίσης είναι ανώριμα και μιμούνται αυτά που στερούνται συνθάσης PGD₂ τύπου λιποκαλίνης (L-PGDS) ή υποδοχέα PGD₂ DP1 [167]. Γενικά, το sPLA2-III που εκκρίνεται από ανώριμα μαστοκύτταρα παράγει PGD₂ που συνδέεται με L-PGDS και αυτή στο DP1 των μαστοκυττάρων ευνοώντας την ωρίμανσή τους (Εικόνα 15).

Γενικά η απουσία sPLA2-III καθιστά τα ελαττώματα των μαστοκυττάρων πιο σοβαρά από αυτά που ανευρίσκονται σε ποντίκια χωρίς L-PGDS ή DP1 [167].



Εικόνα 15. Το sPLA2-III στη αναφυλαξία και στην ωρίμανση των μαστοκυττάρων. Από: Murakami M et al. The Roles of the Secreted Phospholipase A2 Gene Family in Immunology. Adv Immunol. 2016;132:91-134. [97]

6.4.3 Η sPLA2-III στις νόσους των αγγείων

Η δράση υδρόλυσης των sPLA2 δημιουργεί μικρής πυκνότητας LDL με υψηλό αρνητικό φορτίο [168]. Γενικά, η LDL που υπόκειται ενζυματική δράση sPLA2 (III, -V και -X), ευνοεί το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων που είναι σχεδόν πλήρη λιπιδίων [169]. Πειραματικά, ποντίκια χωρίς sPLA2-III παρουσιάζουν αθηρωματικές βλάβες με σημαντικές αυξήσεις της LDL, της θρομβοξάνης (TX) A2 και συστηματική φλεγμονή [169, 170].

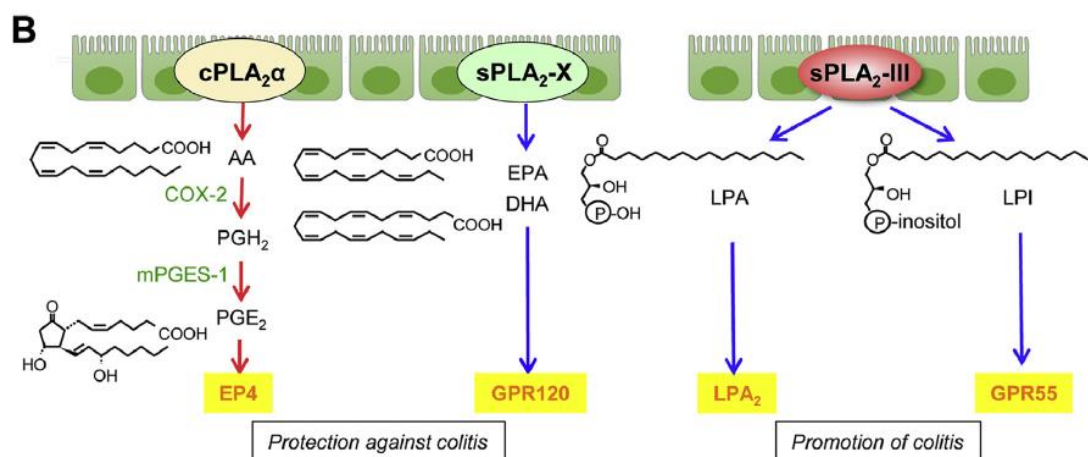
6.4.4 Η sPLA2-III στο νευρικό σύστημα

Το sPLA2-III εκφράζεται σχεδόν σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα [171]. Η ανεύρεσή του σε δενδρίτες ή μετασυναπτικά στο νωτιαίο μυελό το εμπλέκουν στη νευροδιαβίβαση και του συνάπτουν μια πιθανή τροφική δράση στους νευρώνες [172]. Πιθανή επίσης είναι η συσχέτισή του με τη νόσο του Αλτσχάιμερ [173].

6.4.5 Φλεγμονή του παχέος εντέρου, καρκίνος και σχέση με άλλες PLA2

Η cPLA₂α παράγει PGE₂ που προστατεύει από την κολίτιδα (υποδοχέας EP₄) αλλά ευνοεί τον ΚΠΕ μέσω του EP₂. Ο X-sPLA₂ εκφράζεται στα κύτταρα του παχέος εντέρου, εμποδίζει την φλεγμονή και την καρκινογένεση μέσω των προστατευτικών ω3-PUFAs (Εικόνα 16) [174].

Η sPLA₂-III έχει χαρακτήρα εν δυνάμει βιοδείκτη για τον ΚΠΕ [175,176]. Η υψηλή του έκφραση σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό, με υψηλότερο ποσοστό μετάστασης στους λεμφαδένες και μικρότερη επιβίωση [177,163].



Εικόνα 16. Μηχανισμοί δράσης των cPLA₂α, sPLA₂-X και sPLA₂-III στο κόλον. Από: Murase R et al. Group III phospholipase A₂ promotes colitis and colorectal cancer. Sci Rep. 2017 Sep 25;7(1):12261. [174]

Η ισορροπία στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου εμπλέκει τους συναφείς ρόλους διαφορετικών PLA₂. Το cPLA₂α, μετά από διάφορα ερεθίσματα παράγει PGE₂ που προφυλάσσει έναντι της οξείας βλάβης. Επιταχύνει όμως τη χρόνια κολίτιδα και τον καρκίνο λειτουργώντας σε διαφορετικούς υποδοχείς [178, 108]. Η απουσία sPLA₂-IIA και -X στο έντερο μειώνει τη φλεγμονή, αλλά οδηγεί σε καρκίνο του παχέος εντέρου [150].

Το sPLA₂-III παράγει λυσοφωσφιλιπιδικούς μεσολαβητές όπως τους LPC, LPA και LPI [174]. Το LPA ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την

μετανάστευση και τη μετάσταση [179]. Το LPI, προϊόν φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) φαίνεται ότι αυξάνει την κολίτιδα [180]. Αυτά τα παθογενετικά είδη λυσοφωσφολιπιδίων, προϊόντα της sPLA2-III δρουν σε ασταθείς ή κατεστραμμένες επιθηλιακές μεμβράνες [174].

Παραδόξως τα επίπεδα προστατευτικών λιπιδίων στο κόλον σε φυσιολογικές συνθήκες είναι πολύ αυξημένα (αντί μειωμένα) σε απουσία sPLA2-III πιθανόν ως αντιστάθμιση απέναντι σε μια επικείμενη επιθηλιακή βλάβη και φλεγμονή [174]. Επιπλέον η παραγωγή PGE2 σε φυσιολογικό έντερο αλλά με απουσία sPLA2-III οφείλεται σε ιντερλευκίνες (πιθανά IL-22) καθώς η PGE2 και ο υποδοχέας της EP4, προάγουν τη λειτουργία του φραγμού του εντέρου οδηγώντας στην παραγωγή IL-22 από βλαστοκύτταρα μέσω μεσολαβητών [181]. Τέτοιοι αντιφλεγμονώδεις λιπιδικοί μεσολαβητές που μέσω της IL22 προάγουν την έκκριση βλέννης και αντιμικροβιακών πεπτιδίων ευνοώντας την αναγέννηση βλαστοκυττάρων του παχέος εντέρου είναι το LXA4 (που προέρχεται από AA) και το RvD1 (που προέρχεται από DHA) [174,182,183]. Πρόκειται επομένως για μηχανισμούς ομοιόστασης που επηρεάζουν μετα-μεταγραφικά τη δραστηριότητα ή τον εντοπισμό ορισμένων ενζύμων που μεταβολίζουν και παράγουν κυτταροπροστατευτικά λιπίδια.

Η απουσία του sPLA2-III μπορεί να αλλάξει τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Το sPLA2-III που εκκρίνεται επηρεάζει τις λειτουργίες ή τους πληθυσμούς των βλαστοκυττάρων του παχέος εντέρου ή των ILC3. Επιπλέον επηρεάζει το μικροβίωμα, κινητοποιώντας ορισμένους μεταβολίτες λιπιδίων ή δρα απευθείας στις μικροβιακές μεμβράνες.[174].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η sPLA2-III παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των μαστοκυττάρων [167]. Τα μαστοκύτταρα συχνά επηρεάζουν την εξέλιξη της κολίτιδας και του καρκίνου. Το sPLA2-III στα μαστοκύτταρα ίσως παίζει ρόλο σε ασθένειες του παχέος εντέρου [184].

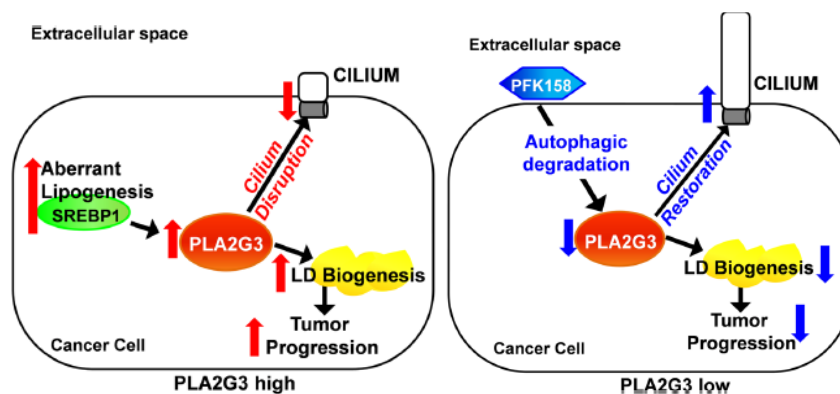
Συνοπτικά από την παραπάνω ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι:

- Η απουσία της PLA2-III μειώνει την ευαισθησία σε οξεία κολίτιδα, με χαμηλότερη έκφραση προφλεγμονωδών και παθογόνων κυτοκινών
- Η απουσία της PLA2-III αυξάνει την έκφραση γονιδίων επιθηλιακού φραγμού.

- Η απουσία της PLA2-III οδηγεί στη μείωση των LPA και LPI τα οποία προάγουν τη φλεγμονή ή τον καρκίνο του παχέος εντέρου μέσω των υποδοχέων τους LPA2 και GPR55 αντίστοιχα.
- Η δράση του sPLA2-III είναι πιθανά σε ισορροπία με εκείνες των cPLA2α και sPLA2-X που προστατεύουν από την κολίτιδα (μέσω της παραγωγής PGE2 και ω3 PUFA)
- Το sPLA2-III συμμετέχει στην επιδείνωση της φλεγμονής και το καρκίνο του παχέος εντέρου.[174,181-184]

6.4.6 Ο ρόλος της sPLA2-III στην χημειοαντίσταση

Τα καρκινικά κύτταρα εκτός από την αύξηση της γλυκόλυσης αλλάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης για να υποστηρίξουν τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξής τους. Αυτός ο εναλλακτικός τρόπος παραγωγής ενέργειας γίνεται με σάρωση εξωγενών λιπιδίων ή με ενεργοποίηση ενδογενούς λιπογένεσης [185]. Τα λιπίδια αποθηκεύονται ως σταγονίδια λιπιδίων (lipid droplets-LDs) που αυξάνουν την επιθετικότητα του όγκου και του δίνουν χημειοανθεκτικότητα [186].



Εικόνα 17. Σχέση αυτοφαγίας, πρωτογενούς βλεφαρίδας και επιπέδων sPLAIII
 Από: Ray U et al. Group III phospholipase A2 downregulation attenuated survival and metastasis in ovarian cancer and promotes chemo-sensitization. J Exp Clin Cancer Res. 2021 Jun 3;40(1):182. [187]

Η αυτοφαγία διατηρεί την ενεργειακή ισορροπία και την κυτταρική ομοιόσταση, γίνεται στα λυσοσώματα και παίζει ρόλο στη πρωτογενή γένεση βλεφαρίδων ανάλογα

με τους τύπους του καρκίνου [187,188]. Οι πρωτογενείς βλεφαρίδες είναι ένα μικροσωληνοειδές προσάρτημα που προέρχεται από το κεντρόσωμα και εκτείνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Λειτουργούν ως σηματοδότες, η δε απώλεια του βλεφαρογόνου στα προ-διηθητικά στάδια του καρκίνου είναι ένα σοβαρό πρώιμο ογκογόνο συμβάν [187,189].

Η ανώμαλη ενεργοποίηση του λιπογενούς μεταγραφικού παράγοντα SREBP1c ευνοεί την αύξηση της PLA2G3 και αυτή με τη σειρά της την αύξηση των LDs, την ανώμαλη λιπογένεση, την απώλεια βλεφαρίδων και την πρόοδο του όγκου (Εικόνα 17) [190]. Η στόχευση αυτής της λιπογένεσης με τον αναστολέα PFK158 μειώνει την έκφραση του PLA2G3 με τρόπο που εξαρτάται από την αυτοφαγία.

Στον καρκίνο των ωοθηκών η αναστολή αυτής της διαδικασίας αποκαθιστά τα βλέφαρα και επιβραδύνει την εξέλιξη του καρκίνου. Φάνηκε μια σημαντική εξασθένηση στη βιογένεση LDs σε κύτταρα καρκίνου ωοθηκών με έλλειψη PLA2G3. Η μείωση του PLA2G3 ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε φάρμακα πλατίνας [187].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΥΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΩΝ

7.1 Οι ελεύθερες ρίζες και ο ρόλος τους στην κυτταρική βλάβη

7.1.1 Οι δραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα τους γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά ενεργά και ασταθή. Αντιδρούν με διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α. Οι ελεύθερες ρίζες που συμμετέχουν στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς είναι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$) και το μονοξειδίο του αζώτου (NO) αλλά και ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού του O_2 και του NO , όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωρικό οξύ και το υπεροξειδίο του αζώτου. Αυτά τα μόρια χαρακτηρίζονται ως δραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ή ROS) ή του αζώτου (Reactive Nitrogen Species ή RNS) αντίστοιχα [191].

Προκαλούν βλάβες σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου, στον κυτταρικό σκελετό, την κυτταρική μεμβράνη και σε μοριακό επίπεδο σε πρωτεΐνες, σε ένζυμα, στο DNA, στο RNA και σε λιπίδια. [192].

Τρόποι ενίσχυσης της οξειδωτικής ικανότητας της ενεργής ρίζας O_2 είναι είτε η οξείδωση πρωτεϊνών που έχουν στο ενεργό τους κέντρο σύμπλοκα σιδήρου-θείου με απελευθέρωση ιόντων σιδήρου είτε η πρωτονίωσή της, η οποία αυξάνεται όσο το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται μειώνεται κάτω από το φυσιολογικό. Αυτό λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό των λυσοσωματίων ή στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ενεργοποιημένη ρίζα O_2 είναι πιο δραστική σε οργανικούς διαλύτες από ό,τι σε υδατικά διαλύματα και είναι πολύ τοξική [193].

Πολλοί εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες, διάφορες χημικές ενώσεις και η υπεριώδης ακτινοβολία Β έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν βλάβη μέσω των ROS και οδηγούν στην καρκινογένεση [194,195].

7.1.2 Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το H_2O_2 δημιουργείται είτε απευθείας από το O_2^- είτε μέσω ενζύμων όπως για παράδειγμα την μονοαμινο οξειδάση (MAO). Είναι ασθενές οξειδωτικό μέσο, αλλά μπορεί να οξειδώσει βιολογικά μόρια, κυρίως αυτά που έχουν θειολικές ομάδες ($-SH$),

σύμπλοκα Fe-S, μόρια αίμης κ.ά. Προκαλεί βλάβες είτε άμεσες είτε έμμεσες κυρίως στο DNA, στα λιπίδια και στις περισσότερες πρωτεΐνες [193]. Διαπερνά πρώτα την κυτταρική μεμβράνη και μετά αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα κέντρα μετάλλων κυρίως Fe. Αντιδρά με αιμοπρωτεΐνες, όπως η μυοσφαιρίνη και αιμοσφαιρίνη, προκαλώντας τη δημιουργία φερρυλικών μορφών αυτών των πρωτεϊνών και ελευθέρων ριζών με καταστρεπτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις στα βιολογικά υλικά.

Ένας άλλος ρόλος του H₂O₂ είναι η μεταγωγή μηνυμάτων. Η συνεχής οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων, πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, πρωτεϊνών μεταφοράς ιόντων κ.τ.λ. μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ανωμαλιών. Οι οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες μεταγραφής και επιδιόρθωσης του DNA έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων.

Επιπλέον, ο σχηματισμός H₂O₂ στα μιτοχόνδρια επηρεάζει σημαντικά τη γενική οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Η αύξηση του οξειδωτικού στρες στα μιτοχόνδρια αποτελεί βασικό παράγοντα της διαδικασίας της απόπτωσης από τα κύτταρα ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και στη διαδικασία της φυσιολογικής γήρανσης. Οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν τη διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων τα οποία είναι πιθανόν να σχετίζονται με την αυτοανοσία [195,196].

7.1.3 Αμυντικοί μηχανισμοί έναντι των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου

Τα ένζυμα τα οποία συνεργάζονται για την απομάκρυνση των ROS είναι κυρίως οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) και οι περοξυρεδοξίνες ή υπεροξυοξειδοαναγωγάσες (PRDX).

Η SOD καταλύει την αναγωγή του O₂ προς H₂O₂ και αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης περισσότερο από 10000 φορές. Το H₂O₂ που σχηματίζεται, απομακρύνεται με τη δράση ορισμένων άλλων ενζύμων όπως η καταλάση.

Η καταλάση (CAT), καταλύει την αναγωγή του H₂O₂ με δύο ηλεκτρόνια σε H₂O. Ανευρίσκεται σε κυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται υπεροξεισωμάτια. Έλλειψη της καταλάσης ή περιορισμένη δραστηριότητά της δεν φαίνεται να έχει σοβαρά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο, πιθανά εξαιτίας της ύπαρξης και άλλων ενζυμικών συστημάτων για την απομάκρυνση του H₂O₂ όπως της υπεροξειδάσης της

γλουταθειόνης (GP) που εντοπίζεται κυρίως στον ενδοκυττάριο χώρο και τα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο αυτό ανάγει το H_2O_2 σε H_2O οξειδώνοντας την γλουταθειόνη (GSH) σε GSSG. Ανάγει επίσης διαφορετικά υπεροξειδία όπως είναι τα λιπιδιακά υπεροξειδία, οργανικά υπεροξειδία, υπεροξειδία της χοληστερόλης ακόμη και το περοξυνιτρόδη. Σε ορισμένα κύτταρα απαντώνται και τα δύο ένζυμα στο κυτταρόπλασμα. Στις περιπτώσεις αυτές πιστεύεται ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του H_2O_2 όταν αυτό βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις απομακρύνεται κυρίως από την καταλάση [193,197].

7.2. Η οικογένεια των υπεροξυοξειδοαναγωγασών

7.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα ένζυμα της οικογένειας αυτής έχουν μοριακό βάρος 20-30 kDa και είναι υπεροξειδάσες που δεν διαθέτουν αίμη ή σελήνιο, όπως οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες της GSH. Απομακρύνουν αποτελεσματικά υπεροξειδία με τη μορφή υπεροξειδίου του υδρογόνου, υδροξυυπεροξειδίου του αλκυλίου και υπεροξυνιτρόδους. Έχουν καταγραφεί έξι υποοικογένειες στα κύτταρα των θηλαστικών, σύμφωνα με τον δείκτη ταξινόμησης PeroxiRedoxin (PREX):

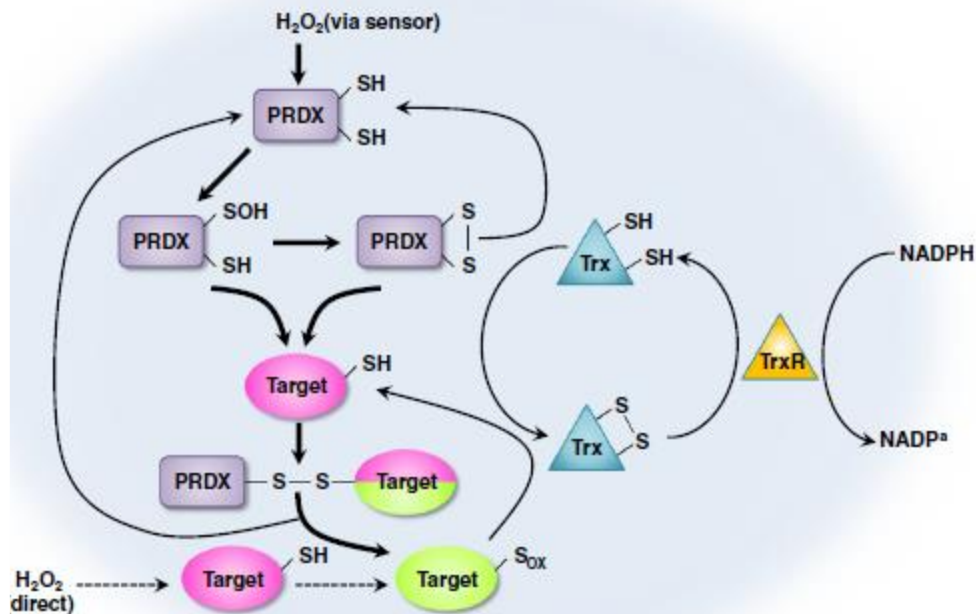
- οι υπεροξυοξειδοαναγωγάσες 1– 4 που ανήκουν στην υποοικογένεια PRDX1
- η υπεροξυοξειδοαναγωγή 5 που είναι μέλος της υποοικογένειας PRDX5
- η υπεροξυοξειδοαναγωγή 6 που αντιπροσωπεύει την υποοικογένεια PRDX6.

Η βασική λειτουργία τους είναι η αναγωγή του H_2O_2 ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων με δύο ηλεκτρόνια σε H_2O και αλκοόλες. Ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούν τις θειολικές ομάδες της θειορεδοξίνης (Trx) (Εικόνα 18).

Είναι σημαντικές στη διατήρηση του οξειδοαναγωγικού ελέγχου των παραγόντων μεταγραφής και στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς οξειδωτικών τροποποιήσεων στο DNA, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες [198].

Η καταλυτική δραστηριότητα των υπεροξυοξειδοαναγωγάσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από μια συντηρημένη υπεροξειδική κυστεΐνη στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης και από ένα υπόλειμμα κυστεΐνης που εντοπίζεται στο καρβοξυλικό

τερματικό τμήμα των πέντε από των έξι υπεροξυοξειδοαναγωγάσεων που ονομάζεται διαχωριστική κυστεΐνη [198].



Εικόνα 18. Μηχανισμός δράσης του οξειδοαναγωγικού συστήματος PRDX. Από: Park MH et al. Roles of peroxidoredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2016 Jul;163:1-23. [199]

7.2.2 Δομή PRDXs

Οι πρωτεΐνες PRDX των θηλαστικών μπορούν να χωριστούν σε τρεις υποομάδες, τις τυπικές 2-Cys, άτυπες 2-Cys και 1-Cys PRDXs. Οι PRDX 1-4 ανήκουν στις τυπικές 2-Cys και το PRDX5 ανήκει στην άτυπη ομάδα 2-Cys, στην οποία όλα τα μέλη περιέχουν δύο συντηρημένα υπολείμματα κυστεΐνης. Η PRDX6 ανήκει στην υποομάδα 1-Cys PRDX στην οποία διατηρείται ένα υπόλειμμα κυστεΐνης. Οι PRDXs είναι παρόμοιες, περιέχουν μια πτυχή θειορεδοξίνης με μερικά επιπλέον στοιχεία δευτερεύουσας δομής. Οι άτυπες PRDX 2-Cys είναι μονομερή ένζυμα, ενώ τόσο τα τυπικά 2-Cys όσο και τα 1-Cys PRDXs είναι ομοδιμερή, που το άκρο C μιας υπομονάδας αντιδρά με άλλη υπομονάδα. Στα τυπικά 2-Cys PRDXs, η κυστεΐνη διάχωρισμού βρίσκεται στον βραχίονα C-τελικό [199].

7.2.3 Γενικές ιδιότητες

Τα PRDX περιέχουν μια ενεργή κυστεΐνη ευαίσθητη στην οξειδωση από το H₂O₂. Η οξειδωμένη κυστεΐνη του PRDX μπορεί να αναχθεί από μια κυτταρική θειόλη, κάνοντας την PRDX να δρα ως υπεροξειδάση. Η ρύθμιση του PRDX μέσω φωσφορυλίωσης σε απάντηση εξωκυτταρικών σημάτων επιτρέπει την τοπική συσσώρευση του H₂O₂. Λειτουργεί έτσι ως σηματοδότης ή ως αισθητήρας H₂O₂ το οποίο τελικά μειώνεται [199,200]. Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος Trx- PRDX φαίνεται στην Εικόνα 18. Τα PRDX συνδέονται με H₂O₂, οξειδώνονται και απενεργοποιούνται. Αυτό αντιστρέφεται από το σύστημα αναγωγής θειορεδοξίνης (Trx)-Trx (TrxR) που χρησιμοποιεί NADPH ως αναγωγικά ισοδύναμα. Η ανηγμένη Trx ανάγει τα δισουλφίδια (S-S) εντός των PRDX στην ανηγμένη της μορφή με Trx. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα H₂O₂ μπορούν να δώσουν απευθείας ικανή οξειδωση της θειόλης των PRDXs [199].

7.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης PRDX

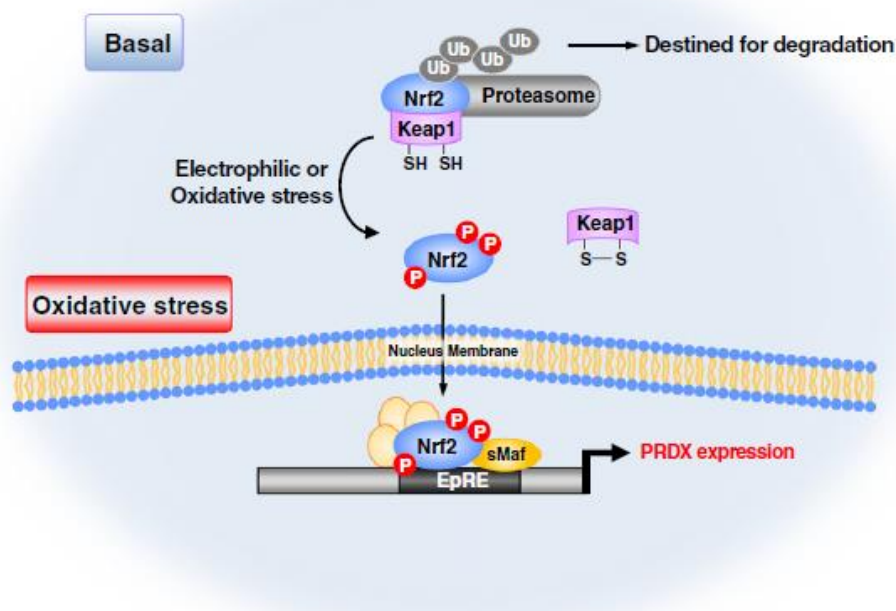
Τα PRDX ρυθμίζονται τόσο σε μεταγραφικό όσο και των μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Ο παράγοντας Nrf2 επάγει την έκφραση των PRDX. Μέσω της οδού ουβικιτίνης (Ub)-πρωτεασώματος και μέσω του παράγοντα Kεap1, ο Nrf2 απελευθερώνεται. Ο Kεap1 δεσμεύει ένα μόριο Nrf2. Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, ο Kεap1 απενεργοποιείται και το Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα. Συνδέεται με πρωτεΐνες Maf (sMaf) και μέσω στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) ευνοεί την έκφραση των PRDX (Εικόνα 19)[199]. Τα MAPK, SP-A, Fkbp52 και το 67 (phox) ρυθμίζουν έμμεσα την δραστηριότητα aiPLA2 [199,201,202].

7.2.5 Πρωτεΐνες PRDX

PRDX1

Η PRDX1 είναι καθαριστής του H₂O₂ και ρυθμιστής μεταγραφής. Μειώνει τα υπεροξειδία με αναγωγικά ισοδύναμα μέσω του συστήματος Trx. Το PRDX1 εμπλέκεται στη ρύθμιση οξειδοαναγωγής του κυττάρου. Παίζει ρόλο στην εξάλειψη των υπεροξειδίων του μεταβολισμού και συμμετέχει στη σηματοδότηση παραγόντων

ανάπτυξης όπως του παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF- α) μέσω της ρύθμισης των συγκεντρώσεων του H₂O₂ εντός του κυττάρου [199,203,204].



Εικόνα 18. Μηχανισμός δράσης του οξειδοαναγωγικού συστήματος PRDX. Από: Park MH et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2016 Jul;163:1-23. [199]

PRDX2

Η PRDX2 οδηγεί στη μείωση του H₂O₂. Συνδέεται με αυξητικούς παράγοντες και μονοπάτια του TNF. Λειτουργεί ως υποδοχέας σήματος H₂O₂ και σηματοδότης οξειδοαναγωγής του παράγοντα STAT3. Ενισχύει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του παράγοντα ανάπτυξης των αιμοπεταλίων (PDGF) και της φωσφολιπάσης Cγ1 στην PDGF σηματοδότηση [199,205,206].

PRDX3

Το PRDX3 αδρανοποιεί τα μιτοχονδριακά H₂O₂. Είναι γνωστό ως γονίδιο στόχος c-myc και miR-23b. Η υπερέκφραση του PRDX3 προστατεύει από το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση [199]. Δρα συνεργικά με το MAP3K13 ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση του NF-kappa-B στο κυτταρόπλασμα [207]. Το PRDX3 ρυθμίζει τον

πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και έχει αντιοξειδωτικές λειτουργίες στα μιτοχόνδρια [208].

PRDX4

Το PRDX4 βρίσκεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ρυθμίζοντας οξειδοαναγωγές. Ρυθμίζει τον προφλεγμονώδη παράγοντα μεταγραφής NF-κB στο κυτταρόπλασμα μέσω IκB-α φωσφορυλίωσης [199,209].

PRDX5

Το PRDX5 είναι μια γρήγορη υπεροξειδάση θειόλης. Αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα υπεροξεισώματος 1 σε θέσεις έναρξης μετάφρασης. Εμπλέκεται με μεταγραφικούς παράγοντες του οξειδωτικού στρες όπως τον Nrf2 ή τον NF-κB [199,210]. Ο LPS και η IFN-γ αυξάνουν την έκφραση του στα μακροφάγα. Αυξημένη έκφραση προκύπτει μέσω αντίδρασης σε ενεργοποίηση του TLR, του p38 και της c-Jun N-τερματικής κινάσης (JNK) [211,212].

PRDX6

Το PRDX6 περιέχει 1 τομέα Trx. Είναι η μόνη με δραστηριότητες υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και iPLA2. Προτιμά τις PC ως υποστρώματα [199,213].

7.2.6. PRDX και καρκίνος

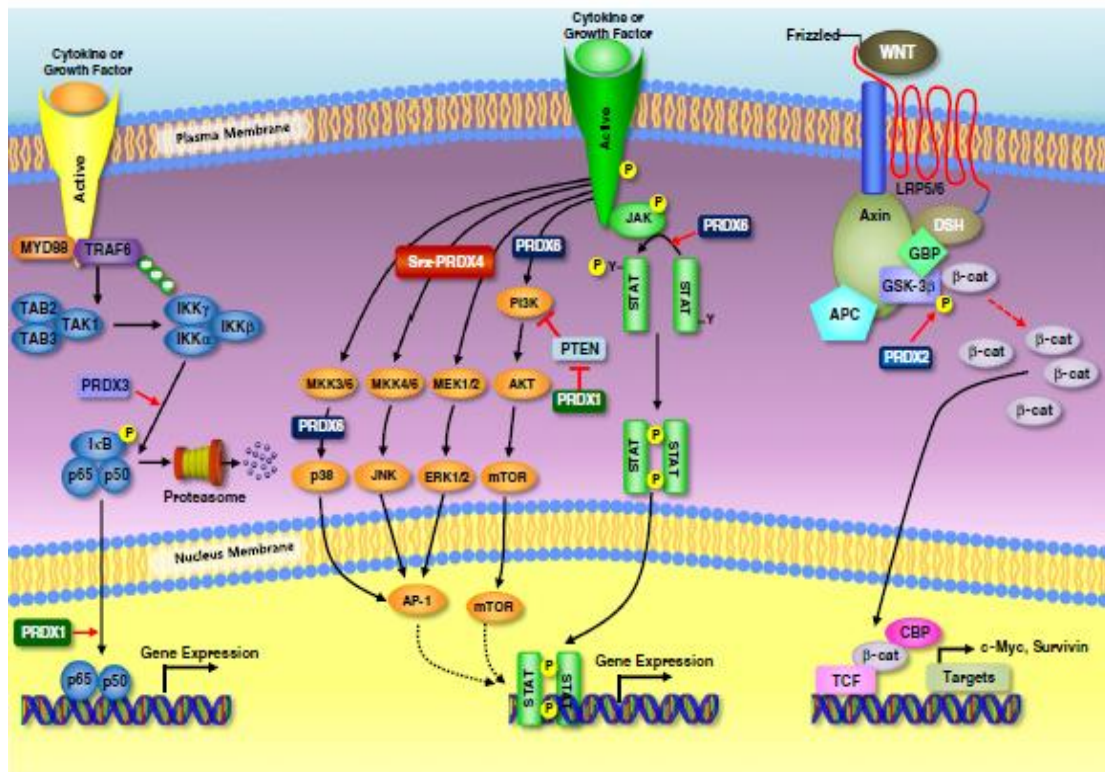
Παρουσιάζουν ένα διπλό και παράδοξο ρόλο. Τα ενδοκυτταρικά και μιτοχονδριακά ROS σχετίζονται με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Από τη μία, η αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακών ROS και η διαταραχή της παραγωγής PRDX σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες και την πρόκληση απόπτωσης [208]. Από την άλλη, καθώς τα PRDXs είναι αντιοξειδωτικά, απομακρύνουν το H₂O₂ στο καρκίνο ευνοώντας την επιβίωση και τη συντήρηση του όγκου [199].

7.2.6.1 Σηματοδότηση PRDX στον καρκίνο

Τα PRDX εμπλέκονται σε διάφορες μοριακές οδούς που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ο παράγοντας NF-κB σχετίζεται με σηματοδότηση μέσω οξειδοαναγωγών. Τα PRDX

ρυθμίζουν τον NF-κB μέσω της αρχικής του ενεργοποίησης στο κυτταρόπλασμα, επηρεάζουν τη φωσφορυλίωση του IκB και την επακόλουθη αποσύνδεση του. Εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση του μονοπατιού MAPK, του IκB (PRDX1), των PI3K, STAT και p38 (PRDX6) και του Wnt (PRDX2) όπως φαίνεται στην Εικόνα 20.

Γενικά, τα PRDX 2-Cys δεν μειώνουν μόνο το H₂O₂ που παρήχθη κατά τη διέγερση του υποδοχέα, αλλά καταστέλλουν επόμενες αποκρίσεις σηματοδότησης του NF-κB, της JNK και της απόπτωσης γενικότερα [214].



Εικόνα 20. Μονοπάτια σηματοδότησης των PRDX στην καρκινογένεση Από: Park MH et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. Pharmacol Ther. 2016 Jul;163:1-23. [199]

Το PRDX1 αυξάνει την ενεργοποίηση του NF-κB σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, τη φωσφορυλίωση του σε καρκίνους της ουροδόχου κύστης ενώ ενεργοποιεί την οδό mTOR/p70S6K στο καρκίνο του οισοφάγου. Το PRDX2 ρυθμίζει το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης στον ΚΠΕ. Το PRDX3 επάγει τη φωσφορυλίωση IκB και τον NF-κB στο κυτταρόπλασμα. Στους όγκους του πνεύμονα, το PRDX4 συνδέεται με το Src. Το PRDX6 ενισχύει την οδό JAK2/STAT3 στον καρκίνο του πνεύμονα. Η υπερέκφραση PRDX6 ενεργοποιεί το Akt μέσω της PI3K και του p38. Υπερέκφραση PRDX5 και

αναστολή της απόπτωσης μετά από αναστολή της GATA1 φάνηκε στον καρκίνο του μαστού (199,215).

7.2.6.2. Έκφραση PRDX στον καρκίνο

Σε στοματικούς όγκους με πλακώδη κύτταρα, η PRDX1 υποεκφράζεται. Αυτό σχετίζεται με τη μάζα του όγκου, προχωρημένο στάδιο και κακή διαφοροποίηση [216]. Αντίθετα, υπερεκφράζεται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) ενώ σχετίζεται θετικά με την έκφραση VEGF, τη νεοαγγείωση, το μέγεθος του όγκου και την AFP ορού [217]. Το PRDX2 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου [218]. Το PRDX3 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και σχετίζεται με την ηλικία, αυξημένο ειδικό προστάτη αντιγόνο (PSA), στάδιο και βαθμολογία Gleason, στον ΗΚΚ όπου συσχετίζεται με κακή διαφοροποίηση και στον ανθεκτικό στην πλατίνα καρκίνο των ωοθηκών [219, 220, 221,]. Η έκφραση του PRDX4 είναι υψηλή στον καρκίνο του πνευμονα και στον ορθοκολικό καρκίνο προχωρημένου σταδίου [222,223]. Το PRDX6 έχει υψηλή έκφραση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, στο πλακώδες καρκίνωμα των πνευμόνων και στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού [224, 225,226].

7.2.7 PRDXs και φλεγμονή

Οι παράγοντες μεταγραφής και οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής. Οι οξειδοαναγωγές με τη σειρά τους συμμετέχουν ενεργά στη φλεγμονή επηρεάζοντας την άμεσα ή έμμεσα. Ο NF-κB είναι σημαντικός ενδιάμεσος παραγωγής διαφόρων κυτοκινών και προσταγλανδινών. Ρυθμίζεται από την οξειδοαναγωγή και είναι σημαντικός για την άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες [199]. Ο Nrf2 ενεργοποιεί προστατευτικά γονίδια που εξαρτώνται από το στρες όπως τη NAD (P) H-κινόνη οξειδοορεδοκτάση 1 και τη γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST) μέσω του στοιχείου ARE / EpRE [227]. Τα PRDX που εκκρίνονται από κύτταρα υπό ήπιο οξειδωτικό στρες προκαλούν ενεργοποίηση του Nrf2 ή του NF-κB που είναι σημαντικά για την έκφραση φλεγμονωδών πρωτεϊνών. Γενικά η PRDX1 φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο στην αθηροσκλήρυνση αλλά χειροτερεύει την ρευματοειδή αρθρίτιδα, η PRDX3 και η PRDX4 προστατεύουν από τις φλεγμονώδεις διεργασίες της παχυσαρκίας και την αθηροσκλήρυνση ενώ PRDX6 ενισχύει την πρόοδο της αρθρίτιδας [199].

7.2.8 PRDXs στο νευρικό σύστημα

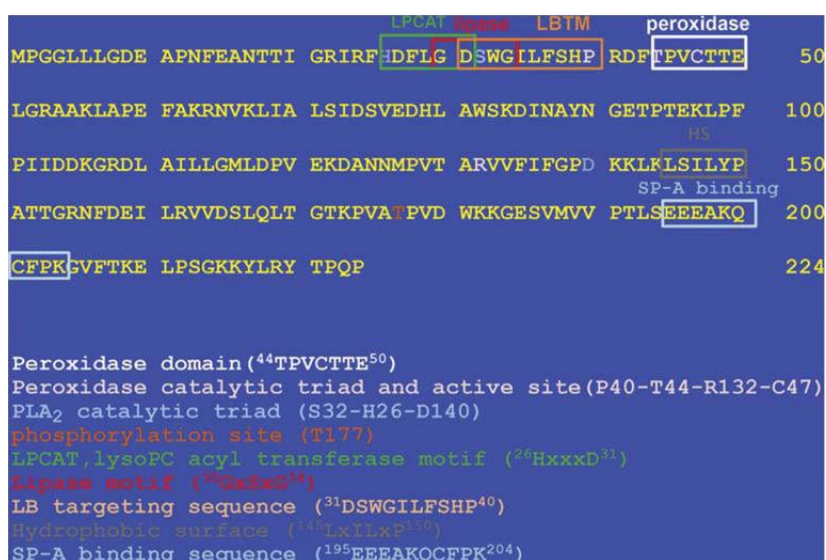
Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε νευροεκφύλιση ή να την επιταχύνει σε ήδη υπάρχον υπόστρωμα. Τόσο στην νευροεκφύλιση όσο και στην νευροπροστασία οι PRDX φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά [228]. Τα PRDX1 και 6 εκφράζονται σε γλοιακά κύτταρα, ενώ τα PRDX2, 3, 4 και 5 εκφράζονται σε νευρώνες. Η PRDX1 φαίνεται να έχει γενικά έναν νευροπροστατευτικό ρόλο. Η PRDX2 οδηγεί σε νευροεκφύλιση στη Ν. Parkinson αλλά καθυστερεί παραδόξως την νευροεκφύλιση στη Ν. Alzheimer ενώ η PRDX3 είναι νευροπροστατευτική στην νευροτοξικότητα αλλά εκφυλιστική στη Νόσο Πάρκινσον [199,228].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Η ΥΠΕΡΟΞΥΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗ-6 (PRDX6)

8.1 Εισαγωγή

Η υπεροξυοξειδοαναγωγή-6 (PRDX-6) είναι μέλος των υπεροξυοξειδοαναγωγασών (PRDX), μιας οικογένειας μη-σελήνιο-υπεροξειδάσεων. Βρέθηκε αρχικά στο ακτινωτό σώμα του ματιού βοοειδούς και στον βλεννογόνο πνευμόνων αρουραίων. Περιγράφεται με πληθώρα διαφορετικών ονομάτων όπως Clara πρωτεΐνη 26 (CC26), p29, μη-σελήνιο GSH υπεροξειδάση και όξινη (ή λυσοσωμική) Ca^{2+} ανεξάρτητη PLA2 (aiPLA2). Φέρει 224 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 25 kDa (Εικόνα 21) [229].



Εικόνα 21. Αλληλουχία αμινοξέων της PRDX6. Από: Fisher AB. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. Arch Biochem Biophys. 2017 Mar 1;617:68-83. [229].

Η PRDX6 καλείται επίσης 1-cys Prdx, λόγω του καταλυτικού μηχανισμού της που βασίζεται σε ένα μόνο συντηρημένο υπόλειμμα κυστεΐνης στο μονομερές Prdx, σε αντίθεση με τα ένζυμα Prdx 2-cys που λειτουργούν με 2 διατηρημένα τμήματα cys ανά μονομερές [229].

8.2 Ενζυματικές δραστηριότητες του PRDX6

8.2.1. Δραστηριότητα υπεροξειδάσης

Η αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων από την PRDX6 περιλαμβάνει 3 βασικά χημικά στάδια: υπεροξείδωση, διάλυση και ανακύκλωση.

- Η υπεροξείδωση ανάγει το υπόστρωμα υδροϋπεροξειδίου με την οξείδωση του αντιδραστικού τμήματος κυστεΐνης (στο αμινοξύ 47) σε ένα σουλφενικό οξύ.
- Η διάλυση των οξειδωμένων ενζύμων 2-cys επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού δισουλφιδίου. Αντίθετα, η PRDX6 δεν έχει μια δεύτερη (διαχωριστική) κυστεΐνη, οπότε η λύση της σουλφενικής κατάστασης απαιτεί δράση της πρωτεΐνης με εξωγενές αναγωγικό όπως η γλουταθειόνη (GSH).

Το GSH (πGST, ισομορφή της οικογένειας GST) σχηματίζει ένα μικτό δισουλφίδιο με οξειδωμένο PRDX6 (γλουταθειονυλίωση PRDX6). Παρόλο που η PRDX6 είναι λειτουργικά υπεροξειδάση GSH, ταξινομείται ως υπεροξυδεροξίνη λόγω της κυστεΐνης αντί της σεληνοκυστεΐνης ως δραστικής ομάδας οξειδοαναγωγής και της δομικής ομολογίας της με άλλα μέλη της οικογένειας .

- Στην ανακύκλωση γίνεται η αναγέννηση της δραστικής πρωτεΐνης. Η γλουταθειονυλιωμένη PRDX6 αντιδρά με GSH για να ξαναγίνει πλήρως αναγμένη με την ελεύθερη GSH ως αναγωγικό. [229-234].

8.2.2. Σχέσεις δομής-λειτουργίας

Στην τριτογενή δομή του οξειδωμένου PRDX6, τα παρακείμενα H39 και R132 σταθεροποιούν το θειολικό C47 στην ενεργή μορφή του [229]. Η υπεροξειδική δράση για τα ένζυμα 2-cys χρειάζεται μια τριάδα (Pro, Thr, Arg) γύρω από τις καταλυτικές θέσεις. Το καταλυτικό 47C στην PRDX6 περιβάλλεται από μια ίδια τριάδα (40P, 44T, 132R)] για το υπόστρωμα του υπεροξειδίου [230].

Η φυσική αναγμένη πρωτεΐνη είναι διμερής σε κρυσταλλική δομή χωρίς αλληλεπίδραση δυο μονομερών όπως στα 2-cys [232]. Η κρυσταλλική δομή φέρει την «πτυχή θειορεδοξίνης» των PRDXs και ενός εκτεταμένου C-άκρου σε σχέση με τα άλλα PRDXs [233,234].

8.2.3 Δραστικότητα υπεροξειδάσης GSH υδροϋπεροξειδίου του φωσφολιπιδίου

Η PRDX6 είναι η μόνη που μπορεί ανάγει υδροϋπεροξειδία φωσφολιπιδίων (PLOOH). Η δράση είναι γνωστή και ως φωσφολιπιδικό υδροϋπεροξειδίο GSH υπεροξειδάσης (PHGPx). Ομοιάζει με τη δραστικότητα της GSH υπεροξειδάσης 4 (GPx4) η οποία περιέργως εκφράζεται ελάχιστα στους πνεύμονες. Πειραματικά, το "νοκ-άουτ" PRDX6 ελαχιστοποιεί τη δράση PHGPx των πνευμόνων. Η αναγωγή οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στο πνεύμονα σχετίζεται με τη δραστηριότητά της [229,235,236].

8.2.4 Δραστικότητα της φωσφολιπάσης A2

Η PRDX6 εκφράζει επίσης μια δεύτερη δραστηριότητα που σχετίζεται με τον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων. Υδρολύει τα γλυκεροφωσφολιπίδια στη θέση sn-2 με δράση φωσφολιπάσης A2 (PLA2). Προτιμά την PC των λιποσωμάτων ως υπόστρωμα, λιγότερο την PE και ελάχιστα φωσφολιπίδια με άλλες ομάδες κεφαλής [229]. Οι ενεργές τοποθεσίες για τη δραστηριότητα PLA2 και τη δραστηριότητα υπεροξειδάσης είναι ανεξάρτητες, καθιστώντας αυτήν μια πραγματική πρωτεΐνη «σεληνόφως» [237]. Η PLA2 δεν απαιτεί την παρουσία Ca^{2+} γι' αυτό και ονομάστηκε ανεξάρτητη από ασβέστιο PLA2 (aiPLA2) ή λυσοσωμική PLA2. Σε αντίθεση με την δραστικότητα υπεροξειδάσης, η PLA2 βρίσκεται στο μονομερές και δεν χρειάζεται διμερισμό [229,232].

Η aiPLA2 εμποδίζεται από αναστολείς άλλων PLA2 αλλά ανταγωνιστικά από την 1-εξαδεκυλ-3-τριφθοροαιθυλγλυκερο-sn-2-φωσφομεθανόλη (MJ33) [238]. Η μεταμεταφραστική αλλαγή με τη μεγαλύτερη επίδραση στη δράση PLA2 είναι η φωσφορυλίωσή της στη θέση T177 από MAP κινάσες (p38, ERK) [239].

8.2.5 Δραστηριότητα λυσοφωσφολιπιδίου ακυλ τρανσφεράσης

Μια τρίτη ξεχωριστή δραστηριότητα της PRDX6 είναι η ικανότητα ακυλίωσης της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης με ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ (παράγωγο CoA) γνωστή ως lysoPC-acyl CoA τρανσφεράση (LPCAT). Προτιμά τη χολίνη (lysoPC) και το παλμιτούλCoA ως το υποκατάστατο sn-2 λιπαρό οξύ [240].

8.2.6 Σύνδεση φωσφολιπιδίων και pH

Οι τρεις παραπάνω αντιδράσεις χρειάζονται τη σύνδεση της PRDX6 σε ένα υπόστρωμα φωσφολιπιδίου. Η PRDX6 Συνδέεται με λιποσωμικά φωσφολιπίδια σε pH 4 αλλά δεσμεύεται λιγότερο καλά σε pH 7. Η φωσφορυλιωμένη PRDX6 δεσμεύεται έντονα τόσο σε όξινο όσο και σε ουδέτερο pH, ενώ συνδέεται εξίσου και στα δύο pH με λιποσώματα με οξειδωμένο φωσφολιπίδιο δεικνύοντας ότι η σύνδεση με το υπόστρωμα καθορίζει την δράση της [229,239].

8.3 Έκφραση πρωτεΐνης και δραστηριότητας PRDX6

8.3.1 Κυτταρικός εντοπισμός

Η PRDX6 βρίσκεται σε όλα τα όργανα, ιδιαίτερα στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά και στους όρχεις. Στα κύτταρα ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Στα επιθηλιακά κύτταρα κυψελίδων πνευμονικού τύπου 2 υπάρχει τόσο σε λυσοσώματα και στρωματικά σώματα (LB) όσο και στο κυτταρόπλασμα [229,241].

8.3.2 Ρύθμιση της έκφρασης

Οξειδωτικά ερεθίσματα (H₂O₂), ο KGF και η δεξαμεθαζόνη επάγουν την έκφραση PRDX6 [229,242,243]. Η μεταγραφή της αυξάνεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 που μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με ένα αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης (ARE, ERE ή GRF για τη δεξαμεθαζόνη) που βρίσκεται πριν από την τοποθεσία έναρξης της μετάφρασης PRDX6 [242,243]. Η έκφραση επηρεάζεται από παράγοντες μεταγραφής όπως τον CCAAT / ενισχυτική πρωτεΐνη β (C / EBPβ) και την πρωτεΐνη σύνδεσης στοιχείου απόκρισης cAMP (CREB) [244].

8.3.3 Ρύθμιση δραστηριότητας

Η φωσφορυλίωση στη θέση T177 με τη μεσολάβηση μιας MAP κινάσης οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας PLA2. Έτσι, η κυτοσολική PRDX6 συνδέεται με κυτταρικές μεμβράνες βρίσκοντας υπόστρωμα για τη δράση του PLA2 [239].

Αναστολείς της δράσης PLA2 είναι η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A (SP-A) στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου 2 και στους εξωκυτταρικούς χώρους των πνευμόνων και η κυτοσολική πρωτεΐνη p67phox που ανήκει στο μηχανισμό NADPH οξειδάσης τύπου 2 (NOX2) [229]. Το p67phox (πιθανά σε αλληλεπίδραση με τα p40phox και p47phox) δεσμεύεται έντονα στη φωσφορυλιωμένη PRDX6 και εμποδίζει τη δράση του PLA2. Η δραστηριότητα του NOX2 απαιτεί φωσφορυλίωση του p67phox ελευθερώνοντας το από τη PRDX6 [202,245].

8.4 Φυσιολογικοί ρόλοι της PRDX6

8.4.1 Απάντηση στο οξειδωτικό στρες

Κύτταρα που εκφράζουν την PRDX6 επιβιώνουν όταν προσβάλλονται από υδροϋπεροξειδία, ακτινοβολία ή LPS (κύτταρα των κυψελίδων του πνεύμονα, σπέρμα). Αυτό γίνεται είτε με τη μείωση του H₂O₂ (ή άλλων υδροπεροξειδίων) από την PRDX6 είτε με την PLOOH υδρολυτική δράση της [229,246,247].

8.4.2 Επιδιόρθωση υπεροξειδωμένων μεμβρανών

Η υπεροξείδωση των κυτταρικών μεμβρανών οδηγεί σε απόπτωση, φερρόπτωση ή κυτταρική νέκρωση. Στην επιδιόρθωση μεμβρανών η PRDX6 εκφράζει και τις 3 δραστηριότητες της και δρα με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η άμεση μείωση των υδροϋπεροξειδίων του φωσφολιπιδίου μέσω της δραστηριότητας PHGPx ενώ ο δεύτερος είναι η οδός αποακυλίωσης / επανακυλίωσης γνωστή ως αναδιαμόρφωση ή οδός Lands. Το υπεροξειδωμένο φωσφολιπίδιο υδρολύεται για να απομακρυνθεί η οξειδωμένη sn-2 ακυλική αλυσίδα. Δίνει έτσι ένα λυσολιπίδιο (PLA2 δραστηριότητα), που επανακυλιώνεται με ένα μη οξειδωμένο λιπαρό οξύ επαναφέροντας την αναγμένη μορφή των λιπιδίων της μεμβράνης (δραστηριότητα LPCAT) [229,248].

Η PRDX6 στο κυτταρόπλασμα δεν συνδέεται με φωσφολιπίδια αλλά με οξειδωμένα φωσφολιπίδια και μετατρέπεται έτσι σε μια πρωτεΐνη μεμβράνης. Έτσι βρίσκει πρόσβαση σε υπόστρωμα φωσφολιπιδίου υδροϋπεροξειδίου τόσο για δραστηριότητα PHGPx όσο και για PLA2. Γενικά, παραμένει ανενεργή στο κυτταρόπλασμα (ως PLA2 υπό συνθήκες ηρεμίας θα ήταν ανεπιθύμητη) αλλά ενεργή στο οξειδωτικό στρες [249].

8.4.3 Μεταβολισμός φωσφολιπιδίων

Η PRDX6 είναι σημαντική στην αποδόμηση και στην αναδιαμόρφωση του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων στα LB του πνεύμονα (επιφανειοδραστική ουσία) μέσω της δραστηριότητας PLA2 και της δημιουργίας lysoPC [229].

Το επιφανειοδραστικό του πνεύμονα απαιτεί διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) για τις ιδιότητες του. Παράγεται είτε απευθείας είτε με αναδιαμόρφωση φωσφατιδυλοχολινών που δεν περιέχουν παλμιτικό στη θέση sn-2. Η αλληλεπίδραση PRDX6 με την πρωτεΐνη επιφανειοδραστικού πνεύμονα A (SP-A) παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγωγή της PC και την αναδιαμόρφωση των πνευμονικών LBs [250].

8.5 Κυτταρική σηματοδότηση

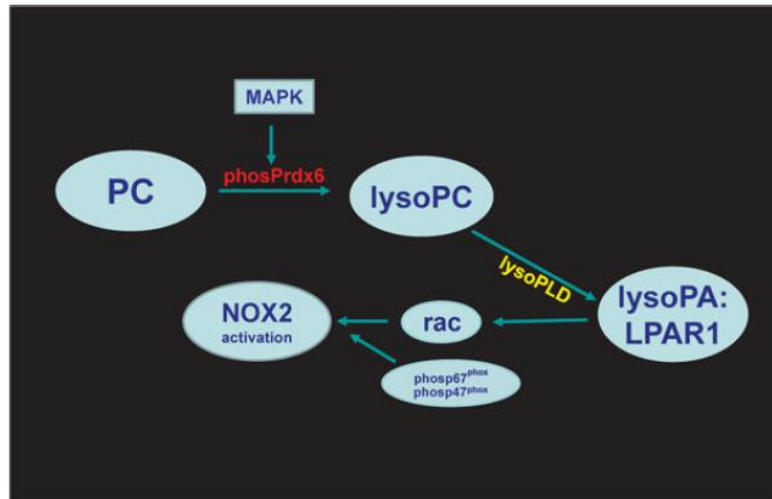
8.5.1 Ενεργοποίηση του NOX2

Το NOX2 είναι μέλος της οικογένειας επτά ενζύμων NOX που παράγουν $O_2 \cdot -$ ή H_2O_2 ως το κύριο προϊόν τους. Σκοπός του NOX2 είναι η βακτηριακή άμυνα και η σηματοδότηση. Η δραστηριότητα PLA2 φάνηκε ότι σχετίζεται με το NOX2 και την παραγωγή εικοσανοειδών [229].

Η δραστηριότητα PLA2 της PRDX6 είναι απαραίτητη για ενεργοποίηση του NOX2 σε πολλά κύτταρα (ενδοθήλιο, μακροφάγοι, ιστιοκύτταρα κ.α) και είναι μεγαλύτερη με την φωσφορυλίωση της PRDX6 που προκαλείται από MAP κινάσες [229,251,252].

Η δραστηριότητα PLA2 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία lysoPC μαζί με ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ. Το LysoPC στη συνέχεια υδρολύεται σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και μέσω του υποδοχέα του οδηγεί σε ενεργοποίηση του rac, ενός παράγοντα που ενεργοποιεί το NOX2 (Εικόνα 22) [229,253].

Το p67phox (αλλά όχι η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη) μπορεί να τερματίσει τη διαδικασία ενεργοποίησης του NOX2 [245].



Εικόνα 22. Ενεργοποίηση του NOX2 μέσω της φωσφορυλοίωσης της PRDX6. Από: Fisher AB. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. Arch Biochem Biophys. 2017 Mar 1;617:68-83. [229]

8.5.2. Αγγειακή μηχανική μεταγωγή σημάτων και PRDX6

Η PRDX6 φαίνεται να εμπλέκεται και στην μηχανική μετάδοση σημάτων. Σε πειραματικές συνθήκες ισχαιμίας ένα αγγειακό πρωτεϊνικό σύμπλοκο κυτταρικής μεμβράνης (μηχανόσωμα) που φέρει μία πρωτεΐνη προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων αιμοπεταλίων (PECAM), έναν υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2) και μία ενδοθηλιακή (VE) – καντερίνη λαμβάνει το αρχικό σήμα ισχαιμίας. Το σύμπλοκο απενεργοποιεί τα κανάλια K^+ -ATP οδηγώντας σε αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης [254,255]. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση κινασών, στην φωσφορυλίωση της PRDX6, στην ενεργοποίηση του NOX2 και στην δημιουργία ελεύθερων ριζών ($O_2 \cdot^-$) [256]. Οι ελεύθερες ρίζες σηματοδοτούν την απελευθέρωση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) για την προώθηση της νεοαγγείωσης αλλά και την ενεργοποίηση των διαύλων Ca^{2+} με σκοπό την παραγωγή NO για επιπλέον αγγειοδιαστολή [229,257].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A2 (aiPLA2) ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PRDX6

9.1 Γενικά

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς προηγουμένως η PRDX6 έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τη καθιστούν σημαντική στα φαινόμενα οξειδοαναγωγών που συμβαίνουν στο κύτταρο. Πράγματι οι πολλές και διαφορετικές λειτουργίες της όπως η δράση υπεροξειδάσης, η αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων φωσφολιπιδίου (δραστικότητα PHGPx), η δραστηριότητα LPC ακυλ- τρανσφεράσης (LPCAT) και η υδρόλυση του δεσμού sn-2 ακυλίου των φωσφολιπιδίων ως δραστηριότητα φωσφολιπάσης A2 (aiPLA2) με ενεργές τοποθεσίες για τη δραστηριότητα PLA2 και τη δραστηριότητα υπεροξειδάσης να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, την καθιστούν μια πραγματική πρωτεΐνη «σεληνόφως» [258].

Αν και κυρίως κυτταροπλασματική, ανευρίσκεται και σε όξινα οργανίδια όπως σε λυσοσώματα και σε σχετιζόμενα με λυσοσώματα οργανίδια (LROs) κυρίως στα LBs των πνευμόνων [259].

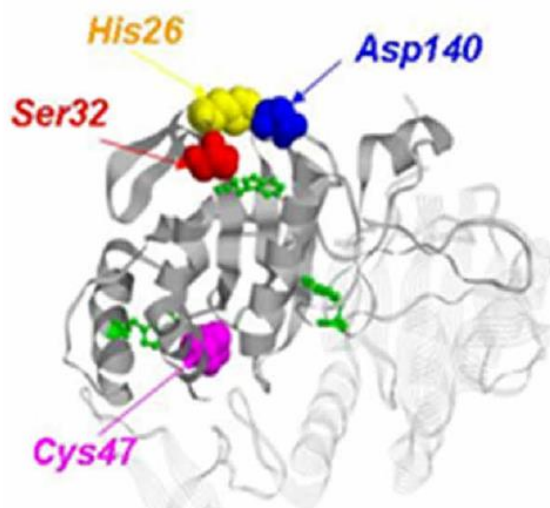
9.2 Δομή και δραστηριότητα της PRDX6

Η επαφή με το υπόστρωμα οδηγεί την PRDX6 σε θέση είτε για αναγωγή στην υπεροξειδική θέση (αμινοξέα γύρω από το C47) είτε για υδρόλυση από την καταλυτική τριάδα S32-H26-D140 [249]. Ενώ η υπεροξειδική θέση βρίσκεται στη βάση ενός ρηχού θύλακα η καταλυτική τριάδα για υδρόλυση βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η σύνδεση του λιπιδίου σε αυτές τις δύο ξεχωριστές ενζυματικά ενεργές θέσεις της πρωτεΐνης [258, 260].

9.3 Ταξινόμηση της PRDX6-PLA2 στην οικογένεια PLA2

Η PRDX6 αναγνωρίστηκε αρχικά ως LPLA2 με βάση την λυσοσωμική και την LRO θέση της αλλά και το όξινο περιβάλλον για την δραστηριότητά της [258,259]. Επιπλέον, λόγω της μη εξάρτησης από το ασβέστιο της αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός ως «όξινο Ca²⁺ + ανεξάρτητο PLA2» (aiPLA2) [258,261].

Η δραστικότητα PLA2 της PRDX6 βασίζεται στη καταλυτική τριάδα SHD (Εικόνα 23) με τη σερίνη στο καταλυτικό κέντρο που την ξεχωρίζει από την LPLA2 [258,262]. Αν και τα aiPLA2 και LPLA2 δρουν και τα δύο στο λιπαρό ακυλικό δεσμό sn-2 στα φωσφολιπίδια, πολλά άλλα χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, οι αναστολείς και οι λειτουργίες είναι διαφορετικά [258].



Εικόνα 23. Τριτογενής δομή της PRDX6 με την καταλυτική θέση PLA2. Από: Fisher AB. The phospholipase A₂ activity of peroxiredoxin 6. *J Lipid Res.* 2018 Jul;59(7):1132-1147 [258].

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ενζύμων aiPLA2 και LPLA2 είναι ότι η PRDX6 αν και βρίσκεται σε λυσοσώματα και LROs βρίσκεται και στο κυτταρόπλασμα σε μεγάλη ποσότητα. Η δραστικότητά του αν και μέγιστη σε όξινο pH υπό βασικές συνθήκες υπάρχει επίσης και σε ουδέτερο pH αν το υπόστρωμα (φωσφολιπίδιο) είναι οξειδωμένο ή αναγμένο μετά από φωσφορυλίωση του ενζύμου.

Έτσι, η PRDX6 μπορεί να λειτουργήσει ως PLA2 τόσο στο κυτταρόπλασμα (ουδέτερο pH) όσο και στα λυσοσώματα (όξινο pH). Αντίθετα το LPLA2 υδρολύει την οξειδωμένη PC αλλά όχι την ακέραια PC ενώ η δραστηριότητα αυτή σε ουδέτερο pH είναι πολύ μικρότερη από ότι σε pH 4 [258].

9.4 PLA2 δραστηριότητα της PRDX6

Το οξειδωμένο φωσφολιπίδιο (sn-2 λινολεϊκό ή αραχιδονικό οξύ) είναι βασικό υπόστρωμα για την aiPLA2 [258]. Η δραστικότητα σε όξινο pH είναι παρόμοια για αναγμένο και οξειδωμένο υπόστρωμα. Αν το υπόστρωμα είναι αναγμένο, η δραστικότητα μειώνεται σημαντικά σε pH 7. Αν το υπόστρωμα είναι οξειδωμένο η δραστικότητα PLA2 είναι παρόμοια σε όξινο και ουδέτερο pH [263]. Η aiPLA2 δρα σε κυτταροπλασματικό pH (ουδέτερο pH) με οξειδωμένα λιπίδια και η δραστικότητα αυξάνεται με την οξείδωση της πρωτεΐνης ενώ η δραστικότητα σε pH 4 δεν επηρεάζεται [258]. Επομένως, αναγωγές ή οξειδώσεις είτε του PRDX6 είτε του υποστρώματος ενισχύουν τόσο τη σχέση πρωτεΐνης-υποστρώματος όσο και την ενζυματική δράση.

Η δραστηριότητα aiPLA2 είναι μεγαλύτερη με την PC ως υπόστρωμα και μικρότερη για την PE, την PG, την ινοσιτόλη και τη σερίνη [264]. Η φωσφορυλίωση του PRDX6 μέσω μιας MAPK κινάσης (στο T177) αυξάνει πολύ τη δραστικότητα PLA2 [239]. Ο διμερισμός της πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητος για τη δραστηριότητα της [232,258].

9.5 Αναστολείς της δραστηριότητας aiPLA2

Η δραστικότητα του aiPLA2 δεν αναστέλλεται από αναστολείς άλλων ενζύμων PLA2 όπως το β-βρωμοφαίνυλο-βρωμίδιο. Αναστέλλεται από το φωσφορικό διαιθυλ-p-νιτροφαινύλιο (DENP) που είναι αναστολέας της πρωτεάσης της σερίνης κατά τρόπο μη ειδικό [264]. Ισχυρός αναστολέας της aiPLA2 είναι το MJ33 [238]. Ενδογενείς αναστολείς είναι η πρωτεΐνη επιφανειοδραστικού πνεύμονα A (SP-A), που παράγεται ανακυκλώνεται στο πνεύμονα ως συστατικό του επιφανειοδραστικού πνεύμονα και η p67rhox, ένα συστατικό του μονοπατιού NOX2 [229,245].

9.6 Δράση aiPLA2

9.6.1 Μεταβολισμός φωσφολιπιδίων πνεύμονα

Το επιφανειοδραστικό του πνεύμονα μειώνει την επιφανειακή τάση των πνευμονικών κυψελίδων και τον «κάματο» της αναπνοής. Η PC είναι το βασικό συστατικό του υπό μορφή διπαλμιτοϋλίου (DPPC) [258]. Παράγεται από κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα

τύπου 2, αποθηκεύεται στα LBs των κυττάρων, εκκρίνεται και επανεπεξεργάζεται στα LBs. Τα LB είναι LROs που έχουν όξινο pH ενεργοποιώντας την aiPLA2 [258,265].

Η αποικοδόμηση του DPPC γίνεται μέσω της PLA2. Η αναδιαμόρφωση επίσης επιτυγχάνεται μέσω της δραστηριότητας PLA2 για τη δημιουργία lysoPC, ακολουθούμενη από επανακυλίωση με ένα acylCoA, που καταλύεται από την LPCAT, για την επανασύνθεση της PC (κύκλος Lands) [265]. Το DPPC καταβολίζεται και από κυψελιδικά μακροφάγα που εκφράζουν τόσο aiPLA2 όσο και LPLA2 [266].

9.6.2 Επιδιόρθωση κυτταρικής μεμβράνης

Η δράση aiPLA2 σχετίζεται με την «επιδιόρθωση» υπεροξειδωμένων κυτταρικών μεμβρανών από ROS και συμμετέχει περίπου εξίσου στη δραστηριότητα PHGPX-PRDX6 για την πιο ικανοποιητική επισκευή της κυτταρικής μεμβράνης [263].

Ένα υπεροξειδωμένο φωσφολιπίδιο μεμβράνης ανάγεται στην αντίστοιχη αλκοόλη του από την PRDX6, η aiPLA2 απελευθερώνει το οξειδωμένο λιπαρό οξύ με την υδρόλυση του δεσμού sn-2 ακυλίου και το lysoPC που προκύπτει επανακυλιώνεται μέσω της δραστηριότητας LPCAT του PRDX6 [240].

9.6.3 Σηματοδότηση μέσω NOX

Το NOX2 ανευρίσκεται σε πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα, στο ενδοθήλιο αλλά και σε άλλους τύπους κυττάρων. Παράγει ανιόν υπεροξειδίου που παίζει ρόλο στη βακτηριακή θανάτωση και στη κυτταρική σηματοδότηση. Η δραστηριότητα aiPLA2 ενεργοποιεί το NOX2 τόσο στα κύτταρα της άμυνας όσο και στα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων. Ο μηχανισμός περιγράφηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο [229,251,252]. Επιπλέον, η PRDX6 διευκολύνει και την δράση της NADPH οξειδάσης τύπου 1 (NOX1) και σταθεροποιεί την έκφραση ενός ομολόγου του p67phox του NOXa1 [267].

Επομένως, η PRDX6 λειτουργεί είτε ως προ-οξειδωτικό είτε ως αντιοξειδωτικό. Από τη μία ενεργοποιεί το NOX2 και η υπεροξειδάση του απομακρύνει τα ROS (H₂O₂), από την άλλη αντιστρέφει την οξείδωση της μεμβράνης μέσω της υπεροξειδάσης και της PLA2 αποτρέποντας τις συνέπειες της υπερπαραγωγής ρίζας οξυγόνου.

9.7 αιPLA2 στην παθολογία

9.7.1 Οξεία βλάβη στους πνεύμονες και σήψη

Η οξεία βλάβη στους πνεύμονες (Acute Lung Injury) είναι μια εκτεταμένη ιστική βλάβη, πρωτογενής ή δευτερογενής ως αντίδραση σε συστηματικές ασθένειες. Η πνευμονία είναι η πιο κοινή πρωτοπαθής πνευμονοπάθεια, ενώ η σήψη είναι μια κοινή αιτία της δευτερογενούς ALI. Χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων στο πνεύμονα και την αυξημένη παραγωγή ROS μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου NOX2 από τα πολυμορφοπύρηνια, τα κύτταρα κυψελίδων, από τα μακροφάγα και τα κύτταρα του πνευμονικού ενδοθηλίου. Το αποτέλεσμα είναι ο εκτεταμένος και διάχυτος τραυματισμός των ιστών μέσω της οξειδωσης κυτταρικών πρωτεϊνών και της υπεροξειδωσης λιπιδίων κυτταρικών μεμβρανών [268]. Μέσω του NOX2, το αιPLA2 αυξάνει την πνευμονική βλάβη στο ALI ενώ μέσω των επιδράσεων της στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης αποκαθιστά τον οξειδωτικό τραυματισμό [251,263].

9.7.2 Άλλη παθολογία

Η υπερέκφραση της PRDX6 έχει φανεί σε μια ποικιλία νευροεκφυλιστικών νόσων του ΚΝΣ όπως την Ν.Πάρκινσον και την Ν.Αλτσχάιμερ [269, 270]. Η αιPLA2 παίζει ρόλο στη γονιμότητα των ανδρών στη γήρανση. Η χορήγηση MJ33 σε ποντικούς μείωσε τους ρυθμούς κινητικότητας και βιωσιμότητας του σπέρματος [271]. Τα επίπεδα έκφρασης της PRDX6 σχετίζονται με το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής ενώ η απώλεια της αιPLA2 φαίνεται να σχετίζεται με διαβήτη τύπου 2 [273].

9.7.3 Καρκίνος και καρκινογένεση

Ο ρόλος της PRDX6 στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων δεν είναι τελείως ξεκάθαρος ενώ πολλές φορές είναι αντικρουόμενος. Πειραματικά σε δέρμα ποντικού, όγκοι οφειλόμενοι σε χημικά ή ιούς παρουσιάζουν σημαντική ανάπτυξη και τάση για διείσδυση όταν η PRDX6 υπερεκφράζεται. Το γεγονός αυτό πιθανά σχετίζεται με τη χρόνια φλεγμονή που οδηγεί σε υπεροξειδώσεις της κυτταρικής μεμβράνης. Αντίθετα η ίδια η υπερέκφραση PRDX6 φαίνεται να αναστέλλει την γένεση νέων

νεοπλασμάτων. Επομένως η PRDX6 έχει ένα διπλό ρόλο που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως για παράδειγμα το υπόστρωμα ή το χρόνο [274].

Στο καρκίνο του πνεύμονα, οι μεταλλάξεις σε ενεργές θέσεις κατάλυσης της PRDX6 αναστέλλουν τη μετάσταση του όγκου, ενώ η θεραπεία με το αναστολέα MJ33 δεν επιδρά, αποκλείοντας έτσι την δραστηριότητα της PLA2 [275]. Σε πειράματα σε ποντίκια, η δραστηριότητα aiPLA2 φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK2 / STAT3. Αυξάνει έτσι τόσο τον αριθμό όσο και το μέγεθος των καρκινωμάτων που προκαλούνται από ουρεθάνη ενώ ευνοεί και την υπερέκφραση των μονοπατιών AP-1 και JNK που έχουν αποδεδειγμένο καρκινικό αποτέλεσμα [276, 277]. Οι MAP και οι Src κινάσες καθώς και ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης ή ο υποδοχέας του φαίνεται να επιδρούν στην νεοπλασματική δράση της aiPLA2 [229].

Στο καρκίνο του μαστού, η υπερέκφραση της PRDX6 φαίνεται να σχετίζεται με κακή πρόγνωση και είναι ανεξάρτητη από την δράση PLA2 [278]. Αντίθετα, το PRDX6-aiPLA2 αυξάνει την απόπτωση από TNF α σε HKK τουλάχιστον *in vitro* [279]. Η καταστολή της πρεσενιλίνης 2 αυξάνει την δραστηριότητα aiPLA2 και ευνοεί την ογκογένεση σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα [226]. Η αντίσταση στην ακτινοβολία, ο αυξημένος πολλαπλασιασμός και η δυνατότητα μετάστασης φαίνεται να συνδέονται με την υπερέκφραση της PRDX6 στο καρκίνο του οισοφάγου [280]. Η αντίσταση στη πλατίνα και τα αυξημένα επίπεδα PRDX6 έχουν παρατηρηθεί στο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών [281]. Στον καρκίνο του παγκρέατος και της ουροδόχου κύστης έχουν επίσης παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PRDX6 [281]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/p38 αυξάνει την έκφραση της PRDX6 στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η έκφραση της PRDX6 σχετίζεται με την ικανότητα διείσδυσης του όγκου και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις [282].

Επομένως ο ρόλος της PRDX6 αλλά και της δραστηριότητας aiPLA2 στα μονοπάτια της ογκογένεσης δεν είναι ξεκάθαρος. Φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη όγκων, την εισβολή και τη μετάσταση αλλά μπορούν να μεταβάλλονται ίσως από άλλους παράγοντες όπως τον κυτταρικό τύπο, τη θέση των όγκων ή τη χρονιότητα φλεγμονών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η διαδοχική εξέλιξη της καρκινογενετικής διαδικασίας στο παχύ έντερο εμπλέκει μακροσκοπικά τα αδενώματα (πολύποδες) ως υπόστρωμα για την νεοπλασματική εκτροπή μέσω πρόδρομων δυσπλαστικών αλλοιώσεων. Η φυσιολογική αλλά και εργώδης διαδικασία της επιθηλιακής ανανέωσης των επιφανειακών αδενικών κυττάρων του οργάνου οδηγεί τα ήδη σχηματισμένα αδενώματα σε ανεξέλεγκτη αύξηση του μεγέθους τους καθώς και στη συσσώρευση γενετικών συμβάντων ικανών να δώσουν ισχυρό νεοπλασματικό δυναμικό καταλήγοντας στην καρκινογένεση. Στους μηχανισμούς γενετικής απορρύθμισης περιλαμβάνονται σημειακές μεταλλάξεις σε εξόνια συγκεκριμένων γονιδίων, τροποποίηση της μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων, ενισχύσεις και διαγραφές γονιδίων ή απώλειες της ετεροζυγωτίας και ομοζυγωτίας αλληλίων.

Μεταξύ των πρωτεϊνικών δομών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση είναι τα ένζυμα της οικογένειας των φωσφολιπασών αλλά και των υπεροξυοξειδοαναγωγασών που διαδραματίζουν κομβικό μεταβολικό ρόλο. Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω η φωσφολιπάση PLA2-IIA σχετίζεται με τον ΚΠΕ, το στάδιο του νεοπλάσματος και εκφράζεται περισσότερο στο αριστερό κόλον. Η PLA2-IIA είναι ένας βασικός παράγοντας στο φλεγμονώδες περιβάλλον του όγκου επηρεάζοντας έμμεσα την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).

Η απουσία της PLA2-III μειώνει την ευαισθησία στην οξεία κολίτιδα, αυξάνει την έκφραση γονιδίων επιθηλιακού φραγμού και οδηγεί στη μείωση παραγόντων που προάγουν τη φλεγμονή ή τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Φαίνεται να συμμετέχει τόσο στην επιδείνωση της φλεγμονής όσο και στο καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η βασική λειτουργία της οικογένειας των υπεροξυοξειδοαναγωγασών είναι η αναγωγή του H_2O_2 ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων. Εμπλέκονται στον οξειδοαναγωγικό έλεγχο των παραγόντων μεταγραφής, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς οξειδωτικών τροποποιήσεων στο DNA, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες. Ο ρόλος τους στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων δεν είναι ξεκάθαρος ενώ πολλές φορές είναι αντικρουόμενος. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η έκφραση της PRDX6 γίνεται υψηλότερη με την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/p38. Αυτό σχετίζεται με την διεισδυτικότητα του όγκου και τις μεταστάσεις των λεμφαδένων. Γενικά η έκφραση της PRDX6 και η δραστηριότητα aiPLA2 φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη,

την διήθηση και τη μετάσταση των όγκων αλλά μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση της έκφρασης των πρωτεϊνών PLA2-IIA (PLA2G2A), PLA-III (PLA2G3) ισομορφών της φωσφολιπάσης A2 και της υπεροξυοξειδοαναγωγάσης PRDX6 (είτε αυτούσιας είτε της δραστηριότητας αιPLA2 που διαθέτει) στον καρκίνο του παχέος εντέρου αλλά και η έκφρασή τους σε παρακείμενους του όγκου μη καρκινικούς ιστούς. Η μελέτη κινήθηκε σε δύο άξονες. Αρχικά μελετήθηκε η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση σε φρέσκο ιστό τόσο σε ιστικό όσο και πλασματικό επίπεδο, με προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Lowry, με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB) και με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR). Λόγω τεχνικών θεμάτων (γρήγορη μεταφορά, φρέσκοι ιστοί και πλάσμα, ειδικές συνθήκες διατήρησης ψύξης κ.α.) η μελέτη περιορίστηκε σε μικρό αριθμό δειγμάτων. Στη συνέχεια και με σκοπό την πιο ευρεία μελέτη ισομορφών φωσφολιπασών A2, μελετήθηκαν επιπλέον δείγματα ΚΠΕ με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και καταγράφηκε η έκφραση των πρωτεϊνών με Digital Image Analysis για να εξαχθούν στατιστικά κλινικοεργαστηριακά συμπεράσματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΡΟΣ Α

Α) ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μελετήθηκε η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των ισομορφών sPLA2-IIA (*PLA2G2A*), sPLA2-III (*PLA2G3*) και aiPLA2 (*PRDX6*). Αυτό πραγματοποιήθηκε σε ιστικό και πλασματικό επίπεδο με προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Lowry, την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE), την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB), την απομόνωση ολικού RNA, τον ποσοτικό προσδιορισμό περιεκτικότητας και τον έλεγχο καθαρότητας RNA καθώς και την σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT) και ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR).

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Συμπεριελήφθησαν 14 τυχαίοι ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας 73.5 έτη (53-91). Αποκλείστηκαν ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και χρόνια λήψη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

Προεγχειρητικά πραγματοποιήθηκε αιμοληψία για τη συλλογή πλάσματος με την συγκατάθεση των ασθενών αλλά και από υγιή μάρτυρα, ενώ η συλλογή των ιστικών δειγμάτων έγινε άμεσα μετεγχειρητικά τόσο από τον όγκο όσο και από τους γύρω μη καρκινικούς ιστούς σε μια απόσταση μακροσκοπικού ορίου 1-2 εκατοστά με τρόπο που δεν αλλοίωνε την ιστολογική σταδιοποίηση του παρασκευάσματος. Η μεταφορά στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε άμεσα εντός λίγων ωρών και τέθηκαν σε ειδικές συνθήκες ψύξης προκειμένου να μην γίνουν αλλοιώσεις του προς μελέτη mRNA. Τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη φαίνονται στον Πίνακα 1. Οι κωδικοί των δειγμάτων που αναφέρονται στον Πίνακα 2 αποτελούν σημάνσεις λήψης και μεταφοράς σε διαφορετικές ημέρες ενώ τα δείγματα με α/α 13 και 14 ως τελευταία της συλλογής δεν χρειάστηκαν σήμανση αλλά μελετήθηκαν άμεσα.

A/A	ID	Φ	ΗΛ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΔΙΑΦΟΡΟΠ	TNM
1	6123	A	81	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	PT3N1c
2	6281	A	69	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	PT1N0
3	6595	A	56	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	PT3N0
4	7205	A	75	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	PT3N0
5	11672	Θ	82	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΚΑΛΗ	PT3N1a
6	11675	A	83	ΚΑΤΙΟΝ- ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	PT3N2a
7	692	A	91	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	PT3N0
8	956	Θ	66	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	PT3N2bM1a
9	993	A	79	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	PT3mN1b
10	1559	A	71	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	PT3N0
11	1941	Θ	53	ΟΡΘΟ	ΧΑΜΗΛΗ	PT3N0
12	1945	A	71	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	PT4N0
13	1786	Θ	80	ΤΥΦΛΟ-ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	PT3N0
14	10100	A	72	ΟΡΘΟΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	PT3N2bM1

ID: Ιστολογική έκθεση Φ:Φύλο ΗΛ:Ηλικία, ΔΙΑΦΟΡΟΠ: Διαφοροποίηση

Πίνακας 1

ΚΩΔΙΚΟΙ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

a/a	Φυσιολογικοί ιστοί	Καρκινικοί ιστοί	Πλάσμα από ασθενείς με καρκίνο
1	1N1	1C1	1C1
2	1N2	1C2	1C2
3	1N3	1C3	2Π
4	2NA	2CA	2Π
5	2NB	2CB	3Π1
6	3N1	3C1	3Π2
7	3N2	3C2	4Α
8	4N	4C	4Α
9	5N	5C	Π9
10	9N	9C	Π10
11	10N	10C	Π11
12	11N	11C	Π12
13			Χωρίς σήμανση
14			Χωρίς σήμανση

Πίνακας 2

B) ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

1) Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Lowry

Αρχή της μεθόδου

Σε αλκαλικό περιβάλλον οι πρωτεΐνες δεσμεύονται με ιόντα Cu^{2+} . Η μέθοδος Lowry βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό ανάγεται από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών- Cu^{2+} με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυανού χρώματος, η ένταση του οποίου φωτομετρείται στα 750 nm.

Αντιδραστήρια-Υλικά

- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, Fraction V, A2153, Sigma)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH, 40,0 g/mol, S5881, Sigma)
- Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3 , 105,99 g/mol, S7795, Sigma)
- Κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 294,10 g/mol, W302600, Sigma)
- Θεικός χαλκός (CuSO_4 , 159,61 g/mol, C1297, Sigma)
- Folin & Ciocalteu's phenol reagent (F9252, Sigma)
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γυάλινες κυψελίδες χαλαζία των 2 mL

Συσκευές

- Φωτόμετρο UV/Vis (Shimadzu UV-1601)

Διαλύματα Εργασίας

- 1. Διάλυμα 0,5 N NaOH:** Ζυγίζονται 2 g NaOH και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2. Διάλυμα 1,0 N NaOH:** Ζυγίζονται 4 g NaOH και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3. Διάλυμα 2 % w/v Na_2CO_3 :** Ζυγίζονται 2 g Na_2CO_3 και διαλύονται σε 1 L νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.
- 4. Διάλυμα 1 % w/v κιτρικού νατρίου:** Ζυγίζονται 1,139 g κιτρικού νατρίου και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

5. Διάλυμα 0,5 % w/v CuSO₄ σε 1 % w/v κιτρικό νάτριο : Ζυγίζονται 0,5 g CuSO₄ και διαλύονται σε 100 mL διαλύματος 1 % w/v κιτρικού νατρίου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

6. Μίγμα διαλυμάτων 2 % w/v Na₂CO₃ και 0,5 % w/v CuSO₄ (αναλογία 50:1): Σε 49 mL διαλύματος 2 % w/v Na₂CO₃ προστίθεται 1 mL διαλύματος 0,5 % w/v CuSO₄. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και στην συνέχεια απορρίπτεται.

7. Διάλυμα stock BSA (200 µg/mL) σε 0,5 N NaOH: Ζυγίζονται 20 mg BSA και διαλύονται σε 100 mL 0,5 N NaOH με ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 37 °C. Το διάλυμα stock φυλάσσεται στους -20 °C.

8. Διάλυμα εργασίας φαινόλης (αναλογία 1:1): Ο απαιτούμενος όγκος αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu phenol reagent αναμιγνύεται με ίσο όγκο νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και στην συνέχεια απορρίπτεται.

Πειραματική Διαδικασία

I. Προετοιμασία προτύπων BSA

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται διαδοχικά 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1,0 mL πρότυπου διαλύματος BSA (200 µg/mL) αντίστοιχα (εύρος συγκεντρώσεων 0-200 µg/mL). Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1,0 mL με διάλυμα 0,5 N NaOH.

II. Προετοιμασία δειγμάτων

Κατάλληλος όγκος δείγματος μεταφέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 0,5 mL. Στην συνέχεια, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1,0 N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1,0 mL με προσθήκη διαλύματος 0,5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται και είτε επώάζεται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση ανάλυση είτε φυλάσσεται στους 4 °C για επακόλουθη ανάλυση.

III. Κατεργασία προτύπων και δειγμάτων

Σε κάθε σωλήνα, προτύπων και δειγμάτων, προστίθενται από 5 mL διαλύματος 2 % w/v Na₂CO₃ - 0,5 % w/v CuSO₄. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 0,5 mL διαλύματος εργασίας φαινόλης, με άμεση ανάδευση κατά την προσθήκη και επώαση για 30 min. Η

φωτομέτρηση των δειγμάτων γίνεται σε γυάλινη κυψελίδα χαλαζία στα 750 nm (Πίνακας 3).

Αντιδραστήρια	Τυφλό	1	2	3	4	5	Δείγμα
BSA (mL)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	-
0,5 N NaOH (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0	-
Na ₂ CO ₃ : CuSO ₄ (αναλογία 50:1), (mL)	5	5	5	5	5	5	5
Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου							
Folin-Ciocalteu : H ₂ O (αναλογία 1:1), (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου							
Απορρόφηση στα 750 nm							
BSA (μg)	0	40	80	120	160	200	-

Πίνακας 3

IV. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των πρότυπων και με βάση την γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Excel, κατασκευάζεται διάγραμμα της μορφής $y=ax+b$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεΐνης) σύμφωνα με την γραμμική σχέση του νόμου του Beer.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά mL δείγματος. Η καμπύλη έχει γραμμική περιοχή περίπου 1-200 μg πρωτεΐνης.

2) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Αρχή της μεθόδου

Ηλεκτροφόρηση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός φορέα. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου,

από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η τριβή εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ως μέσα μετακίνησης χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, διότι αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και το μέγεθος των πόρων τους μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου. Τα μόρια μικρού μεγέθους, μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το προς ανάλυση δείγμα θερμαίνεται παρουσία ισχυρού ανιοντικού απορρυπαντικού, όπως το SDS. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται στο SDS και φορτίζονται αρνητικά. Λόγω του ότι το ποσοστό του SDS που προσδένεται στα πολυπεπτίδια είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους και ανεξάρτητο της αλληλουχίας τους, η μετακίνηση των συμπλόκων SDS-πολυπεπτιδίων εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους και επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων.

Υλικά και συσκευές

1. Bromophenol Blue Sodium Salt ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$, MW:691.9, Cat. No. B-8026, Sigma).
2. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400, $\lambda_{max}=550$ nm, S:22, 24/25, Bio-Rad).
3. Υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS) (Cat. No.161-0700, MW: 228.20, R:8,22,37,42/43, S:17,24,26,43, Bio-Rad).
4. Sodium dodecyl sulphate (SDS) (MW:288.38, Cat. No.161-0301, R: 22,36/38, S: 22, Bio-Rad).
5. Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (MW:154.17, Cat. No. 161-0200, 5 g, R: 22,37/38, S: 22,24/25, Bio-Rad).
6. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide, C_3H_5NO , MW:71.08, R:45-46-24/25-48/23/24/25, S:53-45, Merck).
7. Γλυκερόλη (Glycerol, $CH_2OHCHOHCH_2OH$, MW:92.09, Assay 99.5%, 2.5 L, Analar).

8. TEMED ($C_6H_{16}N_2$, MW:116.2, 99%, Cat. No.T-8133, R:11-20/22-34, S:16-26-36/37/39-45, Sigma).
9. Γλυκίνη (Glycine, MW:75.07, Cat. 161-0718, Bio-Rad).
10. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, C_2H_6OS , FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma).
11. Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Marker, Prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one- 72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas).
12. Trizma Base ($C_4H_{11}NO_3$, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma).
13. Μεθανόλη (Methanol, 1l=0.79 Kg, MW:32.04, Riedel-de Haen).
14. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba).
15. Απόλυτη Αιθανόλη (Ethanol absolute, 1L=0.788 Kg, assay=99.8%, MW:46.07, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen).
16. Σελοφάν για το στέγνωμα των gels (PolyLabo).
17. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad, Mini protean).

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode Buffer ή Running Buffer)

0.025 M Tris-base, 0.192 M Γλυκίνης, 0.1% SDS, pH=8.3 {**διάλυμα 10x**}

- 36 gr Tris-base ,172.8 gr Γλυκίνης και 12 gr SDS προστίθενται σε νερό και ρυθμίζεται το pH σε 8.3. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1200 mL.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8

Ζυγίζονται 6.0 gr Trizma base και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο στους 4°C.

3. Διάλυμα 10 % SDS

10 gr SDS διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4. Διάλυμα 10 % υπερθεϊκού αμμωνίου (APS)

0.1 gr υπερθειϊκού αμμωνίου διαλύονται σε 1 mL νερού. **Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.**

5. Διάλυμα 30 % ακρυλαμιδίου / δις ακρυλαμιδίου (BIS)

29.2 gr ακρυλαμιδίου και 0.8 gr bis-ακρυλαμιδίου διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C.

6. Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0.05 % (w/v)

2.5 mgr κυανού της βρωμοφαινόλης διαλύονται σε 5 mL νερού.

7. Διάλυμα 12% αιθανόλης

Αναμιγνύονται 60 mL αιθανόλης με 440 mL νερού και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

8. Διάλυμα χρωματισμού 1 % κυανού του Coomassie R-250 (Staining Buffer)

2 gr κυανού του Coomassie R-250 διαλύονται σε 200 mL νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

9. Διάλυμα χρώσης πηκτώματος

Αναμιγνύονται 250 mL μεθανόλης, 50 mL οξικού οξέος και 62.5 mL διαλύματος 1 % κυανού του Coomassie R-250. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 500 mL.

10. Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Buffer)

Αναμιγνύονται 300 mL μεθανόλης, 50 mL οξικού οξέος και 650 mL νερού.

11. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων

Αναμιγνύονται 0.3028 gr Trizma base, 0.5 gr SDS, 5 mL γλυκερόλης, 1 mL μερκαπτοαιθανόλης και 5 mgr κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 0.5 mL σε πλαστικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -20 °C.

12. Διάλυμα Μεταφοράς (Transfer Buffer) {Διάλυμα 10x}

6 gr Tris-base, 28.8 gr Glycine και 20 mL διαλύματος SDS 10%. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1200 mL.

Για διάλυμα 1x: 100 mL από 10x και 200 mL MeOH μέχρι τα 1000 mL.

Πειραματική πορεία

Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πλένονται οι γυάλινες πλάκες της συσκευής και τα spacers του kit με dH₂O και EtOH. Συναρμολογούνται σύμφωνα με τις οδηγίες στο kit.

Παρασκευή πηκτώματος διαδρομής (resolving gel)

Σε πλαστικό σωληνάριο corning των 50 mL αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον Πίνακα 4.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 10% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 12% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 15% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ 5% (Stacking gel)
H ₂ O	4 mL	3,4 mL	2,5 mL	3,5 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 1.5 M pH=8.8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 0.5 M pH=6.8	-	-	-	3 mL
10% SDS	100μL	100μL	100 μL	80 μL
Acrylamide / Bis-acrylamide 30%	3,3 mL	4 mL	5 mL	1,3 mL
Υπερθεϊκόαμμώνιο (APS)	100μL	100μL	100 μL	80 μL
TEMED	10μL	10 μL	10 μL	8μL

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτώματος διαδρομής 15% και πηκτώματος επιστοίβασης 5% για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED είναι υπεύθυνα για την έναρξη του πολυμερισμού γι' αυτό και προστίθενται στο τέλος. Αμέσως μετά την προσθήκη των διαλυμάτων, μεταφέρουμε το μίγμα του πηκτώματος ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης έως ότου φτάσει σε επίπεδο 0.5 εκατοστού κάτω από το κτένι και 2 cm κάτω από το άνω όριο του μικρού τζαμιού. Στην συνέχεια προσθέτουμε νερό στην επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου για την προστασία του από την επαφή με τον αέρα. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.

Παρασκευή πηκτώματος επιστοιβάσης (stacking gel)

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαδρομής, απομακρύνεται το νερό χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί. Σε πλαστικό σωληνάριο corning αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάσης, αφήνοντας πάλι τελευταία τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED, σύμφωνα με τον **πίνακα**. Αμέσως μετά την ανάμιξη το μίγμα επιστοιβάζεται προσεκτικά στο πήκτωμα διαδρομής και στη συνέχεια προστίθεται το κτένι για την δημιουργία των θέσεων. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μια περίπου 30 min. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρούνται οι γυάλινες πλάκες από την συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κτένι αφαιρείται και στο χώρο ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες, στις θέσεις των δειγμάτων, αλλά και στον εξωτερικό χώρο του πηκτώματος, σε ύψος περίπου πέντε εκατοστών, τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer).

Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα δείγματος προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να προστεθεί σε κάθε θέση είναι 20 μ L που αντιστοιχεί περίπου σε 80 μ g πρωτεΐνης. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C. Μετά το βρασμό τους, τα δείγματα τοποθετούνται με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης στις αντίστοιχες θέσεις. Στην πρώτη θέση συνήθως τοποθετούνται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για περίπου μια ώρα. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν το μέτωπο της βαφής φτάσει στο τέλος του πηκτώματος της διαδρομής.

Χρώση πρωτεϊνών του πηκτώματος

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες αποσυνδέονται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα βαφής χρωματισμού Coomassie R-250 και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για μισή ώρα ή έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματιστούν κυανές.

Αποχρωματισμός του πηκτώματος

Στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Buffer) και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου μείνουν χρωματισμένες στον επιθυμητό βαθμό μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πηκτώματος

Το ειδικό σελοφάν εμβαπτίζεται στο διάλυμα 12 % αιθανόλης για 2-3 λεπτά και απλώνεται πάνω σε ένα πλαίσιο. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στο σελοφάν, στο κέντρο του πλαισίου, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Ένα ακόμη πλαίσιο στερεώνεται πάνω στο προηγούμενο με τη βοήθεια συνδετήρων. Τα πλαίσια με το πήκτωμα τοποθετούνται κάθετα και αφήνονται για 2-3 ημέρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή για 12-16 ώρες σε ρεύμα αέρα.

3) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης και η βαφή των πηκτωμάτων, είναι ιδανική για την εξέταση όλων των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο δείγμα. Ωστόσο, δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, είναι απαραίτητη η χρήση ανοσοχημικών μεθόδων. Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF. Η μέθοδος αυτή της ανοσοαποτύπωσης ή western blotting, χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση της παρουσίας, σχετικής ποσότητας και μοριακού βάρους μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για την απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισωμάτων χρησιμοποιούνται ενζυμικοί δείκτες, συζευγμένοι σε δευτερεύοντα αντισώματα, οι οποίοι στη συνέχεια ανιχνεύονται με τη χρήση του κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται

σε φωτογραφικό φιλμ. Οι ζώνες αυτές στη συνέχεια μπορούν να αναλυθούν για περαιτέρω πληροφορίες, με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων. Στη περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε το ImageJ densitometry western blotting που επιτρέπει την σχετική ποσοτικοποίηση (χωρίς απόλυτες τιμές) στις ζώνες πρωτεΐνης από ταινίες western blot. Η ποσοτικοποίηση αντικατοπτρίζει τις σχετικές ποσότητες ως αναλογία κάθε ζώνης πρωτεΐνης σε σχέση με τον έλεγχο φόρτωσης λωρίδας. Η ίδια τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του DNA ή του RNA από φιλμ.

Το ImageJ είναι ένα δωρεάν λογισμικό βασισμένο στο Java από τον Wayne Rasband από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (HPIA) και είναι διαθέσιμο για λήψη στο διαδύκτιο.

Υλικά και συσκευές

1. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Hoffer TE70 Semi-dry, Transfer unit, 80-6210-34, Serial No. 20098784, Amersham Biosciences Corp, USA).
2. Μembrάνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Immuno-Blot PVDF membrane for N terminal sequencing, Polyvinylidene difluoride, 140-150 μg πρωτεΐνης/ cm^2 μεμβράνης, Cat. No. 162-0177, 26 cmx3.3 m, 1 roll, Bio-Rad).
3. Δηθητικό χαρτί Whatman.
4. Blotter paper (14x16 cm, Cat. No. 80-6211-67, Amersham Biosciences).
5. Tween-20 (d=1.095, S:24/25, Cat. No. 27,434-8, Sigma).
6. Trizma Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, FW:121.14, min 99.8 %, ερεθιστικό, Cat. No. T-1503, Sigma).
7. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (Horseradish Peroxidase labelled antibodies, ECL 1 & 2 RPN 2209 Amersham Biosciences, UK, περιέχει τα εξής: Detection reagent 1, 125 ml, Cat. No. 1059243, Detection reagent 2, 125 ml, Cat. No. 1059250).
8. Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (LifeRay 24x30 cm, ID. No., LI000216034, Ferrania Incorp. Italy).
9. Φιλμ (Kodak Biomax Xar Film, Scientific Imaging Film for Biological Imaging, 13x18 cm, 50 sheets, Kodak Industrie, Cedex France).
10. Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12, Ref. Cat. No. 5070933, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France).

11. Υγρό μονιμοποίησης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer, Ref. Cat. No. 5071071, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France).

12. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου.

Διαλύματα εργασίας

1. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

7.2 gr γλυκίνης, 1.5 gr Tris-base και 5 mL 10 % SDS προστίθενται σε 400 mL νερού και αναδεύονται. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL με την προσθήκη 100 mL μεθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

2. Διάλυμα έκπλυσης TBS (10x)

24.2 gr Tris-base και 80 gr NaCl προστίθενται σε νερό συνολικού όγκου 1 L και ρυθμίζεται το pH στα 7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Διάλυμα έκπλυσης εργασίας TBS-Tween 20 (=αναστολέας πρωτεασών για τη μη καταστροφή των πρωτεϊνών)

100 mL του διαλύματος έκπλυσης 10x αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 1 L. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL Tween-20. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

4. Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Development)

50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

5. Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (Fixer)

50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

Αντισώματα

Πρωτεύοντα αντισώματα

Mouse monoclonal anti-secretory phospholipase A2 group II (sc-58363, Santa Cruz Biotechnology)

Rabbit polyclonal anti-PLA2G3 (PA5-22135, Invitrogen)

Rabbit polyclonal anti-peroxiredoxin 6 (ab28444, Abcam)

Δευτερογενή Αντισώματα

Goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology)

m-IgGκ BP-HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology)

Πειραματική Πορεία

Προετοιμασία της μεμβράνης PVDF

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα, χρησιμοποιείται μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη πριν από την χρήση της, κόβεται σε διαστάσεις 6 cm x 9 cm, διαβρέχεται με μεθανόλη, στη συνέχεια εμβαπτίζεται πλήρως σε νερό και τελικά τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς, έως την χρήση της. Η μεμβράνη θα πρέπει να διαχειρίζεται πάντα με γάντια.

Μεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς. Εκεί το τζάμι αναποδογυρίζεται έτσι ώστε το gel να είναι από κάτω. Έτσι ξεκολλάει. Στη συσκευή μεταφοράς τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά: 2 χοντρά διηθητικά χαρτιά, 1 απλό, η μεμβράνη PVDF, το πήκτωμα, 1 απλό και 2 χοντρά διηθητικά χαρτιά που έχουν εμβαπτισθεί σε διάλυμα μεταφοράς. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ αυτών. Η PVDF βρίσκεται πάντα προς τη μεριά του θετικού πόλου (κόκκινος πόλος). Η μεταφορά επιτυγχάνεται στα 75 mA για ένα πήκτωμα ή στα 150 mA για δύο, για χρονικό διάστημα μεταξύ μίας και μιάμισης ώρας. Η διάρκεια μεταφοράς εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Για μεγαλύτερο μοριακό μέγεθος, απαιτείται περισσότερος χρόνος. Μετά το πέρας της μεταφοράς το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Σήμανση πρωτεϊνών στη μεμβράνη

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται για μία έως τέσσερις ώρες σε ψυχρό περιβάλλον (4 °C) με διάλυμα 5% γάλακτος-διαλύματος έκπλυσης (Blocking Buffer) για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται και επωάζεται για όλη τη νύχτα (overnight) σε

αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το κατάλληλο μίγμα αντισωμάτων σε διάλυμα TBS-Tween 20. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες εκπλύσεις με TBS-Tween 20 και μιάμιση ώρα επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, αντι-αντίσωμα, σε διάλυμα TBS-Tween 20. Το δευτερεύον αντίσωμα είναι συζευγμένο με τη χημική ουσία (ένζυμο) που προκαλεί χημειοφωταύγεια. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 5 λεπτά.

Εμφάνιση πρωτεϊνών

Η μεμβράνη τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση του διαλύματος, και επωάζεται για 5 λεπτά με το μίγμα (1:1) χημειοφωταύγειας (ECL). Στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης. Στον σκοτεινό θάλαμο, κόβεται κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με την μεμβράνη, τοποθετείται πάνω στην μεμβράνη, σημειώνονται τα άκρα της με μαρκαδόρο και η κασετίνα κλείνεται. Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα μερικά λεπτά (συνήθως 9 λεπτά). Στη συνέχεια το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης (Development) για μερικά λεπτά έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες, εκπλένεται καλά με νερό και τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

4) Απομόνωση ολικού RNA

Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση RNA είναι μία ευαίσθητη μέθοδος, κρίσιμη για την εκτέλεση διαφόρων πειραμάτων μοριακής βιολογίας. Κατά την διαδικασία απομόνωσης, είναι σημαντικό να αποφευχθεί η αποδόμηση του RNA. Τα κύτταρα λύνονται με επώαση σε ένα διάλυμα που περιέχει μεγάλες ποσότητες χαοτροπικών ιόντων. Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης απενεργοποιεί αμέσως τις RNάσες και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης, οι οποίες ευνοούν την προσρόφηση του RNA στην μεμβράνη πυριτίου. Το DNA, το οποίο είναι επίσης δεσμευμένο στην μεμβράνη πυριτίου, απομακρύνεται από ένα διάλυμα rDNάσης, το οποίο εφαρμόζεται απευθείας στην μεμβράνη πυριτίου. Πλύσεις με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα αφαιρούν τα άλατα, τους μεταβολίτες και τα μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά. Το καθαρό RNA εκλύεται τελικά υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με νερό απαλλαγμένο από RNάσες.

Αντιδραστήρια-Υλικά

- NucleoSpin RNA (50 preps, 740955.50. Macherey-Nagel)
- Απόλυτη Αιθανόλη (C₂H₆O, 46,07 g/mol, 1.00983.2511, Merck)
- Αιθανόλη 70% (C₂H₆O, 46,07 g/mol, Riedel-de Haën)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (C₂H₆OS, 78,13 g/mol, M3148, Sigma)
- RNase-free tips 0,1-10 µL (5 racks, 70.1130.200, Sarstedt)
- RNase-free tips 20-200 µL (5 racks, 70.760.202, Sarstedt)
- RNase-free eppendorfs (Certified PCR performance tested, 72.737.002, Sarstedt)

Συσκευές

- Θάλαμος νηματώδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
- Φυγόκεντρος για eppendorfs (MIKRO 20, Hettich zentrifugen)

Διαλύματα Εργασίας

1. Wash Buffer RA3: Σε 12 mL του Buffer RA3 προστίθενται 48 mL απόλυτης αιθανόλης και το μίγμα αναδεύεται σχολαστικά. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και είναι σταθερό για περίπου έναν χρόνο.

2. Recombinant DNase (rDNase): Στο σωληνάριο με την λυοφιλοποιημένη rDNase προστίθενται 550 µL και ακολουθεί επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αναδεύεται προσεκτικά (όχι με vortex) ανά διαστήματα για την διάλυση της rDNase. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα nuclease-free eppendorfs, αποθηκεύεται στους -20 °C και είναι σταθερό για περίπου 6 μήνες. Το κάθε eppendorf δεν πρέπει να ξεπαγώσει περισσότερες από 3 φορές.

3. DNase reaction mixture: Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται για κάθε απομόνωση 10 µL rDNase και 90 µL Reaction Buffer for rDNase (από το kit). Το διάλυμα αναδεύεται προσεκτικά, παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

4. Master premix Buffer RA1-Απόλυτη αιθανόλη: Σε αποστειρωμένο σωλήνα των 15 ή 50 mL προετοιμάζεται διάλυμα Buffer RA1-απόλυτης αιθανόλης σε αναλογία 1:1. Για κάθε 100 µL δείγματος αναμιγνύονται 300 µL Buffer RA1 και 300 µL απόλυτης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται έντονα, παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

Πειραματική Διαδικασία

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε τόσο καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Απομόνωση ολικού RNA από ιστό

1. *Λύση ιστών:* Μεταφορά ιστών σε αποστειρωμένους σωλήνες και προσθήκη 1,8 mL RA1 και 18 µL β-μερακαπτοιθανόλης. Ομογενοποίηση ιστού.
2. *Διήθηση λυμένων κυττάρων και ιστών:* Το εναιώρημα μεταφέρεται στο *NucleoSpin Filter Midi* (από το kit), το οποίο τοποθετείται σε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρείται για 10 min στα 4.500 g.
3. *Καθορισμός συνθηκών πρόσδεσης RNA:* Το *NucleoSpin Filter Unit* αφαιρείται και προστίθενται 1,8 mL αιθανόλης 70% στο σωληνάκι συλλογής. Ακολουθεί πολύ καλή εναιώρηση με πιπέτα.
4. *Πρόσδεση RNA:* Το *NucleoSpin RNA Midi Column* (από το kit) τοποθετείται σε ένα σωληνάκι φυγοκέντρωσης 2 mL (από το kit). Το εναιώρημα μεταφέρεται στο *NucleoSpin RNA Midi Column* και φυγοκεντρείται για 3 min στα 4.500 g. Το *NucleoSpin RNA Midi Column* τοποθετείται σε καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα.
5. *Αφαλάτωση μεμβράνης silica:* Στο *NucleoSpin RNA Midi Column* προστίθενται 2,2 mL MDB και φυγοκεντρείται για 3 min στα 4.500 g για την ξήρανση της μεμβράνης.
6. *Πέψη DNA:* Προσθήκη 250 µL DNase reaction mixture απ' ευθείας στο κέντρο της μεμβράνης silica της στήλης. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. *1^η πλύση (ξήρανση της μεμβράνης):* Προσθήκη 2,6 mL από το Buffer RAW2 (από το kit) στο *NucleoSpin RNA Midi Column*. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 min στα 4.500 g και τοποθέτηση του *NucleoSpin RNA Midi Column* σε καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα.

8. *2^η πλύση*: Προσθήκη 2,6 mL από το Buffer RA3 (από το kit) στο *NucleoSpin RNA Midi Column*. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στα 4.500 g. Το περιεχόμενο από το σωληνάκι απορρίπτεται και αυτό τοποθετείται ξανά κάτω από την στήλη.
9. *3^η πλύση*: Προσθήκη 2,6 mL από το Buffer RA3 στο *NucleoSpin RNA Midi Column* και φυγοκέντρηση για 3 min στα 4.500 g, προκειμένου η μεμβράνη να ξηραθεί πλήρως.
10. *Έκλυση ολικού RNA*: Η στήλη τοποθετείται σε nuclease-free tube (από το kit) και σε αυτήν προστίθενται 600 μ L RNase-free H₂O (από το kit). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στα 4.500 g για την εκχύλιση του RNA.

5) Ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας και έλεγχος καθαρότητας RNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση καθώς και για τον έλεγχο της καθαρότητας των δειγμάτων RNA είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση, η οποία βασίζεται στην αρχή ότι το RNA απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (260 nm), λόγω των πυριμιδινικών και ιμιδαζολικών δακτυλίων που συνιστούν τον σκελετό των νουκλεϊνικών οξέων. Ένα μέρος της ακτινοβολίας διαπερνά το δείγμα, ενώ ένα άλλο απορροφάται από αυτό. Όσο περισσότερη ακτινοβολία απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή του RNA στο δείγμα και τόσο μεγαλύτερη θα είναι η οπτική πυκνότητα (OD).

Αντιδραστήρια-Υλικά

- Πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου
- Γυάλινες κυψελίδες χαλαζία των 2 mL

Συσκευές

- Φωτόμετρο UV/Vis (Shimadzu UV-1601)

Πειραματική Διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας και τον έλεγχο της καθαρότητας των απομονωμένων RNAs είναι η εξής:

1. Ποσότητα ίση με 10 μL από τα απομονωμένα RNAs αραιώνεται με δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο σωληνάκι eppendorf (αραίωση 100 φορές)
2. Για την φωτομέτρηση στο UV/Vis χρησιμοποιούνται δύο γυάλινες κυψελίδες χαλαζία. Η μια πάντα περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, το οποίο χρησιμοποιείται για μηδενισμό (τυφλό), και η άλλη κυψελίδα περιέχει κάθε φορά το εκάστοτε δείγμα RNA.
3. Η απορρόφηση μετράται στα 260 nm (απορροφούν μέγιστα τα νουκλεϊνικά οξέα), αφού προηγουμένως έχει γίνει μηδενισμός σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
4. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται στα 280 nm (απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες), αφού προηγουμένως έχει γίνει μηδενισμός σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
5. Η συγκέντρωση του διαλύματος RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι τα 40 μg RNA/mL δίνουν απορρόφηση ίση με την μονάδα στα 260 nm, με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Περιεκτικότητα απομονωμένου RNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Αραίωση}$$

Ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος και θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 1,8 και του 2,2. Τιμές μικρότερες του 1,6 υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα RNA, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2,2 φανερώνουν την παρουσία μη αμελητέας ποσότητας DNA στο εκχύλισμα RNA.

6) Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT), ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση της αντίδρασης μεταγραφής (reverse transcription, RT), δηλαδή η μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA), βασίζεται στην δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RTase). Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία δημιουργεί συμπληρωματικά μόρια DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA. Αρχικά, στα μόρια RNA υβριδοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή, στα οποία η RTase προσθέτει τα συμπληρωματικά με τα RNA δεοξυριβονουκλεοτίδια για την δημιουργία του cDNA. Όπως είναι εμφανές, ο εκκινητής αυτός καθορίζει την ειδικότητα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, δηλαδή ποια μόρια RNA μόρια θα μεταγραφούν αντίστροφα σε cDNA. Τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) και ο ειδικός εκκινητής για το συγκεκριμένο γονίδιο.

Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό μικρών αλληλουχιών DNA από ένα μεγαλύτερο μόριο δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Η PCR απαιτεί την χρήση ενός ζεύγους εκκινητών, που είναι συμπληρωματικά προς μια αλληλουχία που ορίζεται σε κάθε μία από τις δύο έλικες του DNA. Οι εκκινητές επιμηκύνονται με την δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (*Taq* polymerase) παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε ένα αντίγραφο να κατασκευάζεται από την καθορισμένη αλληλουχία. Οι νεοσύστατοι

κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την σύνθεση του DNA. Αυτό οδηγεί σε λογαριθμική αύξηση.

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) βασίζεται σε φθορίζουσες χρωστικές ή σημασμένους ιχνηθέτες που εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόνο όταν προσδεθούν στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης, αντανακλώντας, έτσι, στην ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται κατά την PCR σε πραγματικό χρόνο ανιχνεύεται με μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, κι όχι στο τέλος της αντίδρασης, όπως δηλαδή συμβαίνει στην συμβατική PCR. Οι καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης διαχωρίζονται κατά την λογαριθμική φάση της αντίδρασης, αντανακλώντας την διαφορά της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. Όπως είναι αναμενόμενο, όσα περισσότερα μόρια υποστρώματος περιέχει το αρχικό μίγμα της αντίδρασης, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για την πρώτη ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υποβάθρου.

Με άλλα λόγια, στην PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται ανίχνευση του σήματος στην λογαριθμική φάση της αντίδρασης, η οποία αντανακλά την αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου στο μίγμα της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υποβάθρου, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος».

Φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην PCR σε πραγματικό χρόνο είναι οι ασύμμετρες χρωστικές κυανίνης SYBR Green, LC Green, EVA Green, SYTO9, BEBO και BOXTO. Οι χρωστικές αυτές δεν φθορίζουν σχεδόν καθόλου όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα της αντίδρασης, όταν όμως προσδεθούν στην μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA φθορίζουν έντονα. Κατά την PCR, ο φθορισμός των χρωστικών αυξάνει καθώς συσσωρεύονται τα προϊόντα της PCR.

Η χρωστική SYBR Green προσδένεται στην μικρή αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού της μέχρι και εκατό φορές. Πρόκειται για μια πολύ σταθερή χρωστική, αφού μόλις το 6 % της δράσης της χάνεται μετά από 30 θερμικούς κύκλους της PCR. Κατά το στάδιο της επέκτασης των εκκινητών και του σχηματισμού του δίκλωνου προϊόντος της PCR, μόρια της χρωστικής SYBR Green προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο dsDNA, με αποτέλεσμα να αυξάνει και πάλι ο φθορισμός, το μέγεθος σήματος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης σε κάθε κύκλο.

Αντιδραστήρια-Υλικά

- iTaq Universal SYBR Green one-step kit (172-5150, BioRad)
- Primers *PRDX6* (Qiagen)
- Primers *PLA2G3* (Qiagen)
- Primers *PLA2G2A* (330001PPH05823B, Qiagen)
- Primers *GAPDH* (QT01192646, Qiagen)
- RNase-free tips 0,1-10 μ L (5 racks, 70.1130.200, Sarstedt)
- RNase-free tips 20-200 μ L (5 racks, 70.760.202, Sarstedt)
- RNase-free eppendorfs (Certified PCR performance tested, 72.737.002, Sarstedt)

Συσκευές

- Θάλαμος νηματώδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
- Mini Opticon PCR System (Real-time PCR System, BioRad)

Πειραματική Διαδικασία

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν 50 ng απομονωμένου RNA από κάθε δείγμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 20 μ L. Σε κάθε σωληνάκι προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα RNA που να αντιστοιχεί στα 50 ng, 2 μ L ζεύγους εκκινητών (forward-reverse primers *PRDX6*, *PLA2G3*, *PLA2G2A* και *GAPDH*), 10 μ L μίγματος *iTaq* DNA πολυμεράσης, ιόντων Mg^{2+} , dNTPs, σταθεροποιητών/αναστολέων και φθοριστικής SYBR Green και 0,25 μ L αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RTase). Η ανάμιξη των παραπάνω αντιδραστηρίων γίνεται τους 4 °C για την αποφυγή της εκκίνησης των ενζυμικών αντιδράσεων μεταγραφής και πολλαπλασιασμού. Συνίσταται η παρασκευή δύο αρχικών μιγμάτων (master mix) ένα για κάθε εκκινητή πριν τον διαμοιρασμό σε κάθε σωληνάκι. Παράλληλα, ετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου: α) αρνητικό δείγμα ελέγχου χωρίς RNA: γίνεται έλεγχος των αντιδραστηρίων για επιμόλυνση και β) αρνητικό δείγμα ελέγχου χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση: γίνεται έλεγχος για επιμόλυνση του δείγματος RNA με DNA. Τα

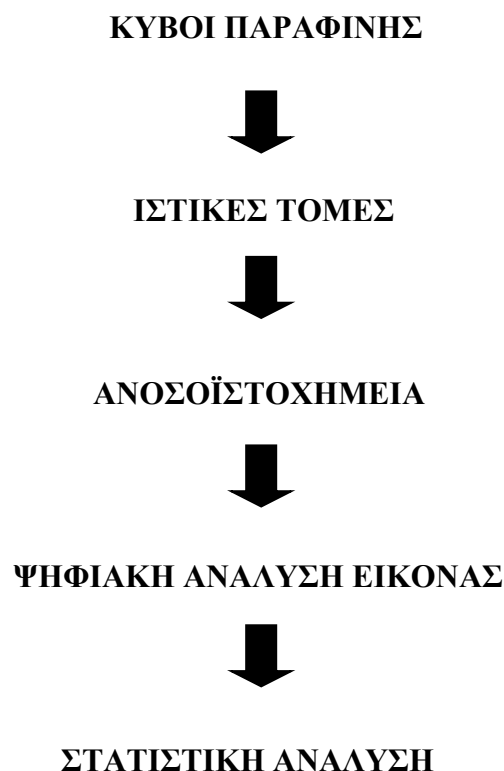
σωληνάκια κλείνονται προσεκτικά και φορώντας πάντα γάντια και το περιεχόμενό τους αναδεύεται σε ανακινούμενη βάση. Ακολούθως, τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις της συσκευής PCR. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά το οποίο ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 5 min στους 50 °C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με την ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στην συνέχεια, για 5 min στους 95 °C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, για 40 sec στους 94 °C για την μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, για 40 sec στους 60 °C και για 1 min στους 70 °C για την επέκταση των κλώνων. Πραγματοποιήθηκαν 42 κύκλοι ενίσχυσης του cDNA. Οι αλληλουχίες του cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΐδης (*GAPDH*). Να σημειωθεί ότι τα γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του cDNA, που αντανακλά την ποιότητα του RNA, καθώς και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

ΜΕΡΟΣ Β

1. Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του βιοπτικού υλικού

Το υλικό αναδύθηκε από την αρχειακή ιστοική βάση του Παθολογοανατομικού Τμήματος του Γ.Ν. Χαλκίδας (Έγκριση Επιστημονικού Συμβουλίου 9586/12-05-2021) και αφορούσε σε - εμπεδωμένα σε κύβους παραφίνης – 30 σποραδικά πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, προϊόντα κολεκτομής, βαθμονομημένα - όσον αφορά τη διαφοροποίηση - σύμφωνα με τα ιστολογικά κριτήρια της WHO (τυποποίηση-διαφοροποίηση-σταδιοποίηση). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ήταν 77 έτη (53-90). Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί εντερικοί βλεννογόνοι ως αυτοί ελήφθησαν από υγιή ιστοικά όρια πέριξ των όγκων. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα των εξεταζόμενων περιπτώσεων περιγράφονται με τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε πρωτεΐνη στην σχετική παράγραφο.

2. Εργαστηριακός αλγόριθμος μελέτης



Προοδευτική ενυδάτωση των τομών (Hydration with degraded alcohol)

100% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

96% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

80% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

70% Αιθανόλη εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

Αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης (Peroxidase blocking)

Επώαση των τομών σε διάλυμα 0,03% H₂O₂ για 5 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων (Antigen Retrieval)

Επώαση των τομών με το πρωτοταγές αντίσωμα για 40 και 60 min, αντίστοιχα.

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Σύνδεση με το σύμπλεγμα Υπεροξειδάσης-Πολυμερούς (Peroxidase Labelled Polymer)

Επώαση των τομών με διάλυμα σημασμένης με πολυμερές δεξτράνης Υπεροξειδάσης (Horseradish peroxidase labeled polymer-HRP LP)

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Προσθήκη 3 σταγόνων διαλύματος χρωμογόνου DAB για 30 min

Έκπλυση με αποσταγμένο H₂O για 5 min x 2 φορές

Εμβάπτιση των τομών σε ισοτονικό διάλυμα TBS για 5 min x 2 φορές

Αντίχρωση και Επικάλυψη

Εμβάπτιση σε διάλυμα Αιματοξυλίνης (Hematoxylin MAYRES-water based) για 5-10 δευτερόλεπτα

Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 2-3 min

Προοδευτική αφυδάτωση (Dehydration with graded alcohol)

70% Αιθανόλη	εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου
85% Αιθανόλη	εμβάπτιση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου
96% Αιθανόλη	εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου
100% Αιθανόλη	εμβάπτιση για 3 min x 2 φορές σε θερμοκρασία δωματίου

Εμβάπτιση σε καθαρή Ξυλόλη για 2-3 min x 3 φορές και επικόλληση καλυπτρίδων (επικάλυψη με Histomount αμέσως πριν εξατμιστεί η Ξυλόλη).

Η όλη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην παράκαμψη της δέσμευσης με τη βιοτίνη αποδίδοντας καθαρότερο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας I 6000 της εταιρείας Biogenex. Ως αποδεκτή ανά δείκτη κρίθηκε η ανοσοϊστοχημική χρώση ως εξής:

Ομαδοποίηση (grouping) ψηφιακής ανάλυσης εικόνας για την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης

MARKER	ΠΡΟΤΥΠΟ ΧΡΩΣΗΣ
PLA2G2A	ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ/MEMBRANΗ
PLA2G3	ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ/MEMBRANΗ
PRDX-6	ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ/MEMBRANΗ

Ψηφιακή ανάλυση εικόνας (Digital Image Analysis)

Οι μετρήσεις έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν με ψηφιακή ανάλυση εικόνας (Digital Image analysis-DIA). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PLA2G2A, PLA2G3, PRDX-6 αξιολογήθηκαν ποσοτικά με εκτίμηση των αντίστοιχων επιπέδων έντασης χρώσης (αξιολόγηση πυκνομετρίας) στα χρωματισμένα κακοήθη κύτταρα. Πραγματοποιήσαμε DIA χρησιμοποιώντας ένα ημι-αυτόματο σύστημα [hardware: Microscope CX-31, (Olympus, Melville, NY, USA) εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Sony, Tokyo, Japan). Windows XP/NIS-Elements Software AR v3.0, (Nikon Corp, Tokyo, Japan)]. Εντοπίστηκαν περιοχές ενδιαφέροντος ανά τομή ιστού (5 οπτικά πεδία σε μεγέθυνση $\times 400$) και καταχωρήθηκαν σε μια ψηφιακή βάση δεδομένων ως στιγμιότυπα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή μιας συγκεκριμένης μακροεντολής (διάχυτη μεμβρανώδης και κυτταροπλασματική/υπομεμβρανώδης έκφραση για κύτταρα όγκου, σύμφωνα με το φύλλο δεδομένων του κατασκευαστή). Με βάση έναν αλγόριθμο, μετρήθηκε ανεξάρτητα η ένταση της χρώσης των τομών φυσιολογικού ιστού (μάρτυρας) και συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες τιμές σε τομές κακοήθους ιστού. Ένα ευρύ φάσμα τιμών συνεχούς κλίμακας του γκρι (0-255) στην ανάλυση RedGreenBlue (RGB) ήταν διαθέσιμο για τη διάκριση διαφορετικών επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης. Σε αυτήν την ψηφιοποιημένη διαδικασία, οι τιμές της έντασης της ανοσοχρώσης που μειώνονται στο 0 θεωρούνται ως προοδευτική υπερέκφραση του δείκτη, ενώ οι τιμές που αυξάνονται στο 255 δείχνουν προοδευτική απώλεια της έντασης της χρώσης. Όλα τα αποτελέσματα και οι τιμές DIA φαίνονται στους πίνακες των αποτελεσμάτων .

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού στατιστικής SPSS version 20 (Stat software Inc Chicago, IL, USA). Εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες Chi Square test και kappa analysis για τη διενέργεια των συγκρίσεων μεταξύ των της ανοσοϊστοχημικής και μοριακής ανάλυσης και των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων, αντίστοιχα. Επιπλέον εφαρμόστηκαν περιγραφικά και συμπερασματικά τεστ. Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται σε πίνακες συχνοτήτων. Για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ ποιοτικών και ποσοτικών

μεταβλητών, λόγω του μικρού αριθμού των ατόμων σε κάθε ομάδα, εφαρμόστηκαν τα μη παραμετρικά τεστ Mann-Whitney, Kruskal-Wallis και Fisher. Οι κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το φύλο, ο βαθμός διαφοροποίησης, το στάδιο της νόσου, η τοπογραφία των όγκων, καθώς και η μέγιστη διάμετρος. Παραμετρικά κριτήρια t tests και τιμές σύγκρισης στους μέσους όρους εφαρμόστηκαν για την σύγκριση έκφρασης των καρκινωμάτων σε σχέση με τους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς. Τέλος, ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ανωτέρω συσχετίσεων ορίστηκε $p < 0,05$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α

1) Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε δείγματα πλάσματος με τη μέθοδο Lowry

Με βάση τις απορροφήσεις των πρότυπων και την γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, δημιουργήθηκε διάγραμμα της μορφής $y=ax+b$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεΐνης) σύμφωνα με την γραμμική σχέση του νόμου του Beer (λογισμικό Excel). Υπολογίστηκε η άγνωστη συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη με βάση την πρότυπη καμπύλη. Έγινε αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά mL δείγματος (Πίνακας 5). Η καμπύλη είχε γραμμική περιοχή περίπου 1-200 μg πρωτεΐνης.

a/a	Κωδικός	Αραίωση	Abs (750 nm)	Total Protein (mg/mL)
1	1C1	70 φορές	0,298	17,18
2	1C2	70 φορές	0,305	17,59
3	2Π	70 φορές	0,271	15,59
4	2Π	70 φορές	0,266	15,29
5	3Π1	70 φορές	0,269	15,47
6	3Π2	70 φορές	0,275	15,82
7	4A	70 φορές	0,304	17,53
8	4A	70 φορές	0,31	17,88
9	Π9	70 φορές	0,287	16,53
10	Π10	70 φορές	0,277	15,94
11	Π11	70 φορές	0,283	16,29
12	Π12	70 φορές	0,322	18,59
13	Δείγμα χωρίς σήμανση	70 φορές	0,317	18,29
14	Δείγμα χωρίς σήμανση	70 φορές	0,281	16,18

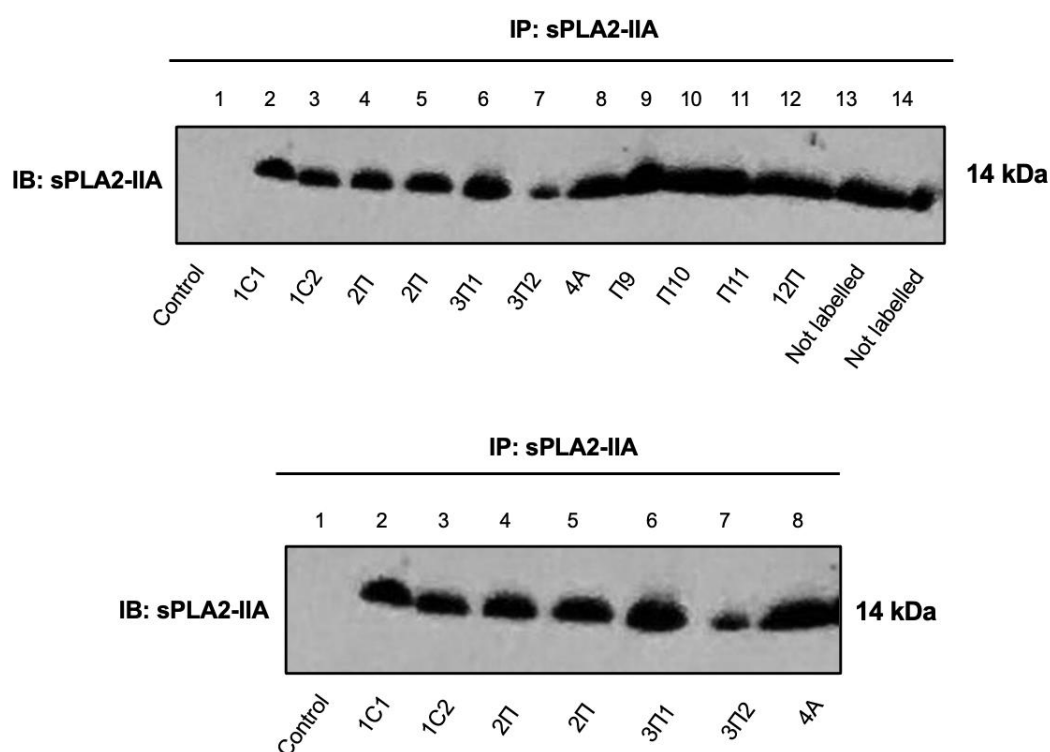
Πίνακας 5

2) Ανοσοαποτύπωση

Με την ανοσοαποτύπωση (western blotting) χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα για την ανίχνευση της παρουσίας, της σχετικής ποσότητας και του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ενώ για την απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικοί δείκτες, συζευγμένοι σε δευτερεύοντα αντισώματα. Οι ενζυμικοί δείκτες ανιχνεύθηκαν με τη χρήση του κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας. Η ακτινοβολία αποτυπώθηκε σε φωτογραφικό φιλμ. Οι ζώνες αυτές αναλύθηκαν για περαιτέρω πληροφορίες, με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων και συγκεκριμένα με Image J Densytometric Analysis (ημιποσοτική μέθοδος).

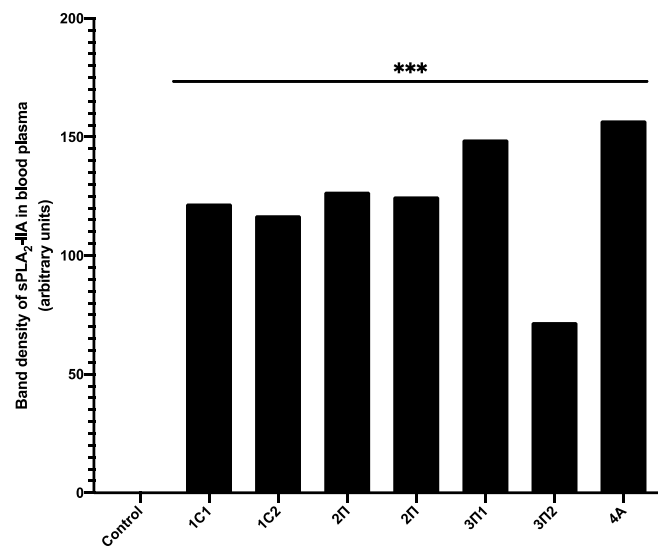
i) Ισομορφή sPLA2-IIA

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 1. Το γονίδιο εκφράστηκε ισχυρά σε 13 δείγματα (το 4A ανεπαρκές) με ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης ενώ από τα 13 δείγματα τα 6 βρέθηκαν εκτός γραμμικής συσχέτισης.



Εικόνα 1

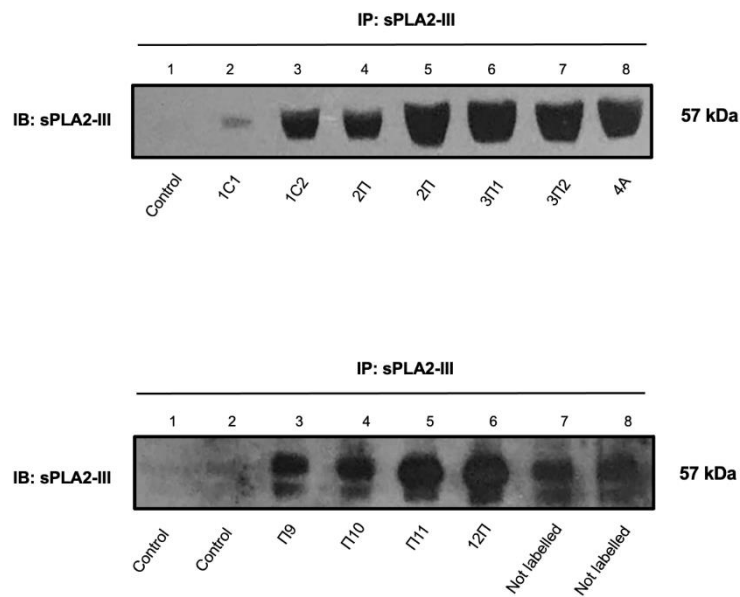
Αναγνωρίστηκε στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης sPLA2-IIA στο πλάσμα σε σχέση με υγιή μάρτυρα όπως φαίνεται στο παρακάτω Γράφημα 1.



Γράφημα 1

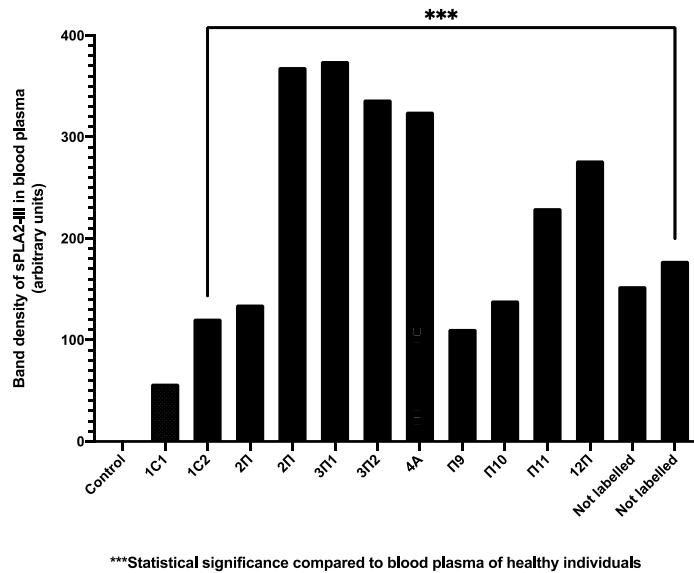
ii) Ισομορφή sPLA2-III

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην ακόλουθη Εικόνα 2. Το γονίδιο εκφράστηκε σε 13 δείγματα (το 4A ανεπαρκές) με ισχυρή έκφραση πρωτεΐνης σε 12 από αυτά (εκτός από το 1C1 και τον υγιή μάρτυρα).



Εικόνα 2

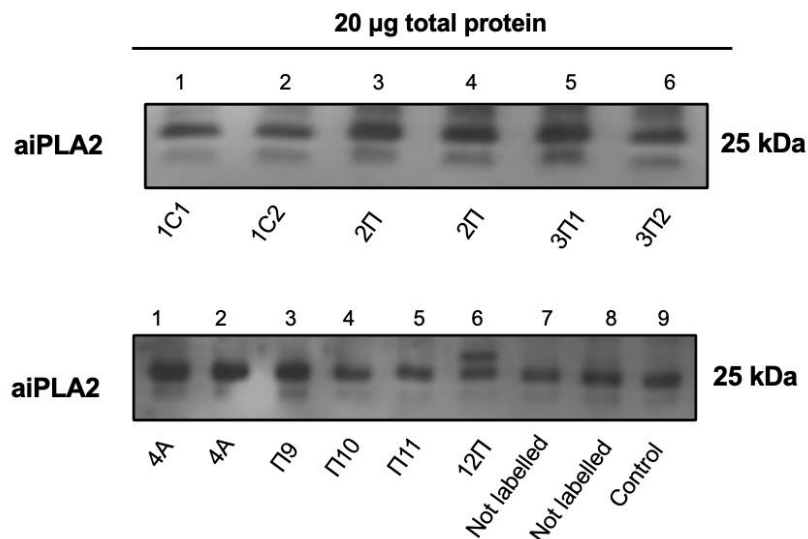
Αναγνωρίστηκε στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης sPLA2-III στο πλάσμα σε σχέση με υγιή μάρτυρα όπως φαίνεται στο παρακάτω Γράφημα 2.



Γράφημα 2

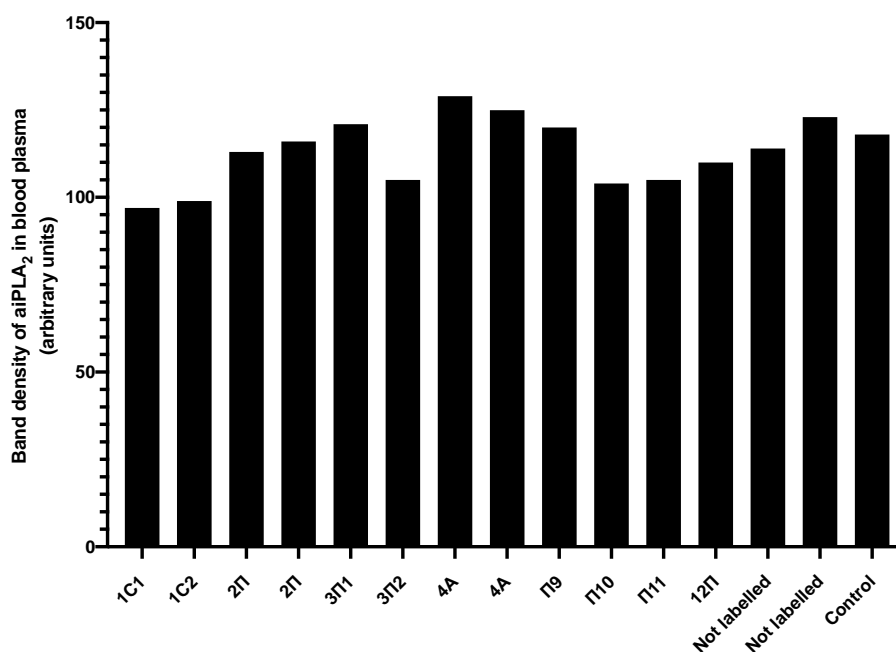
iii) Ισομορφή aiPLA2-PRDX6

Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3. Το γονίδιο εκφράστηκε ισχυρά σε 14 δείγματα όπως επίσης και στους υγιείς μάρτυρες.



Εικόνα 3

Δεν αναγνωρίστηκε στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης aiPLA-PRDX6 στο πλάσμα σε σχέση με υγιή μάρτυρα όπως φαίνεται στο παρακάτω Γράφημα 3.



Γράφημα 3

3) Απομονώσεις RNA

Αποφεύχθηκε η αποδόμηση του RNA. Απενεργοποιήθηκαν οι RNάσες που ευνόησαν την προσρόφηση του RNA σε μεμβράνη πυριτίου. Το DNA απομακρύνθηκε μέσω rDNάσης. Έγινε φασματοφωτομετρική ανάλυση (RNA απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία στα 260 nm ενώ οι πρωτεΐνες στα 280 nm). Όσο περισσότερη ακτινοβολία απορροφήθηκε από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωσή του RNA στο δείγμα και τόσο μεγαλύτερη ήταν η οπτική πυκνότητα (OD).

Η συγκέντρωση του διαλύματος RNA υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Περιεκτικότητα απομονωμένου RNA (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Αραίωση}$$

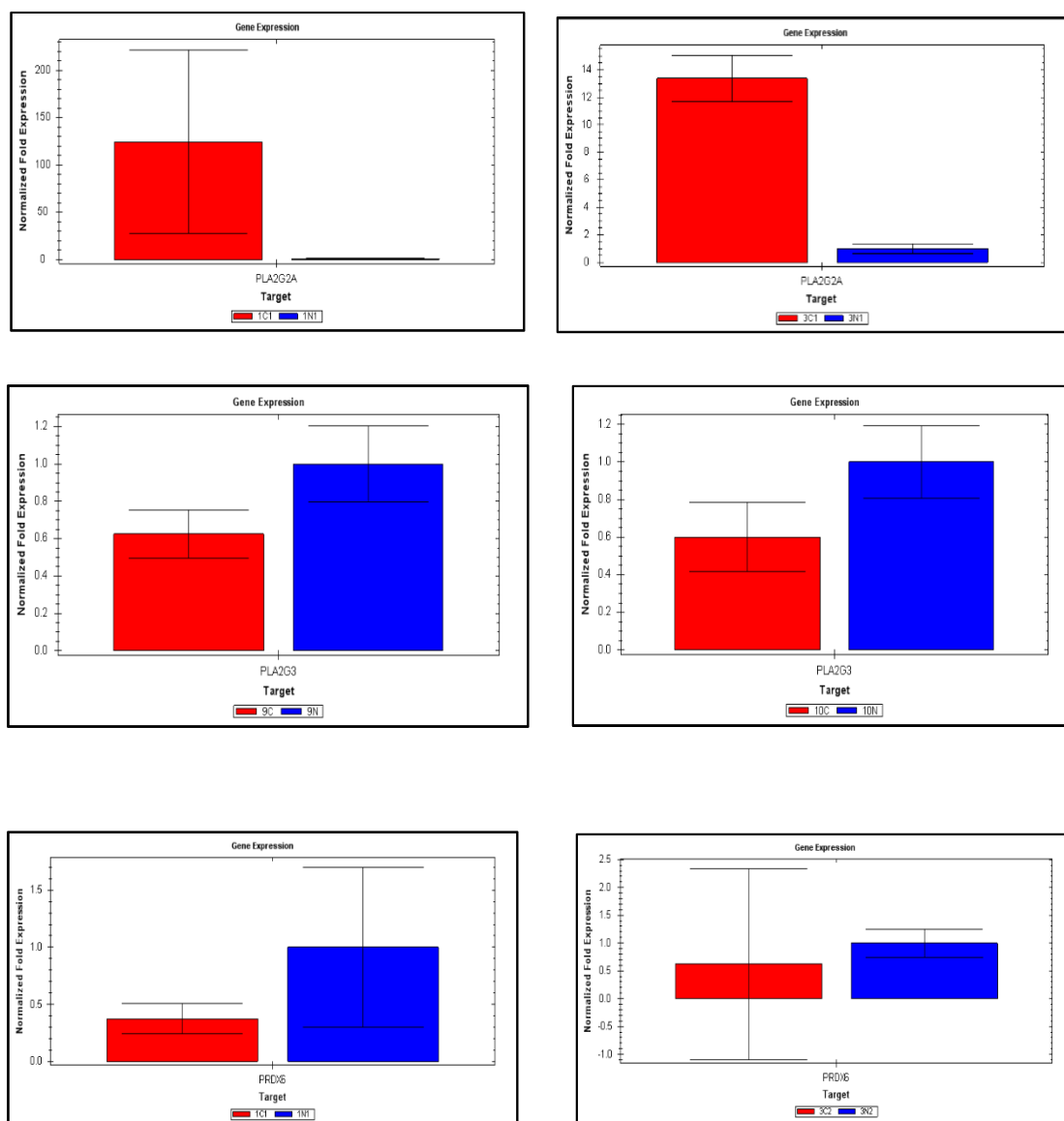
a/a	Δείγμα	Ποσότητα δείγματος προς αραιώση (μl)	αραιώση (φορές)	Abs 260nm	Abs 280nm	Καθαρότητα RNA (λόγος 260/280)	περιεκτικότητα αραιωμένου RNA που φωτομετρήθηκε (μg/ml)	περιεκτικότητα ποικνού απομονωμένου RNA (ng/μl)
1	1N1	10	100	0,192	0,175	1,097	7,68	768
2	1C1	10	100	0,168	0,155	1,083	6,72	672
3	1N3	10	100	0,021	0,014	1,5	0,84	84
4	2NB	10	100	0,036	0,026	1,384	1,44	144
5	3N1	10	100	0,059	0,055	1,07	2,36	236
6	3C1	10	100	0,086	0,068	1,26	3,44	344
7	3N2	10	100	0,05	0,038	1,32	2,00	200
8	3C2	10	100	0,032	0,022	1,45	1,28	128
9	2NA	10	100	0,019	0,01	1,90	0,76	76
10	2CA	10	100	0,005	0,002	2,50	0,20	20
11	9N	10	100	0,157	0,134	1,17	6,28	628
12	9C	10	100	0,166	0,161	1,03	6,64	664
13	10N	10	100	0,129	0,111	1,16	5,16	516
14	10C	10	100	0,101	0,1	1,01	4,04	404
15	11N	10	100	0,113	0,087	1,30	4,52	452
16	11C	10	100	0,122	0,105	1,16	4,88	488
17	1C3	10	100	0,111	0,1	1,11	4,44	444
18	2CB	10	100	0,104	0,081	1,28	4,16	416
19	1N2	10	100	0,157	0,119	1,32	6,28	628
20	1C2	10	100	0,132	0,125	1,06	5,28	528
21	4C	10	100	0,148	0,131	1,13	5,92	592
22	5N	10	100	0,112	0,109	1,03	4,48	448
23	5C	10	100	0,149	0,122	1,22	5,96	596
24	4N	10	100	0,127	0,106	1,20	5,08	508

Πίνακας 6

Ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος και θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 1,8 και του 2,2. Τιμές μικρότερες του 1,6 υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα RNA, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2,2 φανερώνουν την παρουσία μη αμελητέας ποσότητας DNA στο εκχύλισμα RNA. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 6.

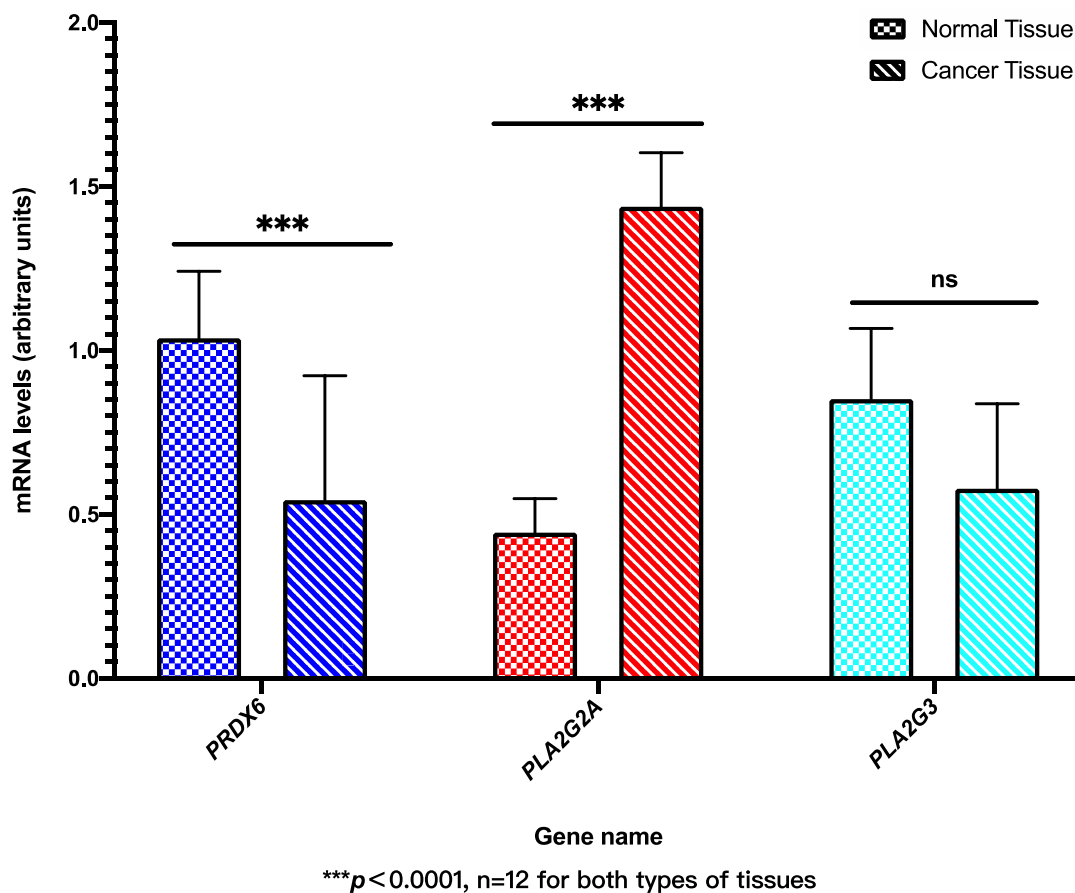
4) qRT-PCR

Πραγματοποιήθηκαν 42 κύκλοι ενίσχυσης του cDNA. Οι αλληλουχίες του cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά επιτυχώς σε 12 περιπτώσεις έχοντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*). Παραδείγματα μεγάλης γονιδιακής έκφρασης περιγράφονται στα παρακάτω γραφήματα (Γράφημα 4) για PLA2G2A (1C1,3C1), PLA2G3(9C,10C), PRDX6 (1C1,3C2).



Γράφημα 4

Τα επίπεδα mRNA στους καρκινικούς ιστούς ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα για την PLA2G2A σε σχέση με τους παρακείμενους του όγκου φυσιολογικούς ιστούς. Δεν αναδείχτηκε στατιστική σημαντικότητα στα επίπεδα mRNA για τη φωσφολιπάση PLA2G3 μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών ιστών. Αντίθετα τα επίπεδα mRNA φαίνονται στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους πέριξ των όγκων ιστούς σε σχέση με τους καρκινικούς ιστούς για την PRDX6 (Γράφημα 5).

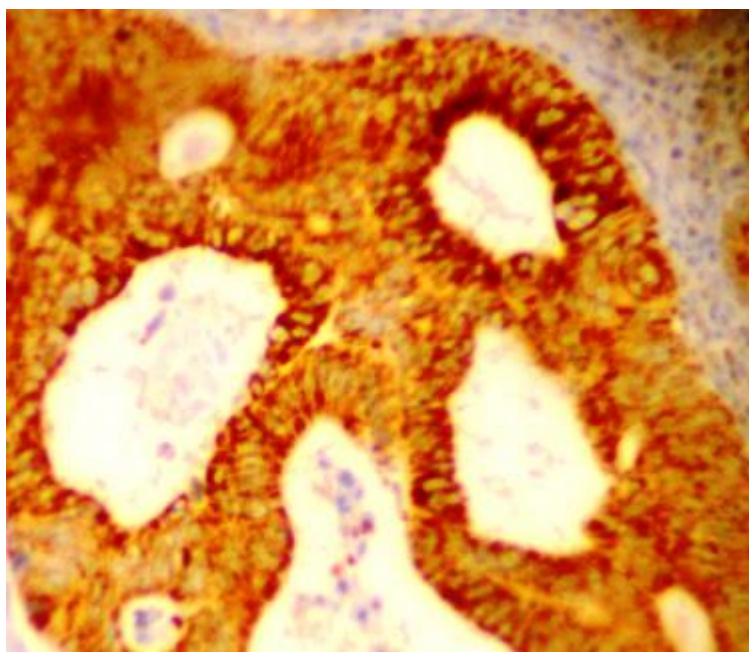


Γράφημα 5

ΜΕΡΟΣ Β

sPLA2-IIA (PLA2G2A)

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε 23/30 (76.6%) περιστατικά (Εικόνα 1), ενώ τα υπόλοιπα 7/30 (23.4 %) ανάδειξαν χαμηλή έκφραση. Θεωρήθηκε υπερέκφραση η ένταση χρώσης με τιμές ≤ 137 των χρωματισμένων κυττάρων ενώ χαμηλή >141 . Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με DIA σε κάθε ιστό περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7). Ο μέσος όρος έκφρασης της PLA2G2 σε παρακείμενους του όγκου φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκε στο 143.03 ενώ στους καρκινικούς ιστούς στο 129.06.



Εικόνα 4: Έκφραση πρωτεΐνης PLA2G2A στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Η υψηλή έκφραση πρωτεΐνης παρουσιάζεται ως ισχυρή διάχυτη μεμβρανική/κυτταροπλασματική καφέ χρώση. (Χρώση τετραϋδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης (DAB), αρχική μεγέθυνση: 100×).

A/A	ID	Φ	ΦΛΕΓ. ΔΙΗΘ.	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΔΙΑΦΟΡ	ΣΤΑΔ	ΔΙΑΜ	ΕΞΕΛΚ.	PLA2G2A
1	123/11	Θ	ΟΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	129.08
2	152/11	Θ	ΟΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	101.87
3	88/11	Θ	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	134.99
4	96/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	7	ΟΧΙ	149.85
5	117/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	100.09
6	229/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	99.67
7	320/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	132.78
8	372/12	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	118.54
9	437/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	109.42
10	605/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	IV	4	ΟΧΙ	139.56
11	645/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	101.67
12	824/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	148.03
13	997/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	2,5	ΟΧΙ	127.72
14	1074/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4,5	ΟΧΙ	129.02
15	1261/12	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΟΧΙ	135.04
16	1321/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	3,5	ΟΧΙ	137.77
17	655/18	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3,5	ΟΧΙ	108.93
18	673/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3,8	ΟΧΙ	127.03
19	685/18	Θ	ΟΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΟΧΙ	150.98
20	734/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΚΑΛΗ	I	4,5	ΟΧΙ	111.03
21	832/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4	ΟΧΙ	129.76
22	869/18	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	2,5	ΟΧΙ	148.77
23	881/18	Θ	ΟΧΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΝΑΙ	112.45
24	911/18	A	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	138.93
25	927/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΝΑΙ	132.67
26	954/18	Θ	ΝΑΙ	ΚΑΤΙΟΝ-ΣΙΓ	ΜΕΣΗ	II	3	ΟΧΙ	149.61
27	1021/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	II	9,5	ΜΙΚΡΗ	130.73
28	1035/18	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	8	ΜΕΤΡΙΑ	138.92
29	56/19	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	1,8	ΜΙΚΡΗ	149.02
30	1513/20	A	ΟΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	147.88

α/α:αύξων αριθμός, ID:κωδικός δείγματος, Φ:Φύλο, ΦΛΕΓΜ.ΔΙΗΘ.:Φλεγμονώδης διάθεση, ΔΙΑΦΟΡ:Διαφοροποίηση, ΣΤΑΔ:Στάδιο, ΔΙΑΜ:Διάμετρος, ΕΞΕΛΚ:Εξέλκωση

Πίνακας 7: Μετρήσεις έκφρασης PLA2G2A με DIA

Κλινικοί παράμετροι				
N=30		ΥΕ	ΧΕ	p
		23/30(76,6%)	7/30(23,4%)	
	n(%)			
Φύλο				0,369
Άρρεν	15(50%)	13 (42,9%)	2(6,6%)	
Θύλη	15(50%)	10 (33,3%)	5(16,4%)	
Βαθμός				0,748
I	1 (3,3%)	1(3,3%)	0(0%)	
II	22(73,3%)	16(52,8%)	6(19,9%)	
III	7(23,3%)	6(19,9%)	1(3,3%)	
Στάδιο				0,971
I	3 (10%)	3(10%)	0(0%)	
II	13(43,3%)	10(33,3%)	3(10%)	
III	10(33,3%)	7(23,3%)	3(10%)	
IV	4 (13,3%)	3(10%)	1(3,3)	
Θέση				0,340
Σιγμοειδές	13 (43,3%)	11(36,3%)	2(6,6%)	
Ορθό	8 (13,3)	6(19,8%)	2(6,6%)	
Ανιόν-τυφλό	9(23,3%)	6(19,8%)	3(10%)	
Φλεγμονή/διήθηση				0,795
Ναι	25(83,5%)	20(66%)	5(16,5%)	
Όχι	5(16,7%)	3(10%)	2(6,7%)	
Εξέλκωση				0,433
Ναι	5(16,7%)	4(13,2%)	1(3,3%)	
Όχι	25(83,5)	19 (62,7%)	6(19,8%)	
Διάμετρος(max,cm)				0,040
<4	14 (47,2%)	12(39,6%)	2(6,6%)	
≥4	16(52,8%)	11(36,3%)	5(16,5%)	
ΥΕ:Υψηλή έκφραση, ΧΕ:Χαμηλή έκφραση				

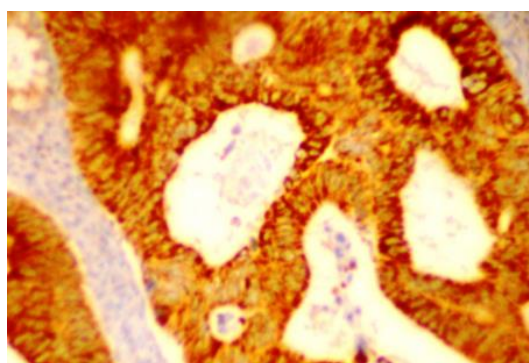
Πίνακας 8

Όπως φαίνεται στο Πίνακα 8, η συνολική έκφραση της πρωτεΐνης αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική για τη διάμετρο των εξεταζόμενων όγκων ($p=0.04$). Η επίδραση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές με άλλες κλινικο-εργαστηριακές παραμέτρους (φλεγμονώδης διήθηση: $p=0.795$; ανατομική θέση: $p=0.340$; βαθμός διαφοροποίησης: $p=0.748$; στάδιο: $p=0.971$; εξέλιξη: $p=0.433$; φύλο: $p=0.369$).

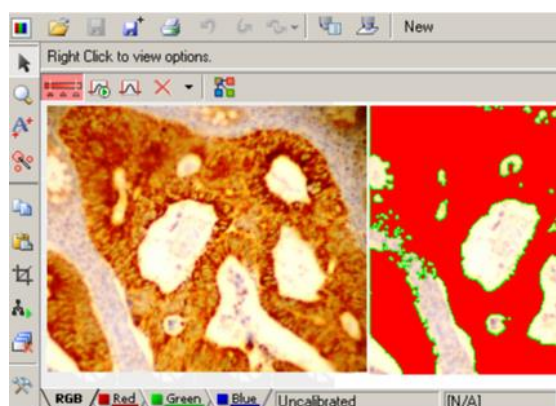
Με βάση το έλεγχο με παραμετρικά κριτήρια t tests και τιμές σύγκρισης στους μέσους όρους έκφρασης καρκινωμάτων σε σχέση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι οι μέσοι όροι στο PLA2G2A των καρκινωμάτων σε σχέση με τους μέσους όρους των παρακείμενων υγιών ιστών ($M = 129.06$ vs $M = 143.03$), $t(29) = -4.27$, $p < .001$.

sPLA2-III (PLA2G3)

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε 23/30 (76.6%) περιστατικά (Εικόνα 5), ενώ τα υπόλοιπα 7/30 (23.4 %) ανάδειξαν χαμηλή έκφραση. Θεωρήθηκε υπερέκφραση η ένταση χρώσης με τιμές ≤ 132 των χρωματισμένων κυττάρων ενώ χαμηλή μεταξύ >141 και ≤ 161 . Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με DIA σε κάθε ιστό περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9). Ο μέσος όρος έκφρασης της PLA2G3 σε παρακείμενους του όγκου φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκε στο 138.99 ενώ στους καρκινικούς ιστούς στο 130.89.



(A)



(B)

Εικόνα 5: Έκφραση πρωτεΐνης PLA2G3 σε αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. A) Επίπεδο έντασης χρώσης υψηλής έκφρασης (διάχυτη κυτταροπλασματική /μεμβρανώδες χρώση, αντίσωμα αντι-PLA2G3, χρώση DAB, αρχική μεγέθυνση: 400x) B). Ανάλυση έκφρασης ψηφιακής εικόνας πρωτεΐνης PLA2G3. Προοδευτικές μετρήσεις σε τρία στάδια: κόκκινες/πράσινες περιοχές αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης ως τιμές έντασης χρώσης (διάχυτο κυτταροπλασματική χρώση, χρώση DAB, αρχική μεγέθυνση: 400x).

A/A	ID	Φ	ΦΛΕΓΜ ΔΙΗΘΗ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΔΙΑΦΟΡ	ΣΤΑΔΙΟ	ΔΙΑΜ	ΕΞΕΛΚΩΣΗ	PLA2G3
1	123/11	Θ	ΟΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	137.88
2	152/11	Θ	ΟΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	141.65
3	88/11	Θ	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	102.45
4	96/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	7	ΟΧΙ	130.08
5	117/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	131.34
6	229/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	140.09
7	320/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	132.56
8	372/12	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	139.08
9	437/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	141.86
10	605/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	IV	4	ΟΧΙ	112.99
11	645/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	105.66
12	824/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	150.67
13	997/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	2,5	ΟΧΙ	136.88
14	1074/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4,5	ΟΧΙ	139.08
15	1261/12	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΟΧΙ	129.65
16	1321/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	3,5	ΟΧΙ	130.99
17	655/18	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3,5	ΟΧΙ	139.03
18	673/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3,8	ΟΧΙ	142.88
19	685/18	Θ	ΟΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΟΧΙ	118.88
20	734/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΚΑΛΗ	I	4,5	ΟΧΙ	143.88
21	832/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4	ΟΧΙ	132.01
22	869/18	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	2,5	ΟΧΙ	107.62
23	881/18	Θ	ΟΧΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΝΑΙ	135.34
24	911/18	A	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	110.73
25	927/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΝΑΙ	138.99
26	954/18	Θ	ΝΑΙ	ΚΑΤΙΟΝ-ΣΙΓ	ΜΕΣΗ	II	3	ΟΧΙ	145.98
27	1021/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	II	9,5	ΜΙΚΡΗ	100.04
28	1035/18	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	8	ΜΕΤΡΙΑ	132.67
29	56/19	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	1,8	ΜΙΚΡΗ	140.99
30	1513/20	A	ΟΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	134.65

Πίνακας 9: Μετρήσεις έκφρασης PLA2G3 με DIA

Κλινικοί παράμετροι				
N=30		ΥΕ	ΧΕ	p
		23/30(76,6%)	7/30(23,4%)	
	n(%)			
Φύλο				0,902
Άρρεν	15(50%)	12 (40%)	3(9,9%)	
Θύλη	15(50%)	11 (36,6%)	4(13,3%)	
Βαθμός				0,001
I	1 (3,3%)	0(%)	1(3,3%)	
II	22(73,3%)	16(33,3%)	6(19,8%)	
III	7(23,3%)	7(23,3%)	0(0%)	
Στάδιο				0,755
I	3 (10%)	2(6,6%)	1(3,3%)	
II	13(43,3%)	9(30%)	4(13,3%)	
III	10(33,3%)	9(30%)	1(3,3%)	
IV	4 (13,3%)	3(9,9%)	1(3,3)	
Θέση				0,027
Σιγμοειδές-Ορθό	21 (70%)	15(50%)	6(19,8%)	
Ανιόν-τυφλό	9(30%)	8(26,4%)	1(3,3%)	
Φλεγμονή/διήθηση				0,846
Ναι	25(83,5%)	19(62,7%)	6(19,8%)	
Όχι	5(16,7%)	4(13,2%)	1(3,3%)	
Εξέλκωση				0,872
Ναι	5(16,7%)	4(13,2%)	1(3,3%)	
Όχι	25(83,5)	19 (62,7%)	6(19,8%)	
Διάμετρος όγκου				0,300
<4	14 (47,2%)	11 (47,5%)	3 (13%)	
≥4	16(52,8%)	12 (52,2)	4 (17,4%)	
ΥΕ: Υψηλή έκφραση, ΧΕ: Χαμηλή έκφραση				

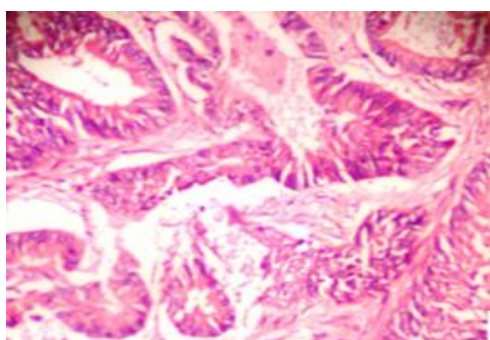
Πίνακας 10

Όπως φαίνεται στο Πίνακα 10, η συνολική έκφραση της πρωτεΐνης αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική για το βαθμό διαφοροποίησης και την ανατομική θέση των εξεταζόμενων όγκων ($p=0.001$, $p=0.027$). Η επίδραση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές με άλλες κλινικο-εργαστηριακές παραμέτρους (φλεγμονώδης διήθηση: $p=0.846$; ανατομική θέση: $p=0.340$; βαθμός διαφοροποίησης: $p=0.748$; στάδιο: $p=0.755$; εξέλκωση: $p=0.872$; φύλο: $p=0.902$; διάμετρος όγκου: $p=0.300$).

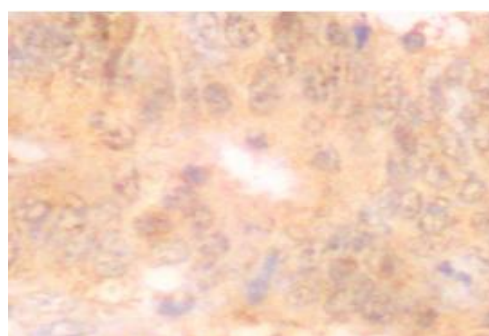
Με βάση το έλεγχο με παραμετρικά κριτήρια t tests και τιμές σύγκρισης στους μέσους όρους έκφρασης των καρκινωμάτων σε σχέση με τους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς φάνηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότεροι μέσοι όροι στο PLA2G3 στα καρκινώματα σε σχέση με το μέσο όρο των παρακείμενων υγιών ιστών ($M = 130.89$ vs $M = 138.99$), $t(29) = -3.21$, $p = 0.003$

PRDX-6

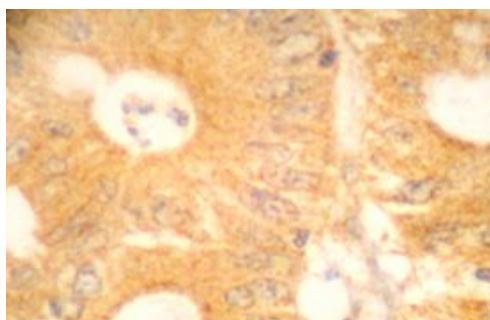
Υπερέκφραση της πρωτεΐνης PRDX-6 παρατηρήθηκε σε 12/30 (40%) περιστατικά, ενώ τα υπόλοιπα 18/30 (60%) ανάδειξαν μέτρια έως χαμηλή έκφραση (Εικόνα 6) . Θεωρήθηκε υπερέκφραση η ένταση χρώσης με τιμές ≤ 130 των χρωματισμένων κυττάρων ενώ χαμηλή μεταξύ >130 και ≤ 160 (Εικόνα 7). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με DIA σε κάθε ιστό περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11). Ο μέσος όρος έκφρασης της PRDX-6 σε παρακαείμενους του όγκου φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκε στο 141.01 ενώ στους καρκινικούς ιστούς στο 136.58.



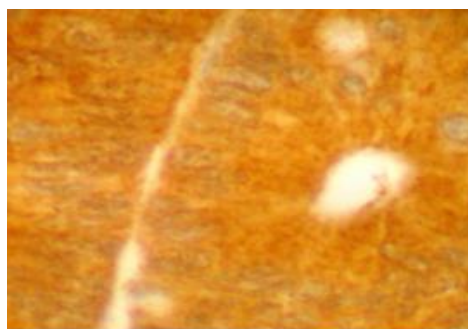
(A)



(B)

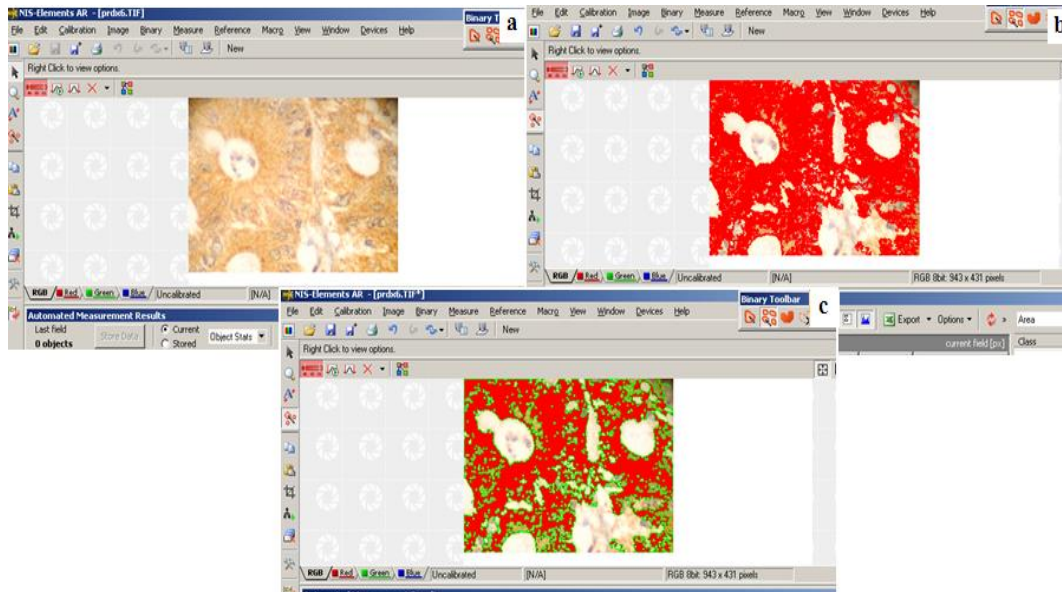


(Γ)



(Δ)

Εικόνα 6: Έκφραση πρωτεΐνης υπεροξειρεδοξίνης-6 (prdx-6) σε τομές αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. Α: Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E), αρχική μεγέθυνση: 100x) Β-Δ: Χαμηλό επίπεδο έκφρασης, μέτριο επίπεδο έκφρασης, υψηλό επίπεδο έκφρασης, αντίστοιχα (διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, anti-prdx-6, χρώση DAB, αρχική μεγέθυνση: 400x)



Εικόνα 7 : Ανάλυση έκφρασης ψηφιακής εικόνας πρωτεΐνης υπεροξειδοξίνης-6 (prdx-6) στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. A-C : Προοδευτικές μετρήσεις σε τρία στάδια: οι κόκκινες/πράσινες περιοχές αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης ως τιμές έντασης χρώσης (διάχυτο μοτίβο κυτταροπλασματικής χρώσης, anti-prdx-6, χρώση DAB, αρχική μεγέθυνση: 400×).

Όπως φαίνεται στο Πίνακα 12 η συνολική έκφραση της πρωτεΐνης αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική για το στάδιο των εξεταζόμενων όγκων ($p=0.011$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι υπάρχει μια προοδευτική αύξηση της έκφρασης από το στάδιο III έως το IV. Η επίδραση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές με άλλες κλινικο-εργαστηριακές παραμέτρους (φλεγμονώδης διήθηση: $p=0.364$; ανατομική θέση: $p=0.93$; βαθμός διαφοροποίησης: $p=0.517$; διάμετρος όγκου: $p=0.983$; εξέλιξη: $p=0.622$; φύλο: $p=1.000$).

Ο έλεγχος με παραμετρικά κριτήρια t tests και τιμές σύγκρισης τους μέσους όρους καρκινωμάτων σε σχέση με παρακείμενους υγιείς ιστούς δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το PRX6 των καρκινωμάτων και τους παρακείμενους υγιείς ιστούς ($M = 136.58$ vs $M = 141.01$), $t(29) = -1.47$, $p = 0.151$.

A/A	ID	Φ	ΦΛΕΓΜ ΛΗΘΗ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΔΙΑΦΟΡ	ΣΤΑΔΙΟ	ΔΙΑΜ	ΕΞΕΛΚΩΣΗ	PRDX-6
1	123/11	Θ	ΌΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	131.88
2	152/11	Θ	ΌΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	149.09
3	88/11	Θ	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	138.99
4	96/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	7	ΟΧΙ	134.08
5	117/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	133.17
6	229/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	129.67
7	320/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	4	ΟΧΙ	141.88
8	372/12	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	145.32
9	437/12	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	IV	6	ΟΧΙ	134.55
10	605/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	IV	4	ΟΧΙ	140.77
11	645/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	156.77
12	824/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	2	ΟΧΙ	141.76
13	997/12	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	2,5	ΟΧΙ	145.03
14	1074/12	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4,5	ΟΧΙ	111.78
15	1261/12	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΟΧΙ	156.76
16	1321/12	Θ	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	I	3,5	ΟΧΙ	159.54
17	655/18	Θ	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3,5	ΟΧΙ	140.99
18	673/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	III	3,8	ΟΧΙ	106.67
19	685/18	Θ	ΌΧΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΟΧΙ	138.79
20	734/18	A	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΚΑΛΗ	I	4,5	ΟΧΙ	140.99
21	832/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	4	ΟΧΙ	134.99
22	869/18	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	2,5	ΟΧΙ	118.45
23	881/18	Θ	ΌΧΙ	ΤΥΦΛΟ	ΜΕΣΗ	II	7,5	ΝΑΙ	140.67
24	911/18	A	ΝΑΙ	ΑΝΙΟΝ	ΧΑΜΗΛΗ	II	4	ΟΧΙ	142.43
25	927/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	II	3,5	ΝΑΙ	127.88
26	954/18	Θ	ΝΑΙ	ΚΑΤΙΟΝ-ΣΙΓ	ΜΕΣΗ	II	3	ΟΧΙ	141.03
27	1021/18	A	ΝΑΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΧΑΜΗΛΗ	II	9,5	ΜΙΚΡΗ	142.04
28	1035/18	A	ΝΑΙ	ΤΥΦΛΟ	ΧΑΜΗΛΗ	III	8	ΜΕΤΡΙΑ	115.78
29	56/19	Θ	ΝΑΙ	ΟΡΘΟ	ΜΕΣΗ	IV	1,8	ΜΙΚΡΗ	116.99
30	1513/20	A	ΌΧΙ	ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΣ	ΜΕΣΗ	III	3	ΟΧΙ	139.04

Πίνακας 11: Μετρήσεις έκφρασης PRDX-6 με DIA

Κλινικοί παράμετροι				
N=30		ΥΕ	ΧΕ	p
		23/30(76,6%)	7/30(23,4%)	
	n(%)			
Φύλο				1,000
Άρρεν	15(50%)	6 (20%)	9(30%)	
Θύλη	15(50%)	6(20%)	9(30%)	
Βαθμός				0,517
I	1 (3,3%)	0(%)	1(3,3%)	
II	22(73,3%)	10(33%)	12(40%)	
III	7(23,3%)	2(6,7%)	5(16,7%)	
Στάδιο				0,011
I	3 (10%)	0(0%)	3(10%)	
II	13(43,3%)	2(6,7%)	11(36,7%)	
III	10(33,3%)	7(23,3%)	3(10%)	
IV	4 (13,3%)	3(10%)	1(3,3)	
Θέση				0,930
Σιγμοειδές	13 (43,3%)	6(20,3%)	7(6,7%)	
Ορθό	8(13,3%)	2(13,3)	6(20%)	
Ανιόν-τυφλό	9(23,3%)	4(13,3%)	5(16,7%)	
Φλεγμονή/διήθηση				0,364
Ναι	25(83,5%)	9(23,3%)	16(50%)	
Όχι	5(16,7%)	3(10%)	2(6,7%)	
Εξέλκωση				0,622
Ναι	5(16,7%)	1(3,3%)	4(13,3%)	
Όχι	25(83,5)	14 (46,7%)	11(36,7%)	
Διάμετρος όγκου				0,983
<4	14 (47,2%)	7 (6,7%)	7 (6,7%)	
≥4	16(52,8%)	5 (16,7%)	11 (36,7%)	
ΥΕ:Υψηλή έκφραση, ΧΕ:Χαμηλή έκφραση				

Πίνακας 12

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προσεγγίζοντας τις βιοχημικές και μεταβολικές απορρυθμίσεις που επισυμβαίνουν στο ενδοκυττάριο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής εκτροπής και κακοήθους εξαλλαγής, η απελευθέρωση τόσο λιπαρών οξέων όσο και παραγόντων του οξειδωτικού στρες αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμη παράμετρο. Σε μεταβολικό επίπεδο ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων μέσω της υδρόλυσης ευοδώνεται από τα ένζυμα φωσφολιπάσες, ειδικά του τύπου A2, που οδηγούν στην απελευθέρωση αραχιδονικού και λυσοφωσφατιδικού οξέος και στη συνέχεια σε λευκοτριένια και προσταγλανδίνες που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Οι φωσφολιπάσες τύπου A2 εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες στο επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τις νεότερες μοριακές σταδιοποιήσεις όπως το Consensus Molecular Subtype (CMS) οι όγκοι του παχέος εντέρου χαρακτηρίζονται αλλά και αντιμετωπίζονται με βάση μοριακά και γονιδιακά κριτήρια. Ιδιαίτερα οι CMS3 (μεταβολικός) και ο CMS4 (μεσεγχυματικός) χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό μεταλλάξεων αλλά με αλλοιώσεις που εμπλέκουν κοινούς ενδιάμεσους με τα μονοπάτια των φωσφολιπασών όπως τις εναλλακτικές και αλλοιωμένες οδούς λιπογένεσης, την υψηλή έκφραση HER2, το υπερδιεγερμένο στρώμα με έντονα φαινόμενα αγγειογένεσης και τοπικής φλεγμονής, και την υψηλή έκφραση ιντεγγρανών και ινοβλαστών [89,91,93].

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στη βιβλιογραφική ανασκόπηση ο κυρίαρχος ρόλος της sPLA2-IIA (PLA2G2A) είναι αντιβακτηριακός ενώ φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1β, ο TNF και τα DAMPs αυξάνουν την έκκριση του ενζύμου και ενισχύουν περαιτέρω τη φλεγμονή [94, 133].

Ο ρόλος της sPLA2-IIA στον καρκίνο όμως δεν είναι ξεκάθαρος. Εκφράζεται διαφορετικά σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου γεγονός που πιθανά εξαρτάται από το τύπο των κυττάρων, τη θέση των νεοπλασμάτων ή τη σύνδεση με ενδο-εξωκυττάρους διαφορετικούς υποδοχείς (βιμεντίνη, ιντεγγρανίνη κ.α.) [138]. Υψηλές συγκεντρώσεις ανευρίσκονται σε καρκίνους προχωρημένου σταδίου τόσο στον ορό όσο και σε ιστικό επίπεδο όπως στο λέμφωμα non Hodgkin και στο μύελωμα [142,143]. Στον καρκίνο του προστάτη η έκφραση της sPLA2-IIA σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του όγκου

ενώ παραδόξως στον καρκίνο του στομάχου σχετίζεται με παράταση της επιβίωσης και λιγότερες μεταστάσεις [144,145].

Η έκφραση του γονιδίου sPLA2-IIA σχετίζεται με βασικά μονοπάτια της ογκογένεσης (EGFR/HER2-PI3K-Akt και NF-κB) όπως στο καρκίνο του οισοφάγου και του πνεύμονα (η αναστολή της sPLA-IIA μειώνει την έκφραση EGFR και HER2 και αντίστροφα) [148,149]. Στο καρκίνο του πνεύμονα υπερεκφράζεται σε ιστό και πλάσμα και σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και μειωμένη ολική επιβίωση [149]. Σε πειραματικά μοντέλα, δρα ως γενετικός τροποποιητής της φλεγμονής και του ΚΠΕ αντισταθμίζοντας τη δράση του cPLA2α και της PGE2 που συμβάλλουν στη βελτίωση της κολίτιδας αλλά ευνοούν τον ΚΠΕ [94,150]. Στο γαστρικό καρκίνο τα επίπεδα mRNA είναι αυξημένα και σε αντίθεση με άλλα νεοπλάσματα αυτό σχετίζεται με αύξηση της 5ετούς επιβίωσης των ασθενών [151].

Στον ΚΠΕ βρέθηκε υψηλή έκφραση sPLA2-IIA στην περιφέρεια του όγκου και μικρή στο κέντρο του [283]. Η 10ετής επιβίωση φαίνεται να είναι ανάλογη με την αρνητική έκφραση και σχετίζεται με το Στάδιο II. Η έκφραση είναι μεγαλύτερη σε ΚΠΕ αριστερού κόλου και λιγότερο δεξιά [151]. Στον καρκίνο του ορθού φαίνεται να σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και μικρή απόκριση στη θεραπεία. Είναι κακός προγνωστικός δείκτης στη ολική επιβίωση και στη περίοδο ελεύθερης νόσου [153].

Η sPLA2-IIA συμμετέχει ενεργά στο φλεγμονώδες περιβάλλον του όγκου. Δρα στην εξωκυττάρια ουσία και ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Υποδοχείς της sPLA2-IIA όπως οι ιντεγκρίνες και η βιμεντίνη δίνουν σήματα μέσω των μονοπατιών MAPK-ERK1/2, συμμετέχουν στη κυτταρική μετανάστευση, στην ενδοκυτταρική μεταφορά λιπιδίων και στην EMT [124,130,131]

Το αντιφλεγμονώδες Varespladib, το S3319 που αναστέλλει το ICAM-1, η οχναφλαβόνη που αναστέλλει απευθείας την sPLA2-IIA, το γCdcPLI με ιδιότητες anti-VEGF αλλά και η αναστολή της αννεξίνης είναι ενδιαφέρουσες αντι- sPLA2-IIA αντικαρκινικές προσεγγίσεις [154,156-159].

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης αναγνωρίστηκε μια στατιστικά σημαντική έκφραση της sPLA2-IIA στο πλάσμα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες επιβεβαιώνοντας εν μέρει την αυξημένη παρουσία της φωσφολιπάσης στον ορό που περιέγραψαν και

άλλες μελέτες για διαφορετικούς καρκίνους όπως του προστάτη, του πνεύμονα και των αιματολογικών όγκων. Αξία θα είχε μια μελλοντική σύγκριση προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών επιπέδων πλάσματος σε διαστήματα απομακρυσμένα από το χειρουργικό στρες και την φλεγμονή καθώς και μια συσχέτιση με τη επιβίωση. Επιπλέον στατιστικά σημαντική αναδείχτηκε η έκφραση mRNA (υψηλή) με qRT-PCR που συνέκρινε την έκφραση sPLA2-IIA στον όγκο με εγγύς του όγκου υγείς ιστούς επιδεικνύοντας πιθανά ότι οι γονιδιακές αλλαγές τουλάχιστον αρχικά είναι ένα φαινόμενο τοπικό που ευνοεί την ανάπτυξη του ΚΠΕ και επιδέχεται ίσως αλλοιώσεις από άλλους επιγενετικούς παράγοντες. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα μας έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Mounier et al [175] όπου το mRNA-PLA2G2A εκφράζεται σταθερά υψηλά στο φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο (υψηλότερη έκφραση από όλες τις φωσφολιπάσες σε σχέση με γονίδια αναφοράς όπως το GAPDH), εκφράζεται λιγότερο σε καρκίνο στο δεξιό κόλον σε σχέση με το φυσιολογικό και έχει σχεδόν πανομοιότυπη έκφραση συγκρίνοντας φυσιολογικούς με καρκινικούς ιστούς στο αριστερό κόλον. Ίσως το γεγονός ότι στα δείγματα μας σε αντίθεση με αυτή τη μελέτη συμπεριελήφθησαν και δείγματα ορθού άλλαξε το αποτέλεσμα θέτοντας ίσως την υπόθεση ότι στον καρκίνο του ορθού η συμπεριφορά του sPLA2-IIA είναι διαφορετική.

Σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας, υψηλή έκφραση αναγνωρίστηκε στο 76,7% των εξεταζόμενων ασθενών. Αναγνωρίστηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την διάμετρο του όγκου που πιθανά σχετίζεται με την τοπικότητα του φαινομένου. Η σχέση έκφρασης-διαμέτρου όγκου έχει πιθανά κοινή βάση με την μελέτη των Trieble et al. [283] που ανευρίσκει υπερέκφραση sPLA2IIA στην περιφέρεια και λιγότερο στο κέντρο του όγκου, φαινόμενο που πιθανά σχετίζεται με την τοπική απελευθέρωση PLA2IIA από ανοσοκύτταρα με τρόπο περισσότερο τοπικής έκκρισης ή παράκρino παρά μεταγραφικό, ρήξη των τοπικών φραγμών διείσδυσης, αύξηση προσταγλαδινών τοπικά (το sPLA2-IIA δρα στην εξώτερη επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών και ελευθερώνει AA περισσότερο από κυστίδια), σύνδεση με υποδοχείς (πιθανά βιμεντίνη, ιντεγκρίνη κ.α.) και επίσπευση της EMT. Αν και όχι στατιστικά σημαντικό, αξία λόγου είναι η παρατήρηση ότι στο 66% των όγκων με φλεγμονώδη διήθηση υπήρξε υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματά μας [284] έρχονται επίσης σε αντίθεση με την συσχέτιση της έκφρασης της PLA2G2A με το στάδιο II της νόσου που εκτενώς περιγράφεται στην ανασκόπηση των Scott et al [151]. Επιπλέον, ο μέσος όρος στις

τιμές έκφρασης των καρκινωμάτων σε σχέση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς αναδείχτηκε στατιστικά σημαντικός και στην ανοσοϊστοχημεία (χαμηλότεροι μέσοι όροι σήματος στο PLA2G2A σε σχέση με μέσους όρους των φυσιολογικών) επιβεβαιώνοντας την γενικότερη υψηλή έκφραση PLA2G2A στον καρκινικό ιστό.

Η sPLA2-III (PLA2G3) είναι άτυπη sPLA2 με δομή διαφορετική από τα συμβατικά sPLA2. Συμμετέχει στην ωρίμανση του επιδιδυμικού σπέρματος ενώ στην αναφυλαξία είτε ενεργοποιεί τα μαστοκύτταρα είτε βοηθά την ωρίμανσή τους [102,108,97].

Η ισορροπία στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου εμπλέκει διαφορετικές PLA2 με ρόλους αντικρουόμενους όπως η cPLA2α (παράγει PGE2 που προστατεύει από την κολίτιδα αλλά ευνοεί τον ΚΠΕ) και η X-sPLA2 (μειώνει την φλεγμονή και την καρκινογένεση μέσω των προστατευτικών ω3-PUFAs) [174]. Η sPLA2-III παράγει λυσοφωσφιλιπιδικούς μεσολαβητές όπως τους LPC, LPA και LPI που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση δρώντας ιδιαίτερα σε ασταθείς ή κατεστραμμένες επιθηλιακές μεμβράνες [174,179]. Το sPLA2-III επηρεάζει τα βλαστοκύτταρα του παχέος εντέρου ή ακόμα και το μικροβίωμα, ενεργοποιώντας ορισμένους άγνωστους μεταβολίτες λιπιδίων ή δρώντας απευθείας σε μικροβιακές μεμβράνες [174]. Τα μαστοκύτταρα επίσης επηρεάζουν την εξέλιξη της κολίτιδας και του καρκίνου [184]. Το sPLA2-III επιδεινώνει τη φλεγμονή και τις νεοπλασματικές διεργασίες του παχέος εντέρου και έχει χαρακτήρα βιοδείκτη για τον ΚΠΕ [175,176]. Η υψηλή του έκφραση σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό, με υψηλότερο ποσοστό μετάστασης στους λεμφαδένες και μικρότερη επιβίωση [177,163]. Η sPLA-III ενισχύει άτυπες μορφές λιπογένεσης (δημιουργία lipid droplets-LDs) και απώλεια πρωτογενών βλεφαρίδων που αυξάνουν την επιθετικότητα των όγκων και την χημειοανθεκτικότητα. Η αναστολή ή η απώλεια PLA2G3 μειώνει τα LDs, αποκαθιστά τις βλεφαρίδες και ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε φάρμακα πλατίνας [186,187,189].

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση σε ιστικό και πλασματικό επίπεδο και αναγνωρίστηκε μια στατιστικά σημαντική έκφραση της sPLA2III στο πλάσμα σε 12 από τους 13 ασθενείς που εξετάστηκαν σε σχέση με υγιείς μάρτυρες επιβεβαιώνοντας την αυξημένη παρουσία της φωσφολιπάσης στον ορό. Αξία θα είχε ίσως μια ευρύτερη μελέτη για προεγχειρητική και μετεγχειρητική μέτρηση στο ΚΠΕ που θα της έδινε περισσότερο χαρακτήρα βιοδείκτη και ίσως μια συσχέτιση με την επιβίωση ή την

χημειοανθεκτικότητα. Επιπλέον, δεν φάνηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση γονιδιακής έκφρασης mRNA με qRT-PCR που συνέκρινε την έκφραση της sPLA2G3 στο όγκο με περίξ του όγκου υγιείς ιστούς. Η μελέτη μας έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Mounier et al [175] που παρουσιάζει σχεδόν παρόμοια χαρακτηριστικά και αναγνωρίζει υψηλά επίπεδα PLA2G3 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και στην ανοσοϊστοχημεία. Αν και έκφραση mRNA αναγνωρίστηκε τόσο σε μη καρκινικό περίξ του όγκου βλεννογόνο όσο και στον όγκο δεν προέκυψε μια στατιστική σημαντικότητα μεταξύ τους. Αντίθετα η έκφραση φαίνεται αυξημένη στο φυσιολογικό ιστό. Η παρατήρηση αυτή ίσως έχει αξία λαμβάνοντας υπόψιν τον αντίθετο ρόλο που παίζει η PLA2-X και η σχέση ισορροπίας που παρουσιάζει με την sPLA2-III. Η πιθανή ταυτόχρονη μελέτη της στο ίδιο δείγμα θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στην μελέτη των Mounier et al [175] η υψηλή έκφραση PLA2G3 συνοδεύεται από σχεδόν μηδαμινή έκφραση της sPLA2-X που ως γνωστόν έχει αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση αλλά και ελάχιστη στατιστικά σημαντική έκφραση PLA2G2A σε σχέση με υγιείς ιστούς. Αντίθετα στη δική μας μελέτη η PLA2G2A ήταν σημαντικά υψηλότερη στους καρκινικούς ιστούς απ' ότι στους φυσιολογικούς ενώ χωρίς στατιστική σημαντικότητα η PLA2G3. Το αποτέλεσμα θα μπορούσε να δώσει τροφή για περαιτέρω μελέτη στους διαφορετικούς μηχανισμούς έκκρισης ή μεταγγραφής των sPLA2 και ίσως τον αντισταθμιστικό ρόλο του sPLA2-X ή το ρόλο των μαστοκυττάρων.

Σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας, υψηλή έκφραση αναγνωρίστηκε στο 76,7% των εξεταζόμενων ασθενών [285]. Αναγνωρίστηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου καθώς επίσης και τη θέση του όγκου κυρίως δεξιά. Το εύρημα είναι σε αντίθεση με άλλες μελέτες [175] που δεν αναγνωρίζουν διαφορές έκφρασης μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλου αλλά συμφωνεί με άλλες ως προς την διαφορετική γονιδιακή έκφραση μεταξύ δεξιού και αριστερού κόλου [286]. Ίσως ο καρκίνος του ορθού που μελετήθηκε μαζί δημιούργησε αυτές τις διαφορές. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα αξίζει να σημειωθεί η προοδευτικά αυξητική υπερέκφραση από το βαθμό διαφοροποίησης I/II στο III. Χαρακτηριστικά, όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή έκφραση στη DIA με μέσο όρο 109,7 (100-132). Το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με την μελέτη των Kazama et al [177] όπου η έκφραση δεν σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων. Αν και όχι στατιστικά σημαντικό, άξια λόγου είναι η παρατήρηση ότι στο 62,7% των όγκων με φλεγμονώδη διήθηση υπήρξε υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης. Επιπλέον, ο μέσος όρος

στις τιμές έκφρασης των καρκινωμάτων σε σχέση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς αναδείχθηκε στατιστικά σημαντικός στην ανοσοϊστοχημεία (χαμηλότεροι μέσοι όροι σήματος στο PLA2G3 σε σχέση με μέσους όρους των φυσιολογικών) επιβεβαιώνοντας την γενικότερη υψηλή έκφραση PLA2G3 στον καρκινικό ιστό που φαίνεται και σε άλλες μελέτες [175]. Ίσως η μελέτη έκφρασης του sPLA2-III σε αρχικά στάδια της ογκογένεσης, συμπεριλαμβανομένων των αδενωμάτων, η διερεύνηση σχετικών μονοπατιών όπως το Wnt, η ανίχνευση ίσως στα κόπρανα ή στο ορό με γρήγορες και πρακτικές μεθόδους να έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Τα ένζυμα της οικογένειας PRDX απομακρύνουν αποτελεσματικά υπεροξείδια. Ασκούν οξειδοαναγωγικό έλεγχο σε παράγοντες μεταγραφής, στο DNA, στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες, στις οξειδωμένες μεμβράνες, στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων αλλά και στην σηματοδότηση μέσω του NOX2 [198].

Εμπλέκονται σε διάφορες οδούς σήματος που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ρυθμίζουν τον NF-κB μέσω της αρχικής του ενεργοποίησης στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκονται στη ρύθμιση του μονοπατιού MAPK, του IκB (PRDX1), του PI3K, STAT, p38 (PRDX6) και του Wnt (PRDX2) [214]. Για παράδειγμα το PRDX1 ενεργοποιεί την οδό mTOR/p70S6K στο καρκίνο του οισοφάγου ενώ το PRDX2 ρυθμίζει το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης στον ΚΠΕ. Το PRDX6 ενισχύει την ογκογένεση μέσω της οδού JAK2/STAT3 στον καρκίνο του πνεύμονα ενώ η υπερέκφραση του ενεργοποιεί το Akt μέσω της PI3K και της p38. [199,215].

Η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των PRDX στον καρκίνο ποικίλει. Για παράδειγμα η PRDX1 υποεκφράζεται σε στοματικούς όγκους με πλακώδη κύτταρα και σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και κακή διαφοροποίηση, η PRDX2 υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου ενώ το PRDX4 στον ορθοκολικό καρκίνο με μετάσταση στους λεμφαδένες [216, 218, 223].

Η PRDX6 έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Έχει την ικανότητα δέσμευσης φωσφολιπιδίων και την ιδιότητα aiPLA2 που της προσδίδουν ιδιότητες πρωτεΐνης «σεληνόφως» [258].

Ο ρόλος της PRDX6 στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων δεν είναι τελείως ξεκάθαρος ενώ πολλές φορές είναι αντικρουόμενος. Σε δερματικούς όγκους υπερέκφραση του Prdx6 ευνοεί την ανάπτυξη και τη διεύδυση γεγονός που σχετίζεται ίσως με τη χρόνια φλεγμονή ενώ η ίδια η υπερέκφραση φαίνεται να αναστέλλει την γένεση νέων

νεοπλασμάτων [274]. Στο καρκίνο του πνεύμονα, οι μεταλλάξεις της PRDX6 αναστέλλουν τη μετάσταση του όγκου [275]. Από την άλλη, σε πειράματα με ποντίκια, η δραστηριότητα αιPLA2 ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK2 / STAT3 αυξάνοντας τον αριθμό επαγόμενων από ουρεθάνη αδενοκαρκινωμάτων. Επιπλέον η αιPLA2 ευνοεί την ογκογένεση μέσω υπερέκφρασης των μονοπατιών AP-1 και JNK και την ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα καρκίνου πνεύμονα ποντικού [226, 276, 277].

Στο καρκίνο του μαστού, η υπερέκφραση του PRDX6 σχετίστηκε με κακή πρόγνωση ανεξάρτητα από την δράση PLA2 [278]. Αντίθετα, το αιPLA2-PRDX6 αύξησε την απόπτωση από TNFα σε HKK in vitro [279]. Στο καρκίνο του οισοφάγου, η υπερέκφραση της PRDX6 φαίνεται να αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό και την αντίσταση στην ακτινοβολία ενώ στο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών αυξημένα επίπεδα PRDX6 φαίνεται να αυξάνουν την αντίσταση στη πλατίνη [280,281].

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η έκφραση της PRDX6 αυξάνεται μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT/p38 και σχετίζεται με την διεισδυτικότητα του όγκου και τις μεταστάσεις των λεμφαδένων [282].

Αρχικά διερευνήθηκε η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση σε ιστικό και πλασματικό επίπεδο. Βρέθηκε μια μη στατιστικά σημαντική έκφραση της αιPLA στο πλάσμα σε όλους τους ασθενείς που εξετάστηκαν σε σχέση με υγιείς μάρτυρες αναδεικνύοντας ίσως την έμφυτη παρουσία της φωσφολιπάσης στον ορό που πιθανά δεν σχετίζεται με την καρκινική κατάσταση των ασθενών. Επιπλέον φάνηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση γονιδιακής έκφρασης σε qRT-PCR που συνέκρινε την έκφραση της PRDX6 στο όγκο με περίξ του όγκου υγιείς ιστούς. Αν και έκφραση mRNA εμφανίστηκε τόσο σε φυσιολογικό βλεννογόνο όσο και στον όγκο προέκυψε μια στατιστική σημαντικότητα μεταξύ τους. Η συνολική έκφραση ήταν μεγαλύτερη στους υγιείς περίξ του όγκου ιστούς και μικρότερη στο όγκο. Η παρατήρηση αυτή ίσως έχει αξία θεωρώντας ότι η PRDX6 ανευρίσκεται κατά τρόπο έμφυτο στον υγιή ιστό και πιθανά περιορίζεται στο καρκινικό ιστό λόγω αρνητικών σημάτων καταστολής από το όγκο με σκοπό την διατήρηση και επέκταση μιας ανισορροπίας σε οξειδοαναγωγικό επίπεδο, ανισορροπία που ευνοεί την ογκογένεση, τον συνεχή πολλαπλασιασμό κυττάρων, την τοπική διαταραχή μικροπεριβάλλοντος και την EMT.

Σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης PRDX-6 παρατηρήθηκε σε 12/30 (40%) περιστατικά, ενώ τα υπόλοιπα 18/30 (60%) ανάδειξαν μέτρια έως

χαμηλή έκφραση, ένα αποτέλεσμα που, αν και σε διαφορετικά δείγματα, συγκλίνει με την παραπάνω παρατήρηση ότι η PRDX6 εκφράζεται μέτρια ή χαμηλά στους καρκινικούς ιστούς. Η συνολική έκφραση της πρωτεΐνης αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική για το στάδιο των εξεταζόμενων όγκων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι υπάρχει μια προοδευτική αύξηση της έκφρασης από το στάδιο III έως το IV [287]. Το εύρημα έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη των Huang et al [282] που ανέδειξε υπερέκφραση της PRDX6 σε προχωρημένο στάδιο και το συσχέτισε με τον ρόλο της στην μετανάστευση και το μεταστατικό δυναμικό των όγκων. Τέλος, η σύγκριση των μέσων όρων έκφρασης των καρκινωμάτων σε σχέση με παρακείμενους υγιείς ιστούς δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το PRDX6 αποτέλεσμα που μερικώς συγκλίνει με την qRT-PCR αφήνοντας ερωτηματικά για πολλαπλούς άγνωστους παράγοντες που επηρεάζουν την έκφρασή της.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μια σειρά γενετικών και επιγενετικών απορρυθμίσεων λαμβάνουν χώρα στο ενδοκυττάριο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής εκτροπής και της κακοήθους εξαλλαγής. Πολλές από αυτές βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο διερεύνησης καρπός της οποίας είναι αφενός μεν μια πλούσια πλέον γνώση και βιβλιογραφία των μηχανισμών σηματοδότησης της νεοπλασματικής διεργασίας αλλά και μια νεότερη και πιο αποτελεσματική προσέγγιση σε επίπεδο χημειοθεραπείας ή ανοσοθεραπείας. Ωστόσο ο ρόλος των λιπαρών οξέων όσο και παραγόντων του οξειδωτικού στρες σε αυτές τις διεργασίες ογκογένεσης αλλά και της αντίστασης των όγκων στην χημειο-ακτινοθεραπεία φαίνεται να αποτελεί επίσης μια σημαντική μεταβλητή. Οι φωσφολιπάσες A2 μέσω του αραχιδονικού οξέος εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις και νεοπλασματικές δραστηριότητες ιδιαίτερα του γαστρεντερικού γεγονός που επιβεβαιώνεται με μια πιο ενεργή έρευνα και πιο πλούσια βιβλιογραφία ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία. Ο ρόλος των υπεροξυοξειδοαναγωγασών στην ογκογένεση φαίνεται σιγά σιγά να τεκμηριώνεται αλλά τα δεδομένα είναι αρκετά αντικρουόμενα σε ότι αφορά την πρωτεϊνική έκφραση, τον τύπο των ιστών και των όγκων αλλά κυρίως τους ενδιάμεσους παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την δράση τους.

Τα αυξημένα επίπεδα ορού και mRNA και η υπερέκφραση του PLA2G2A που παρατηρήθηκε σε ένα σημαντικό υποσύνολο ΚΠΕ καθώς και ο συσχετισμός με την ανάπτυξη του όγκου (αυξημένη διάμετρος) τον καθιστούν έναν ενδιαφέροντα παράγοντα για περαιτέρω μελέτη και πιθανό θεραπευτικό στόχο στον ΚΠΕ. Τα αυξημένα επίπεδα ορού, η μη στατιστική σημαντικότητα mRNA και η υπερέκφραση του PLA2G3 που σχετίζεται με την επιθετική βιολογική συμπεριφορά (αποδιαφοροποίηση νεοπλασμάτων) και με την τοπογραφία των όγκων επιβάλλουν περισσότερη και ευρύτερη έρευνα. Η παρουσία στον ορό υγιών μαρτύρων και ασθενών, η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε περιβάλλοντες του όγκου υγιείς ιστούς και η υπερέκφραση του PRDX-6 που παρατηρείται σε ένα σημαντικό υποσύνολο ΚΠΕ που συσχετίζεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά (προχωρημένο στάδιο) δίνουν υλικό για μια πιο ευρεία έρευνα του ενζύμου σε σχέση με τον ΚΠΕ και τα φαινόμενα οξειδοαναγωγών στον πρωτογενή όγκο ή κατά τη διάρκεια χημειοθεραπειών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Οι φωσφολιπάσες A2 (PLA2) είναι ένζυμα που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων υδρολύοντάς τα σε λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδοξειδοαναγωγάση-6 (PRDX6) είναι πρωτεΐνη που δρα ως αντιοξειδωτικό ένζυμο, εμπλέκεται κυρίως στη μείωση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου και την επιδιόρθωση κυτταρικών μεμβρανών και με δραστικότητα φωσφολιπάσης A2. Παίζουν ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση, στη φλεγμονή, στην αθηροσκλήρυνση και στον καρκίνο. Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την έκφραση των PLA2G2A, PLA2G3, PRDX-6 στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (ΚΠΕ).

Μέθοδοι: Μελετήθηκε η γονιδιακή/πρωτεϊνική έκφραση σε ιστικό και πλάσματικό επίπεδο με προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Lowry, την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE), την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB), την απομόνωση ολικού RNA, τον ποσοτικό προσδιορισμό περιεκτικότητας και έλεγχο καθαρότητας RNA, την σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT) και ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) σε 14 ασθενείς με ΚΠΕ με μέσο όρο ηλικίας 73.5 έτη (53-91). Επιπλέον μελετήθηκε μια σειρά από τριάντα (n=30) μονωμένες με φορμαλίνη, ενσωματωμένες σε παραφίνη τομές ιστού πρωτογενούς ΚΠΕ ασθενών με μέσο όρο ηλικίας 77 έτη (53-90). Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία και ψηφιακή ανάλυση εικόνας (Digital Image Analysis).

Αποτελέσματα: Επίπεδα πλάσματος στατιστικά σημαντικά σε σχέση με υγιείς μάρτυρες για την PLA2G2A αναδείχθηκαν σε 7/14 ασθενείς ενώ στατιστικά σημαντική συσχέτιση (υπερσυγκέντρωση PLA2G2A) αναδείχθηκε και σε επίπεδο mRNA σε σχέση με περιβάλλοντες του όγκου μη καρκινικούς ιστούς. Στην ανοσοϊστοχημεία, υπερέκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε 23/30 (76,6%) περιπτώσεις, ενώ χαμηλή σε 7/30 (23,4%). Η συνολική έκφραση συσχετίστηκε ισχυρά με τη διάμετρο του όγκου (p=0,004) (μη στατιστικά σημαντικό στάδιο: p=0,971, φλεγμονώδης διήθηση: p=0,795, εντόπιση καρκινώματος: p=0,340, βαθμός διαφοροποίησης: p=0,748 φύλο: p=0,369, εξέλιξη: p=0,433). Επίπεδα πλάσματος στατιστικά σημαντικά σε σχέση με υγιείς μάρτυρες για την PLA2G3 αναδείχθηκαν σε 12/14 ασθενείς. Μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση (υπερσυγκέντρωση) αναδείχθηκε

σε επίπεδο mRNA σε σχέση με περιβάλλοντες του όγκου μη καρκινικούς ιστούς. Υπερέκφραση πρωτεΐνης PLA2G3 παρατηρήθηκε σε 23/30 (76,6%) περιπτώσεις, ενώ χαμηλή έκφραση σε 07/30 (23,40%). Η συνολική έκφραση του PLA2G3 συσχετίστηκε ισχυρά με τον βαθμό και τον εντοπισμό του όγκου των εξεταζόμενων όγκων ($p=0,001$, $p=0,027$, αντίστοιχα), ενώ άλλες στατιστικές σημαντικότητες δεν αναγνωρίστηκαν (φλεγμονώδης διήθηση: $p=0,846$, στάδιο: $p=0,755$, όγκος διάμετρος: $p=0,300$, εξέλκωση: $p=0,872$, φύλο: $p=0,902$). Υψηλά επίπεδα πλάσματος PRDX-6-aiPLA2 αναδείχθηκαν σε όλους τους ασθενείς χωρίς στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση (υποσυγκέντρωση) αναδείχθηκε σε επίπεδο mRNA, με τα επίπεδα mRNA-PRDX6 μειωμένα σε σχέση με περιβάλλοντες του όγκου μη καρκινικούς ιστούς. Υπερέκφραση πρωτεΐνης PRDX-6 (αυξημένα επίπεδα ανοσοχρώσης) παρατηρήθηκε σε 12/30 (40%) περιπτώσεις, ενώ 18/30 (60%) ιστοί παρουσίασαν χαμηλά έως μέτρια επίπεδα πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Η συνολική έκφραση του Prdx-6 συσχετίστηκε ισχυρά με το στάδιο των εξετασθέντων όγκων ($p=0,011$), ενώ άλλες στατιστικές σημαντικότητες δεν αναδείχθηκαν (φλεγμονώδης διήθηση: $p=0,364$, εντόπιση καρκινώματος: $p=0,93$, βαθμός διαφοροποίησης: $p=0,517$; διάμετρος όγκου: $p=0,983$, εξέλκωση: $p=0,622$).

Συμπεράσματα: Αυξημένα επίπεδα ορού και mRNA και η υπερέκφραση του PLA2G2A που παρατηρείται σε ένα σημαντικό υποσύνολο ΚΠΕ που συσχετίζεται με την προχωρημένη εξέλιξη της ανάπτυξης του όγκου (αυξημένη διάμετρος) τον καθιστούν έναν ενδιαφέροντα παράγοντα ως βιοδείκτη και πιθανό θεραπευτικό στόχο στον ΚΠΕ. Αυξημένα επίπεδα ορού, μη στατιστική σημαντικότητα mRNA και η υπερέκφραση του PLA2G3 που παρατηρείται σε ένα σημαντικό υποσύνολο ΚΠΕ που σχετίζεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά (αποδιαφοροποίηση νεοπλασμάτων) και επίσης ένα είδος επιλεκτικότητας στον εντοπισμό του κακοήθους υποστρώματος επιτρέπουν περισσότερη και ευρύτερη έρευνα. Η παρουσία στον ορό τόσο υγιών μαρτύρων όσο και ασθενών, η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε περιβάλλοντες του όγκου υγιείς ιστούς και η υπερέκφραση του Prdx-6 που παρατηρείται σε ένα σημαντικό υποσύνολο ΚΠΕ που συσχετίζεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά (προχωρημένο στάδιο) δίνουν υλικό για μια πιο ευρεία έρευνα του ενζύμου σε σχέση με τον ΚΠΕ και τα φαινόμενα οξειδοαναγωγών στον πρωτογενή όγκο ή κατά τη διάρκεια χημειοθεραπειών.

ABSTRACT

Title: Study of the phospholipases A2 isoforms expression in patients with colon cancer.

Evangelos Falidas

Background/Aim: Phospholipases A2 (PLA2) are enzymes that regulate metabolism of the phospholipids by hydrolyzing them into fatty acids. Peroxiredoxin-6 (PRDX-6) is a protein acting as antioxidant enzyme and partially as PLA2 phospholipase involved in a variety of metabolic functions including mainly the intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂) levels reduction and the repair of altered cellular membranes. They play a critical role in cellular signaling, inflammation, atherosclerosis and in cancer. The aim of this study is to investigate the expression of PLA2G2A, PLA2G3, PRDX6 in colon adenocarcinomas (CRC).

Methods: Gene /protein tissue expression was studied at tissue and plasma levels by total protein assay Lowry method, protein electrophoresis in denatured polyacrylamide gel (SDS-PAGE), immunoblotting of proteins, total RNA content assay isolation and purity control, mRNA reverse transcription cDNA synthesis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in 14 CRC patients with a mean age 73.5 (53-91). In addition, a series of thirty (n = 30) formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of primary CRCs of patients with a mean age of 77 (53-90) were studied. Immunohistochemistry and digital image analysis (Digital Image Analysis) were performed.

Results: Statistically significant plasma levels between CRC and healthy controls for PLA2G2A were found in 7/14 patients. A statistically significant correlation (PLA2G2A hyperconcentration) was observed at mRNA level between tumor and non-cancerous surrounding tissues. PLA2G2A protein over expression was observed in 23/30 (76.6%) cases, whereas 7/30 (23.4%) CRC tissues demonstrated low protein levels, respectively. PLA2G2A overall expression was strongly associated with tumor diameter ($p=0.004$), whereas other statistical significances were not assessed (stage: $p=0.971$, inflammatory infiltration: $p=0.795$; carcinoma location: $p=0.340$; differentiation grade: $p=0.748$; gender: $p=0.369$; ulceration: $p=0.433$). Statistically significant plasma levels between CRC and healthy controls for PLA2G3 were found in 12/14 patients. A statistically significant correlation (PLA2G3 hyperconcentration) was not observed at mRNA level between tumor and non-cancerous surrounding

tissues. PLA2G3 protein over expression (increased immunostaining levels) was observed in 23/30 (76.6%) cases, whereas 07/30 (23.40%) CRCs tissues demonstrated low protein levels, respectively. PLA2G3 overall expression was strongly associated with the grade and tumor localization of the examined tumors ($p=0.001$, $p=0.027$, respectively), whereas other statistical significances were not assessed (inflammatory infiltration: $p=0.846$; stage: $p=0.755$; tumor diameter: $p=0.300$; ulceration: $p=0.872$; gender: $p=0.902$). No statistically significant plasma levels (however high in all 14 patients) between CRC and healthy controls for PRDX6 were found in 12/14 patients. High plasma levels of PRDX6-aiPLA2 were found in all CRC patients compared to healthy controls without however statistical significance. A statistically significant correlation (hypoconcentration) was observed at mRNA level between tumor and non-cancerous surrounding tissues (mRNA-PRDX6 levels reduced). PRDX-6 protein over expression was observed in 12/30 (40%) cases, whereas 18/30 (60%) CRC tissues demonstrated low to moderate protein levels, respectively. PRDX-6 overall expression was strongly associated with the stage of the examined tumors ($p=0.011$), whereas other statistical significances were not assessed (inflammatory infiltration: $p=0.364$; carcinoma location: $p=0.93$; differentiation grade: $p=0.517$; tumor diameter: $p=0.983$; ulceration: $p=0.622$).

Conclusions: Elevated serum and mRNA levels and overexpression of PLA2G2A observed in a significant subset of CRC associated with advanced tumor growth (increased diameter) make it an interesting biomarker and potential therapeutic target in CRC. Elevated serum levels, non-statistical significance of mRNA and overexpression of PLA2G3 observed in a significant CRC subset in immunohistochemistry associated with aggressive biological behavior (tumor differentiation) and a kind of selectivity in localization of malignant substrate allow a broader research. The elevated serum concentration in both healthy controls and patients, the higher mRNA concentration in non-cancerous surrounding tissues of the tumor and the overexpression of PRDX-6 observed in a significant subset of CRC related to aggressive biological behavior (advanced stage) provide material for a more extensive research of the enzyme regarding redox effects in the primary CRC or during chemotherapy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Netter's Κλινική Ανατομία, 2η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Βασιλειάδη 2015
2. Χειρουργικές Παθήσεις Παχέος Εντέρου και Πρωκτού, Κεφάλαιο 1. Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου και του πρωκτού. Α. Μιχαλόπουλος, Ιατρικές Εκδόσεις Βασιλειάδη 2015
3. Ignjatovic D, Spasojevic M, Stimec B. Can the gastrocolic trunk of Henle serve as an anatomical landmark in laparoscopic right colectomy? A postmortem anatomical study. *The American Journal of Surgery*. 2010;199:249–254.
4. Kadrić N, Mesić D, Bazardzanović M. Anatomija kolona, rektuma i anusa [Anatomy of the colon, rectum and anus]. *Med Arh*. 2003;57(3 Suppl 1):29-31
5. Negoï I, Beuran M, Hostiuc S, Negoï RI, Inoue Y. Surgical Anatomy of the Superior Mesenteric Vessels Related to Colon and Pancreatic Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2018 Mar 8;8(1):4184.
6. Spasojevic M, Stimec B, Fasel J, Terraz S, Ignjatovic D. 3D relations between right colon arteries and the superior mesenteric vein: a preliminary study with multidetector computed tomography. *Surgical endoscopy*. 2011;25:1883–1886.
7. Gamo E, Jiménez C, Pallares E, Simón C, Valderrama F, Sañudo JR, Arrazola J. The superior mesenteric artery and the variations of the colic patterns. A new anatomical and radiological classification of the colic arteries. *Surg Radiol Anat*. 2016 Jul;38(5):519-27
8. Ignjatovic D, Stimec B, Finjord T, Bergamaschi R. Venous anatomy of the right colon: three-dimensional topographic mapping of the gastrocolic trunk of Henle. *Tech Coloproctol*. 2004 Mar;8(1):19-21; discussion 21-2
9. Tajima Y, Ishida H, Ohsawa T, Kumamoto K, Ishibashi K, Haga N, Osada H. Three-dimensional vascular anatomy relevant to oncologic resection of right colon cancer. *Int Surg*. 2011 Oct-Dec;96(4):300-4
10. Jin G, Tuo H, Sugiyama M, Oki A, Abe N, Mori T, Masaki T, Atomi Y. Anatomic study of the superior right colic vein: its relevance to pancreatic and colonic surgery. *Am J Surg*. 2006 Jan;191(1):100-3
11. Spasojevic M, Stimec BV, Dyrbekk AP, Tepavcevic Z, Edwin B, Bakka A, Ignjatovic D. Lymph node distribution in the d3 area of the right mesocolon: implications for an anatomically correct cancer resection. A postmortem study. *Dis Colon Rectum*. 2013 Dec;56(12):1381-7

12. Jamieson JK, Dobson JF. VII. Lymphatics of the Colon: With Special Reference to the Operative Treatment of Cancer of the Colon. *Ann Surg.* 1909 Dec;50(6):1077-90
13. Textbook of Gastroenterology, Chapter 51. Colon: Anatomy and Structural Anomalies. Steven M. Cohn, Elisa H. Birnbaum, Charles M. Friel. Ed Tadataka Yamada, 2009 Blackwell Publishing Ltd
14. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ.* 1992 Apr 25;304(6834):1106-8.
15. Moran BJ, Jackson AA. Function of the human colon. *Br J Surg.* 1992 Nov;79(11):1132-7.
16. Carey WD. Colon physiology. A review. *Cleve Clin Q.* 1977 Summer;44(2):73-81.
17. Kvietys PR, Granger DN. Physiology and pathophysiology of the colonic circulation. *Clin Gastroenterol.* 1986 Oct;15(4):967-83.
18. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87-108
19. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-86
20. Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis.* 2011;29(2):222-8. doi: 10.1159/000323926. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21734388.
21. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017 Apr;66(4):683-691
22. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Sep;69(5):363-385
23. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med.* 2016 Jan 22;14:21
24. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30
25. Beaulieu N, Bloom R, Stein R. Breakway: the global burden of cancer – challenges and opportunities. *The Economist Intelligence Chart*, 2009.

26. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jun;18(6):1688-94.
27. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR, Liu K. Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Apr;11(4):385-91
28. Bruce WR, Giacca A, Medline A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Dec;9(12):1271-9.
29. Rafiemanesh H, Mohammadian-Hafshejani A, Ghoncheh M, Sepehri Z, Shamlou R, Salehiniya H, Towhidi F, Makhsosi BR. Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Relationships with the Human Development Index across the World. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(5):2465-73.
30. Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE. Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol.* 1998 May 1;147(9):816-25
31. Sun L, Yu S. Diabetes mellitus is an independent risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2012 Jun;57(6):1586-97.
32. Guraya SY. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol.* 2015 May 21;21(19):6026-31.
33. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P, Jenab M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011 Sep;22(9):1958-1972.
34. Cheng J, Chen Y, Wang X, Wang J, Yan Z, Gong G, Li G, Li C. Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. *Eur J Cancer Prev* 2015 Jan; 24(1):6-15
35. Snider AJ, Bialkowska AB, Ghaleb AM, Yang VW, Obeid LM, Hannun YA. Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods Mol Biol.* 2016;1438:245-54.
36. Shawki S, Ashburn J, Signs SA, Huang E. Colon Cancer: Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018 Apr;27(2):269-287.
37. Vano YA, Rodrigues MJ, Schneider SM. Lien épidémiologique entre comportement alimentaire et cancer: exemple du cancer colorectal [Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer]. *Bull Cancer.* 2009 Jun;96(6):647-58. French

38. Rashtak S, Rego R, Sweetser SR, Sinicrope FA. Sessile Serrated Polyps and Colon Cancer Prevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017 May;10(5):270-278. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0264. Epub 2017 Mar 21
39. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2007 Dec;53(4):351-73 [abstract]
40. Aarons CB, Shanmugan S, Bleier JI. Management of malignant colon polyps: current status and controversies. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 21;20(43):16178-83
41. Freeman HJ. Early stage colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 14;19(46):8468-73
42. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):1- 24
43. Hugén N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol* 2014 Mar; 25(3): 651–657.
44. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 20;24(33):5313-27
45. Henson DE, Hueman MT, Chen D, Patel JA, Wang H, Schwartz AM. The anatomy of the TNM for colon cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2017 Feb;8(1):12-19.
46. Gonen M, Schrag D, Weiser MR. Nodal staging score: a tool to assess adequate staging of node-negative colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:6166-6171
47. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):537-44.
48. Weisenberg E. TNM staging of colorectal carcinoma (AJCC 8th edition). *PathologyOutlines.com* website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumorstaging8ed.html>. Accessed April 11th, 2019
49. Τριμπόνιας Γ, Πασπάτης Γ. Προληπτικός έλεγχος για καρκίνο παχέως εντέρου: σε ποιους, πότε και πόσο συχνά. *Ευεξία και διατροφή* 2010: 45: 6-9.

50. Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. *Cancer J.* 2010 May-Jun;16(3):196-201
51. Watanabe T, Muto T. Colorectal carcinogenesis based on molecular biology of early colorectal cancer, with special reference to nonpolypoid (superficial) lesions. *World J Surg.* 2000 Sep;24(9):1091-7
52. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1; 319(9):525-32.
53. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2101-14.
54. Jasperson K, Tuohy T, Neklason D, Burt R. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2044-58.
55. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Friedl W, Møller P, Hes FJ, Järvinen H, Mecklin JP, Nagengast FM, Parc Y, Phillips RK, Hyer W, Ponz de Leon M, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen JT, Clark SK, Hodgson SV. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut.* 2010 Jul;59(7):975-86
56. <https://eclass.uoa.gr/modules/document/index.php?course=MED409&download=/4f8e691encof/58065ff9Q31h/56ab16b79EIE.pptx>, website, accessed 13 November 2021
57. Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl).* 2009 Nov;87(11):1097-104 [abstract]
58. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2151-62
59. Hatano Y, Fukuda S, Hisamatsu K, Hirata A, Hara A, Tomita H. Multifaceted Interpretation of Colon Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 5;18(7):1446
60. Boman B, Huang E. Human Colon Cancer Stem Cells: A New Paradigm in Gastrointestinal Oncology. *JCO* 2008; 26(17): 2828-38
61. Salama P, Platell C. Colorectal cancer stem cells. *ANZ J Surg* 2009; 79: 697-702).
62. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12(37): 5932-40

63. Pino M, Chung D. The Chromosomal instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059-72
64. Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Cheng H, Ajani JA. Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer*. 2009 Aug 15;115(16):3609-17
65. Boland R, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2073-87.
66. Compton C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *ModPathol* 2003; 16(4): 376-88.
67. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016 Mar;13(1):120-35.
68. Raab M, Sanhaji M, Matthes Y, Hörlin A, Lorenz I, Dötsch C, Habbe N, Waidmann O, Kurunci-Csacsko E, Firestein R, Becker S, Strebhardt K. PLK1 has tumor-suppressive potential in APC-truncated colon cancer cells. *Nat Commun*. 2018 Mar 16;9(1):1106
69. Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*. 2003 Dec 12;2:41
70. Brandt R, Sell T, Lüthen M, Uhlitz F, Klinger B, Riemer P, Giesecke-Thiel C, Schulze S, El-Shimy IA, Kunkel D, Fauler B, Mielke T, Mages N, Herrmann BG, Sers C, Blüthgen N, Morkel M. Cell type-dependent differential activation of ERK by oncogenic KRAS in colon cancer and intestinal epithelium. *Nat Commun*. 2019 Jul 2;10(1):2919
71. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, Penault-Llorca F, Bouché O, Tabernero J, Mini E, Goldberg RM, Folprecht G, Luc Van Laethem J, Sargent DJ, Alberts SR, Emile JF, Laurent Puig P, Sinicrope FA. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016 Dec 31;109(5):djw272.
72. Korphaisarn K, Pongpaibul A, Roothumnong E, Pongsuktavorn K, Thamlikitkul L, Anekpuritanang T, Pongvarin N, Thongnoppakhun W, Pithukpakorn M. High Frequency of KRAS Codon 146 and FBXW7 Mutations in Thai Patients with Stage II-III Colon Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Aug 1;20(8):2319-2326.

73. Wang G, Huang Y, Wu Z, Zhao C, Cong H, Ju S, Wang X. KRAS-mutant colon cancer cells respond to combined treatment of ABT263 and axitinib. *Biosci Rep*. 2019 Mar 6;39(3):BSR20181786.
74. Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019 Apr 1;11(4):267-276.
75. Hao Q, Cho W. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; 15(12):22109-22127
76. Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Mason JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jan;65(1):46-52
77. Tejpar S. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(6):1071-87.
78. Ma S, Lei Y, Zhang L, Wang J. Research on the inhibiting effect of tanshinone IIA on colon cancer cell growth via COX-2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J BUON*. 2018 Sep-Oct;23(5):1337-1342
79. Che XH, Chen CL, Ye XL, Weng GB, Guo XZ, Yu WY, Tao J, Chen YC, Chen X. Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. *Oncol Rep*. 2016 Mar;35(3):1680-8
80. Jin P, Wang DZ, Lyu CX, Wang YT, He YQ, Sheng JQ, Li X. Mismatch Repair Protein hMLH1, but not hMSH2, Enhances Estrogen-Induced Apoptosis of Colon Cancer Cells. *J Cancer*. 2017 Sep 15;8(16):3232-3241.
81. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015 Jul;16(7):30
82. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 1;33(16):1787-96
83. Koenig JL, Toesca DAS, Harris JP, Tsai CJ, Haraldsdottir S, Lin AY, Pollom EL, Chang DT. Microsatellite Instability and Adjuvant Chemotherapy in Stage II Colon Cancer. *Am J Clin Oncol*. 2019 Jul;42(7):573-580.
84. Gkekas I, Novotny J, Pecan L, Strigård K, Palmqvist R, Gunnarsson U. Microsatellite Instability as a Prognostic Factor in Stage II Colon Cancer Patients,

- a Meta-Analysis of Published Literature. *Anticancer Res.* 2017 Dec;37(12):6563-6574
85. Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Kim JY, Kim YH, Chang DK, Rhee PL, Kim DS, Yun H, Cho YB, Kim HC, Yun SH, Lee WY, Chun HK, Park YS. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 Sep;66(4):659-67
 86. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Fléjou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 2013;10(5):e1001453.
 87. Hong SP, Min BS, Kim TI, Cheon JH, Kim NK, Kim H, Kim WH. The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012 May;48(8):1235-43. doi: 10.1016/j.ejca.2011.10.005. Epub 2011 Nov 7
 88. Komor MA, Bosch LJ, Bounova G, Bolijn AS, Delis-van Diemen PM, Rausch C, Hoogstrate Y, Stubbs AP, de Jong M, Jenster G, van Grieken NC, Carvalho B, Wessels LF, Jimenez CR, Fijneman RJ, Meijer GA; NGS-ProToCol Consortium. Consensus molecular subtype classification of colorectal adenomas. *J Pathol.* 2018 Nov;246(3):266-276.
 89. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6
 90. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-7.

91. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J.* 2017 Summer;3(3):105-111. Epub 2017 Jun 13.
92. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:268.
93. Abdelkader A, Hartley C, Hagen C. Tubulovillous adenomas with serrated features are precursors to KRAS mutant colorectal carcinoma. *Modern Pathol.* 2017;30(S2):157
94. Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules.* 2020 Oct 19;10(10):1457
95. Kim RR, Chen Z, Mann TJ, Bastard K, F Scott K, Church WB. Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2. *Molecules.* 2020 Sep 28;25(19):4459.
96. Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;77:495–520.
97. Murakami M, Yamamoto K, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y. The Roles of the Secreted Phospholipase A2 Gene Family in Immunology. *Adv Immunol.* 2016;132:91-134.
98. Hui DY. Group 1B phospholipase A2 in metabolic and inflammatory disease modulation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019;1864:784–788.
99. Entwistle LJ, Pelly VS, Coomes SM, Kannan Y, Perez-Lloret J, Czieso S, Silva Dos Santos M, MacRae JI, Collinson L, Sesay A, Nikolov N, Metidji A, Helmby H, Hui DY, Wilson MS. Epithelial-Cell-Derived Phospholipase A2 Group 1B Is an Endogenous Anthelmintic. *Cell Host Microbe.* 2017 Oct 11;22(4):484-493.e5
100. Pothlichet J, Rose T, Bugault F, Jemmet L, Meola A, Haouz A, Saul F, Geny D, Alcamí J, Ruiz-Mateos E, Teyton L, Lambeau G, Thèze J. PLA2G1B is involved in CD4 anergy and CD4 lymphopenia in HIV-infected patients. *J Clin Invest.* 2020 Jun 1;130(6):2872-2887.
101. Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y, Sato H, Shimo K, Kobayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Kabashima K, Arita M, Arai H, Lambeau G, Bollinger JM, Hara S, Gelb MH, Murakami M. Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J Exp Med.* 2013 Jun 3;210(6):1217-34.

102. Murakami M, Miki Y, Sato H, Murase R, Taketomi Y, Yamamoto K. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A2s. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019;1864:803–818.
103. Vijay R, Hua X, Meyerholz DK, Miki Y, Yamamoto K, Gelb M, Murakami M, Perlman S. Critical role of phospholipase A2 group IID in age-related susceptibility to severe acute respiratory syndrome–CoV infection. *J. Exp. Med.* 2015;212:1851–1868.
104. Ohtsuki M, Taketomi Y, Arata S, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Yamamoto K, Kudo I, Murakami M. Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36420-33
105. Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metab.* 2014 Jul 1;20(1):119-32.
106. Yamaguchi M, Samuchiwal SK, Quehenberger O, Boyce JA, Balestrieri B. Macrophages regulate lung ILC2 activation via Pla2g5-dependent mechanisms. *Mucosal Immunol.* 2018 May;11(3):615-626
107. Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, Sato H, Yamamoto K, Masuda S, Pernet-Gallay K, Pierre V, Hara S, Murakami M, De Waard M, Lambeau G, Arnoult C. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest.* 2010 May;120(5):1415-28
108. Murase R, Sato H, Yamamoto K, Ushida A, Nishito Y, Ikeda K, Kobayashi T, Yamamoto T, Taketomi Y, Murakami M. Group X secreted phospholipase A2 releases ω 3 polyunsaturated fatty acids, suppresses colitis, and promotes sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 2016;291:6895–6911.
109. Henderson WR Jr, Chi EY, Bollinger JG, Tien YT, Ye X, Castelli L, Rubtsov YP, Singer AG, Chiang GK, Nevalainen T, Rudensky AY, Gelb MH. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 2007 Apr 16;204(4):865-77.

110. Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A₂. *J Lipid Res.* 2015 Jul;56(7):1248-61
111. Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: A family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J. Lipid Res.* 2008;50:S63–S68.
112. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 2011;111:6130–6185.
113. Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.* 1990;31:228–238 [abstract]
114. Yu L, Dennis EA. Critical role of a hydrogen bond in the interaction of phospholipase A₂ with transition-state and substrate analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:9325–9329.
115. Jain MK, Gelb MH. Phospholipase A₂-catalyzed hydrolysis of vesicles: Uses of interfacial catalysis in the scooting mode. *Meth. Enzymol.* 1991;197:112–125
116. Dore E, Boilard E. Roles of secreted phospholipase A₂ group IIA in inflammation and host defense. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019;1864:789–802.
117. Kuwata H, Yamamoto S, Takekura A, Murakami M, Kudo I. Group IIA secretory phospholipase A₂ is a unique 12/15-lipoxygenase-regulated gene in cytokine-stimulated rat fibroblastic 3Y1 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1686:15–23.
118. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48535-49
119. Wong DA, Kita Y, Uozumi N, Shimizu T. Discrete role for cytosolic phospholipase A₂α in platelets: Studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA secretory phospholipase A₂. *J. Exp. Med.* 2002;196:349–357.
120. Murakami M, Kuwata H, Amakasu Y, Shimbara S, Nakatani Y, Atsumi G, Kudo I. Prostaglandin E₂ amplifies cytosolic phospholipase A₂- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in mouse osteoblastic cells.

- Enhancement by secretory phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1997;272:19891–19897
121. Edwards SH, Thompson D, Baker SF, Wood SP, Wilton DC. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry.* 2002;41:15468–15476
 122. Bryant KJ, Bidgood MJ, Lei PW, Taberner M, Salom C, Kumar V, Lee L, Church WB, Courtenay B, Smart BP, Gelb MH, Cahill MA, Graham GG, McNeil HP, Scott KF. A bifunctional role for group IIA secreted phospholipase A2 in human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem.* 2011 Jan 28;286(4):2492-503
 123. Tada K, Murakami M, Kambe T, Kudo I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J. Immunol.* 1998;161:5008–5015.
 124. Saegusa J, Akakura N, Wu CY, Hoogland C, Ma Z, Lam KS, Liu FT, Takada YK, Takada Y. Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins α v β 3 and α 4 β 1 and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2008;283:26107–26115.
 125. Han WK, Sapirstein A, Hung CC, Alessandrini A, Bonventre JV. Cross-talk between cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA2 regulates cPLA2 α activity that is responsible for arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* 2003;278:24153–24163
 126. Dong Q, Patel M, Scott KF, Graham GG, Russell PJ, Sved P. Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2006;240:9–16
 127. Kuwata H., Nakatani Y., Murakami M., Kudo I. Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1733–1740
 128. Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1990;265:9526–9532

129. Suga H, Murakami M, Kudo I, Inoue K. Participation in cellular prostaglandin synthesis of type-II phospholipase A2 secreted and anchored on cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Eur. J. Biochem./FEBS*. 1993;218:807–813.
130. Murakami M, Nakatani Y, Kuwata H, Kudo I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000;1488:159–166.
131. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls*. 2011;68:3033–3046.
132. Gronroos JO, Salonen JH, Viander M, Nevalainen TJ, Laine VJ. Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. *Scand. J. Immunol*. 2005;62:413–419
133. Mayer RJ, Marshall LA. New insights on mammalian phospholipase A2(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J*. 1993;7:339–348.
134. Boilard E, Lai Y, Larabee K, Balestrieri B, Ghomashchi F, Fujioka D, Gobezie R, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Thornhill TS, Divangahi M, Remold H, Lambeau G, Gelb MH, Arm JP, Lee DM. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol Med*. 2010 May;2(5):172-87
135. Tan TL, Goh YY. The role of group IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a biomarker for the diagnosis of sepsis and bacterial infection in adults-A systematic review. *PLoS One*. 2017 Jul 3;12(7):e0180554
136. Nakos G, Kitsioulis E, Hatzidaki E, Koulouras V, Touqui L, Lekka ME. Phospholipases A2 and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2005 Apr;33(4):772-9
137. Kim DK, Fukuda T, Thompson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol*. 1995;269:L109–L118. [abstract]
138. Quach ND, Arnold RD, Cummings BS. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol*. 2014 Aug 15;90(4):338-48
139. Dacheux M, Sinou V, Payré C, Jeammet L, Parzy D, Grellier P, Deregnaucourt C, Lambeau G. Antimalarial activity of human group IIA secreted phospholipase

- A2 in relation to enzymatic hydrolysis of oxidized lipoproteins. *Infect. Immun.* 2019;87:e00556-19
140. Rosenson RS, Hurt-Camejo E. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur. Heart J.* 2012;33:2899–2909.
 141. Hartford M, Wiklund O, Mattsson Hulten L, Perers E, Person A, Herlitz J, Hurt-Camejo E, Karlsson T, Caidahl K. CRP, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA, and intercellular adhesion molecule-1 during the early phase of acute coronary syndromes and long-term follow-up. *Int. J. Cardiol.* 2006;108:55–62
 142. Brglez V, Lambeau G, Petan T. Secreted phospholipases A2 in cancer: diverse mechanisms of action. *Biochimie.* 2014 Dec;107 Pt A:114-23.
 143. Menschikowski M, Hagelgans A, Schuler U, Froeschke S, Rosner A, Siegert G. Plasma levels of phospholipase A2-IIA in patients with different types of malignancies: Prognosis and association with inflammatory and coagulation biomarkers. *Pathol. Oncol. Res.* 2013;19:839–846.
 144. Graff JR, Konicek BW, Deddens JA, Chedid M, Hurst BM, Colligan B, Neubauer BL, Carter HW, Carter JH. Expression of group Iia secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clin. Cancer Res.* 2001;7:3857–3861.
 145. Xing XF, Li H, Zhong XY, Zhang LH, Wang XH, Liu YQ, Jia SQ, Shi T, Niu ZJ, Peng Y, Du H, Zhang GG, Hu Y, Lu AP, Li JY, Chen S, Ji JF. Phospholipase A2 group IIA expression correlates with prolonged survival in gastric cancer. *Histopathology.* 2011 Aug;59(2):198-206
 146. Jiang J, Neubauer BL, Graff JR, Chedid M, Thomas JE, Roehm NW, Zhang S, Eckert GJ, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2002 Feb;160(2):667-71
 147. Dong Z, Liu Y, Scott KF, Levin L, Gaitonde K, Bracken RB, Burke B, Zhai QJ, Wang J, Oleksowicz L, Lu S. Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1948-55
 148. Halpern AL, Kohtz PD, White AM, Houk AK, Rehring JF, Hanson L, McCarter MD, Joshi M, Meng X, Fullerton DA, Weyant MJ. Secretory Phospholipase A2 Iia Mediates Expression of Growth Factor Receptors in Esophageal Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci.* 2021 Mar;66(3):784-795

149. Dong Z, Meller J, Succop P, Wang J, Wikenheiser-Brokamp K, Starnes S, Lu S. Secretory phospholipase A2-IIa upregulates HER/HER2-elicited signaling in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2014 Sep;45(3):978-84.
150. Schewe M, Franken PF, Sacchetti A, Schmitt M, Joosten R, Böttcher R, van Royen ME, Jeammet L, Payré C, Scott PM, Webb NR, Gelb M, Cormier RT, Lambeau G, Fodde R. Secreted Phospholipases A2 Are Intestinal Stem Cell Niche Factors with Distinct Roles in Homeostasis, Inflammation, and Cancer. *Cell Stem Cell.* 2016 Jul 7;19(1):38-51
151. Scott KF, Sajinovic M, Hein J, Nixdorf S, Galettis P, Liauw W, de Souza P, Dong Q, Graham GG, Russell PJ. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. *Biochimie.* 2010 Jun;92(6):601-10.
152. Belinsky GS, Rajan TV, Saria EA, Giardina C, Rosenberg DW. Expression of secretory phospholipase A2 in colon tumor cells potentiates tumor growth. *Mol Carcinog.* 2007 Feb;46(2):106-16.
153. He HL, Lee YE, Shiue YL, Lee SW, Lin LC, Chen TJ, Wu TF, Li CF. PLA2G2A overexpression is associated with poor therapeutic response and inferior outcome in rectal cancer patients receiving neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Histopathology.* 2015 Jun;66(7):991-1002.
154. Vecchi L, Araújo TG, Azevedo FVPV, Mota STS, Ávila VMR, Ribeiro MA, Goulart LR. Phospholipase A(2) Drives Tumorigenesis and Cancer Aggressiveness through Its Interaction with Annexin A1. *Cells.* 2021 Jun 11;10(6):1472.
155. Hansford KA, Reid RC, Clark CI, Tyndall JD, Whitehouse MW, Guthrie T, McGearry RP, Schafer K, Martin JL, Fairlie DP. D-Tyrosine as a chiral precursor to potent inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (IIa) with antiinflammatory activity. *Chembiochem.* 2003;4:181–185.
156. Yu JA, Sadaria MR, Meng X, Mitra S, Ao L, Fullerton DA, Weyant MJ. Lung cancer cell invasion and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are attenuated by secretory phospholipase A(2) inhibition. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2012;143:405–411.
157. Moon TC, Hwang HS, Quan Z, Son KH, Kim CH, Kim HP, Kang SS, Son JK, Chang HW. Ochnaflavone, naturally occurring biflavonoid, inhibits phospholipase A2 dependent phosphatidylethanolamine degradation in a CC14-induced rat liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29:2359–2361.

158. Gimenes SNC, Lopes DS, Alves PT, Azevedo FVPV, Vecchi L, Goulart LR, Rodrigues TCS, Santos ALQ, Brites VLC, Teixeira TL, da Silva CV, Dias MH, Teixeira SC, Rodrigues RS, Yoneyama KAG, Oliveira RA, Rodrigues VM. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. *Sci Rep.* 2017 Aug 1;7(1):7077.
159. Zóia MAP, Azevedo FVP, Vecchi L, Mota STS, Rodovalho VR, Cordeiro AO, Correia LIV, Silva ACA, Ávila VMR, Araújo TG, Goulart LR. Inhibition of Triple-Negative Breast Cancer Cell Aggressiveness by Cathepsin D Blockage: Role of Annexin A1. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 16;20(6):1337
160. Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 2000;275:7492–7496.
161. Hariprasad G, Kumar M, Kaur P, Singh TP, Kumar RP. Human group III PLA2 as a drug target: structural analysis and inhibitor binding studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2010;47:496–501
162. Cupillard L, Koumanov K, Mattéi MG, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):15745-52. doi: 10.1074/jbc.272.25.15745.
163. Murakami M, Masuda S, Shimbara, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Cellular Distribution, Post-translational Modification, and Tumorigenic Potential of Human Group III Secreted Phospholipase A2. *J.Biol.Chem* 2005;280(26): 24987–24998
164. Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet JR. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 2006;74:1104–1113.
165. Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, Hosono T, Arata S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Kudo I, Murakami M. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J. Clin. Invest.* 2010;120:1400–1414.
166. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, Nakanishi H, Shindou H, Okamura T, Ito C, Toshimori K, Sasaki T, Shimizu T. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells

- by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 2017;292:12065–12076.
167. Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat. Immunol.* 2013;14:554–563
168. Ishimoto Y, Yamada K, Yamamoto S, Ono T, Notoya M, Hanasaki K. Group V and X secretory phospholipase A2s-induced modification of high-density lipoprotein linked to the reduction of its antiatherogenic functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;1642:129–138.
169. Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M. Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 2008;283:33483–33497.
170. Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Masuda S, Kobayashi T, Yamamoto K, Murakami M. Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation. *Biochem. J.* 2009;421:17–27.
171. Yang H, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Ong WY. Expression and localization of sPLA2-III in the rat CNS. *Neurochem. Res.* 2013;38:753–760.
172. Masuda S, Yamamoto K, Hirabayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I, Murakami M. Human group III secreted phospholipase A2 promotes neuronal outgrowth and survival. *Biochem. J.* 2008;409:429–438.
173. Martinez-Garcia A, Sastre I, Recuero M, Aldudo J, Vilella E, Mateo I, Sanchez-Juan P, Vargas T, Carro E, Bermejo-Pareja F, Rodriguez-Rodriguez E, Combarros O, Rosich-Estrago M, Frank A, Valdivieso F, Bullido MJ. PLA2G3, a gene involved in oxidative stress induced death, is associated with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2010;22:1181–1187.

174. Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, Yamamoto K, Murakami M. Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. *Sci Rep.* 2017 Sep 25;7(1):12261.
175. Mounier CM, Wendum D, Greenspan E, Fléjou JF, Rosenberg DW, Lambeau G. Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. *Br J Cancer.* 2008 Feb 12;98(3):587-95.
176. Hoeft B, Linseisen J, Beckmann L, Müller-Decker K, Canzian F, Hüsing A, Kaaks R, Vogel U, Jakobsen MU, Overvad K, Hansen RD, Knüppel S, Boeing H, Trichopoulou A, Koumantaki Y, Trichopoulos D, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, van Gils CH, Peeters PH, Dumeaux V, Lund E, Huerta Castaño JM, Muñoz X, Rodriguez L, Barricarte A, Manjer J, Jirström K, Van Guelpen B, Hallmans G, Spencer EA, Crowe FL, Khaw KT, Wareham N, Morois S, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Chajes V, Jenab M, Boffetta P, Vineis P, Mouw T, Norat T, Riboli E, Nieters A. Polymorphisms in fatty-acid-metabolism-related genes are associated with colorectal cancer risk. *Carcinogenesis.* 2010 Mar;31(3):466-72.
177. Kazama S, Kitayama J, Hiyoshi M, Taketomi Y, Murakami M, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Yamaguchi H, Nozawa H, Ishihara S, Sunami E, Watanabe T. Phospholipase A2 Group III and Group X Have Opposing Associations with Prognosis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2015 May;35(5):2983-90.
178. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 1993 Jan 29;72(2):269-78. [abstract]
179. Lin S, Lee SJ, Shim H, Chun J, Yun CC. The absence of LPA receptor 2 reduces the tumorigenesis by ApcMin mutation in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010;299:G1128–1138.
180. Grill M, Högenauer C, Blesl A, Haybaeck J, Golob-Schwarzl N, Ferreirós N, Thomas D, Gurke R, Trötz Müller M, Köfeler HC, Gallé B, Schicho R. Members of the endocannabinoid system are distinctly regulated in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Sci Rep.* 2019 Feb 20;9(1):2358.
181. Duffin R, O'Connor RA, Crittenden S, Forster T, Yu C, Zheng X, Smyth D, Robb CT, Rossi F, Skouras C, Tang S, Richards J, Pellicoro A, Weller RB, Breyer RM,

- Mole DJ, Iredale JP, Anderton SM, Narumiya S, Maizels RM, Ghazal P, Howie SE, Rossi AG, Yao C. Prostaglandin E₂ constrains systemic inflammation through an innate lymphoid cell-IL-22 axis. *Science*. 2016 Mar 18;351(6279):1333-8.
182. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):92-101.
183. Muñoz M, Eidenschenk C, Ota N, Wong K, Lohmann U, Köhl AA, Wang X, Manzanillo P, Li Y, Rutz S, Zheng Y, Diehl L, Kayagaki N, van Lookeren-Campagne M, Liesenfeld O, Heimesaat M, Ouyang W. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity*. 2015 Feb 17;42(2):321-331.
184. Rigoni A, Bongiovanni L, Burocchi A, Sangaletti S, Danelli L, Guarnotta C, Lewis A, Rizzo A, Silver AR, Tripodo C, Colombo MP. Mast Cells Infiltrating Inflamed or Transformed Gut Alternatively Sustain Mucosal Healing or Tumor Growth. *Cancer Res*. 2015 Sep 15;75(18):3760-70.
185. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:763–77 [abstract]
186. Koizume S, Miyagi Y. Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1430.
187. Ray U, Roy D, Jin L, Thirusangu P, Staub J, Xiao Y, Kalogera E, Wahner Hendrickson AE, Cullen GD, Goergen K, Oberg AL, Shridhar V. Group III phospholipase A2 downregulation attenuated survival and metastasis in ovarian cancer and promotes chemo-sensitization. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Jun 3;40(1):182.
188. Tang Z, Lin MG, Stowe TR, Chen S, Zhu M, Stearns T, Franco B, Zhong Q. Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):254-7.
189. Menzl I, Lebeau L, Pandey R, Hassounah NB, Li FW, Nagle R, Weihs K, McDermott KM. Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development. *Cilia*. 2014 Jul 1;3:7
190. Gijls HL, Willemarck N, Vanderhoydonc F, Khan NA, Dehairs J, Derua R, Waelkens E, Taketomi Y, Murakami M, Agostinis P, Annaert W, Swinnen JV. Primary cilium suppression by SREBP1c involves distortion of vesicular trafficking by PLA2G3. *Mol Biol Cell*. 2015 Jun 15;26(12):2321-32.

191. Abbraccio MP, Brunstock G. Purinergic signalling: pathophysiological Roles *Jpn J. Pharmacol.* 1998;78:113-145.
192. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Aug;80:50-64.
193. Shields HJ, Traa A and Van Raamsdonk JM (2021) Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:628157. doi: 10.3389/fcell.2021.62815
194. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084.
195. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017 Feb 28;387:95-105
196. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:472-485.
197. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, Varol M, Jain A, Khan MA, Sethi G. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules.* 2019 Nov 13;9(11):735
198. Ismail T, Kim Y, Lee H, Lee DS, Lee HS. Interplay Between Mitochondrial Peroxiredoxins and ROS in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 7;20(18):4407.
199. Park MH, Jo M, Kim YR, Lee CK, Hong JT. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2016 Jul;163:1-23.
200. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *J Biol Chem.* 2012;287:4403–4410.
201. Wu Y, Feinstein SI, Manevich Y, Chowdhury I, Pak JH, Kazi A. Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A(2) activity. *Biochem J.* 2009;419:669–679.
202. Krishnaiah SY, Dodia C, Feinstein SI, Fisher AB. p67(phox) terminates the phospholipase A(2)-derived signal for activation of NADPH oxidase (NOX2) *FASEB J.* 2013;27:2066–2073.
203. O’Leary PC, Terrile M, Bajor M, Gaj P, Hennessy BT, Mills GB. Peroxiredoxin-1 protects estrogen receptor α from oxidative stress-induced suppression and is a

- protein biomarker of favorable prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16:R79-R79.
204. Watanabe R., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther.* 2010;127:261–270. [abstract]
 205. Zhao F, Wang Q. The protective effect of peroxiredoxin II on oxidative stress induced apoptosis in pancreatic β -cells. *Cell Biosci.* 2012;2:22.
 206. Sobotta MC, Liou W, Stöcker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol.* 2015;11:64–70.[abstract]
 207. Masaki M, Ikeda A, Shiraki E, Oka S, Kawasaki T. Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. *Eur J Biochem.* 2003 Jan;270(1):76-83.
 208. Song I.S., Kim H.K., Jeong S.H., Lee S.R., Kim N., Rhee B.D. Mitochondrial Peroxiredoxin III is a Potential Target for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2011;12:7163–7185.
 209. Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT. Regulatory Role for a Novel Human Thioredoxin Peroxidase in NF- κ B Activation. *J Biol Chem.* 1997;272:30952–30961
 210. Nguyễn-Nhu NT, Berck J, Clippe A, Duconseille E, Cherif H, Boone C, Van der Eecken V, Bernard A, Banmeyer I, Knoops B. Human peroxiredoxin 5 gene organization, initial characterization of its promoter and identification of alternative forms of mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jul-Aug;1769(7-8):472-83
 211. Abbas K, Breton J, Picot CR, Quesniaux V, Bouton C, Drapier JC. Signaling events leading to peroxiredoxin 5 up-regulation in immunostimulated macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:794–802.
 212. Diet A, Abbas K, Bouton C, Guillon B, Tomasello F, Fourquet S. Regulation of Peroxiredoxins by Nitric Oxide in Immunostimulated Macrophages. *J Biol Chem.* 2007;282:36199–36205.
 213. Fisher AB. Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A(2) Activities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:831–844.
 214. Yang CS, Lee DS, Song CH, An SJ, Li S, Kim JM, Kim CS, Yoo DG, Jeon BH, Yang HY, Lee TH, Lee ZW, El-Benna J, Yu DY, Jo EK. Roles of peroxiredoxin

- II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. *J Exp Med*. 2007 Mar 19;204(3):583-94.
215. Seo MJ, Liu X, Chang M, Park JH. GATA-binding protein 1 is a novel transcription regulator of peroxiredoxin 5 in human breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2012 Mar;40(3):655-64
216. Yanagawa T, Iwasa S, Ishii T, Tabuchi K, Yusa H, Onizawa K, Omura K, Harada H, Suzuki H, Yoshida H. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker. *Cancer Lett*. 2000 Aug 1;156(1):27-35.[abstract]
217. Sun QK, Zhu JY, Wang W, Lv Y, Zhou HC, Yu JH, Xu GL, Ma JL, Zhong W, Jia WD. Diagnostic and prognostic significance of peroxiredoxin 1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2014 Jan;31(1):786
218. Lu W, Fu Z, Wang H, Feng J, Wei J, Guo J. Peroxiredoxin 2 is upregulated in colorectal cancer and contributes to colorectal cancer cells' survival by protecting cells from oxidative stress. *Mol Cell Biochem*. 2014 Feb;387(1-2):261-70 [abstract]
219. Basu A, Banerjee H, Rojas H, Martinez SR, Roy S, Jia Z, Lilly MB, De León M, Casiano CA. Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *Prostate*. 2011 May 15;71(7):755-65
220. Qiao B, Wang J, Xie J, Niu Y, Ye S, Wan Q, Ye Q. Detection and identification of peroxiredoxin 3 as a biomarker in hepatocellular carcinoma by a proteomic approach. *Int J Mol Med*. 2012 May;29(5):832-40
221. Wang XY, Wang HJ, Li XQ. Peroxiredoxin III protein expression is associated with platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2013 Aug;34(4):2275-81[abstract]
222. Hwang KE, Park C, Seol CH, Hwang YR, Hwang JS, Jung JW, Choi KH, Jeong ET, Kim HR. Elevated prx1 provides resistance to docetaxel, but is not associated with predictive significance in lung cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2013 Aug;75(2):59-66
223. Yi N, Xiao MB, Ni WK, Jiang F, Lu CH, Ni RZ. High expression of peroxiredoxin 4 affects the survival time of colorectal cancer patients, but is not an independent unfavorable prognostic factor. *Mol Clin Oncol*. 2014 Sep;2(5):767-772

224. Quan C, Cha EJ, Lee HL, Han KH, Lee KM, Kim WJ. Enhanced expression of peroxiredoxin I and VI correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1512-6.
225. Zhang XZ, Xiao ZF, Li C, Xiao ZQ, Yang F, Li DJ, Li MY, Li F, Chen ZC. Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Dec;100(12):2396-401
226. Yun HM, Park MH, Kim DH, Ahn YJ, Park KR, Kim TM, Yun NY, Jung YS, Hwang DY, Yoon DY, Han SB, Hong JT. Loss of presenilin 2 is associated with increased iPLA2 activity and lung tumor development. *Oncogene*. 2014 Oct 30;33(44):5193-200
227. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(1):221-9
228. Perez-Pinzon MA, Stetler RA, Fiskum G. Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Jul;32(7):1362-76
229. Fisher AB. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2017 Mar 1;617:68-83.
230. Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 1;15(3):795-815
231. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*. 2001;52:35-41.
232. Zhou S, Sorokina EM, Harper S, Li H, Ralat L, Dodia C, Speicher DW, Feinstein SI, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 homodimerization and heterodimerization with glutathione S-transferase pi are required for its peroxidase but not phospholipase A2 activity. *Free Radic Biol Med*. 2016 May;94:145-56.
233. Ralat LA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry*. 2006 Jan 17;45(2):360-72 [abstract]
234. Poole LB, Nelson KJ. Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Mol Cells*. 2016 Jan;39(1):53-9

235. Fukuhara R, Kageyama T. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2005 Aug;141(4):428-36 [abstract]
236. Liu G, Feinstein SI, Wang Y, Dodia C, Fisher D, Yu K, Ho YS, Fisher AB. Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung. *Free Radic Biol Med*. 2010 Oct 15;49(7):1172-81.
237. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 2000 Sep 15;275(37):28421-7
238. Fisher AB, Dodia C, Chander A, Jain M. A competitive inhibitor of phospholipase A2 decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung. *Biochem J*. 1992 Dec 1;288 (Pt 2)(Pt 2):407-11.
239. Wu Y, Feinstein SI, Manevich Y, Chowdhury I, Pak JH, Kazi A, Dodia C, Speicher DW, Fisher AB. Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A(2) activity. *Biochem J*. 2009 May 1;419(3):669-79.
240. Fisher AB, Dodia C, Sorokina EM, Li H, Zhou S, Raabe T, Feinstein SI. A novel lysophosphatidylcholine acyl transferase activity is expressed by peroxiredoxin 6. *J Lipid Res*. 2016 Apr;57(4):587-96.
241. Fisher AB, Dodia C, Chander A. Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A2 by surfactant protein A. *Am J Physiol*. 1994 Sep;267(3 Pt 1):L335-41 [abstract]
242. Chowdhury I, Mo Y, Gao L, Kazi A, Fisher AB, Feinstein SI. Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan 15;46(2):146-53
243. Chowdhury I, Fisher AB, Christofidou-Solomidou M, Gao L, Tao JQ, Sorokina EM, Lien YC, Bates SR, Feinstein SI. Keratinocyte growth factor and glucocorticoid induction of human peroxiredoxin 6 gene expression occur by independent mechanisms that are synergistic. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 20;20(3):391-402.

244. Wu X, Ji P, Zhang L, Bu G, Gu H, Wang X, Xiong Y, Zuo B. The Expression of Porcine Prdx6 Gene Is Up-Regulated by C/EBP β and CREB. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144851
245. Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, Leto TL, Saito N. A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell*. 2007 Feb;18(2):441-54.
246. Lien YC, Feinstein SI, Dodia C, Fisher AB. The roles of peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 in protecting pulmonary microvascular endothelial cells against peroxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Mar 1;16(5):440-51.
247. Ozkosem B, Feinstein SI, Fisher AB, O'Flaherty C. Absence of Peroxiredoxin 6 Amplifies the Effect of Oxidant Stress on Mobility and SCSA/CMA3 Defined Chromatin Quality and Impairs Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa. *Biol Reprod*. 2016 Mar;94(3):68
248. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*. 2016 Mar;26(3):165-176
249. Manevich Y, Shuvaeva T, Dodia C, Kazi A, Feinstein SI, Fisher AB. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch Biochem Biophys*. 2009 May 15;485(2):139-49
250. Chatterjee S, Feinstein SI, Dodia C, Sorokina E, Lien YC, Nguyen S, Debolt K, Speicher D, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 2011 Apr 1;286(13):11696-706.
251. Wu YZ, Manevich Y, Baldwin JL, Dodia C, Yu K, Feinstein SI, Fisher AB. Interaction of surfactant protein A with peroxiredoxin 6 regulates phospholipase A2 activity. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7515-25.
252. Ellison MA, Thurman GW, Ambruso DR. Phox activity of differentiated PLB-985 cells is enhanced, in an agonist specific manner, by the PLA2 activity of Prdx6-PLA2. *Eur J Immunol*. 2012 Jun;42(6):1609-17.
253. Vázquez-Medina JP, Dodia C, Weng L, Mesaros C, Blair IA, Feinstein SI, Chatterjee S, Fisher AB. The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 modulates NADPH oxidase 2 activation via lysophosphatidic acid receptor

- signaling in the pulmonary endothelium and alveolar macrophages. *FASEB J*. 2016 Aug;30(8):2885-98
254. Chatterjee S, Fisher AB. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 20;20(6):899-913
255. Chatterjee S, Fujiwara K, Pérez NG, Ushio-Fukai M, Fisher AB. Mechanosignaling in the vasculature: emerging concepts in sensing, transduction and physiological responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Jun 15;308(12):H1451-62.
256. Chatterjee S, Browning EA, Hong N, DeBolt K, Sorokina EM, Liu W, Birnbaum MJ, Fisher AB. Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):H105-14
257. Wei Z, Manevich Y, Al-Mehdi AB, Chatterjee S, Fisher AB. Ca²⁺ flux through voltage-gated channels with flow cessation in pulmonary microvascular endothelial cells. *Microcirculation*. 2004 Sep;11(6):517-26
258. Fisher AB. The phospholipase A₂ activity of peroxiredoxin 6. *J Lipid Res*. 2018 Jul;59(7):1132-1147.
259. Fisher AB, Dodia C, Yu K, Manevich Y, Feinstein SI. Lung phospholipid metabolism in transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1761(7):785-92.
260. Kim KH, Lee W, Kim EE. Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 2;477(4):717-722.
261. Balboa MA, Balsinde J. Involvement of calcium-independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40384-9.
262. Manevich Y, Reddy KS, Shuvaeva T, Feinstein SI, Fisher AB. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J Lipid Res*. 2007 Oct;48(10):2306-18.
263. Li H, Benipal B, Zhou S, Dodia C, Chatterjee S, Tao JQ, Sorokina EM, Raabe T, Feinstein SI, Fisher AB. Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of

- peroxidized cell membranes following oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2015 Oct;87:356-65.
264. Akiba S, Dodia C, Chen X, Fisher AB. Characterization of acidic Ca(2+)-independent phospholipase A2 of bovine lung. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998 Jun;120(2):393-404.[abstract]
265. Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S46-51.
266. Abe A, Hiraoka M, Wild S, Wilcoxon SE, Paine R 3rd, Shayman JA. Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42605-11.
267. Kwon J, Wang A, Burke DJ, Boudreau HE, Lekstrom KJ, Korzeniowska A, Sugamata R, Kim YS, Yi L, Ersoy I, Jaeger S, Palaniappan K, Ambruso DR, Jackson SH, Leto TL. Peroxiredoxin 6 (Prdx6) supports NADPH oxidase1 (Nox1)-based superoxide generation and cell migration. *Free Radic Biol Med.* 2016 Jul;96:99-115.
268. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2731-40.
269. Power JH, Shannon JM, Blumbergs PC, Gai WP. Nonselenium glutathione peroxidase in human brain : elevated levels in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol.* 2002 Sep;161(3):885-94.
270. Power JH, Asad S, Chataway TK, Chegini F, Manavis J, Temlett JA, Jensen PH, Blumbergs PC, Gai WP. Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol.* 2008 Jun;115(6):611-22.
271. Moawad AR, Fernandez MC, Scarlata E, Dodia C, Feinstein SI, Fisher AB, O'Flaherty C. Deficiency of peroxiredoxin 6 or inhibition of its phospholipase A₂ activity impair the in vitro sperm fertilizing competence in mice. *Sci Rep.* 2017 Oct 11;7(1):12994.
272. Burillo E., Jorge I., Martinez-Lopez D., Camafeita E., Blanco-Colio L. M., Trevisan-Herraz M., Ezkurdia I., Egido J., Michel J. B., Meilhac O., et al. . 2016. Quantitative HDL proteomics identifies peroxiredoxin-6 as a biomarker of human abdominal aortic aneurysm. *Sci. Rep.* 6: 38477.

273. Pacifici F, Arriga R, Sorice GP, Capuani B, Scioli MG, Pastore D, Donadel G, Bellia A, Caratelli S, Coppola A, Ferrelli F, Federici M, Sconocchia G, Tesaro M, Sbraccia P, Della-Morte D, Giaccari A, Orlandi A, Lauro D. Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3210-20.
274. Rolfs F, Huber M, Gruber F, Böhm F, Pfister HJ, Bochkov VN, Tschachler E, Dummer R, Hohl D, Schäfer M, Werner S. Dual role of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 6 in skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 2013 Jun 1;73(11):3460-9.
275. Ho JN, Lee SB, Lee SS, Yoon SH, Kang GY, Hwang SG, Um HD. Phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2010 Apr;9(4):825-32.
276. Yun HM, Park KR, Park MH, Kim DH, Jo MR, Kim JY, Kim EC, Yoon DY, Han SB, Hong JT. PRDX6 promotes tumor development via the JAK2/STAT3 pathway in a urethane-induced lung tumor model. *Free Radic Biol Med*. 2015 Mar;80:136-44 [abstract]
277. Jo M, Yun HM, Park KR, Hee Park M, Myoung Kim T, Ho Pak J, Jae Lee S, Moon DC, Park CW, Song S, Lee CK, Bae Han S, Tae Hong J. Lung tumor growth-promoting function of peroxiredoxin 6. *Free Radic Biol Med*. 2013 Aug;61:453-63 [abstract]
278. Seibold P, Hall P, Schoof N, Nevanlinna H, Heikkinen T, Benner A, Liu J, Schmezer P, Popanda O, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients--potential differential effects by radiotherapy? *Breast*. 2013 Oct;22(5):817-23 [abstract].
279. Xu X, Lu D, Zhuang R, Wei X, Xie H, Wang C, Zhu Y, Wang J, Zhong C, Zhang X, Wei Q, He Z, Zhou L, Zheng S. The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 promotes cancer cell death induced by tumor necrosis factor alpha in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2016 Sep;55(9):1299-308 [abstract].
280. He Y, Xu W, Xiao Y, Pan L, Chen G, Tang Y, Zhou J, Wu J, Zhu W, Zhang S, Cao J. Overexpression of Peroxiredoxin 6 (PRDX6) Promotes the Aggressive Phenotypes of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer*. 2018 Oct 10;9(21):3939-3949.
281. Nicolussi A, D'Inzeo S, Capalbo C, Giannini G, Coppa A. The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol*. 2017 Feb;6(2):139-153

282. Huang WS, Huang CY, Hsieh MC, Kuo YH, Tung SY, Shen CH, Hsieh YY, Teng CC, Lee KC, Lee KF, Kuo HC. Expression of PRDX6 Correlates with Migration and Invasiveness of Colorectal Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(6):2616-2630.
283. Tribler L, Jensen LT, Jørgensen K, Brünner N, Gelb MH, Nielsen HJ, Jensen SS. Increased expression and activity of group IIA and X secretory phospholipase A2 in peritumoral versus central colon carcinoma tissue. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5A):3179-85.
284. Falidas E, Kitsiouli E, Spyropoulou D, Tsiambas E, Kalogirou A, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Mastronikoli S, Peschos D, Dimas O, Vlachos K. Secretory Phospholipase A2 Digital Expression Analysis in Colon Adenocarcinoma. *In Vivo.* 2022 Mar-Apr;36(2):738-742.
285. Falidas E, Kitsiouli E, Tsounis D, Kalogirou A, Tsiambas E, Tziakou D, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Spyropoulou D, Vlachos K. PLA2G3 phospholipase expression patterns in colon adenocarcinoma. *JBUON* (manuscript ID: 1029207, Anticipated publication: vol 26, no.6, 2021, 2018 issue.)
286. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut.* 2005 Mar;54(3):374-84.
287. Falidas E, Kitsiouli E, Tsounis D, Kalogirou A, Tsiambas E, Tsouvelas G, Papadopoulos S, Mitsis M, Lekka M, Vlachos K. Impact of peroxiredoxin-6 expression on colon adenocarcinoma. *J BUON.* 2021 Sep-Oct;26(5):1893-1897.