

Stężenia sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII w surowicy krwi chorych na chłoniaka Hodgkina

Maria Kowalska¹, Janina Kamińska¹, Małgorzata Fuksiewicz¹,
Beata Kotowicz¹, Alicja Siedlecka¹, Joanna Tajer², Jan Walewski²

Wstęp. W surowicy krwi chorych na nowotwory złośliwe obserwuje się podwyższone stężenia zarówno cytokin, jak i ich rozpuszczalnych receptorów. Głównym źródłem rozpuszczalnych receptorów są komórki nowotworowe, które wykazują większe tendencje do złączania receptorów niż komórki prawidłowe. Celem pracy była ocena związku pomiędzy stężeniami rozpuszczalnych receptorów, takich jak: sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII a wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi i laboratoryjnymi w surowicy krwi chorych na chłoniaka Hodgkina (HL).

Pacjenci i metody. Badaniami objęto 61 chorych z potwierdzonym histopatologicznie chłoniakiem Hodgkina, leczonych w latach 1997-2003 w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Badaniami histopatologicznymi wykluczono infekcję wirusem EBV. Cytokiny oznaczano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA, zestawami firmy R&D. Zakres normy dla cytokin określano na podstawie badań wykonanych u 50 zdrowych osób. Do analiz statystycznych zastosowano test Mann-Whitneya i test Kruskalla-Wallis.

Wyniki. Wykazano istotnie wyższe stężenia sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII u chorych na HL w porównaniu z osobami zdrowymi. Stężenia sIL-2R α były podwyższone u najwyższego odsetka chorych, korelowały ze stopniem zaawansowania klinicznego i były istotnie wyższe u chorych z objawami ogólnymi, rozległymi zmianami w śródpiersiu, z większą liczbą zajętych miejsc limfatycznych oraz u chorych poniżej 30. roku życia. Stężenia obu receptorów TNF α , tj. sTNF RI i sTNF RII, były istotnie wyższe u chorych z objawami ogólnymi i z rozległymi zmianami w śródpiersiu. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami wszystkich badanych receptorów a płcią i podtypem histopatologicznym. Stężenia sIL-2R α i sTNF RII korelowały z wartościami OB i LDH, natomiast stężenia sTNF RI wykazywały korelację tylko z wartościami OB.

Wnioski. sIL-2R α może być markerem przydatnym w monitorowaniu leczenia. Weryfikacja wartości oznaczania w surowicy krwi stężeń rozpuszczalnych receptorów jako niezależnych czynników prognostycznych, wymaga potwierdzenia na większej liczbie chorych i dłuższego czasu obserwacji.

Serum sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII concentrations in patients with Hodgkin's lymphoma

Introduction. Elevated blood serum concentrations of cytokines and soluble cytokine receptors are common in cancer patients. Soluble cytokine receptors are thought to derive mainly from cancer cells, which are more likely to shed surface receptors than the normal cells. The purpose of the study was to relate serum concentrations of sIL-2R α , sTNF RI and sTNF RII in patients with Hodgkin's lymphoma (HL) to their clinico-pathological and biochemical characteristics.

Patients and methods. Sixty one patients with HL treated in the Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology in Warsaw between 1997 and 2003 were studied. As confirmed by histopathological assessment, none of the HL was EBV-associated. Concentrations of soluble receptors were measured in the blood sera by the ELISA kits of R&D, Minneapolis, and compared with normal ranges that have been previously assessed in 50 healthy blood donors. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were employed for the statistical analyses.

Results. Significantly higher concentrations of serum sIL-2R α , sTNF RI and sTNF RII were found in patients with HL than in healthy donors. The highest proportion of patients presented elevated sIL-2R α levels, which were found to correlate with the clinical stage of the disease and were significantly higher in patients with systemic symptoms, massive mediastinal mass and with the greater number of lymph node regions involved, as well as in patients under the age of 30 years. The serum concentrations of TNF α RI and TNF α RII were significantly higher in patients with systemic symptoms and with extensive

¹ Zakład Markerów Nowotworowych

² Klinika Nowotworów Układu Chłonnego
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie

mediastinum involvement. None of the soluble receptors examined related to sex or HL pathologic subtype. The levels of all the soluble receptors examined correlated with erythrocyte sedimentation rate while sIL-2R α and sTNF RII also related to LDH activity.

Conclusions. Serum sIL-2R α examination may be useful for monitoring of HL patients. To verify the value of serum soluble cytokine receptor levels as independent prognostic markers, further studies, in a larger series of patients and with a longer follow-up period, need to be performed.

Słowa kluczowe: chłoniak Hodgkina, rozpuszczalne receptory cytokin, parametry kliniczno-patologiczne

Key words: Hodgkin's lymphoma, soluble cytokine receptors, clinico-pathological features

Wstęp

W surowicy krwi chorych na nowotwory złośliwe obserwuje się podwyższone stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów. Głównym źródłem rozpuszczalnych receptorów są komórki nowotworowe, które wykazują większe tendencje do zluszczenia receptorów niż komórki prawidłowe. W literaturze przedstawiane są również prace, w których autorzy sugerują, że rozpuszczalne receptory mogą być „aktywnie produkowane” zarówno przez pobudzone komórki nowotworowe, jak i przez komórki odczynowe [1].

U chorych na nowotwory złośliwe szczególnie dużo uwagi poświęcono rozpuszczalnym receptorom dla interleukiny 2 (sIL-2R α) i czynnika martwicy nowotworów sTNF RI i sTNF RII. Rozpuszczalny receptor sIL-2R jest uwalniany głównie z powierzchni aktywowanych limfocytów. Jego obecność stwierdzono nie tylko na prawidłowych limfocytach, ale również na komórkach różnych nowotworów, w tym komórkach Hodgkina i Reed-Sternberga [2-4]. Podwyższone stężenie w surowicy krwi sIL-2R α u chorych na nowotwory złośliwe może sugerować jego stymulującą rolę w proliferacji komórek nowotworowych [2, 5-6]. W warunkach fizjologicznych rozpuszczalne receptory TNF α zapewniają zachowanie homeostazy w stanach, w których dochodzi do uruchomienia kaskady cytokin prozapalnych. Wykazano, że receptor sTNF RI jest jednym z głównych mediatorów apoptozy [7-10]. W badaniach własnych zwrócono uwagę na bardzo częste występowanie podwyższonych stężeń rozpuszczalnych receptorów TNF α u chorych na nowotwory nielimfoidalne, w tym zwłaszcza sTNF RI [11, 12].

Interesujące było zatem zbadanie zachowania się stężeń rozpuszczalnych receptorów w surowicy krwi u chorych na chłoniaka Hodgkina (HL). W prezentowanej pracy przedstawiono zależności pomiędzy stężeniami sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII a wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi u chorych na HL.

Pacjenci i metody

Badaniami objęto 61 chorych na chłoniaka Hodgkina (HL) przed leczeniem (37 kobiet, 24 mężczyzn; wiek 15-63 lata, mediana wieku: 26 lat) leczonych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Rozpoznanie u wszystkich badanych chorych było potwierdzone badaniem histopatologicznym.

W badaniach histopatologicznych wykluczono u chorych infekcję wirusem Epsteina-Barr (EBV). Charakterystykę chorych przedstawiono w Tabeli I.

Tab. I. Charakterystyka kliniczno-patologiczna chorych na HL

	Liczba chorych
Wiek	
≤30	40/61
>30	21/61
Płeć	
kobiety	37/61
mężczyźni	24/61
Stopień zaawansowania klinicznego (wg Ann Arbor)	
I	7/61
II	41/61
III	8/61
IV	5/61
Klasyfikacja histopatologiczna	
NS – stwardnienie guzkowe	45/61
MC – postać mieszano-komórkowa	7/61
LD – z zanikiem limfocytów	5/61
LP – z przewagą limfocytów	1/61
nie oceniano	3/61
Objawy ogólne	
brak	35/61
obecne	26/61
MMR*	
<1/3	34/61
>1/3	27/61
Liczba zajętych miejsc limfatycznych	
<3	24/61
≥3	37/61

* rozległość zmiany w śródpiersiu

W surowicy krwi u chorych oznaczano stężenia rozpuszczalnych receptorów sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII zestawami firmy R & D Systems (Minneapolis, USA). Ustalono własne normy dla stężeń cytokin u 50 zdrowych osób (grupa referencyjna) w wieku od 19 do 74 lat (mediana: 42 lata). Punkty odcięcia, przyjęto jako wartość odcinającą 5 i 95 percentyla.

Do obliczeń statystycznych stosowano program Statistica PL. 6.0 for Windows, Excel 7.0 for Windows oraz program MedCalc. Dla porównania dwóch niezależnych prób korzystano z testu U Mann-Whitneya, a dla więcej niż dwóch niezależnych prób – z testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Dla określenia siły związku pomiędzy analizowanymi zmiennymi i kierunku ich zależności korzystano z rachunku korelacji rang Spearmana.

Tab. II. Wartości median i zakres stężeń rozpuszczalnych receptorów cytokin (pg/ml) u osób zdrowych i chorych na HL

Receptory cytokin	Zdrowi		Chorzy		Chorzy vs zdrowi	Odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami (%)
	mediana	zakres	mediana	zakres		
sIL-2R α	1112	(758-1753)	3156	(1103-20000)	p<0,0000	75
sTNFRI	832	(600-1200)	1329	(702-3004)	p<0,0000	63
sTNFRII	2189	(1577-3500)	3448	(1633-5000)	p<0,0000	48

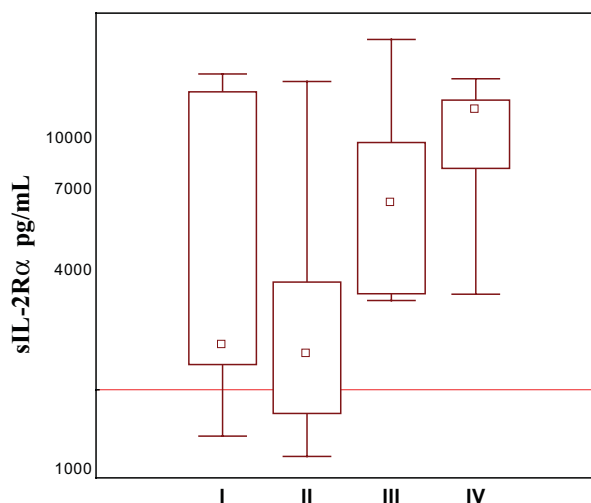
Wyniki

Stężenia badanych cytokin u chorych na HL

U 61 chorych na HL oznaczono w surowicy krwi stężenia rozpuszczalnych receptorów sIL-2R α , sTNF RI i sTNF RII. W Tabeli II przedstawiono wartość median, zakres stężeń u osób zdrowych i chorych oraz procent podwyższonych wyników oznaczonych cytokin u badanych chorych. Porównując testem Mann-Whitneya stężenia cytokin u chorych na HL ze stężeniami u osób zdrowych, stwierdzono różnice istotne statystycznie dla badanych receptorów. Różnice te były na wysokim poziomie istotności, wynoszącym p<0,00001. U ponad 50% chorych stwierdzono podwyższone stężenia sIL-2R α i sTNF RI.

Korelacja stężeń cytokin z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi

Stężenia oznaczanych rozpuszczalnych receptorów korelowano ze stopniem zaawansowania klinicznego, płcią, wiekiem, podtypem histopatologicznym, obecnością objawów ogólnych, wielkością zajętego śródpiersia i liczbą zajętych miejsc limfatycznych. Za pomocą testu Kruskal-Wallisa ANOVA i współczynnika korelacji rang Spearmana stwierdzono, że stężenia tylko sIL-2R α (R=0,35; p<0,006) narastają wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego (Ryc. 1). Wykazano istotnie wyższe stężenia wszystkich badanych receptorów u chorych z objawami ogólnymi, jak również z rozległymi zmianami w śródpiersiu (Ryc. 2, 3). Tylko dla stężeń sIL-2R α



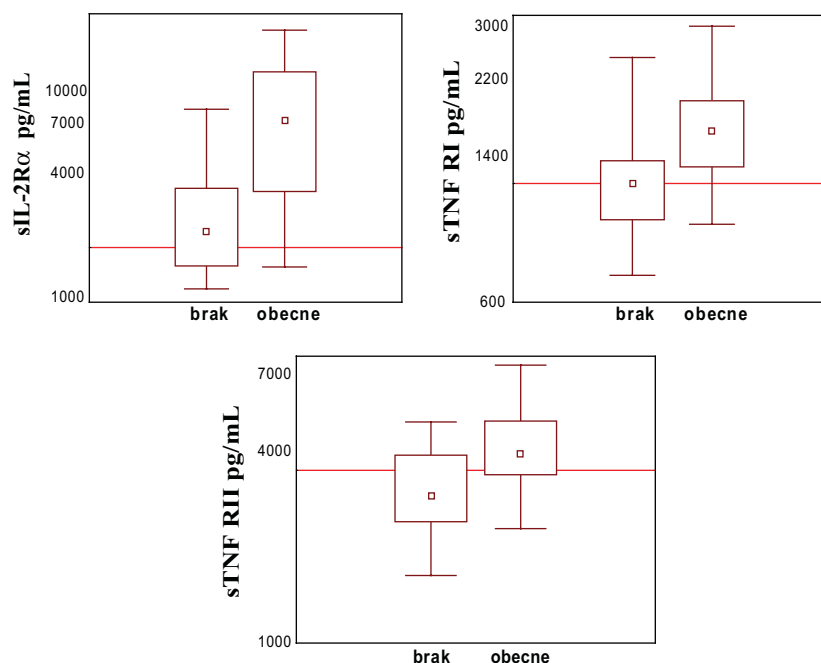
Ryc. 1. Rozkład stężeń i median sIL-2R α w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego chorych na HL

stwierdzono związek pomiędzy liczbą zajętych chorobą miejsc limfatycznych i wiekiem chorych. Stężenia tej cytokiny były istotnie wyższe zarówno u chorych z liczbą powyżej trzech zajętych miejsc, jak i w grupie chorych młodszych (Ryc. 4, 5). Korelacją rang Spearmana wykazano spadek stężeń tego receptora z wiekiem (R=-0,36, p<0,005). Nie wykazano natomiast zależności statystycznych pomiędzy stężeniami badanych receptorów a płcią i podtypem histopatologicznym (NS vs inne). Zależności pomiędzy stężeniami badanych cytokin a parametrami kliniczno-patologicznymi przedstawiono w Tabeli III. Z badanych parametrów laboratoryjnych wykazano ko-

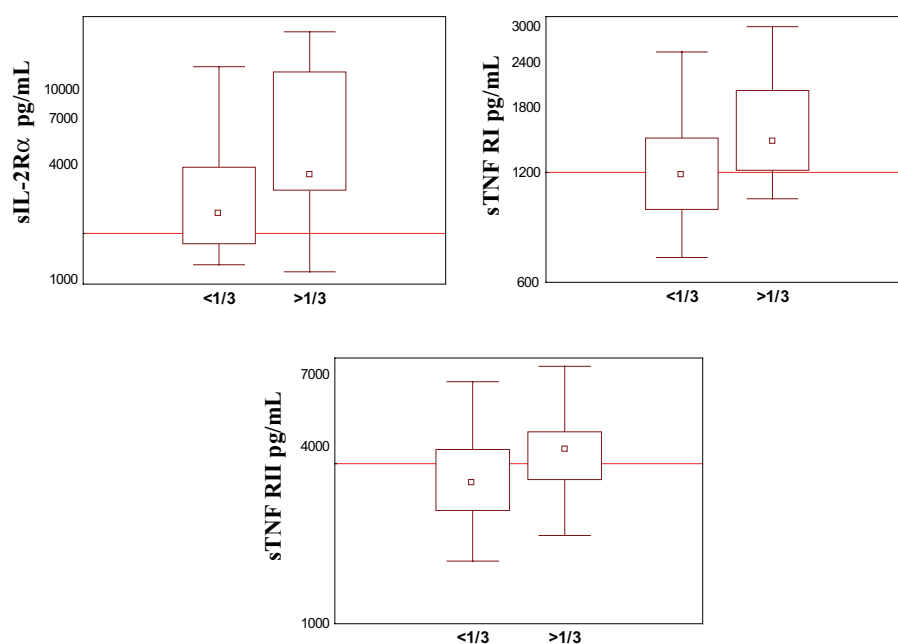
Tab. III. Zależności pomiędzy stężeniami rozpuszczalnych receptorów a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi

Cechy kliniczno-patologiczne	sIL-2R α	sTNF RI	sTNF RII
Wiek ≤30 vs >30	p<0,01	NS	NS
Stopień zaawansowania klinicznego I vs II vs III vs IV	p<0,0016	NS	NS
Objawy ogólne brak vs obecne	p<0,000009	p<0,0006	p<0,0002
MMR* <1/3 vs >1/3	p<0,01	p<0,001	p<0,026
Liczba zajętych miejsc limfatycznych <3 vs ≥3	p<0,049	NS	NS

* rozległość zmiany w śródpiersiu



Ryc. 2. Rozkład stężeń i median rozpuszczalnych receptorów cytokin w zależności od występowania objawów ogólnych u chorych na HL



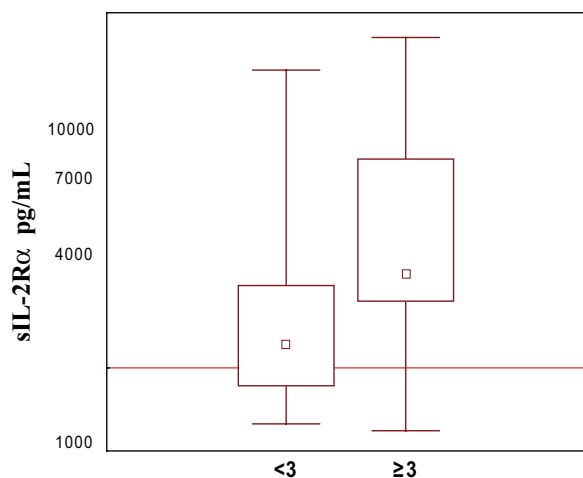
Ryc. 3. Rozkład stężeń i median rozpuszczalnych receptorów cytokin w zależności od rozległości zmian w śródpiersiu

relację pomiędzy wartością OB a stężeniami wszystkich badanych receptorów sIL-2Rα ($p < 0,001$, $R = 0,42$), sTNF RI ($p < 0,0002$, $R = 0,47$) i sTNF RII ($p < 0,007$, $R = 0,34$) i korelację pomiędzy aktywnościami LDH a sIL-2Rα ($p < 0,001$, $R = 0,42$) i sTNF RII ($p < 0,0002$, $R = 0,46$).

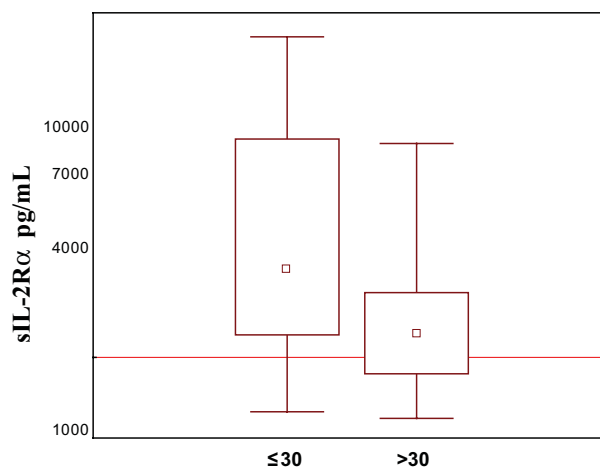
Dyskusja

W prowadzonych badaniach obserwowano najwyższy odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami sIL-2Rα i sTNF RI.

Stężenia sIL-2Rα korelowały ze wszystkimi badanymi parametrami kliniczno-patologicznymi oprócz podtypu histopatologicznego. Jego znamienne podwyższone stężenia związane były ze stopniem zaawansowania klinicznego, objawami ogólnymi, zwiększoną liczbą zajętych miejsc limfatycznych i wielkością zajętego śródpiersia. Stężenia sIL-2Rα korelowały również z parametrami laboratoryjnymi, takim jak wartości OB i aktywności LDH. Wyniki badań były zgodne z wynikami innych autorów, którzy również obserwowali znamienne wyższe stężenia sIL-2Rα u chorych z objawami ogólnymi oraz



Ryc. 4. Rozkład stężeń i median sIL-2R α w zależności od liczby zajętych chorobą miejsc limfatycznych



Ryc. 5. Rozkład stężeń i median sIL-2R α w zależności od wieku chorego na HL

korelację pomiędzy jego stężeniami a stopniem zaawansowania oraz aktywnością LDH i wartościami OB [13-18]. Podobnie jak niektórzy autorzy, nie wykazaliśmy istotnych różnic pomiędzy stężeniami sIL-2R α a podtypami histopatologicznymi [14-17]. Natomiast w przeciwieństwie do innych autorów, obserwowaliśmy znamienne wyższe stężenia u młodszych chorych [14-17].

Z badanych rozpuszczalnych receptorów TNF α , stężenia sTNF RI były podwyższone u znacznie większego odsetka chorych niż sTNF RII. Stężenia obu receptorów były wyższe u chorych z objawami ogólnymi, z rozległymi zmianami w śródpiersiu oraz korelowały z wartością OB. Natomiast tylko stężenia sTNF RII korelowały z aktywnościami LDH. W dostępnej literaturze pojawiło się niewiele prac dotyczących zachowania się stężeń receptorów TNF α , tj. sTNF RI i sTNF RII u chorych na HL. Wyniki badań zawarte w tych publikacjach były sprzeczne [19-21].

Względnie niedawno okazało się, że oba receptory dla TNF, zwłaszcza receptor TNF RI, zawierają tzw. domeny śmierci, w związku z tym związanie ligandu z tym receptorem uruchamia procesy apoptozy [7-10]. Źródłem wolnych receptorów u chorych na nowotwory są komórki nowotworowe dodatkowo pobudzone przez inne cytokiny, przy czym wiadomo, że proces uwalniania receptorów z ich powierzchni (receptor *shedding*) jest intensywniejszy niż proces ich złuszczenia z komórek normalnych. Można więc przypuszczać, że uwalnianie receptorów TNF α przez komórki nowotworowe może być jednym z mechanizmów ich obrony przed apoptozą [1].

We wszystkich badanych wcześniej przez nas umiejscowieniach nowotworu, tj. w raku jelita grubego, płuca oraz mięsach tkanek miękkich i kości, podobnie jak u chorych na chłoniaka Hodgkina, obserwowano wysoki odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami oznaczanych rozpuszczalnych receptorów. U chorych na HL stwierdzano jednak najczęściej podwyższone stężenia sIL-2R α , podczas gdy u chorych na nowotwory nielimfoidalne sTNF RI [11, 12, 22, 23]. Poza tym u chorych na raka jelita grubego i mięsaki kości podwyższone stężenia

sTNF RI okazały się złym czynnikiem prognostycznym [11, 23]. W naszych badaniach u chorych na chłoniaka Hodgkina czas obserwacji nie pozwolił na przeprowadzenie takiej analizy. Jednak przydatność oznaczania w surowicy krwi stężeń rozpuszczalnych receptorów, jako niezależnych czynników prognostycznych, wymaga dłuższego czasu obserwacji. Obecnie można przypuszczać, że oznaczanie stężeń sIL-2R α może być pomocne w monitorowaniu leczenia.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Dr n. med. Maria Kowalska

Zakład Markerów Nowotworowych
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Piśmiennictwo

1. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 231-40.
2. Mazur G, Frydecka I. Interleukina 2 (IL-2) i jej receptor (IL-2R) u osób zdrowych i w różnych stanach chorobowych. *Acta Haematol Pol* 1993; 24: 307-13.
3. Horiuchi S, Koyanagi Y, Yanaka Y i wsp. Altered interleukin-2 receptor α -chain is expressed in human T-cell leukaemia virus type-I-infected T-cell lines and human peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukaemia patients through an alternative splicing mechanism. *Immunology* 1997; 91: 28-34.
4. Sheibani K, Winberg CD, van de Velde S i wsp. Distribution of lymphocytes with interleukin-2 receptors (TAC antigens) in reactive lymphoproliferative processes, Hodgkin's disease, and non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistologic study of 300 cases. *Ann J Pathol* 1987; 127: 27-37.
5. Tsilivakos V, Tsapis A, Kakolyris S i wsp. Characterization of interleukin 2 receptors on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 1994; 8: 1571-8.
6. Touw I, Delwel R, Bolhuis R i wsp. Common and Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells express interleukin 2 receptors, and interleukin 2 stimulates in vitro colony formation. *Blood* 1985; 66: 556-61.

7. Fang L, Fang J, Chen CQ. TNF receptor-associated factor-2 binding site is involved in TNF R75-dependent enhancement of TNFR55-induced cell death. *Cell Res* 2001; 11: 217-22.
8. Gupta S. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR1 and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol* 2002; 37: 293-9.
9. Gupta S, Su H, Bi R i wsp. Differential Sensitivity of Naive and Memory Subsets of Human CD8+ T Cells to TNF- α -Induced Apoptosis. *J Clin Immunol* 2006; 26: 193-203.
10. de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoeur H i wsp. Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3. *Blood* 2002; 99: 1666-75.
11. Kaminska J, Nowacki MP, Kowalska M i wsp. Clinical significance of serum cytokines measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I – an independent prognostic factor. *Tumor Biol* 2005; 26: 186-94.
12. Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B i wsp. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. *Oncology* 2006; 70: 115-25.
13. Pizzolo G, Chilosi M, Vinante F i wsp. Soluble interleukin-2 receptors in the serum of patients with Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1987; 55: 427-8.
14. Ambrosetti A, Nadali G, Vinante F i wsp. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in Hodgkin disease. *Cancer* 1993; 72: 201-6.
15. Viviani S, Camerini E, Bonfante V i wsp. Soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in Hodgkin's disease: outcome and clinical implications. *Br J Cancer* 1998; 77: 992-7.
16. Gorschlüter M, Bohlen H, Hasenclever D i wsp. Serum cytokine levels correlate with clinical parameters in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1995; 6: 477-82.
17. Enblad G, Sundstrom C, Gronowitz S i wsp. Serum levels of interleukin-2 receptor (CD 25) in patients with Hodgkin's disease, with special reference to age and prognosis. *Ann Oncol* 1995; 6: 65-70.
18. Gause A, Roschansky V, Tschiersch A i wsp. Low serum interleukin-2 receptor levels correlate with a good prognosis in patients with Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1991; 2: 43-7.
19. Vener C, Guffanti A, Pomati M i wsp. Soluble cytokine levels correlate with the activity and clinical stage of Hodgkin's disease at diagnosis. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 333-9.
20. Trümper L, Jung W, Dahl G i wsp. Interleukin-7, interleukin-8, soluble TNF receptor, and p53 protein levels are elevated in the serum of patients with Hodgkin's disease. *Ann Oncology* 1994; 5: 93-6.
21. Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P i wsp. Plasma levels of tumor necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *Brit J Cancer* 1998; 77: 2357-62.
22. Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M i wsp. Cytokine serum levels in soft tissue sarcoma patients: correlations with clinico-pathological features and prognosis. *Int J Cancer* 2002; 100: 463-71.
23. Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M i wsp. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 2003; 84: 151-9.

Otrzymano: 3 sierpnia 2006 r.

Przyjęto do druku: 21 listopada 2006 r.