

Polisitemia Vera'da CXCL9-CXCR3 Sitokin Sinyal Yolağının Etkisi

Effect of CXCL9-CXCR3 Cytokine Signaling Pathway in Polycytemia Vera

Cemil Altunay¹, Akif Selim Yavuz², Selçuk Sözer Tokdemir¹

¹Istanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Altunay C, Yavuz AS, Sözer Tokdemir S. Effect of CXCL9-CXCR3 Cytokine Signaling Pathway in Polycytemia Vera. Experimed 2018; 8(3): 84-92.

ÖZ

Amaç: Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN), miyeloproliferatif bozukluklar arasında en sık görülen hastalıklardandır. Tamamen işlevsel olan ve son aşamaya kadar farklılaşmış kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilirler. Önceki çalışmalarda Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörün (GM-CSF) sağlıklı hematopoietik kök hücreler (HKH)'de proliferasyon kontrolünden sorumlu CXCR3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, CXCL9-CXCR3 sinyal yolağının MPN progresyonunda etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, MPN ve sağlıklı insan perifer kan mononükleer hücrelerinde (MNH) ve kanser HKH de CXCL9 kemokini ve bunun reseptörü olan CXCR3'ün iki izoformunun (CXCR3A ve CXCR3B) gen ifade seviyeleri, MNH yüzeyinde ise CXCR3 reseptör varlığı incelenmiştir. Ekspresyon seviyelerini araştırmak amacıyla kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hücre yüzey reseptör durumunun incelenmesi içinse akım ölçer metotları kullanılmıştır. GM-CSF'in MNH ve CD34+ hücrelerinde uygulamasının ardından CXCR3 ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Bulgular: MNH'de CXCR3A ifadesinin hastalarda sağlıklılara göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı bulunmuştur. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında CXCR3B ve CXCL9 ifade seviyeleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. CXCR3 Hücre yüzey reseptör durumuna bakıldığında ise hastalardan elde edilen MNH'deki anlatımda sağlıklı gruptan elde edilenlere göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu sonuçlar MPN'de CXCR3A/CXCR3B dengesi ile bu reseptörlere özgün olarak bağlanan kemokinler CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in inflamasyon ve kanser progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Myeloproliferatif neoplaziler, JAK2V617F, CXCR9-CXCL3

GİRİŞ

Myeloproliferatif neoplaziler (MPN) Miyelofibroz (MF), Polisitemia vera (PV) ve Esansiyel trombositemi'den (ET) oluşur (1, 2). BCR-ABL-negatif MPN'ler olarak da adlandırılan klasik MPN'ler, miyeloproliferatif bozukluklar arasında en sık görülen hastalıklardır (3). MPN'ler, tamamen işlevsel olan, son aşamaya kadar farklılaşmış kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilir. Bu hematopoietik hücre bozuklukları, miyeloid soy hücre tiplerinin (≥ 1) klonal proliferasyonu ile karakterize edilir (1, 2, 4). Çoğunlukla Janus kinaz 2 (JAK2), kalretikülün (CALR) veya trombopoietin reseptörü (MPL) gen-

ABSTRACT

Objective: Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are among the most common myeloproliferative disorders. MPNs are characterized by excessive production of terminally differentiated blood cells. The expression of CXCR3, responsible for regulating the proliferation of healthy hematopoietic stem cells, is known to be induced by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). The aim of this study is to investigate the role of CXCL9-CXCR3 signaling pathway in the progression of MPN.

Material and Method: We determined the expression of CXCL9 and two isoforms of the CXCR3 receptor (CXCR3A and CXCR3B) on the surface of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cancer stem cells. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used to measure expression levels, and flow cytometry was used to examine the presence of cell surface receptors. In addition, qPCR was used to quantify CXCR3 expression after GM-CSF application in cell culture. In PBMC and CD34+ cells, the mRNA level of CXCR3A expression was found to be elevated in patients with MPN.

Results: There was no statistically significant difference in mRNA expression of CXCR3B and CXCL9 between patients and healthy controls. There was significant reduction in cell surface expression of the CXCR3 receptor in PBMC obtained from patients. T

Conclusion: Thus, these results indicate that imbalance in the expression of CXCR3A/CXCR3B isoforms and chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 that bind to these receptors, may mediate inflammation and cancer progression in MPN.

Keywords: Myeloproliferative disorders, JAK2V617F, CXCL9-CXCR3

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selçuk Sözer Tokdemir **E-mail:** ssozer@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 27.11.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 18.12.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

lerindeki mutasyonlarla ilişkilidir (5-11). Klinik bulgular MPN alt tipine göre değişebilir. Bunlar arasında polisitemi, anemi, lökositoz, trombositoz, yorgunluk ve hepatosplenomegali bulunur (5, 12, 13). Genel olarak, hastalar trombotik ve tromboembolik olaylarda artmış risk taşırlar ve genel popülasyona göre daha yüksek mortalite riskine sahiptirler (14-29). MF'ye (PV veya ET olanlar için) veya akut miyeloid lösemiye ilerlemeler hastalar arasında büyük bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir (5, 20). MPN'ler, çoğu hasta için genellikle düşük yaşam kalitesine yol açan hastalıklardır (20-24). Semptomlar kaşıntı, gece terlemeleri, mikrovasküler belirtiler, splenomegali ve splenomegali ile ilişkili bulguları (örn; karın ağrısı, erken tokluk) içerebilir ve yorgunluk en şiddetli göstergelerden biridir (12, 21-23).

Enflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücrel kaynakları çoktur. Bu kaynaklar, MPN alt tipine ve ilişkili komplikasyonlara (tromboz ve kemik iliği fibrozu) bağlı olarak değişir. ET, PMF ve PV hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla, çeşitli sitokinlerin plazma seviyelerinde yükselme saptanmıştır (25). Bu bulgu, inflamatuvar bir sürecin MPN'nin fizyopatolojisine dahil olabileceğini, kemokinlerin otokrin, parakrin ve endokrin davranışlarında rol oynayabileceğini ve hatta hematopoietik nişi etkileyebileceğini göstermektedir. MPN hastaları ile yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylere kıyasla yüksek kemokin üretim sıklığı ile karakterize olan işlevsiz kemokin üretimi gösterilmiştir. Ayrıca, kemokin seviyeleri ve hematolojik parametreler arasındaki korelasyon, bağışıklık düzensizliğinin hematolojik hücrelerin üretimini etkileyebileceğini ve şiddetle çoğalmasını desteklediğini göstermektedir. Bulgular ayrıca MPN hastalarında kemokinlerin aşırı prodüksiyonunu, bunun proinflamatuvar bir durumla sonuçlandığını vurgulamaktadır (25). Yapılan bir çalışmada, Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörün (GM-CSF) sağlıklı hematopoietik kök hücrelerde proliferasyon kontrolünden sorumlu CXCR3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

Bu gelişmeler ışığında, CXCL9-CXCR3 sinyal yolağı MPN progresyonunda etkili olup olmadığı önem kazanmaktadır. Çalışmamızın amaçları MPN'de önemli oldukları düşünülen CXCL9 kemokininin ve reseptörü CXCR3'ün MPN hasta ve kontrol MNC'lerinde, kanser kök hücrelerinde ve CXCR3'ün MNC hücre yüzey anlatım düzeylerinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızın hedefi, MPN prognoz ve tedavi süreçlerinin kolaylaştırılmasına katkı sağlamaktır. Bulgular bilimsel çalışmaları yeni kemokin ve kemokin reseptörlerini de prognoz ve tedavi süreçlerinde etkili olmaları açısından aday hale getirebilecektir. MPN'de kemokin ve kemokin reseptörlerinin hastalık süreçlerine etkisini gösteren herhangi bir bilimsel çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda elde edilen veriler MPN'nin yanında diğer MPN'lere ve farklı kanser türlerine katkı sağlayabilecek potansiyelindedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Hücre Çözme

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğinde teşhis konulmuş olan MPN tanısı almış ve onam formu

imzalatılmış toplam 32 hastada flebetomi uygulanarak toplanan perifer kan mononükleer hücreleri (MNH) ve kontrol olarak kullanılan gönüllü olarak çalışmaya katılan 10 sağlıklı erişkinden elde edilen perifer kan MNH'leri, fikal gradient santrifüj yöntemi ile ayrıştırıldı ve toplandı. Toplanan bu MNH'ler daha sonra yüzey belirteçlerine göre izole edilerek DNA ve RNA izolasyonunda kullanıldı.

Sağlıklı kontrol kanlarından elde edilen MNH'ler dondurulmadan direkt olarak deneylerde kullanıldı. Bu nedenle bu grup için hücre çözme işlemi uygulanmadı.

Hasta kanından MNH izolasyonundan sonra kalan MNH'ler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Hücrelerin çalışmalarda kullanılması gerektiğinde hücreler azot tankından alındı ve hücre çözme protokolü uygulandı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hücre Ayrımı

Kök hücre ayrımı için iki farklı popülasyon hedeflenmiştir. Bunlar CD34⁺ ve CD34⁺Lineage⁻ popülasyonlarıdır. İlk olarak, CD34⁺ hücreler 'CD34 MicroBeads' ile manyetik olarak işaretlendi. Daha sonra, hücre süspansiyonu bir 'MACS Ayrıcı'nın manyetik alanına yerleştirilen 'MACS® Kolona' yüklendi. Manyetik olarak işaretlenmiş CD34⁺ hücreler, kolonun içerisinde tutunurlar. Kolonu manyetik alandan çıkardıktan sonra, tutunmuş olan CD34⁺ hücreler pozitif seçilmiş hücreler olarak saflaştırıldı. Manyetik ayırmadan sonra saflık analizi yapıldı. Bunun için bir miktar hücre alınıp CD34 PE Antikor ile boyandıktan sonra akım hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Kök hücrelerin izolasyonu, iki aşamalı bir prosedürde gerçekleştirildi. İlk olarak, Lin⁺ hücreler (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61 ve CD235a (Glikopin A)), spesifik antijenlere ve Anti-Biotin MicroBeads'e karşı biyotin-konjuge antikorların bir kokteyli ile manyetik olarak işaretlendi. Hücreler manyetik alanına yerleştirilen bir kolon üzerinde manyetik olarak ayrıldılar, işaretlenmemiş Lin⁻ hücreler akıp geçerken manyetik olarak etiketlenmiş Lin⁺ hücreler kolon içinde kalır. İkinci adımda, Lin⁻ kök hücreler doğrudan CD34 işaretleyici ile etiketlendi. Ardından bir manyetik ayırma daha yapıldı ve CD34⁺ kök hücreler, kolonun manyetik alandan çıkarılmasından sonra elde edildi. Prosedür elde edilen PBMC sayısı belirlendikten sonra uygulandı.

Hücrelerden DNA İzolasyonu

Sağlıklı bireylerden ve MPN hastalarından toplanan perifer kanlardan izole edilen MNH'ler ve iki farklı kit kullanılarak, hücre ayırıcı ile ayrımı sağlanmış CD34⁺, CD34⁻ hücreler için DNA izolasyonu yapıldı. DNA, uzun süreli saklama için -20°C'de, kısa süre içinde kullanılacağına +4°C'de saklandı.

İki Aşamalı Allel Spesifik PZR

İki aşamalı veya iç içe polimeraz zincir reaksiyonu (allel spesifik PZR), spesifik olmayan bağlanmayı azaltarak istenmeyen ürünlerin oluşmasını engelleyen bir polimeraz zincir reaksiyon

modifikasyonudur. İki faklı primer seti gerektirir. İlk primer seti ile mutasyonu içeren bölge çoğaltılır. İlk aşamadan sonra jelde 521 bç'lik DNA parçaları görülür. İlk aşama sonunda mutant ve yabanil tipteki JAK2 geni ayırt edilememektedir. PZR işleminin 2. aşamasında mutasyon bölgesine özgü farklı primer setleri kullanılır. Bu şekilde sadece istenilen bölgenin çoğaltılması sağlanarak spesifik bantlar elde edilir. Reaksiyon sonrasında örnekler agaroz jelde yürütüldü ve görüntüleri alındı. Jele yüklenen örneğin mutant alleli (JAK2V617F) taşıması durumunda 279 bç uzunluğunda bir bant görülür, yabanil tip allel taşıması durumunda ise 229 bç uzunluğunda bir bant görülür. Allel spesifik nested PZR'da kullanılan primerler başka çalışmada belirtilmiştir.

RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (q-PCR)

Sağlıklı kontrollerden ve MPN hastalarından alınan perifer kanlardan izole edilen MNH'lerden, CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerden RNA elde etmek amacıyla 'Jena Bioscience - Total RNA Purification Kit' kullanıldı.

Sağlıklı ve hasta MNH'lerden ve CD34⁺ ve CD34⁻ kök hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA elde etmek amacıyla "Script cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience)" kullanıldı.

CXCR3A, CXCR3B ve CXCL9 genlerinin Polisitemia Vera prognozunda etkili olduğu düşünüldüğünden, bu genlerin olası ekspresyon değişimlerinin hastalıkla ilişkisini incelemek amacıyla gen ifade analizleri yapıldı. Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile karşılaştırmalı ölçümler SYBR Green kullanılarak elde edilmiştir ve referans gen olarak GAPDH kullanıldı. CXCR3A geni için, ENST00000373693.3 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1624 bp olup 368 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. CXCR3A gen dizisi 5' ACCCAGCAGC-CAGAGCAC 3' ve 5' TCATAGGAAGAGCTGAAGTTCTCCA 3' primerler kullanıldı. CXCR3B geni için, ENST00000373691.4 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1861 bp olup 415 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 111 nükleotittir. CXCR3B gen 5' CAACCACAAGCACCA-AAGC 3' ve 5' TCTTCTGCGTGATCCATC 3' primerler kullanıldı. CXCL9 geni için, ENST00000264888.5 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 2740 bp olup 125 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 73 nükleotittir. CXCL9 gen 5' CCTTAAACAATTGCCCAAG 3' ve 5' TTGAATC-CATTCTTCAGTGTAGC 3' primerler kullanıldı. GAPDH geni için, ENST00000229239.9 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1875 bp olup 335 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 66 nükleotittir. GAPDH için 5' AGCCACATCGCTCAGACAC 3' ve 5' GCCCAATACGCCAAATCC 3' primerleri kullanıldı.

Akım Sitometri Cihazında Hücre Yüzey Analizi

Sağlıklı kontrollerden ve hastalardan elde edilen MNH, CD34⁺ ve CD34⁻ hücre gruplarının yüzeylerinde CXCR3 reseptörünün durumu incelendi. İşlem için her bir tüpte 50 000 - 100 000 hücre kullanıldı.

CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ Hücrelere GM-CSF Uygulaması

Literatürde GM-CSF'in (Granülosit-Makrofaj Koloni Stimulasyon Faktörü) sağlıklı CD34⁺ hücrelerde CXCR3 gen ifadesini arttırdığı bilinmektedir (26). MPN hastalarında elde edilen CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ hücreler 2 gün boyunca GM-CSF ile muamele edilmiştir. Uygulanan GM-CSF konsantrasyonu 10 ng/ml'dir. Besi yeri olarak IMDM-%20 FBS kullanılmıştır. 6-kuyulu tabağın her bir kuyusuna 3 mL besiyeri içinde 100 000-150 000 hücre eklenecek şekilde uygulandı. 2 gün sonunda toplanan hücrelerden sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif PZR işlemleri uygulandı. Bu işlem ayrıca hasta MNC ve kordon kanı hücreleri için uygulandı.

Ekspresyon analizi amacıyla uygulanan qPCR'de her bir örnek için triplike çalışma gerçekleştirildi. PZR verimi 2 olarak belirlendi.

Ekspresyon Verilerinin İstatistiksel Analizi

CXCR3A, CXCR3B ve CXCL9 gen ekspresyon düzeyleri GAPDH referans geni kullanılarak araştırıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Hasta} - Ct_{Referans}) - (Ct_{Sağlıklı} - Ct_{Referans})}$ yöntemi ile hesaplandı (27). Grafikleri oluşturma ve istatistiksel analizler için GraphPad Prism 5.0 yazılımı kullanıldı. Sağlıklı ve hasta örneklerin karşılaştırmalı mRNA düzeylerini incelemek için Mann-Whitney U testi uygulandı. Mann-Whitney U testi, aynı popülasyondan gelen iki örneği karşılaştırmak için kullanılan ve iki örneğin eşit olup olmadığını test etmek için kullanılan, parametrik olmayan bir testtir.

BULGULAR

İki Aşamalı Allel Spesifik PZR Sonuçları

Tüm hastalarda mononükleer hücre (MNH) DNA 'larından JAK-2V617F mutasyon durumunu tespit etmek amacıyla allel spesifik nested PZR yapıldı. Çalışmada kullanılan MPN hasta örneklerinden 17 hastanın JAK2V617F heterozygot allel taşıdığı, 15 hastanın ise JAK2 yabanil tip allel taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo 1).

Gen İfadesi Sonuçları

Yapılan gen ifadesi çalışmaları öncelikle hasta ve kontrol toplam mononükleer hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Literatürde belirtildiği üzere CXCR3'ün toplam MNH ve lenfosit ekspresyonları arasında rölatif bir fark olmadığından (28) lenfosit izolasyonu yapılmayıp ifade toplam MNH'de tespit edilmiştir.

Yapılan gen ifadesi analizlerinde mononükleer hücrelerden elde edilen RNA'lar kullanılarak CXCR3B geni için: 27 hasta, 10 kontrol (Şekil 1a); CXCR3A geni için: 27 hasta, 10 kontrol (Şekil 1b) ve CXCL9 geni için ise 26 hasta 9 kontrol (Şekil 1c) kullanılarak mononükleer hücre RNA'larında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar p değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Ardından kanser kök hücrelerinde CXCR3 ve CXCL9 gen ifadesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Toplam 4 hastadan elde edilen CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ gruplarına ait hücreler kullanılmıştır. Bu hücre gruplarında CXCL9 ve CXCR3 anlatım seviyesi tespit edilememiştir.

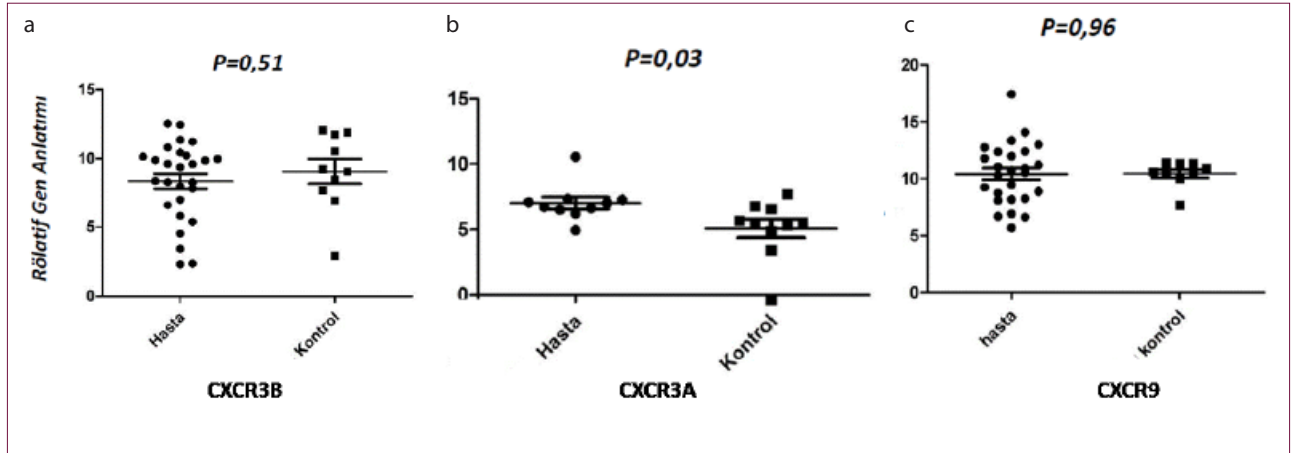
Hücre Yüzey CXCR3 Reseptör Anlatımı

CXCR3 reseptörünün hücre yüzeyindeki durumu akım ölçer cihazıyla elde edilen verilerin analizi ile tespit edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya katılan hastaların yaş, aldıkları tedavi ve JAK2V617F durumu

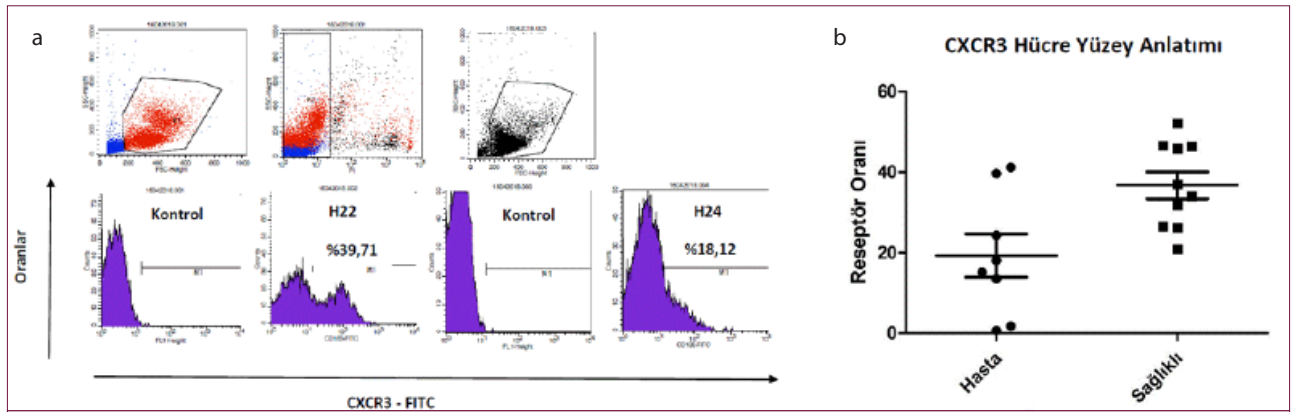
Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Tanı Yaşı	Mutasyon Durumu	Aldığı Tedavi
H8	62	50	JAK2V617F Heterozigot allel	F
H11	27	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-R-A-İ
H9	29	-	JAK2 Yabani Tip	F
H12	66	59	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü
H15	36	27	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H17	54	44	JAK2 Yabani Tip	F-A
H18	52	46	JAK2 Yabani Tip	F-H-A-L-At-S
H19	68	63	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-C-Ü
H20	62	-	JAK2 Yabani Tip	F
H23	31	27	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-V
H25	48	41	JAK2 Yabani Tip	F
H28	83	75	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-Ü
H29	32	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H34	56	43	JAK2 Yabani Tip	F
H35	70	66	JAK2V617F Heterozigot allel	F
H37	53	35	JAK2 Yabani Tip	F-A
H38	63	54	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü-H
H39	39	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A
H43	59	45	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H10	56	48	JAK2 Yabani Tip	F
H14	92	64	JAK2 Yabani Tip	F
H16	58	--	JAK2 Yabani Tip	F
H24	71	-	JAK2 Yabani Tip	F-A-C
H36	71	63	JAK2 Yabani Tip	F-Ko-CI
H56	55	49	JAK2 Yabani Tip	F-A
H13	69	52	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-H
H21	48	41	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü
H22	65	54	JAK2 Yabani Tip	F-A-H-Ü
H26	55	45	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-T-Ü-A
H46	55	53	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A
H54	55	55	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A
H57	55	-	JAK2 Yabani Tip	F

Tabloda Kullanılan Kısaltmalar: F: Flebetomi, H: Hidroksiüre, T: Tromboredüktin, Ü: Ürikoliz, A: Asetilsalisilik Asit, R: Ruxolitinib, L: Larcadip, At: Ator, S: Saneloc, C: Coraspin, Ko: Kordexa, CI: Clexane



Şekil 1. CXCR3A, CXCR3B ve CXCR9 gen ifadeleri

CXCR3B: Hasta ve kontrol sütunları için "ortalama ± standart sapma" değerleri sırasıyla 8.366 ± 0.5493 n=27 ve 9.06 ± 0.88 'dir. Toplam Örnek Sayısı (n)=27 hasta, n=10 kontrol'dür. p=0,51'dir (a); CXCR3A: 7.02 ± 0.44 n=10 ve 5.08 ± 0.71 n=27 hasta, n=10 kontrol , p=0,03'tür (b); CXCR9: 10.42 ± 0.53 n=26 ve 10.46 ± 0.37 . n=26 hasta, n=9 kontrol , p=0,96'dır (c)



Şekil 2. CXCR3 'ün mononükleer hücre yüzey değerlendirilmesi

Akım Ölçer analizinde kullanılan kapılama özellikleri ve örnek olarak sunulmuş Hasta 22 ve 24 analiz sonuçları (a); hasta ve kontrol sütunları için "ortalama ± standart sapma" değerleri sırasıyla 19.33 ± 5.39 'dir. Toplam hasta sayısı=8 ve 36.78 ± 3.35 toplam sağlıklı kontrol sayısı=10'dür. p=0,01'dir (b)

Örneklem olarak, 22 ve 24 numaralı hasta MNH hücreleri için elde edilen sonuçlar Şekil 2'te gösterilmiştir. Öncelikle ana hücre popülasyonunun bulunduğu canlı hücre grubunun bulunduğu bölge seçilmiştir. Ardından propidium iodür (PI) ile boyanmamış olan canlı hücrelerin popülasyonunu oluşturan bölge seçilerek bu hücrelerin CXCR3 antikoruyla ifade göre CXCR3 reseptör pozitif/negatif oranları elde edilmiştir. Şekil 2.A'da örnek olarak gösterilmiş H22 CXCR3 reseptörü için %39,71; H24 ise %18,12 oranlarında pozitif ifade tespit edilmiştir.

Toplamda 8 hasta ve 10 sağlıklı kontrol kullanılarak akımölçer analizleri tamamlanmıştır. Verilerin istatistiksel analizi Şekil 2-B'da gösterilmiştir.

CD34+ ve CD34+Lin- Hücrelere GM-CSF Uygulaması Sonuçları

Amaç CD34+ hücrelerde normal şartlarda var olmayan CXCR3 gen ifadesinin MPN hastalarında GM-CSF uygulaması ile artıp artmadığını incelemektir. Perifer kandan elde edilen MNH'lerden CD34+ ve CD34+Lin- hücre popülasyonları GM-CSF ile mu-

mele edildikten sonra RNA izolasyonları ve kantitatif PZR işlemi gerçekleştirildi. Bu deneyler 4 hastada ve sağlıklı kontrol olarak kordon kanı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalarda CD34+ ve CD34+Lin- kök hücre popülasyonlarında CXCR3 anlatımı tespit edilememiştir. GM-CSF uygulamasının da bu anlatımı istatistiksel olarak değiştirmedığı görülmüştür.

Tüm bu çalışmalara ek olarak kullanılmış olan hücre izolasyon ve dondurma tekniklerinin bir artefaktı sonucu CXCR3 gen anlatımında bir farklılık olabileceği test edilmiştir. Bu çalışma için yeni izole edilmiş ve dondurulmuş hücrelerle yapılan deney sonuçları karşılaştırılmış ve taze veya dondurulmuş hücrelerden elde edilen CXCR3 ve CXCL9 gen anlatım sonuçları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA

Kemokinler, lenfosit yüzeylerinde bulunan spesifik reseptörler aracılığıyla sinyallerini iletirler (29). MPN hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla, çeşitli sitokin ve kemokinlerin plazma seviyel-

erinde yükselme saptanmıştır. Bu bulgu, inflamatuvar bir sürecin MPN'nin fizyopatolojisine dahil olabileceğini, kemokinlerin rol oynayabileceğini ve hatta hematopoietik nişi etkileyebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerde (PBMC) CXCR3A gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p=0,03$). Bunun yanında CXCR3B izoformu ve CXCL9 için gen ifadelerinde hasta ve sağlıklılar arasında anlamlı bir farkın mevcut olmadığı sonucu elde edilmiştir (p değerleri sırasıyla 0,96 ve 0,51).

Mevcut literatüre göre, CXCR3A hücre proliferasyonundan ve kemotaksiden sorumluyken CXCR3B'nin büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (30-32). Tümör oluşumunda, PBMC'nin proliferasyonu ve migrasyonu engellendiğinde bu hücrelerin istenmeyen ölümü meydana gelmiştir. Bu senaryo, tümör hücrelerinde metastaz için proliferasyon ve migrasyonun bu hücrelerin fizyolojik ölüm sinyallerinden kaçışı ile desteklendiği görüşünü tersine çevrilmiştir. Bu ortamı tümör büyümesi lehine korumak için, CXCR3A ve CXCR3B'nin ifadesi PBMC ve tümör hücrelerinde farklı şekillerde düzenlenmektedir (33).

CXCR3A ekspresyonunun hastalarda artması ve CXCR3B ekspresyonunun değişmemesi MPN'de kemokin aracılı göç sinyalinin hatalı olmasına, MPN-PBMC'nin aşırı derecede artmış kemotaksisine neden olabilir. CXCR3A varyantının, tümör bölgesine sitotoksik T hücresi/Doğal öldürücü hücreler (NK)/Doğal öldürücü T hücrelerinin daha fazla migrasyonunu sağlamak için kemokinleri ile daha fazla etkileşerek uyarılmak üzere gen ifade artışı gösterdiği kanıtlanmıştır (34).

CXCR3 gen ifade profilindeki değişiklikler, kanser gelişiminin başlangıç aşamaları veya metastatik hastalığa ilerlemesi ile ilişkili olabilir. CXCR3A, prostat, yumurtalık, meme ve böbrek kanserinde tümör ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir (35-37). Ayrıca, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in, seçici olarak CXCR3A'yı eksprese eden insan mast hücre hattı üzerinde proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (38, 39).

MPN'de inflamasyon sıklıkla görülen bir komplikasyondur. Kemokinlerin ve reseptörlerinin tümör mikroçevresindeki habis transformasyondaki rolü hala tartışmalıdır. Kronik inflamasyon, proliferasyona uğrayan hücrelerde, neoplastik transformasyona yol açan DNA hasarına neden olur (40-42). İnflamasyon, kanserde CXCR3'ün artmış ekspresyonuna; promotör demetilasyonunu veya intron CpG bölgelerinin demetilasyonunu uyurarak neden olabilir (43-45). Bu kalıcı inflamasyonun ve CXCL10'un sürekli salgılanmasının, yapısal CXCR3A-kemokin (CXCL10) sinyalleme yoluyla malign neoplastik transformasyonu destekleyen epitel hücrelerde CXCR3A ifadesini artırabileceği gösterilmiştir (46). Bu nedenle çalışmamızda CXCL9'dan sonra CXCL10'un da MPN'deki durumunu araştırmak yeni kapılar açabilir.

MPN'de dikkat çeken önemli semptomlardan bir diğeri kendini ciltte gösterir. Özellikle sıcak bir duşun ardından olmak üzere hastalarda rahatsız edici düzeyde bir kaşıntı semptomu

görülmektedir. IL-29'un CXCR3A taşıyan immün hücrelerin sedef hastalıklı deriye gitmesine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. IL-29, insan cildindeki hedef hücreler olan keratinositlerde ve melanositlerde CXCR3A'nın ligandları CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in ekspresyonunu uyarmaktadır. CXCL9 uyarımı oldukça zayıfken, CXCL10 indüksiyonu biraz daha kuvvetlidir, IL-29 ile muamele edilmiş keratinositlerde CXCL11'in ekspresyon artışı en kuvvetli şekilde gözlenmiştir. Fare derisine enjekte edildiğinde, IL-29'un mürin karşılığı, T-hücrelerinin lokal infiltrasyonuna, T-hücresinin sitokin ekspresyonuna ve indüklenen iltihaplanma sonucunda deri kalınlaşmasına neden olmuştur. Sedef hastalıklı ciltte CXCR3A ligand ekspresyonu, CXCL11 kan plazma düzeylerinde anlamlı artış ile ve artmış CXCL10 seviyeleri ile ilişkiliyken, IL-29 ile en düşük uyarımlı ligandın (CXCL9) kan konsantrasyonları değiştirilmemiştir. Bu nedenle CXCL11'in kandaki seviyesi, IL-29 ve IFN- γ 'nın lokal aktivitesi için bir biyobelirteç olabilir (47). CXCL9'un çalışmamızda da değişmediği sonucuyla paralel olmasıyla beraber, bu bilgiler birlikte düşünüldüğünde, çalışmamızda CXCR3A ekspresyonunun hastalarda sağlıklı bireylere göre artmış olması ve CXCL9 ekspresyonunun değişmemiş olması CXCL11 ve CXCL10 ligandlarının ilişkili olabileceğine ve araştırılmaları gerektiğine işaret etmektedir.

MPN'de diğer bir semptom hepatomegalidir. Hepatomegali ile hepatik fibroz arasındaki ilişki önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (48). CXCR3; fibroblastlar, epitel ve endotel hücreler, düz kas hücreleri, aktive olmuş T lenfositleri ve dendritik hücreler üzerinde ifade edilir. Bu hücreler ya CXCR3A'yı ya varyantı olan CXCR3B'yı ya da her ikisinin dengeli bir kombinasyonunu ifade eder (49). CXCL4-CXCR3 yolağının uyarılması, karaciğer fibrogenezine katkıda bulunan kemokinlerin de kaynağı olan karaciğer hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu artırır (50). CXCL4 shRNA'sının, karaciğer hücrelerinde fibroz ile ilişkili proteinlerin (CXCR3, EGFR, JAK2, STAT3 ve Collagen IV) ekspresyonunu anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur (51). Bu durum, hastalarda CXCR3A ekspresyon artışının MPN hastalarında hepatomegaliye katkı sağlıyor olabileceğini göstermektedir.

Hücre yüzey reseptör ekspresyonu sonuçlarımız CXCR3A ve CXCR3B mRNA seviyesindeki ekspresyon sonucumuzun tam tersi çıkmıştır. Yani CXCR3A mRNA seviyesini hastalarda artmış durumda tespit edilmiş ancak CXCR3 hücre yüzey reseptörünün hastalarda azalmış durumda olduğu sonucu elde edilmiştir. mRNA sonuç olarak proteine çevrildiği için, genellikle mRNA ve protein seviyeleri arasında bir tür korelasyon olduğu varsayılır. Ancak, genellikle mRNA düzeyi ve protein seviyesi arasında tespit edilen zayıf korelasyonların nedenleri vardır ve bunlar karşılıklı olarak uyumlu olmayabilir. İlk olarak, henüz yeterince tanımlanmamış olan ve mRNA'yı proteine çevirmeyle ilişkili çok sayıda, karmaşık ve çeşitli post-transkripsiyonel mekanizmalar vardır. Ayrıca proteinler in vivo yarı ömürlerinde büyük ölçüde farklılık gösterebilirler. Son olarak hem protein hem de mRNA deneylerinde teknik olarak net bir sonuç elde etme yeteneğimizi sınırlandıran önemli miktarda hatalar ve arka plan parazitleri mevcuttur (52, 53).

Çalışmamızda, CXCR3 mRNA ve protein düzeylerinde ifade seviyelerinin ters çıkmasının daha olası bir sebebi reseptör internalizasyonudur. GPCR'nin internalizasyonu ve geri dönüşüm mekanizmaları hakkında elde edilen bilgiler son zamanlarda artmıştır. Internalizasyon bir kez gerçekleştiğinde, bir GPCR için iki durumdan biri mümkündür; ligandın ayrılması ve fonksiyonel reseptörün plazma membranına geri dönüşü veya bozunuşu gerçekleşebilir. Bir transfeksiyon sistemiyle CXCR3'ün CXCL11 ile indüklenmiş internalizasyonunun meydana geldiği bulunmuştur (54). PBMC'ler ile yapılan bir çalışmada CXCL11'in taze izole edilmiş hücreler üzerindeki etkinliğinin CXCL9 ve CXCL10'a göre daha yüksek olduğu belirgin bir şekilde tespit edilmiştir. Yani, CXCL11 CXCR3'ün internalizasyonunu önemli bir şekilde uyarmıştır (55). Bu durum, çalışma sonuçlarımıza göre, CXCL11 ekspresyonunun MPN'de artmış olabileceği şüphesini doğurmaktadır.

CXCR3B ifadesinin azalması tümör ilişkili-anjiyogenezde azalmayla ve tümöre bağımlı immünite ile ilişkilidir. CXCR3B, anti-migrasyon ve anti-anjiyogenez durumlarını sağladığı için her iki izoformu değil de CXCR3A'nın biyobelirteç olarak hedeflenmesinin tercih edilebileceği ifade edilmiştir (56).

Bu çalışma MPN hastalığında CXCR3A/CXCR3B dengesinin bozulmuş olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Çalışma, bu reseptörlere özgün olarak bağlanan kemokinlerden CXCL10 ve CXCL11'in de MPN progresyonunda etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, MPN'de de CXCR3A/CXCR3B dengesi, inflamasyon ve kanser progresyonu ile ilişkili olabilir. MPN'de artmış CXCR3A ekspresyonunun ve CXCR3B ekspresyon durumunun altında yatan mekanizma ile kanser gelişimi ve progresyonundaki rollerini anlamak için ilave çalışmalar gerekmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır (Karar Sayısı: 13; Karar Tarihi 11/08/2017).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.A., S.S.T.; Tasarım - C.A., S.S.T.; Denetleme - C.A., A.S.Y., S.S.T.; Kaynaklar - A.S.Y., S.S.T.; Gereçler - S.S.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.A., S.S.T.; Analiz ve/veya Yorum - C.A., S.S.T.; Literatür Taraması - C.A.; Yazan - C.A., S.S.T.; Eleştirel İnceleme - S.S.T., A.S.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 27338). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 112S483).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Clinical Research Ethics Committee of Istanbul

University Istanbul School of Medicine (Decision Number: 13; Decision Date: 08/11/2017).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.A., S.S.T.; Design - C.A., S.S.T.; Supervision - C.A., A.S.Y., S.S.T.; Resource - A.S.Y., S.S.T.; Materials - S.S.T.; Data Collection and/or Processing - C.A., S.S.T.; Analysis and/or Interpretation - C.A., S.S.T.; Literature Search - C.A.; Writing - C.A., S.S.T.; Critical Reviews - S.S.T., A.S.Y.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by grant from Istanbul University Scientific Research Project Council (Project No: 27338) and some parts from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project No: 112S483)

KAYNAKLAR

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51. [\[CrossRef\]](#)
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-405. [\[CrossRef\]](#)
3. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129: 667-79. [\[CrossRef\]](#)
4. Geyer J, Orazi A. Myeloproliferative neoplasms (BCR-ABL1 negative) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: current diagnostic principles and upcoming updates. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 12-9. [\[CrossRef\]](#)
5. Kaplan JB, Stein BL, McMahan B, Giles FJ, Platanius LC. Evolving therapeutic strategies for the classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *EBio Med* 2016; 3: 17-25. [\[CrossRef\]](#)
6. Geyer HL, Mesa RA. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? *Blood* 2014; 124: 3529-37. [\[CrossRef\]](#)
7. Tefferi A. Mutations galore in myeloproliferative neoplasms: would the real Spartacus please stand up? : Nature Publishing Group; 2011.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New Eng J Med* 2013; 369: 2379-90. [\[CrossRef\]](#)
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *New Eng J Med* 2013; 369: 2391-405. [\[CrossRef\]](#)
10. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270. [\[CrossRef\]](#)

11. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472-6. [\[CrossRef\]](#)
12. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjian J-J, Slot S, Zweegman S, et al. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J Clin Oncol* 2012; 30: 4098. [\[CrossRef\]](#)
13. Geyer HL, Scherber RM, Dueck AC, Kiladjian J-J, Xiao Z, Slot S, et al. Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: retrospective assessment in 1470 patients. *Blood* 2014; 123: 3803-10. [\[CrossRef\]](#)
14. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3179-84. [\[CrossRef\]](#)
15. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi A, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013; 27: 1874. [\[CrossRef\]](#)
16. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS-plus: DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 392-7. [\[CrossRef\]](#)
17. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010; 115: 1703-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; 113: 2895-901. [\[CrossRef\]](#)
19. Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol* 2016; 9: 18. [\[CrossRef\]](#)
20. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S, et al. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *BMC Cancer* 2016; 16: 167. [\[CrossRef\]](#)
21. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood* 2011; 118: 401-8. [\[CrossRef\]](#)
22. Johansson P, Mesa R, Scherber R, Abellsson J, Samuelsson J, Birgegård G, et al. Association between quality of life and clinical parameters in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 441-4. [\[CrossRef\]](#)
23. Abellsson J, Andréasson B, Samuelsson J, Hultcrantz M, Ejerblad E, Johansson B, et al. Patients with polycythemia vera have worst impairment of quality of life among patients with newly diagnosed myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 2226-30. [\[CrossRef\]](#)
25. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs). *Cancer* 2007; 109: 68-76. [\[CrossRef\]](#)
26. da Costa Cacemiro M, Cominal JG, Tognon R, de Souza Nunes N, Simões BP, de Figueiredo-Pontes LL, et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. *Hematol Transfus Cell Ther* 2018.
27. Jinquan T, Quan S, Jacobi HH, Jing C, Millner A, Jensen B, et al. CXC chemokine receptor 3 expression on CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon γ -inducible protein 10 and monokine induced by interferon γ . *Blood* 2000; 96: 1230-8.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25: 402-8. [\[CrossRef\]](#)
29. Callahan MK, Williams KA, Kivisäkk P, Pearce D, Stins MF, Ransohoff RM. CXCR3 marks CD4+ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer. *J Neuroimmunol* 2004; 153: 150-7. [\[CrossRef\]](#)
30. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14. [\[CrossRef\]](#)
31. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565. [\[CrossRef\]](#)
32. Glaser J, Gonzalez R, Perreau VM, Cotman CW, Keirstead HS. Neutralization of the chemokine CXCL10 enhances tissue sparing and angiogenesis following spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004; 77: 701-8. [\[CrossRef\]](#)
33. Kelsen SG, Aksoy MO, Yang Y, Shahabuddin S, Litvin J, Safadi F, et al. The chemokine receptor CXCR3 and its splice variant are expressed in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L584-91. [\[CrossRef\]](#)
34. Chakraborty K, Bose A, Pal S, Chattopadhyay U, Baral R. Interferon- α 2b Restores the Impaired Chemotactic Activity of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients by Modulating CXC Receptor Ligand Interaction. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 28: 487-500. [\[CrossRef\]](#)
35. Chakraborty K, Bose A, Pal S, Sarkar K, Goswami S, Ghosh D, et al. Neem leaf glycoprotein restores the impaired chemotactic activity of peripheral blood mononuclear cells

- from head and neck squamous cell carcinoma patients by maintaining CXCR3/CXCL10 balance. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 330-40. [\[CrossRef\]](#)
36. Furuya M, Yoneyama T, Miyagi E, Tanaka R, Nagahama K, Miyagi Y, et al. Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecol Oncol* 2011; 122: 648-55. [\[CrossRef\]](#)
 37. Wu Q, Dhir R, Wells A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer* 2012; 11: 3. [\[CrossRef\]](#)
 38. Datta D, Contreras AG, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S. Calcineurin inhibitors modulate CXCR3 splice variant expression and mediate renal cancer progression. *J American Soc Nephrol* 2008; 19: 2437-46. [\[CrossRef\]](#)
 39. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, Lasagni L, Luconi M, Galli G, et al. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J American Soc Nephrol* 1999; 10: 2518-26.
 40. Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L, Mavilia C, Beltrame C, Francalanci M, et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J American Soc Nephrol* 2002; 13: 53-64.
 41. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-33. [\[CrossRef\]](#)
 42. Perwez Hussain S, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-80. [\[CrossRef\]](#)
 43. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry* 1998; 63: 854-65.
 44. Ma B, Khazali A, Wells A. CXCR3 in carcinoma progression. *Histol Histopathol* 2015; 30: 781.
 45. Lleo A, Zhang W, Zhao M, Tan Y, Bernuzzi F, Zhu B, et al. DNA methylation profiling of the X chromosome reveals an aberrant demethylation on CXCR3 promoter in primary biliary cirrhosis. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 61. [\[CrossRef\]](#)
 46. Kumar DSS, Wells A. CXCR3 epigenome switches splice variants in prostate cancer. *AACR*; 2013.
 47. Urrea S, Fischer MC, Martínez JR, Véliz L, Orellana P, Solar A, et al. Differential expression profile of CXCR3 splicing variants is associated with thyroid neoplasia. Potential role in papillary thyroid carcinoma oncogenesis? *Oncotarget* 2018; 9: 2445. [\[CrossRef\]](#)
 48. Witte E, Kokolakis G, Witte K, Warszawska K, Friedrich M, Christou D, et al. Interleukin-29 induces epithelial production of CXCR3A ligands and T-cell infiltration. *J Mol Med* 2016; 94: 391-400. [\[CrossRef\]](#)
 49. Walters JH, Mc GI. The mechanism of malarial hepatomegaly and its relationship to hepatic fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1960; 54: 135-45. [\[CrossRef\]](#)
 50. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 311-27. [\[CrossRef\]](#)
 51. Wasmuth H, Weiskirchen R. Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2010; 48: 38-45. [\[CrossRef\]](#)
 52. Li J, Liu B, Shi Y, Xie K-L, Yin H-F, Yan L-n, et al. CXCL4 Contributes to the Pathogenesis of Chronic Liver Allograft Dysfunction. *J Immunol Res* 2016; 2016: 9276986. [\[CrossRef\]](#)
 53. Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 2001; 17: 509-19. [\[CrossRef\]](#)
 54. Szallasi Z. Genetic network analysis in light of massively parallel biological data acquisition. *Pac Symp Biocomput* 1999; 5-16.
 55. Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem* 2004; 279: 30219-27. [\[CrossRef\]](#)
 56. Meiser A, Mueller A, Wise EL, McDonagh EM, Petit SJ, Saran N, et al. The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J Immunol* 2008; 180: 6713-24. [\[CrossRef\]](#)
 57. Wu Q, Dhir R, Wells A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer* 2012; 11: 3. [\[CrossRef\]](#)