

W prowadzonych badaniach wykazano, że stężenia wielu cytokin i ich wolnych receptorów są podwyższone u dużego odsetka chorych na raka jajnika, jelita grubego, niedrobnokomórkowego raka płuca oraz mięsaki tkanek miękkich i kości. Stwierdzono również, że w wymienionych umiejscowieniach nowotworu zwiększone stężenia niektórych cytokin występują już we wczesnych stopniach zaawansowania choroby i korelują z szeregiem cech kliniczno-patologicznych nowotworu, takich jak: stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości histologicznej i wielkość guza. Spośród wielu oznaczanych cytokin najczęściej spotyka się podwyższone stężenia sTNF RI, IL-6, IL-8, M-CSF, VEGF i sTNF RII. Zwraca uwagę fakt, że przy rzadko podwyższonych stężeniach TNF- α często występują podwyższone stężenia jego receptorów, w tym zwłaszcza sTNF RI. Stężenia niektórych cytokin w surowicy krwi okazały się również niezależnymi czynnikami prognostycznymi. Wykazano, że niezależnymi czynnikami prognostycznymi są: u chorych na raka jajnika – sTNF RII i VEGF; jelita grubego – sTNF RI; niedrobnokomórkowego raka płuca – M-CSF; mięsaków tkanek miękkich – IL-6, IL-8 i mięsaków kości – sTNF RI i IL-1ra. Zwraca uwagę fakt, że w wielu umiejscowieniach obserwuje się równoległy wzrost wielu cytokin i ich wolnych receptorów należących do grup o różnych funkcjach. Oznaczanie ich stężeń w surowicy krwi chorych na nowotwory złośliwe, zwłaszcza ze standardowymi markerami nowotworowymi, może być przydatne nie tylko w wykorzystaniu ich jako niezależnych czynników prognostycznych, ale również w tworzeniu dodatkowych przesłanek do indywidualnego doboru optymalnych metod leczenia.

Słowa kluczowe: cytokiny, markery nowotworowe, czynnik prognostyczny.

Cytokiny jako niezależne czynniki prognostyczne u chorych na nowotwory złośliwe

The prognostic value of cytokine levels in patients with cancer

Janina Kamińska, Maria Kowalska, Beata Kotowicz, Małgorzata Fuksiewicz

Zakład Markerów Nowotworowych, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Wstęp

U chorych na nowotwory złośliwe najważniejszym czynnikiem prognostycznym jest stopień zaawansowania klinicznego, który decyduje o całej strategii leczenia i monitorowania chorych. Nieustannie poszukuje się nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, które pozwoliłyby na indywidualny tok leczenia. Obecnie stosowane markery nowotworowe odzwierciedlają dynamikę już toczącego się procesu chorobowego, jednak ich czułość diagnostyczna jest nie zawsze zadowalająca. W ostatnich latach poznano produkty wielu genów, które w warunkach fizjologicznych są czynnikami wzrostu i/lub różnicowania się komórek. Cytokiny, które należą do czynników o takim właśnie działaniu, mogą stymulować lub hamować wzrost nowotworów. W procesie rozwoju wielu nowotworów złośliwych dochodzi do zwiększonej, niekontrolowanej ekspresji genów kontrolujących syntezę czynników wzrostowych – w tym m.in. różnych cytokin i ich receptorów oraz uwalniania tych czynników w zwiększonych ilościach do płynów ustrojowych.

Pobudzenie syntezy jednej cytokiny prowadzi zazwyczaj do kaskadowego pobudzenia syntezy całego szeregu innych cytokin, dlatego w pobudzonych tkankach bardzo często obserwuje się wiele cytokin. Zwiększone uwalnianie cytokin może być prawdopodobnie czynnikiem związanym z progresją procesów nowotworowych. Dlatego podkreśla się rolę czynników wzrostowych w patogenezie nowotworów złośliwych, w tym cytokin jako czynników stymulujących proliferację komórek nowotworowych, hamujących procesy apoptozy, stymulujących neoangiogenezę w guzie oraz umożliwiających zagnieżdżanie i namnażanie się komórek nowotworowych w narządach odległych [1–6].

Z doniesień literaturowych i badań własnych wynika, że niektóre cytokiny są już podwyższone w niskich stopniach zaawansowania, gdzie markery nowotworowe są podwyższone nieznacznie [7–9]. W dostępnym piśmiennictwie pojawiło się wiele prac, w których analizowano związek pomiędzy stężeniami cytokin a całkowitym czasem przeżycia. Prowadzone badania były najczęściej ograniczone do oznaczeń pojedynczych cytokin, tj. IL-6, IL-10 i VEGF [10–14].

Celem pracy było zbadanie, czy istnieją współzależności pomiędzy stężeniami poszczególnych cytokin w surowicy krwi chorych a cechami kliniczno-patologicznymi nowotworów oraz ich znaczenia jako niezależnych czynników prognostycznych.

Pacjenci i metody

Badaniami objęto łącznie 554 chorych, leczonych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie w latach 1997–2004,

We have demonstrated that the serum levels of many cytokines and soluble cytokine receptors are increased in a great proportion of patients with ovarian cancer, colorectal cancer, non-small cell lung carcinoma and soft tissue and bone sarcomas. In addition, the elevated concentrations of some cytokine/cytokine receptor are present in patients already in the early stages of the diseases, and relate to clinicopathologic characteristics, such as clinical stage, tumour grade and tumour size. Interestingly, in many cancer types, multiple cytokines and soluble cytokine receptors characterised by different activities are increased in parallel. Of the numerous cytokines and cytokine receptors that have been studied, sTNF RI, IL-6, IL-8, M-CSF, VEGF and sTNF RII are most frequently increased. It is noteworthy that while the levels of TNF- α are mostly normal, the concentrations of its receptors, especially of the sTNF RI, are commonly increased. The levels of some cytokines/cytokine receptors proved to be independent prognostic factors, i.e. of sTNF RII and VEGF in ovarian cancer, of sTNF RI in colorectal cancer, of M-CSF in non-small cell lung carcinoma, of IL-6 and IL-8 in soft tissue sarcoma and of sTNF RI and IL-1ra in bone sarcoma. Circulating cytokine and cytokine receptor measurements along with the standard tumour marker assessments, may not only serve as prognostic tools in cancer patients, but also provide grounds for individual optimisation of treatment.

Key words: cytokines, tumour markers, prognostic factor.

u których rozpoznano raka jajnika, jelita grubego, niedrobnokomórkowego raka płuca i mięsaki tkanek miękkich i kości. U tych chorych oznaczono w surowicy krwi stężenia cytokin i ich wolnych receptorów, tj. IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R α , sIL-6R, TNF- α , sTNF RI, sTNF RII, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, VEGF i bFGF. Podstawą do ustalenia normy były badania stężeń cytokin u 50 osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną.

Cytokiny i ich wolne receptory oznaczano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), zestawami firmy R&D Systems (Minneapolis, USA).

Do obliczeń statystycznych stosowano program Statistica PL 6.0. Dla porównania dwóch niezależnych prób stosowano test Manna-Whitney'a, natomiast dla więcej niż dwóch test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Metodą Kaplana-Meiera z wykorzystaniem wieloczynnikowej analizy wg modelu ryzyka Coxa, określano współzależność występowania podwyższonych stężeń w surowicy krwi z czasem przeżycia chorych.

Omówienie wyników

W prowadzonych badaniach analizowano zachowanie się stężeń wielu cytokin i ich wolnych receptorów u chorych na nowotwory złośliwe oraz zbadano, czy istnieją współzależności pomiędzy stężeniami poszczególnych cytokin w surowicy krwi a cechami kliniczno-patologicznymi nowotworów, jak również ich znaczenia jako niezależnych czynników prognostycznych. Badania te umożliwiły wyselekcjonowanie tych cytokin, które mogą być najbardziej przydatne w onkologicznej praktyce klinicznej. Spośród wielu oznaczanych cytokin najczęściej spotyka się podwyższone stężenia sTNF RI, IL-6, IL-8, M-CSF, VEGF i sTNF RII. Wykazano, że stężenia niektórych cytokin korelują z szeregiem cech patologiczno-klinicznych nowotworu, w tym ze stopniem zaawansowania klinicznego, stopniem złośliwości histologicznej i wielkością guza (tab. 1.). Analiza stężeń cytokin i ich wolnych receptorów w surowicy krwi w powiązaniu z cechami kliniczno-patologicznymi nowotworów może dostarczyć dodatkowych informacji charakteryzujących udział tych mediatorów w różnych procesach i mechanizmach, które prowadzą do progresji nowotworów. Z badań własnych wynika, że korelacje z cechami kliniczno-patologicznymi występowały najczęściej w odniesieniu do cytokin prozapalnych i wolnych receptorów cytokinowych. Takie korelacje mogą sugerować, że procesy zapalne odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworów w różnych umiejscowieniach. Jak dotychczas wykazano to głównie w odniesieniu do raków jelita grubego i jajnika [15].

W badanych 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.

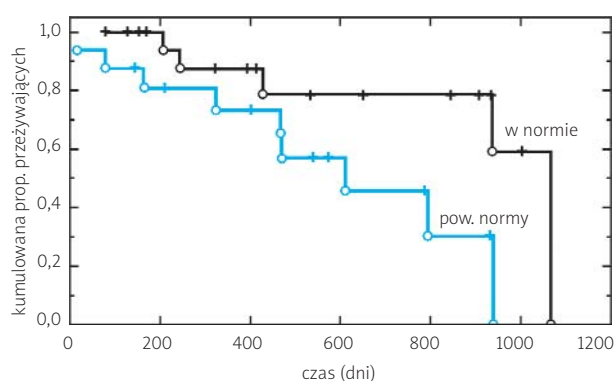
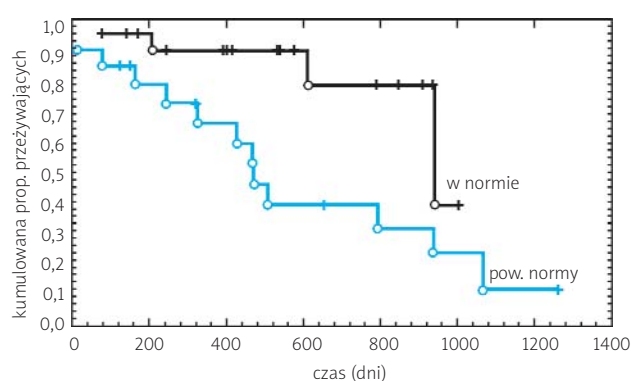
W wyniku tej analizy wykazano, że niezależnymi czynnikami rokowniczymi są: u chorych na raka jajnika – sTNF RII i VEGF (ryc. 1., 2.); jelita grubego – sTNF RI; niedrobnokomórkowego raka płuca – M-CSF; mięsaków tkanek miękkich – IL-6, IL-8 i mięsaków kości sTNF RI i IL-1ra [16–18].

W piśmiennictwie autorzy prac, wykazując znaczenie cytokin w prognozowaniu przebiegu choroby, badali najczęściej tylko pojedyncze cytokiny [19–23]. Nasze badania, prowadzone na wielu cytokinach, pozwoliły na wskazanie tych, które w analizie wieloczynnikowej miały największą wartość czynnika ryzyka.

W prowadzonych badaniach zwrócono uwagę, że przy rzadko podwyższonych stężeniach TNF- α obserwuje się częste występowanie podwyższonych stężeń jego wolnych receptorów, w tym zwłaszcza sTNF RI. Wcześniejsze badania stężeń tego receptora w surowicy krwi chorych na nowotwory były nieliczne. Receptory dla TNF- α występują na powierzchni bardzo wielu typów komórek, w tym także konstytutywnie. W warunkach fizjologicznych zapewniają one zachowanie homeostazy w stanach, w których

Tabela 1. Cytokiny i ich wolne receptory, których stężenia mają związek z cechami kliniczno-patologicznymi u chorych na nowotwory złośliwe**Table 1.** Serum cytokines and soluble cytokine receptors found to correlate with clinicopathologic characteristics of cancer patients

Umiejscowienie nowotworu	Stan zaawansowania klinicznego	Stopień złośliwości histologicznej	Wielkość guza	Czas przeżycia
jelito grube	IL-6, IL-8, M-CSF, sTNF RI, IL-1ra	IL-6, sTNF RI, sIL-2R α , TNF- α	nie analizowano	sTNF RI
płuco	IL-6, M-CSF	brak zależności	IL-6, IL-10	M-CSF
jajnik	M-CSF, sTNF RI, sTNF RII, sIL-2R α	sIL-2R α	nie analizowano	sTNF RII, VEGF
mięśaki tkanek miękkich	IL-6, IL-8, sTNF RI, M-CSF, VEGF, sIL-2R α	IL-6, IL-8	IL-6, sTNF RI, sIL-2R α , IL-8, M-CSF, VEGF	IL-6, IL-8
mięśaki kości	sTNF RI, VEGF, sIL-2R α , bFGF	sIL-2R α , VEGF	IL-6, IL-8, sTNF RI sTNF RII, VEGF	IL-1ra, sTNF RI

**Ryc. 1.** Prawdopodobieństwo przeżycia chorych na raka jajnika w zależności od stężenia VEGF w surowicy krwi**Fig. 1.** Overall survival (OS) of ovarian cancer patients stratified by serum levels of VEGF**Ryc. 2.** Prawdopodobieństwo przeżycia chorych na raka jajnika w zależności od stężenia sTNF RII w surowicy krwi**Fig. 2.** Overall survival (OS) of ovarian cancer patients stratified by serum levels of sTNF RII

dochodzi do uruchomienia kaskady cytokin prozapalnych. W niedawno opublikowanych badaniach wykazano także, że receptor sTNF RI jest jednym z głównych mediatorów apoptozy [23–26]. Na rolę receptorów w patogenezie nowotworów nielimfoidalnych wskazują uzyskane wyniki własne, w których wykazano, że stężenie sTNF RI w surowicy krwi jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego, mięsakach kości, a stężenie sTNF RII jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jajnika.

Z przedstawionych badań wynika, że cytokiny i ich wolne receptory w surowicy krwi, które ze względu na ograniczoną swoistość polegającą na ich występowaniu w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, w przebiegu gojenia się ran i rozległych urazów nie spełniają kryteriów klasycznych markerów nowotworowych. Natomiast mogą być czynnikami charakteryzującymi biologię nowotworów, użytecznymi zwłaszcza w przewidywaniu dalszego przebiegu procesu nowotworowego.

Piśmiennictwo

- Atwell DM, Grichnik KP, Newman MF, Reves JG, McBride WT. Balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 1145-50.
- Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM. The effects of IL-6 on cell adhesion and E-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 1998; 10: 720-8.
- Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2501-5.
- Frassanito MA, Cusmai A, Iodice G, Dammacco F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 2001; 97: 483-9.
- Speirs V, Atkin SL. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer* 1999; 80: 898-903.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Cheng WF, Chang MC, Su JL, Hsieh CY. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2001; 20: 5799-809.
- Kaminska J, Nowacki MP, Kowalska M, Rysinska A, Chwalinski M, Fuksiewicz M, Michalski W, Chechlińska M. 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.
- Mroczo B, Szmítowski M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Okulczyk B. Stem cell factor (SCF) and interleukin 3 (IL-3) in the sera of patients with colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1019-24.
- Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, Lise M, Jessup M. Interleukin-6 blood level is associated with circulating

- carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 133-8.
10. Galizia G, Oditura M, Romano C, et al. Prognostic significance of circulating IL10 and IL-6 serum levels in colon cancer undergoing surgery. *Clin Immunol* 2002; 102: 169-78.
 11. Giacomelli L, Gianni W, Belfiore C, et al. 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.
 12. Berglund A, Molina D, Larsson A, Einarsson R, Glimelius B. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1430-7.
 13. Yoon SS, Segal NH, Olshen AB, Brennan MF, Singer S. 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.
 14. Chin KF, Greenman J, Reusch P, Gardiner E, Marme D, Monson JR. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 497-505.
 15. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
 16. Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine serum levels in soft tissue sarcoma patients: Correlations with clinico-pathological features and prognosis. *Int J Cancer* 2002; 100: 463-71.
 17. Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. 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.
 18. Kamińska J, Kowalska M, Kotowicz B, Fuksiewicz M, Glogowski M, Wojcik E, Chechlińska M, Steffen J. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF – an independent prognostic factor. *Oncology* 2006; 70: 115-25.
 19. Yoshimura H, Dhar DK, Nakamoto T, Kotoh T, Takano M, Soma G, Nagasue N. Prognostic significance of tumor necrosis factor receptor in colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 85-9.
 20. Cooper BC, Ritchie JM, Broghammer CL, Coffin J, Sorosky JJ, Buller RE, Hendrix MJ, Sood AK. Preoperative serum vascular endothelial growth factor levels: significance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3193-7.
 21. Oditura M, De Vita F, Catalano G, Infusino S, Lieto E, Martinelli E, Morgillo F, Castellano P, et al. Elevated serum levels of interleukin-8 in advanced non-small cell lung cancer patients: relationship with prognosis. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1129-35.
 22. Mroczko B, Szmitkowski M. Czynniki wzrostu kolonii makrofagowych (M-CSF) w diagnostyce i monitorowaniu niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2001; 105: 203-9.
 23. Fang L, Fang J, Chen CQ. TNF receptor – associated factor-2 binding site is involved in TNFR75-dependent enhancement of TNFR55-induced cell death. *Cell Res* 2001; 11: 217-22.
 24. Gupta S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Molecul Med* 2001; 1: 317-24.
 25. Gupta S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol* 2002; 37: 293-9.
 26. de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoer H, Rapp C, Gougeon ML. 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.

Adres do korespondencji

dr hab. med **Janina Kamińska**
Zakład Markerów Nowotworowych
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa
tel./faks +48 22 644 76 07
e-mail: kaminskaj@coi.waw.pl

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