

Stężenia cytokin prozapalnych i inhibitorowych w surowicy krwi chorych na chłoniaka Hodgkina

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

Wstęp. U chorych na chłoniaka Hodgkina (HL) obserwuje się w surowicy krwi często podwyższone stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów. Celem pracy było zbadanie zachowania się stężeń cytokin prozapalnych: IL-1 β , TNF α , IL-6; chemokiny – IL-8 i cytokin inhibitorowych IL-10 i IL-1-ra w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych i laboratoryjnych u chorych na HL.

pacjenci i metody. Badaniami objęto 61 chorych z potwierdzonym histopatologicznie chłoniakiem Hodgkina, leczonych w latach 1997-2003 w Centrum Onkologii – Instytucie, 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-Whitney'a i test Kruskalla-Wallisa.

Wyniki: U ponad 50% chorych stwierdzono podwyższone stężenia IL-6, IL-10 i IL-1ra. Wykazano istotnie wyższe stężenia TNF α , IL-6, IL-10 i IL-1ra u chorych na HL w porównaniu z osobami zdrowymi. Na podstawie krzywych ROC wykazano najwyższą czułość diagnostyczną IL-6 i IL-10. Stężenia IL-10, IL-1ra i TNF α wzrastały wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego. U chorych z ogólnymi objawami stężenia IL-6, IL-10 i TNF α były istotnie wyższe. Wykazano istotnie wyższe stężenia IL-6 u chorych z rozległymi zmianami w śródpiersiu oraz znamienne wyższe stężenia IL-10 i IL-1ra u chorych z większą liczbą zajętych chorobą miejsc limfatycznych. Nie wykazano zależności statystycznych pomiędzy stężeniami cytokin a płcią i podtypem histopatologicznym. Obserwowano ponadto korelację pomiędzy wartością OB a stężeniami IL-6, IL-10 i IL-1ra. Natomiast aktywność LDH korelowała tylko ze stężeniami TNF α .

Wnioski: Z badanych cytokin oznaczanie IL-6, ze względu na jej największą czułość diagnostyczną, może być przydatne w monitorowaniu leczenia chorych na HL. Wymaga to jednak potwierdzenia na większej liczbie chorych.

Pro-inflammatory and inhibitory cytokines in the sera of patients with Hodgkin's lymphoma

Introduction. Patients with Hodgkin's lymphoma (HL) often present elevated serum concentrations of cytokines and soluble cytokine receptors. The purpose of the study was to examine the relationships between the serum levels of the proinflammatory cytokines, IL-1 β , TNF α and IL-6; of the chemokine IL-8; of the inhibitory cytokines IL-10 and IL-1-ra; and the clinico-pathological and blood parameters of patients with Hodgkin's lymphoma.

Patients and methods. Sixty one patients with pathologically confirmed HL and no EBV infection, treated in the Cancer Centre and Institute of Oncology in Warsaw in the years 1997-2003, were included. Serum cytokine levels were measured by the commercially available kits of R&D Systems, Minneapolis. Normal ranges were assessed in 50 healthy blood donors. For the statistical analyses Mann-Whitney and Kruskall-Wallis tests were employed.

Results. Serum levels of IL-6, IL-10 and IL-1ra were found to be elevated in over 50% of patients. TNF α , IL-6, IL-10 and IL-1ra concentrations were significantly elevated in the sera of HL patients as compared to healthy donors. The ROC curves' analyses have shown IL-6 and IL-10 to present the highest diagnostic sensitivity of all cytokines studied. IL-10, IL-1ra and TNF α concentrations were found to increase with clinical stage. Significantly higher IL-6, IL-10 and TNF α levels were found in HL patients with systemic symptoms than in the others. Significantly higher IL-6 levels were found in patients with extensive mediastinum involvement, and significantly higher IL-10 and IL-1ra concentrations in patients with the greater number of lymph node regions involved. Cytokine levels correlated neither with sex

¹ Zakład Markerów Nowotworowych

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

nor with histopathological subtype of HL. The levels of IL-6, IL-10 and IL-1ra correlated with the erythrocyte sedimentation rate and the levels of TNF α correlated with LDH activity.

Conclusions. Serum IL-6 levels present the highest diagnostic sensitivity of all the cytokines studied, and might be applied in monitoring of HL patients. This needs to be confirmed in a greater series of patients.

Słowa kluczowe: chłoniak Hodgkina, cytokiny prozapalne, cytokiny inhibitorowe

Key words: Hodgkin's lymphoma, pro-inflammatory cytokines, inhibitory cytokines

Wstęp

Od wielu lat chłoniaka Hodgkina (HL) uważano za chorobę zapalną, dopiero badania cytogenetyczne wskazały na nowotworowy charakter komórek Hodgkina i Reed-Sternberga (H-RS). Prawdopodobnie przyczyną niepowodzenia licznych badań dotyczących natury chłoniaka Hodgkina był niewielki odsetek komórek H-RS, otoczonych przez liczne komórki naciekające. Zjawisko to utrudniało wyizolowanie czystej populacji komórek H-RS, niezbędnych do określenia ich charakteru, jak i badania ekspresji różnych białek, w tym cytokin, odgrywających istotną rolę w tej chorobie.

Stosując czułe techniki, takie jak hybrydyzacja *in situ* (ISH), immunohistochemia (IHC) i reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), określono ekspresję mRNA cytokin, zarówno w liniach komórkowych Reed-Sternberga, jak i w pierwotnych komórkach. Technikami tymi udało się potwierdzić ekspresję takich cytokin jak: IL-1, TNF α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, M-CSF, sIL-2R i TNFR [1- 4]. U chorych na HL często obserwowano w surowicy krwi podwyższone stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów [5-10]. Źródłem tych cytokin mogą być zarówno komórki H-RS, jak i komórki naciekające, tak więc obserwowany profil cytokin we krwi jest wynikiem interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i naciekającymi.

W prezentowanej pracy przedstawiono korelację pomiędzy stężeniami cytokin prozapalnych: IL-1 β , TNF α , IL-6; chemokiny – IL-8 i cytokin inhibitorowych – IL-10 oraz IL-1ra, a wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi i laboratoryjnymi u chorych na HL.

Pacjenci i metody

Badaniami objęto 61 chorych przed leczeniem z potwierdzonym histopatologicznie chłoniakiem Hodgkina – HL (37 kobiet, 24 mężczyzn; wiek 15-63 lat, mediana wieku: 26 lat), leczonych w Centrum Onkologii – Instytucie, w Warszawie. Czas obserwacji chorych wynosił około 9 lat. U wszystkich chorych badaniami histopatologicznymi wykluczono infekcję wirusem EBV. Charakterystykę chorych przedstawiono w Tabeli I.

Stężenia w surowicy krwi cytokin prozapalnych IL-1 β , TNF α , IL-6; chemokiny – IL-8 i cytokin inhibitorowych – IL-10 i IL-1ra oznaczono zestawami firmy R&D Systems (Minneapolis, USA). Ustalono zakres własnych norm dla stężeń cytokin u 50 zdrowych osób (grupa referencyjna) w wieku od 19 do 74 lat (mediana 42 lata). Odnośnie punktów odcięcia przyjęto jako wartość odcinającą 5 i 95 percentyla.

Do obliczeń statystycznych stosowano program Statistica PL. 6.0 oraz MedCalc dla określenia pól powierzchni pod krzywymi ROC. Dla porównania prób niezależnych korzystano z testu Mann-Whitney'a i testu ANOVA rang Kruskal-Wallisa.

Tab. I. Charakterystyka kliniczno-patologiczna chorych na HL

Parametry	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

Związek pomiędzy analizowanymi zmiennymi liczono postępując się korelacją rang Spearmana.

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

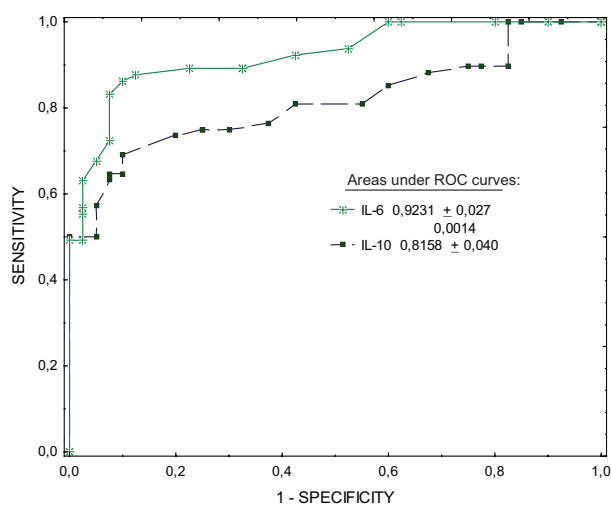
Wyniki

U 61 chorych na HL oznaczono w surowicy krwi stężenia: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-1ra. Z dalszych badań wyłączono IL-1 β i IL-8, których stężenia były w zakresie wartości prawidłowych u większości chorych. W Tabeli II u osób zdrowych i chorych przedstawiono wartości median, zakres stężeń oraz procent podwyższonych wyników oznaczonych cytokin. W badanej grupie chorych stwierdzono aż u 80% podwyższone stężenia IL-6, podczas gdy stężenia TNF α były podwyższone

Tab. II. Wartości median i zakres stężeń IL-6, IL-10, IL-1ra i TNF α u osób zdrowych i chorych na HL

Cytokiny	Zdrowi		Chorzy		Chorzy vs zdrowi	Odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami (%)
	mediana	zakres	mediana	zakres		
IL-6	0,8	(0,7-2,4)	8,2	(0,7-450)	p<0,0000	80
IL-10	3,0	(2,0-7,3)	8,8	(2,0-163,5)	p<0,0000	61
IL-1ra	248	(98-473)	501	(98-2890)	p<0,0000	55
TNF α	4,4	(<4,4)	4,4	(4,4-20)	p<0,0006	31

tylko u 31% badanych. Testem Mann-Whitney'a wykazano istotnie wyższe stężenia IL-6, IL-10, IL-1ra i TNF α u chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi. Najwyższą czułość diagnostyczną liczoną z krzywych ROC stwierdzono dla stężeń IL-6 (Ryc. 1).



Ryc.1. Przebieg krzywych ROC dla stężeń IL-6 i IL-10 u chorych na HL

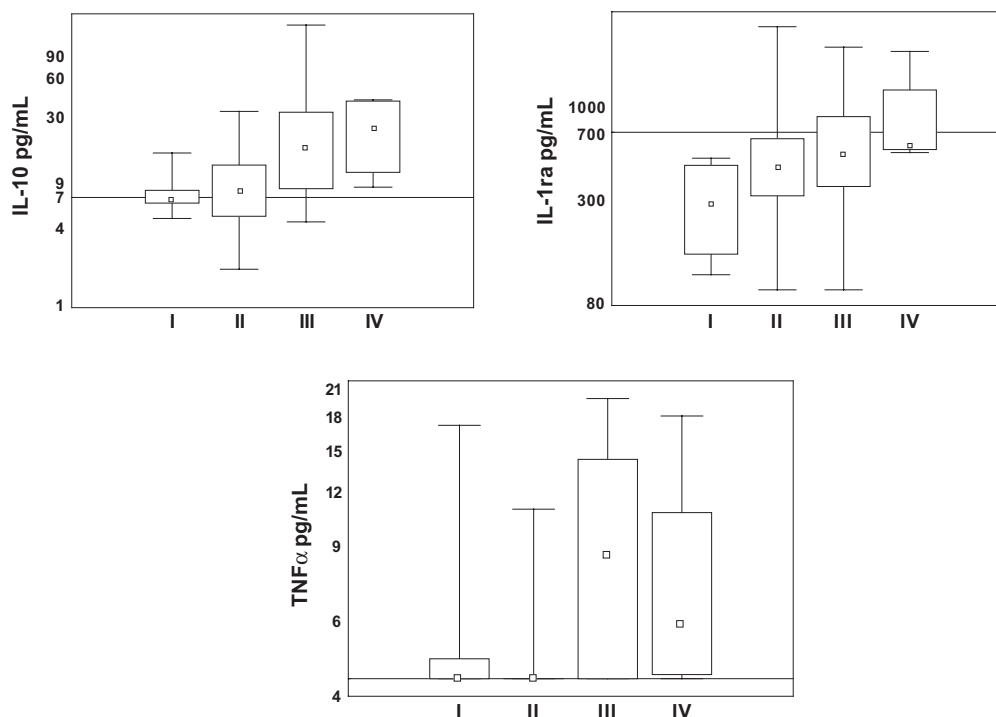
Korelacja stężeń cytokin z wybranymi cechami kliniczno patologicznymi

Stężenia oznaczanych cytokin korelowano ze stopniem zaawansowania klinicznego, płcią, wiekiem, podtypem histopatologicznym, obecnością objawów ogólnych, wielkością zajętego śródpiersia i liczbą zajętych miejsc limfatycznych. Testem Kruskal-Wallis'a ANOVA i współczynnikiem korelacji rang Spearmana wykazano narastanie stężeń IL-10 (p<0,002, R=0,38), IL-1ra (p<0,006, R=0,35) i TNF α (p<0,003, R=0,37) wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego. U chorych z objawami ogólnymi stwierdzono istotnie wyższe stężenia IL-6, IL-10 i TNF α , w porównaniu z ich stężeniami u chorych bez tych objawów. Również obserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6 u chorych z rozległymi zmianami w śródpiersiu oraz znamienne wyższe stężenia IL-10 i IL-1ra u chorych z większą liczbą zajętych chorobą miejsc limfatycznych. Wykazano także, że stężenia IL-6 i IL-10 są istotnie wyższe u chorych poniżej 30 roku życia. Zależności pomiędzy stężeniami badanych cytokin a parametrami kliniczno-patologicznymi przedstawiono w Tabeli III i na rycinach 2-5. Nie wykazano zależności statystycznych

Tab. III. Zależności pomiędzy stężeniami badanych cytokin a cechami kliniczno-patologicznymi

Cechy kliniczno-patologiczne	IL-6	IL-10	IL-1ra	TNF α
Wiek				
≤30 vs >30	p< 0,024	p<0,045	NS	NS
Stopień zaawansowania klinicznego				
I vs II vs III vs IV	NS	p<0,022	p<0,033	p<0,002
Objawy ogólne				
brak vs obecne	p<0,0008	p<0,0004	NS	p<0,012
MMR*				
<1/3 vs >1/3	p<0,0076	NS	NS	NS
Liczba zajętych miejsc limfatycznych				
< 3 vs ≥3	NS	p<0,01	p<0,01	NS
Płeć				
kobiety vs mężczyźni	NS	NS	NS	NS
Klasyfikacja histopatologiczna				
NS vs inne	NS	NS	NS	NS

* rozległość zmiany w śródpiersiu



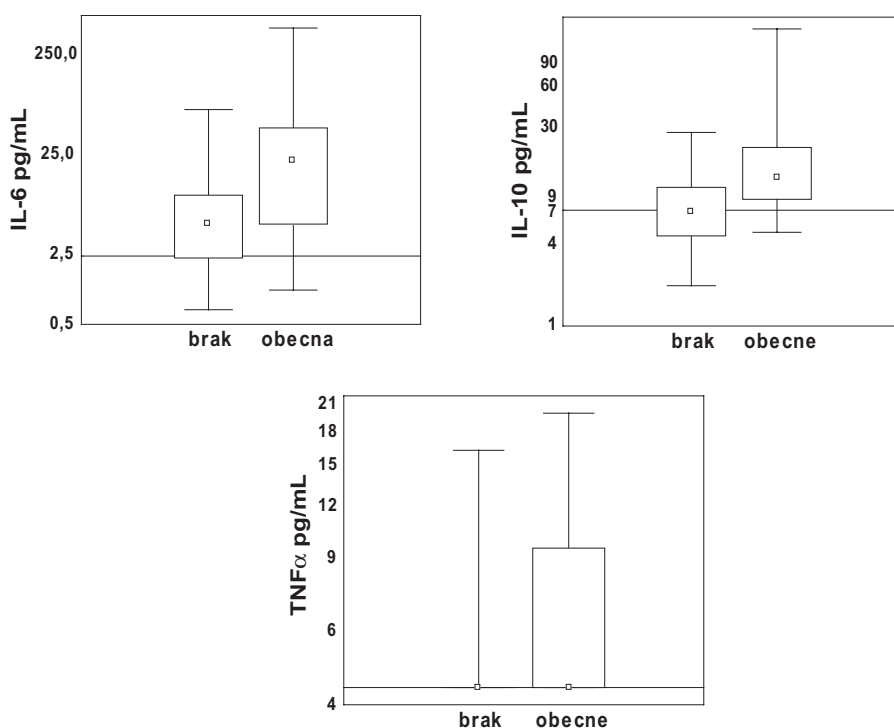
Ryc. 2. Rozkład stężeń i median IL-10, IL-1ra i TNF α w zależności od stopnia zaawansowania

pomiędzy stężeniami cytokin, a płcią i podtypem histopatologicznym.

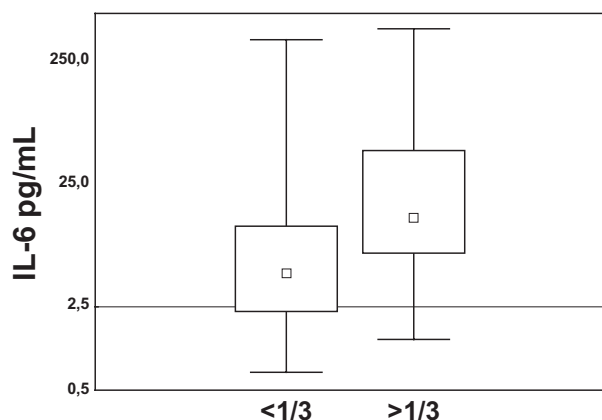
Z badanych parametrów laboratoryjnych OB i LDH, wykazano narastanie stężeń IL-6 ($R=0,55$; $p<0,000007$), IL-10 ($R=0,43$; $p<0,0006$) i IL-1ra ($R=0,40$; $p<0,001$) wraz z wartościami OB, natomiast taką zależność dla aktywności LDH obserwowano tylko dla stężeń TNF α ($R=0,37$; $p<0,005$).

Dyskusja

W prowadzonych badaniach obserwowano wysoki odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami w surowicy krwi IL-6, IL-10, IL-1ra i TNF α . Natomiast stężenia IL-1 β , podobnie jak w badaniach innych autorów, podwyższone były sporadycznie [5]. Również stężenia IL-8 były podwyższone tylko u niewielkiego odsetka chorych. W nie-



Ryc. 3. Rozkład stężeń i median IL-6, IL-10 i TNF α w zależności od występowania objawów ogólnych u chorych na HL



Ryc. 4. Rozkład stężeń i median IL-6 w zależności od rozległości zmian w śródpiersiu u chorych na HL

licznych prac dotyczących zachowania się stężeń IL-8 u chorych na HL wyniki badań są sprzeczne [5, 6, 11]. Większość dostępnych prac dotyczyła ekspresji mRNA IL-8 w liniach komórkowych HR-S lub w komórkach naciekających, w których autorzy wykazali niską ekspresję mRNA IL-8 w komórkach H-RS i wysoką ekspresję w komórkach naciekających, tłumacząc w ten sposób podwyższone stężenia tej cytokiny w surowicy krwi chorych [3, 4, 12]. Również nasze wcześniejsze badania, u chorych o innych umiejscowieniach nowotworu takich jak rak jelita grubego, jajnika, niedrobnokomórkowy rak płuca, mięsaki tkanek miękkich i kości, wykazały u znacznego odsetka chorych podwyższone stężenia IL-8 [13-15].

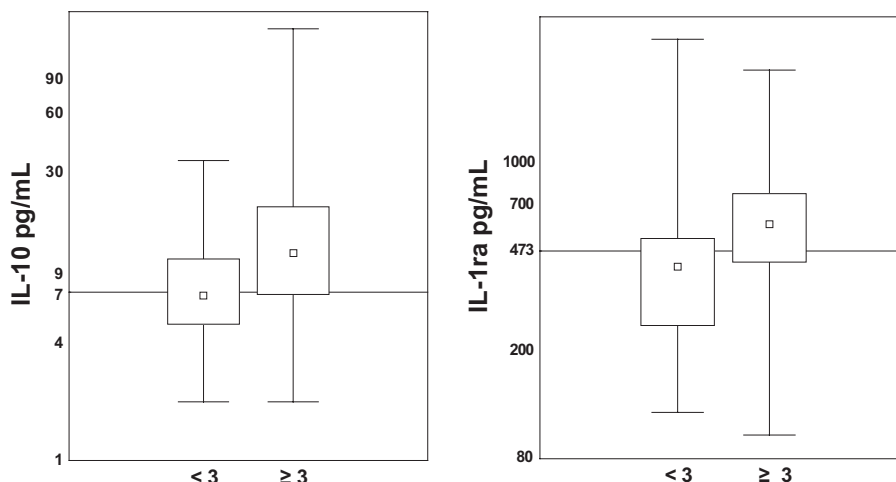
U chorych na HL, u których obserwowano objawy ogólne, stwierdzono MMR powyżej 1/3 i podwyższone wartości OB. Uzyskane wyniki sugerują, że IL-6, jako cytokina zapalna, może odgrywać rolę w patogenezie objawów ogólnych, o czym donoszą również inni autorzy [5, 9, 16]. W piśmiennictwie spotyka się także prace, które nie wykazują takich zależności, co utrudnia jednolitą interpretację roli IL-6 w powstawaniu objawów ogólnych [17-19]. Ekspresja mRNA dla TNF α i IL-1 jest powszechna w liniach komórkowych H-RS oraz w znacznym odsetku komórek naciekających. Cytokiny te biorą

udział w reakcjach zapalnych, indukując uwalnianie IL-6, na co mogą wskazywać również podwyższone stężenia IL-6, w badanej przez nas grupie chorych. Natomiast stężenia TNF α były podwyższone u 31% chorych i korelowały ze stopniem zaawansowania, objawami ogólnymi i aktywnością LDH. Doniesienia innych autorów są rozbieżne, wahają się co do odsetka podwyższonych wyników i korelacji z badanymi parametrami [5, 9, 18, 20].

Z oznaczanych cytokin, IL-10 najczęściej korelowała z badanymi parametrami kliniczno-patologicznymi. Jej znamienne wyższe stężenia związane były zarówno ze stopniem zaawansowania klinicznego, objawami ogólnymi, zwiększoną liczbą zajętych miejsc limfatycznych, wiekiem poniżej 30 lat oraz wartością OB. Dane literaturowe dotyczące zależności pomiędzy stężeniami IL-10, a parametrami kliniczno-patologicznymi są sprzeczne. Natomiast autorzy licznych prac są zgodni, że jej podwyższone stężenia są złym czynnikiem prognostycznym [7, 8, 10, 21, 22].

W badanej przez nas grupie chorych, podwyższone stężenia IL-1ra obserwowano u znacznego odsetka chorych i korelowały one ze stopniem zaawansowania klinicznego oraz wartościami OB. Stężenia tej cytokiny były także wyższe u chorych ze zwiększoną liczbą zajętych miejsc limfatycznych. Gruss i wsp [23] wykazali istotnie niższe stężenia IL-1ra u chorych z objawami ogólnymi, czego nie potwierdziły nasze badania. W piśmiennictwie spotyka się prace, w których autorzy przypisują IL-1ra rolę czynnika ochronnego poprzez blokowanie działania IL-1 [23, 24].

Wyniki naszych badań, jak i innych autorów, potwierdzają teorię, że objawy towarzyszące chłoniakowi Hodgkina związane są z zachwianą równowagą w uwalnianiu cytokin, oraz ich działaniu lokalnym i ogólnoustrojowym. Chorzy na chłoniaka Hodgkina mają z reguły długi okres przeżycia, zatem wskazanie, która z badanych cytokin może okazać się niezależnym czynnikiem prognostycznym, wymaga znacznie dłuższego czasu obserwacji.



Ryc. 5. Rozkład stężeń i median IL-10 i IL-1ra w zależności od liczby zajętych chorobą miejsc limfatycznych u chorych na HL

Wnioski

W oparciu o wysoką czułość diagnostyczną oznaczeń IL-6, można przypuszczać, że oznaczanie tej cytokiny może być przydatne w ocenie odpowiedzi na leczenie.

Dr Maria Kowalska

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

and outcome of Hodgkin's disease patients. *Br J Cancer* 1998; 77: 2357-62.

21. Axedorph U, Sjoberg J, Grimfos G i wsp. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the international prognostic score in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2000; 11: 1405-11.
22. Bohlen H, Kessler M, Sextro M i wsp. Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease. *Ann Hematol* 2000; 79: 110-3.
23. Gruss H.J, Doelken G, Brach MA i wsp. High concentrations of the interleukin-1 receptor antagonist in serum of patients with Hodgkin's disease. *Lancet* 1992; 340: 68.
24. Dunlop R, Campbell CW. Cytokines and advanced cancer. Review Article. *J Pain Symptom Manage* 2000; 20: 214-32.

Otrzymano: 3 sierpnia 2006 r.

Przyjęto do druku: 13 grudnia 2006 r.

Piśmiennictwo

1. Klein S, Jucker M, Diehl V i wsp. Production of multiple cytokines by Hodgkin's disease derived cell lines. *Hematol Oncol* 1992; 10: 319-.
2. Luciani MG, Stoppacciaro A, Peri G i wsp. The monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) in Hodgkin's disease and in solid tumours. *Mol Pathol* 1998; 51: 273-6.
3. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-97.
4. Malec M, Soderqvist M, Sirsjo A i wsp. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 103: 1755-62.
5. Gorschluter M, Bohlen H, Hasenclever D i wsp. Serum cytokine levels correlate with clinical parameters in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1995; 6: 477-82.
6. Denizot Y, Fixe P, Liozon E i wsp. Serum interleukin-8 (IL-8) and IL-6 concentrations in patients with hematological malignancies. *Lancet* 1992; 340: 4016-.
7. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P i wsp. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol* 1999; 10: 433-40.
8. Viviani S, Notti P, Bonfante V i wsp. Elevated pretreatment serum levels of IL-10 are associated with a poor prognosis in Hodgkin's disease, the Milan Cancer Institute Experience. *Med Oncol* 2000; 17: 59-63.
9. 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: 333-40.
10. Salgami EV, Efstathiou SP, Vlachakis V i wsp. High pretreatment interleukin-10 is an independent predictor of poor failure-free survival in patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematol* 2002; 32: 377-87.
11. Trumper 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.
12. Foss HD, Herbst H, Gottstein S i wsp. Interleukin-8 in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1996; 148: 1229-36.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F i wsp. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Cancer Res* 1993; 53: 2118-22.
17. Gause A, Keymis S, Scholz R i wsp. Increased levels of circulating cytokines in patients with untreated Hodgkin's disease. *Lymphokine and Cytokine Res* 1991; 11: 109-13.
18. Blay JY, Farcet JP, Lavaud A i wsp. Serum concentrations of cytokines in patients with Hodgkin's disease. *Eur J Cancer* 1994; 30: 321-4.
19. Seymour JF, Talpaz M, Hagemester FB i wsp. Clinical correlates of elevated serum levels of interleukin-6 in patients with untreated Hodgkin's disease. *Am J Med* 1997; 102: 21-8.
20. Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P i wsp. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features