

Przydatność oznaczania stężeń cytokin w monitorowaniu leczenia chorych na mięsaki tkanek miękkich

Janina Kamińska¹, Maria Kowalska¹, Beata Kotowicz¹,
Małgorzata Fuksiewicz¹, Piotr Rutkowski², Włodzimierz Ruka²

Wstęp. Celem pracy było określenie przydatności oznaczania w surowicy krwi stężeń wybranych cytokin w monitorowaniu leczenia chorych na mięsaki tkanek miękkich.

Pacjenci i metody. Badaniami objęto 69 chorych na mięsaki tkanek miękkich. Wszystkie rozpoznania potwierdzono w badaniu histopatologicznym. Po leczeniu radykalnym (leczenie operacyjne z uzupełniającą radio- lub chemioterapią), oznaczano stężenia cytokin w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia i po 7-9 tygodniach po jego zakończeniu. Do monitorowania leczenia, spośród wszystkich badanych cytokin, wyselekcjonowano IL-6, IL-8, sTNF RI i VEGF. Cytokiny oznaczano w surowicy krwi zestawami firmy R&D. Normy dla cytokin określano na podstawie badań wykonanych u 50 zdrowych osób. Do analiz statystycznych zastosowano test Mann-Whitney'a i test Wilcoxon.

Wyniki. U chorych, u których nie stwierdzono nawrotu choroby, po leczeniu stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie stężeń IL-6 i IL-8, podczas gdy u chorych z nawrotem choroby (wznowa/przerzuty) nie stwierdzono różnic znamienych w stężeniach analizowanych cytokin. Przed leczeniem, u chorych z nawrotem choroby obserwowano wyższy ich odsetek z podwyższonymi stężeniami IL-6 i sTNF RI w porównaniu z chorymi bez nawrotu choroby, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Natomiast po leczeniu, u chorych z nawrotem choroby obserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6, IL-8 i sTNF RI w porównaniu z tymi bez nawrotu choroby.

Podsumowanie. Wyniki badań wskazują, że zmiany stężeń badanych cytokin w surowicy krwi mogą być pomocnym markerem w ocenie odpowiedzi na leczenie chorych na mięsaki tkanek miękkich, gdzie brak standardowego markera nowotworowego.

Słowa kluczowe: cytokiny, mięsaki tkanek miękkich, monitorowanie leczenia

Wstęp

Cytokiny stanowią heterogenną grupę białek o dużej aktywności biologicznej. Uczestniczą one w przekazywaniu informacji między komórkami kontrolującymi ich podstawowe funkcje – w tym zwłaszcza rozplęm, różnicowanie i migrację – poprzez oddziaływanie autokrynne lub parakrynne. Są one plejotropowymi czynnikami wzrostu i różnicowania się komórek w reakcjach immunologicznych, w procesach zapalnych oraz w fizjologicznej odnowie różnych tkanek.

W procesach nowotworowych dochodzi bardzo często do nadmiernej i niekontrolowanej ekspresji genów cytokin i ich receptorów w komórkach nowotworowych oraz do ich zwiększonej syntezy w komórkach zrębu narządów, w których rozwija się nowotwór. Jeżeli cytokiny i ich wolne receptory są uwalniane do płynów ustrojowych w wystarczająco wysokich stężeniach, to mogą być

markerami użytecznymi w rozpoznawaniu, prognozowaniu i monitorowaniu leczenia choroby nowotworowej.

Dotychczasowe badania ograniczały się przede wszystkim do badań dotyczących zależności pomiędzy stężeniami cytokin i ich wolnych receptorów w surowicy krwi, a parametrami kliniczno-patologicznymi, charakterystycznymi dla określonej lokalizacji nowotworu oraz ich znaczenia jako niezależnych czynników prognostycznych (1-5). We wcześniejszych naszych badaniach przeprowadzono analizę stężeń szerokiego spektrum cytokin o różnych funkcjach oraz ich wolnych receptorów, co umożliwiło wyselekcjonowanie tych, które w onkologicznej praktyce klinicznej mogą być najbardziej przydatne. W kilku umiejscowieniach nowotworów przeprowadzono także analizę związku pomiędzy stężeniami cytokin i ich wolnych receptorów a czasem przeżycia oraz analizę wieloczynnikową, która umożliwiła zbadanie, czy stężenia tych mediatorów w surowicy krwi są niezależnymi czynnikami rokowniczymi [1, 2, 6].

W dostępnym piśmiennictwie pojawiło się niewiele prac, w których analizowano współzależności pomiędzy stężeniami cytokin w surowicy krwi a odpowiedzią na leczenie [7-11]. Celowe jest zatem rozszerzenie zakresu ba-

¹ Zakład Markerów Nowotworowych

² Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

dań nad kliniczną przydatnością oznaczania stężeń cytokin w surowicy krwi chorych na różne nowotwory złośliwe.

Pacjenci i metody

Badaniami objęto 69 chorych na mięsaki tkanek miękkich. Charakterystykę chorych przedstawiono w Tabeli I. Wszystkie rozpoznania potwierdzono w badaniu histopatologicznym. Chorzy z kilkoma nowotworami lub z aktualnie istniejącymi uogólnionymi stanami zapalnymi byli wykluczeni z badań.

Tab. I. Charakterystyka chorych na mięsaki tkanek miękkich

	Liczba chorych (%) n=69
Płeć	
mężczyźni	33 (48)
kobiety	36 (52)
Wiek	18-84 (mediana 52 lat)
Typ histologiczny	
<i>liposarcoma</i>	20 (29,1)
<i>schwannoma malignum</i>	7 (10,1)
<i>sarcoma synoviale</i>	8 (11,6)
<i>FHM</i>	11 (15,9)
<i>leiomyosarcoma</i>	7 (10,1)
inne	16 (23,2)
Rozmiar guza	
<10 cm	30 (43,5)
≥10 cm	39 (56,5)
Stopień złośliwości histologicznej	
G1	11 (15,9)
G2	24 (34,8)
G3	34 (49,3)

U wszystkich chorych oznaczano stężenia cytokin w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia i po jego zakończeniu. Analizą objęto jedynie chorych leczonych w sposób w założeniu radykalny (leczenie operacyjne z uzupełniającą radio- lub che-

mioterapią), bez cech rozsiewu choroby w chwili rozpoczęcia terapii.

Chorych poddano starannej obserwacji, z medianą czasu dla żyjących przekraczającą 3 lata.

Po uzyskaniu zgody od chorego pobierano 10 ml krwi na skrzep, a następnie po odwirowaniu, surowicę przechowywano w temperaturze -70°C . Normy dla cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w surowicy krwi określano na podstawie badań wykonanych u 50 zdrowych osób, stanowiących grupę kontrolną [2].

Cytokiny i ich wolne receptory oznaczano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA, zestawami firmy R&D Systems Minneapolis, USA.

Analiza statystyczna

Dla porównania dwóch niezależnych prób stosowano test Mann-Whitney'a, natomiast dla prób zależnych test Wilcoxon.

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

Wyniki

Do monitorowania leczenia chorych zakwalifikowano te cytokiny lub ich rozpuszczalne receptory, których stężenia we wcześniejszych badaniach miały związek z różnymi cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu lub miały znaczenie prognostyczne. Spośród wszystkich wcześniej badanych cytokin [2,6] do monitorowania leczenia zakwalifikowano cytokiny prognostyczne IL-6 i IL-8 oraz cytokinę proangiogenną VEGF i rozpuszczalny receptor sTNF RI, które korelowały z wielkością guza. Cytokiny te charakteryzowały się również wysoką czułością diagnostyczną.

W tabelach IIa i IIb przedstawiono mediany, zakres stężeń oraz odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami analizowanych cytokin przed i po zakończeniu leczenia,

Tab. II. Cytokiny u chorych na mięsaki tkanek miękkich w zależności od odpowiedzi na leczenie

a) remisja choroby

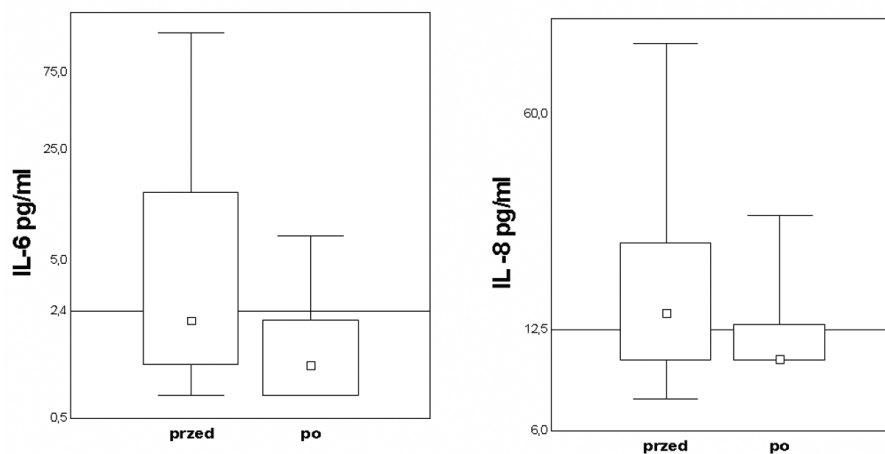
Cytokiny	Przed leczeniem		odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami, %	Po leczeniu		p	odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami, %
	mediana	zakres pg/ml		mediana	zakres pg/ml		
IL-6	2,1	(0,7-135)	16/33 (48%)	1,1	(0,7-7,1)	0,003	6/32 (19%)
IL-8	14,2	(7,6-100,5)	19/33 (57%)	10,1	(10-28,7)	0,001	10/32 (31%)
VEGF	368	(50-1527)	19/32 (59%)	312	(61-1387)	NS	15/33 (45%)
sTNF RI	1359	(743-3633)	15/26 (58%)	1367	(600-3120)	NS	21/31 (68%)

NS = nieznamienne statystycznie

b) nawrót choroby

Cytokiny	Przed leczeniem		odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami, %	Po leczeniu		p	odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami, %
	mediana	zakres pg/ml		mediana	zakres pg/ml		
IL-6	4,0	(0,7-129)	23/36 (64%)	3,2	(0,7-86,5)	NS	20/36 (55%)
IL-8	13,8	(10-149)	21/36 (58%)	13,3	(10-220)	NS	20/36 (55%)
VEGF	286	(30-2000)	17/34 (50%)	430	(29-2000)	NS	20/35 (57%)
sTNF RI	1288	(898-4186)	22/31 (71%)	1733	(744-5000)	NS	29/36 (80%)

NS = nieznamienne statystycznie



Ryc. 1. Rozkład stężeń i median IL-6 i IL-8 przed i po leczeniu u chorych, u których nie stwierdzono nawrotu choroby

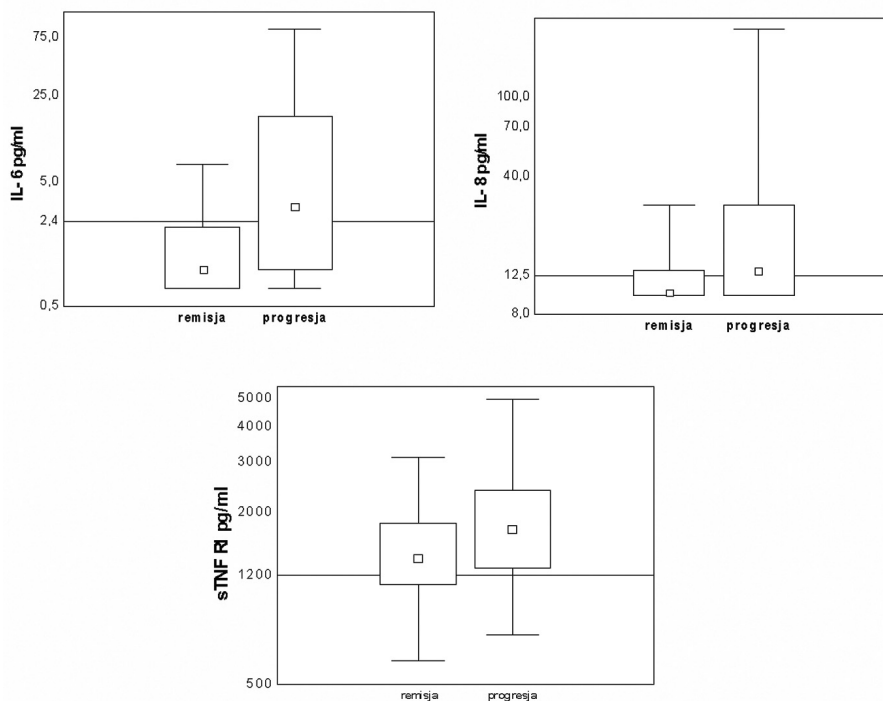
odpowiednio w grupach chorych, gdzie nie obserwowano nawrotu choroby w czasie długotrwałej obserwacji (33 chorych) oraz u tych, u których stwierdzono nawrót (36 chorych). W grupie chorych, gdzie nie stwierdzono nawrotu, po leczeniu stwierdzono istotnie statystycznie zmniejszenie stężeń IL-6 ($p < 0,003$) i IL-8 ($p < 0,001$) (Tabela IIa, Ryc.1). Natomiast w grupie chorych, u których wystąpił nawrót choroby (wznowa/przerzuty) nie stwierdzono zmniejszenia stężeń analizowanych cytokin po leczeniu (Tabela IIb).

Analizowano również zachowanie się stężeń cytokin u chorych w zależności od ich stanu klinicznego. Przed leczeniem, u chorych z nawrotem choroby obserwowano wyższy odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami IL-6 i sTNF RI w porównaniu z chorymi bez nawrotu choro-

by, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Natomiast po leczeniu u chorych z nawrotem choroby obserwowano istotnie wyższe stężenia IL-6 ($p < 0,001$), IL-8 ($p < 0,05$) i sTNF RI ($p < 0,02$) w porównaniu z grupą chorych bez nawrotu choroby (Ryc. 2).

Dyskusja

Oznaczanie cytokin i ich wolnych receptorów w surowicy krwi przed podjęciem leczenia może być użyteczne dla przewidywania dynamiki rozwoju procesu nowotworowego i doboru optymalnych metod leczenia. Dotyczy to zwłaszcza nowotworów, w których brak klasycznych markerów nowotworowych, takich jak mięsaki tkanek miękkich. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania odpowied-



Ryc. 2. Rozkład stężeń i median IL-6, IL-8 i sTNF RI u chorych po leczeniu w zależności od stanu klinicznego

nich markerów, które mogłyby być pomocne w szeroko pojętej diagnostyce. Rolę taką mogą spełniać cytokiny i ich rozpuszczalne receptory. Jednakże liczba prac zajmujących się tymi zagadnieniami jest niewielka, zwłaszcza w przypadku mięsaków tkanek miękkich [2, 11]. Znacznie częściej badacze zajmują się związkami cytokin z określonymi cechami kliniczno-patologicznymi oraz określeniem właściwości prognostycznych, niż wykorzystaniem ich w monitorowaniu leczenia chorych [1, 3, 8, 9, 12-14]. Wartość oznaczania stężeń cytokin w monitorowaniu leczenia chorych na mięsaki tkanek miękkich była przedmiotem nielicznych prac, a wyniki tych badań były sprzeczne [2, 8, 9, 11].

Prowadzone wcześniej badania pozwoliły nam na wyselekcjonowanie tych cytokin, które odgrywały istotną rolę zarówno jako czynniki prognostyczne, jak i korelowały z różnymi cechami kliniczno-patologicznymi. W badaniach tych wykazaliśmy znaczenie oznaczania stężeń IL-6 i IL-8 jako niezależnych czynników prognostycznych oraz związek stężeń VEGF i sTNF RI z wielkością guza u chorych na mięsaki tkanek miękkich [2].

W prezentowanej obecnie pracy określono możliwości wykorzystania oznaczania stężeń wybranych cytokin w monitorowaniu leczenia tych chorych. Analizowano nie tylko wpływ leczenia na zachowanie się stężeń cytokin, ale również badano, czy istnieją różnice w stężeniach cytokin w surowicy krwi chorych bez nawrotu choroby vs z nawrotem choroby.

W grupie chorych bez nawrotu, po leczeniu stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie stężeń IL-6 i IL-8. Natomiast u chorych z nawrotem (wznowa/przerzuty) nie wykazano żadnych różnic istotnych statystycznie. Brak tych różnic być może jest związany z faktem, że u chorych z nawrotem choroby obserwuje się już przed leczeniem wysoki odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami IL-6.

Natomiast analizując zachowanie się stężeń cytokin u chorych w zależności od ich stanu klinicznego wykazano, że u chorych przed leczeniem z nawrotem obserwowano wyższy odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami IL-6 i sTNF RI w porównaniu z chorymi bez nawrotu choroby, nie wykazując jednak różnic znamiennych. Natomiast po leczeniu u chorych z nawrotem obserwowano znacznie wyższe stężenia cytokin prognostycznych IL-6, IL-8 oraz rozpuszczalnego receptora sTNF RI, w porównaniu z grupą chorych bez nawrotu choroby.

W badanych przez nas wcześniej umiejscowieniach nowotworu stężenia rozpuszczalnych receptorów były wyraźnie wyższe niż TNF α [1, 2, 6]. Receptor TNF RI (55 kD) występuje w zasadzie na powierzchni wszystkich komórek w tym zwłaszcza nabłonkowych. Oba receptory dla TNF, zwłaszcza receptor TNF RI, zawierają tzw domeny śmierci, w związku z tym związanie ligandu z tym receptorem uruchamia procesy apoptozy. Można więc przypuszczać, chociaż nie ma na to pewnych dowodów, że uwalnianie receptorów TNF przez komórki nowotworowe jest elementem ich mechanizmu obrony przed apoptozą [15].

Podsumowanie

Jak wynika z przedstawionych badań, u chorych na mięsaki tkanek miękkich zmiana w stężeniach cytokin w surowicy krwi podczas monitorowania leczenia jest związana z nawrotem choroby. Wyniki badań wskazują, że szczególnie zmiany stężeń IL-6, IL-8 i sTNF RI w surowicy krwi mogą być pomocnym markerem w ocenie odpowiedzi na leczenie, przede wszystkim u chorych na mięsaki tkanek miękkich u których brak standardowego markera nowotworowego.

Doc. dr hab. med. Janina Kamińska

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

Piśmiennictwo

1. Kamińska J, Nowacki MP, Kowalska M i wsp. Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I – an independent prognostic factor. *Tumor Biology* 2005; 26: 186-94.
2. 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.
3. Belluco C, Nitti D, Frantz M i wsp. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 133-8.
4. Martin F, Santolaria F, Batista N i wsp. Cytokine levels (IL-6 and INF- γ), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine* 1999; 11: 80-6.
5. Punnonen R, Teisala K, Kuoppala T i wsp. Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. *Cancer* 1998; 83: 788-96.
6. 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; 1-9
7. Giacomelli L, Gianni W, Belfiore C i wsp. Persistence of epidermal growth factor receptor and interleukin 10 in blood of colorectal cancer patients after surgery identifies patients with high to relapse. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2678-82.
8. Yoon SS, Segal NH, Olshen AB i wsp. Circulating angiogenic factor levels correlate with extent of disease and risk of recurrence in patients with soft tissue sarcoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 1261-6.
9. Yudoh K, Kanamori M, Ohmori K i wsp. Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 2001; 84: 1610-5.
10. Chin KF, Greenman J, Reusch P i wsp. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 497-505.
11. Graeven U, Andre N, Achilles E i wsp. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 577-81.
12. De Vita F, Romano C, Orditura M i wsp. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J Interfer Cytokine Res* 2001; 21: 45-52.
13. Iyoda A, Kenzo H, Masayuki B i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor in thoracic sarcomas. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1625-9.
14. Mroczko B, Szmikowski M. Hematopoietic cytokines as tumor markers. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1347-54.
15. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytok Growth Factor Rev* 1996; 7: 231-40.

Otrzymano: 7 lutego 2006 r.

Przyjęto do druku: 27 marca 2006 r.