

Porównanie stężeń wybranych cytokin w surowicy krwi u dzieci z guzami mózgu i lokalizacji pozamózgowej

Comparison of serum levels of certain cytokines in children with brain tumors and extracerebral neoplasms

ANNA CHARUBCZYK¹, ELŻBIETA ZIELIŃSKA¹, PIOTR KUNA²

¹ Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Sporna 36/50, Łódź

² Klinika Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wprowadzenie. Guzy mózgu stanowią drugą co do częstości grupę chorób nowotworowych u dzieci. Miejscowo w pierwotnych guzach mózgu oraz innych guzach usytuowanych pozamózgowo produkowane są cytokiny hamujące rozwój komórek. Ich wydzielanie do płynu mózgowo-rdzeniowego, jamy opłucnej i otrzewnej oraz surowicy krwi jest efektem martwicy i hipoksji związanej z mechanicznym uszkodzeniem okolicy guza. U dzieci z guzami litymi, a zwłaszcza guzami mózgu, do chwili obecnej nie badano stężenia cytokin w surowicy krwi.

Cel pracy. Porównanie stężeń IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, RANTES, GM-CSF, MCP-1, IFN γ w surowicy krwi u dzieci z guzami mózgu i nowotworami o lokalizacji pozamózgowej i określenie znaczenia tych cytokin dla przebiegu klinicznego choroby.

Materiał i metody. Badania wykonano w Katedrze Pediatrii UM w Łodzi w latach 2002-2004. Grupę badaną stanowiło 100 dzieci z chorobą nowotworową (29 z guzami mózgu i 71 z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej) oraz 49 dzieci zdrowych (mediana wieku 8,5 \pm 4,5 vs 8,3 \pm 4,4). Badania stężeń IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IFN γ i MCP-1 wykonano metodą ELISA przy użyciu przeciwciał monoklonalnych.

Wyniki. Przeprowadzona analiza wykazała statystycznie istotnie niższe stężenie IL-8 ($p < 0,001$) i IL-12 ($p = 0,047$) w grupie dzieci z guzami mózgu w stosunku do dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej. Obserwowano dłuższe okresy przeżycia bez niekorzystnych zdarzeń u dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej i niskim stężeniem IL-8 w surowicy krwi w stosunku do ogółu badanych dzieci i wysokim poziomem IL-8 ($p < 0,004$). Dzieci z lokalizacją pozamózgową nowotworu przeżywały dłużej od dzieci z guzami mózgu ($p < 0,005$).

Wnioski. Podwyższone stężenie IL-8 w surowicy krwi u dzieci z chorobą nowotworową jest złym czynnikiem prognostycznym przebiegu choroby. Przeżywalność dzieci z nowotworami o niskim stężeniem IL-8 jest gorsza, co wskazuje na większe znaczenie oznaczeń jej stężenia w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Alergia Astma Immunologia, 2005, 10(2), 83-89

Słowa kluczowe: nowotwory, interleukiny, dzieci

Introduction. Brain tumors are the second group of neoplastic diseases in children. Cytokines produced locally in primary brain tumors and other solid tumors can inhibit cells development. The secretion of cytokines into cerebrospinal fluid, pleural and peritoneal cavity and blood serum is the effect of necrosis and hypoxia related to mechanical tissue lesion in the region of tumor. Studies on cytokines concentration in blood serum of patients with solid tumors, especially brain tumors were not performed until now.

Aim of the study. The aim of the study was to evaluate the concentration of some cytokines: IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, RANTES, GM-CSF, MCP-1, IFN γ in blood serum of children with brain tumors in comparison to children with extracerebral neoplasms and to qualify the significance of these cytokines for the clinical course of a disease.

Material and methods. 100 children were included into the study (29 children with brain tumors and 71 children with extracerebral neoplasms), mean age 8,5 \pm 4,5. The control group consisted of 49 healthy children, mean age 8,3 \pm 4,4. Serum levels of cytokines were studied by ELISA method (R and D Systems, Minneapolis, USA).

Results. Mean serum IL-8 and IL-12 concentration (pg/ml) were significantly lower in children with brain tumors compared to children with extracerebral neoplasms ($p < 0,001$, $p = 0,047$). We observed the longer period of survival time of children with extracerebral neoplasms and low blood serum IL-8 concentration was longer than the survival time of children with neoplasms and high concentration IL-8 ($p < 0,004$). Children with extracerebral neoplasms survived longer than children with brain tumors ($p < 0,005$).

Conclusions. Increase blood serum concentration of IL-8 in children with neoplasms is a poor prognostic factor of the course of a disease. The survival of children with brain tumors who have low concentration of IL-8 is worse, what indicates, that estimation of the concentration of IL-8 in cerebrospinal fluid has greater diagnostic significance.

Alergia Astma Immunologia, 2005, 10(2), 83-89

Key words: neoplasms, interleukin, children

Guzy mózgu, po białaczkach i chłoniakach, stanowią drugą co do częstości grupę chorób nowotworowych wieku dziecięcego [1]. W odróżnieniu od osób dorosłych, gdzie częściej występują przerzutowe guzy do ośrodkowego układu nerwowego (oun) z innych narządów, u dzieci najczęściej występują pierwotne guzy wywodzące się z różnych struktur wewnątrzczaszkowych lub wewnątrz rdzenia kręgowego. Nowotwory oun są niejednorodną pod względem utkania histopatologicznego grupą rozrostów nowotworowych. Niezależnie od obrazu histologicznego i stopnia złośliwości, nowotwory oun wyjątkowo rzadko dają przerzuty do narządów obwodowych [2]. Z drugiej strony duża dynamika podziałów komórek nowotworowych powoduje, że w niektórych typach guzów następuje bardzo duży rozsiew w obrębie struktur mózgowych. W przypadkach guzów o niskim stopniu złośliwości histologicznej lokalizacja guza w sąsiedztwie ważnych dla życia ośrodków mózgowych może warunkować brak dostępności operacyjnej. Nowe zasady chemioterapii neoadjuwantowej i radioterapii poprawiły znacznie rokowanie w guzach mózgu, lecz nadal statystyka długoletnich przeżyć jest niezadowolająca [3]. W ostatnich latach zwraca się także uwagę na inny aspekt warunkujący destrukcję tkanki mózgowej w chorobach nowotworowych oun. Wykazano bowiem, że w surowicy pacjentów z guzami mózgu występują przeciwciała, które reagują z powierzchniowymi antygenami kwasu glikolipidowego mieliny. Te reakcje immunologiczne mogą być odpowiedzialne za demielinizację i procesy rozrostu guzów [4]. Miejscowo w pierwotnych guzach mózgu produkowane są różne cytokiny hamujące rozwój komórek [5]. Wydzielanie cytokin do płynu mózgowo-rdzeniowego po zabiegu usunięcia guza nie jest jednak związane z reakcją immunologiczną, a raczej jest to efekt martwicy i hipoksji związanej z mechanicznym uszkodzeniem okolicy guza [6]. Jak do tej pory nie badano stężeń cytokin w surowicy krwi u pacjentów z guzami mózgu. Spośród różnych cytokin, interleukina-8 (IL-8) bierze udział w procesach wzrostu, angiogenezy oraz tworzenia przerzutów w różnych nowotworach [7,8]. W reakcjach immunologicznych i nieimmunologicznych uczestniczy wiele cytokin należących do glikoprotein, które regulują procesy różnicowania limfocytów, aktywują komórki układu immunologicznego (IL-2, IL-12), wpływają na angiogenezę (IL-8, IL-12), wywołują bezpośredni efekt cytotoksyczny na komórki nowotworowe (IFN γ) [9,10,11,12,13]. Ponieważ większość komórek eukariotycznych organizmu ludzkiego, a także komórki nowotworowe, wytwarza liczne cytokiny, celem pracy jest porównanie profilu stężeń wybranych cytokin (IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, RANTES, GM-CSF, MCP-1, IFN γ) w surowicy krwi u dzieci z guzami mózgu i nowotworami o lokalizacji pozamózgowej oraz określenie znaczenia tych cytokin dla przebiegu klinicznego choroby.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Badania przeprowadzono w Katedrze Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2002-2004. Grupę badaną stanowiło 100 dzieci z chorobą nowotworową (39 dziewczynek i 61 chłopców) w wieku od 3,4 m-ca do 17,7 lat (mediana 8,5 \pm 4,5) w chwili rozpoznania nowotworu, przed zastosowaniem chemioterapii i/lub radioterapii. Grupę odniesienia dla badanych stężeń cytokin stanowiło 49 dzieci zdrowych (13 dziewczynek i 36 chłopców) w porównywalnym wieku (mediana 8,3 \pm 4,4). Większość badanych dzieci pochodziła z miasta (59% dzieci z chorobą nowotworową i 69,3% dzieci z grupy kontrolnej). Charakterystykę dzieci z grup badanych przedstawiono w tabeli I. U wszystkich dzieci przeprowadzono badanie podmiotowe przy użyciu indywidualnie zaprogramowanej ankiety, badanie przedmiotowe oraz badania diagnostyczne. Chorobę nowotworową rozpoznano w oparciu o ogólnie przyjęte standardy (badania cytologiczne, histopatologiczne, immunologiczne i cytogenetyczne oraz diagnostykę obrazową i badanie markerów nowotworowych). W tabeli II wyszczególniono liczbę dzieci z poszczególnymi typami nowotworów oun i nowotworów o lokalizacji pozamózgowej. Aby ocenić znaczenie cytokin dla przebiegu choroby, dzieci z chorobą nowotworową podzielono na 2 podgrupy:

- I. 29 dzieci z guzami mózgu (12 dziewczynek i 17 chłopców), mediana wieku 9,37 lat
- II. 71 dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej (27 dziewczynek i 44 chłopców), mediana wieku 10,98.

Tabela I. Charakterystyka dzieci z grup badanych

	Dzieci z chorobą nowotworową	Dzieci z guzami mózgu	Dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej	Grupa kontrolna
Liczba dzieci	100	29	71	49
Płeć:				
- żeńska	39	12	31	13
- męska	61	17	46	36
Wiek (lata)	8,5 \pm 4,5	9,37 (4,5-13,5)	10,98 (3,4-15,1)	8,3 \pm 4,4
Wieś/miasto	41/59	17/12	24/47	15/34
Zgony	23 (23%)	12 (41,3%)	11 (15,5%)	0

Badania laboratoryjne

Przed wprowadzeniem leczenia pobierano od dzieci krew w celu oznaczenia cytokin, następnie odwirowywano i przechowywano surowicę do oznaczeń w temperaturze -70°C.

Tabela II. Charakterystyka dzieci z chorobą nowotworową

Dzieci z chorobą nowotworową n=100	Liczba dzieci	Rozpoznanie histopatologiczne	Liczba dzieci	%	Zgony (liczba dzieci)
Guzy mózgu	29	Medulloblastoma	8	27,6	1
		Astrocytoma	5	17,2	0
		Ependymoma	3	10,3	1
		PNET	1	3,4	1
		Glioblastoma	2	6,9	2
		Ganglioglioma	2	6,9	2
		Glioma	1	3,4	1
		Germinoma	2	6,9	2
		Brak weryfikacji histopatologicznej	5	17,2	2
Białaczki	25	ALL	17	68	2
		AML	5	20	2
		CML	3	12	2
Chłoniaki nieziarnicze	9	B-NHL	5	55,6	1
		T-NHL	4	44,4	0
Ziarnica złośliwa	7	-	7	-	0
Nerczak płodowy	5	-	5	-	0
Zwojak zarodkowy współczulny	7	Neuroblastoma	5	71,4	0
		Ganglioneuroblastoma	2	28,6	0
Guz jajnika	2	Dysgerminoma	1	50	0
		Juvenile granulosa cell tumor	1	50	0
Inne	16	Chondrosarcoma	1	6,25	0
		Sarcoma	1	6,25	1
		Adrenal cortical carcinoma	1	6,25	brak danych
		Carcinoma embryonale	1	6,25	1
		Pheochromocytoma	1	6,25	brak danych
		Hepatoblastoma	1	6,25	0
		Teratoma immaturum	1	6,25	0
		PNET	1	6,25	0
		Osteosarcoma	2	12,5	0
		Rhabdomyosarcoma	5	31,25	2
		Brak weryfikacji histopatologicznej	1	6,25	0
		Razem	100		100

Badania ilościowe surowiczych stężeń wybranych cytokin: IL-3, IL-4, IL-5, IL-12, interferonu gamma (IFN γ), czynnika pobudzającego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), w tym chemokin IL-8, RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), monocytarnego chemotaktycznego

czynnika białkowego (MCP-1), w surowicy krwi wykonano metodą enzymatyczną ELISA. Dla interleukin: IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, MCP-1, IFN γ przy użyciu przeciwciał monoklonalnych firmy „Bender MedSystems GmbH”, Austria z czułością metody odpowiednio: 2 pg/ml, 2,2 pg/ml, 11 pg/ml, 110,9 pg/ml, 3,5 pg/ml, 1,5 pg/ml. Dla GM-CSF przy użyciu przeciwciał monoklonalnych firmy „Promo-Kine EIA” z czułością metody 0,195 ng/ml i dla interleukin: IL-3 i RANTES przy użyciu przeciwciał monoklonalnych firmy „R&D Systems, Minneapolis” USA z czułością metody odpowiednio: 7,4 pg/ml, 2 pg/ml. Intensywność barwy, czyli absorbancję, mierzono przy użyciu czytnika ELISA typ ELx808 IU firmy Bio-Tek Inst., przy długości fali 450 nm. Stężenie badanych cytokin w surowicy krwi odczytywano ze sporządzonych krzywych standardowych dla każdej cytokiny.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA (StatSoftInc.USA). Weryfikację normalności rozkładu dokonano za pomocą testu Kolmogorov-Smirnov’a. Porównania wartości badanych parametrów przeprowadzono z zastosowaniem testu t-studenta lub Mann-Whitney’a w zależności od normalności rozkładu. Przeżywalność dzieci z chorobą nowotworową w zależności od poziomu cytokiny w surowicy krwi przeprowadzono za pomocą testu Kaplana-Meiera. Dla wszystkich testów statystycznych za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

Stężenie cytokin u dzieci z chorobą nowotworową w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej

W porównaniu do grupy kontrolnej, u dzieci z chorobą nowotworową stwierdzono statystycznie znamienne niższe średnie stężenie IL-4 ($p < 0,001$), GM-CSF ($p = 0,007$) i IFN γ ($p = 0,006$) oraz statystycznie znamienne wyższe średnie stężenie IL-3 ($p < 0,001$) (tab. III).

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężeń dla IL-5, IL-12, RANTES i MCP-1 między badanymi grupami.

Stężenie cytokin u dzieci z guzami mózgu w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej

Stwierdzono statystycznie znamienne niższe stężenia GM-CSF ($p = 0,01$) i MCP-1 ($p = 0,01$) u dzieci z guzami mózgu w stosunku do grupy kontrolnej oraz statystycznie znamienne wyższe stężenie IL-3 ($p < 0,001$) i IFN γ ($p = 0,006$) (tab. III).

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężeń IL-4, IL-5, IL-8, IL-12 i RANTES między badanymi grupami.

Tabela III. Porównanie stężeń cytokin w surowicy krwi dzieci z chorobą nowotworową i w grupie kontrolnej

Cytokina	Dzieci z chorobą nowotworową	Grupa kontrolna	p	Dzieci z guzami mózgu	Grupa kontrolna	p	Dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej	Grupa kontrolna	p	Dzieci z guzami mózgu	Dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej	p
	n=100 Mediana	n=49 Mediana		n=29 Mediana	n=49a Median		n=71 Mediana	n=49 Mediana		n=29 Mediana	n=71 Mediana	
IL-3	0,44 (0,08-2,1)	0,04 (0-0,11)	<0,001	1,25 (0,12-2,16)	0,04 (0-0,11)	<0,001	0,16 (0,09-2)	0,04 (0-0,11)	0,04	1,25 (0,12-2,16)	0,16 (0,09-2)	0,19
IL-4	0 (0-0)	0,11 (0-1)	<0,001	0 (0-0)	0,11 (0-1)	0,17	0,00 (0-0)	0,11 (0-1)	0,83	0 (0-0)	0,00 (0-0)	0,59
IL-5	0 (0-0)	0,00 (0-0)	0,06	0 (0-0)	0 (0-0)	0,13	0,00 (0-0)	0 (0-0)	0,09	0 (0-0)	0,00 (0-0)	0,83
IL-8	7,86 (2,7-24,7)	6,20 (0-21,3)	0,05	3,20 (1,25-7)	6,20 (0-21,3)	0,59	12,60 (5,5-36,6)	6,20 (0-21,3)	0,00	3,20 (1,25-7)	12,60 (5,5-36,6)	<0,001
IL-12	156,60 (95,1-232,8)	154,20 (100,1-205,6)	0,64	129,10 (84-172,7)	154,20 (100,1-205,6)	0,27	181,70 (99,9-254,4)	154,20 (100,1-205,6)	0,23	129,10 (84-172,7)	181,70 (99,9-254,4)	0,05
RANTES	793,40 (492,6-1110,3)	652,10 (533-1017,8)	0,35	888,5±361,3	652,10 (533-1017,8)	0,10	805±517,5	652,10 (533-1017,8)	0,74	888,5±361,3	805±517,5	0,43
GM-SCF	0,04 (0-0,16)	0,15 (0,12-0,17)	0,01	0,00 (0-1,15)	0,15 (0,12-0,17)	0,01	0,05 (0-0,16)	0,15 (0,12-0,17)	0,01	0,00 (0-1,15)	0,05 (0-0,16)	0,42
MCP-1	39,50 (21,3-67,8)	48,80 (39,2-57)	0,14	37,40 (17,7-52,1)	48,80 (39,2-57)	0,01	44,50 (25-91,4)	48,80 (39,2-57)	0,49	37,40 (17,7-52,1)	44,50 (25-91,4)	0,17
IFNγ	0,00 (0-0,9)	0,55 (0,2-1,1)	0,006	0,00 (0-0,91)	0,55 (0,2-1,1)	0,006	0,00 (0-0,94)	0,55 (0,2-1,1)	0,025	0,00 (0-0,91)	0,00 (0-0,94)	0,57

Stężenie cytokin u dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej

U dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej stwierdzono statystycznie znamienne niższe średnie stężenie GM-CSF ($p=0,01$) i IFN γ ($p=0,025$) oraz statystycznie znamienne wyższe średnie stężenie IL-3 ($p=0,036$) i IL-8 ($p=0,004$) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. III).

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężeń IL-4, IL-5, IL-12, RANTES i MCP-1 między badanymi grupami.

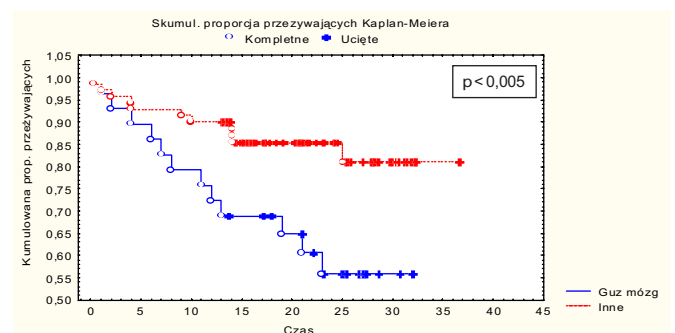
Stężenie cytokin u dzieci z guzami mózgu i chorobą nowotworową o lokalizacji pozamózgowej

Wykazano statystycznie istotnie niższe średnie stężenie IL-8 ($p<0,001$) i IL-12 ($p=0,047$) w grupie dzieci z guzami mózgu w stosunku do nowotworów o lokalizacji pozamózgowej (tab. III).

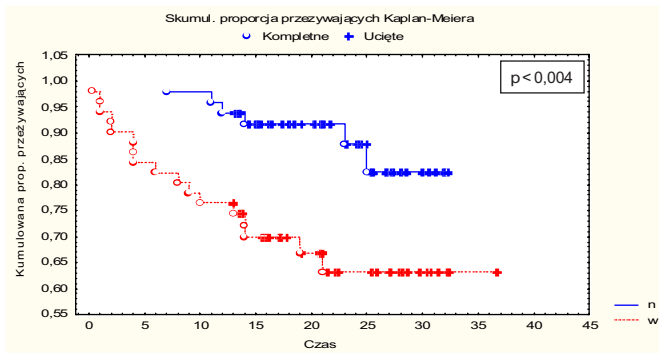
Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężeń IL-3, IL-4, IL-5, RANTES, GM-CSF, MCP-1 i IFN γ między badanymi grupami.

W związku z obserwowanym wysoce statystycznie znamienne niższym stężeniem IL-8 ($p<0,001$) i statystycznie znamienne niższym stężeniem IL-12 ($p=0,047$) u dzieci z guzami mózgu w stosunku do dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej, przeprowadzono analizę statystyczną przeżycia badanych dzieci. Jak wykazano w ta-

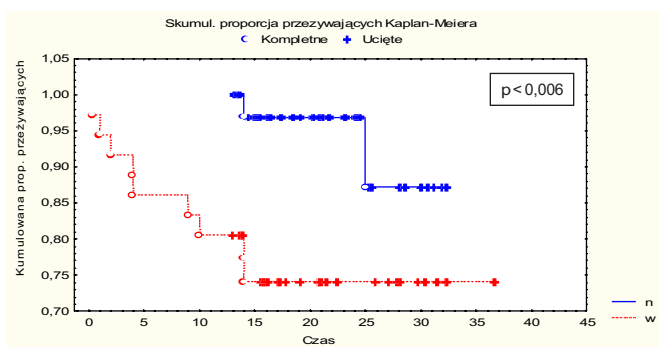
beli I, spośród badanych dzieci zmarło 23, w tym 12 dzieci z guzami mózgu i 11 dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej. Dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej przeżywały statystycznie dłużej od dzieci z guzami mózgu ($p<0,005$) (ryc. 1). Dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej i niskim stężeniem IL-8 w surowicy przeżywały statystycznie dłużej w stosunku do dzieci z chorobą nowotworową i z wysokim poziomem IL-8 ($p<0,004$) (ryc. 2). Podobne wyniki dłuższej przeżywalności uzyskano u dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej i niskim stężeniem IL-8 ($p<0,006$) (ryc. 3). Takiej zależności nie wykazano u dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej i stężeniem IL-12. Czas przeżycia dzieci z guzami mózgu nie różnił się istotnie statystycznie w zależności od poziomu IL-12.



Ryc. 1. Przeżywalność dzieci z guzami mózgu i nowotworami o lokalizacji pozamózgowej



Ryc. 2. Poziom IL-8 a przeżywalność dzieci z chorobą nowotworową ogółem



Ryc. 3. Poziom IL-8 a przeżywalność dzieci z nowotworami o lokalizacji pozamózgowej

DYSKUSJA

W ostatnich latach pojawiły się prace wskazujące na rolę IL-8, IL-12 i chemokiny RANTES w procesach wzrostu, progresji, a także hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych [14,15,16,17,18,19,20]. Dotychczasowe badania nad cytokinami prowadzone były wyłącznie na modelach zwierzęcych i ludziach dorosłych. Stężenia wybranych cytokin lub ich receptorów oznaczano wyłącznie w masie guzów nowotworowych [21]. W związku z brakiem prac na temat oznaczania cytokin w surowicy krwi w przeprowadzonych przez nas badaniach ocenialiśmy ich stężenia u dzieci z różnymi chorobami nowotworowymi ze szczególnym uwzględnieniem źle rokujących i bardzo częstych u dzieci guzów mózgu. Zamiennie niskie stężenia IL-8 w surowicy krwi u dzieci z guzami mózgu w stosunku do nowotworów o innej lokalizacji ($p < 0,001$) i grupy kontrolnej ($p = 0,004$) mogą prawdopodobnie wynikać ze słabego unaczynienia guzów mózgu, jak również gorszej penetracji IL-8 poprzez barierę krew/płyn mózgowo-rdzeniowy [10]. Desbaillets i wsp. zaobserwowali u dorosłych pacjentów z guzami mózgu o charakterze gwiaździaków zwiększoną ekspresję IL-8 w okołonaczyniowej powierzchni masy guza. U ludzi dorosłych niektórzy autorzy wskazywali na zwiększoną syntezę IL-8 *in vivo* we wszystkich stadiach zaawansowania gwiaździaków [22]. W naszych badaniach niski poziom IL-8 u dzieci z guzami mózgu może wynikać z faktu oznaczania jej stężenia w su-

rowicy krwi, a nie w płynie mózgowo-rdzeniowym. Założyliśmy bowiem, że podwyższone stężenia IL-8 w płynie mózgowo-rdzeniowym mogą się przekładać na ogólną reakcję immunologiczną przeciwko chorobie. To założenie wydaje się tym bardziej zasadne, że u dzieci z guzami o lokalizacji pozamózgowej wykrywaliśmy podwyższone stężenia IL-8. Podobnie jak u naszych dzieci z guzami o lokalizacji pozamózgowej, Streier i wsp. wykazali, że w niektórych nowotworach, szczególnie nowotworach płuc, dochodzi do samoistnego wytwarzania wysokich stężeń IL-8. [17]. Zwiększoną ekspresję IL-8 wykrywano także w komórkach nowotworowych i podścielisku guzów trzustki [23] oraz szyjki macicy i endometrium w okresie ich progresji [7,9], a także w przerzutach nowotworowych do innych narządów [19]. Jednakże żaden z cytowanych autorów nie opisywał stężeń cytokin w surowicy krwi. Pomimo różnorodnych biologicznych funkcji IL-8, wzrost jej produkcji przez komórki nowotworowe i przerzutowe guza są nadal niejasne. W związku z opisywanym złym rokowaniem chorych z różnymi nowotworami a stężeniem IL-8, przeprowadziliśmy analizę przeżywalności u naszych dzieci z chorobą nowotworową. Nasze badania, podobnie jak innych badaczy, potwierdzają krótsze przeżycie dzieci z wysokimi poziomami IL-8 a chorobą nowotworową ($p < 0,004$) (ryc.2) i nowotworami o lokalizacji pozamózgowej ($p < 0,006$). Smith [24], Desbaillets [22], Yoneda i Xu ze wsp. [25,26] wykazali znaczący wpływ IL-8 na angiogenezę, tworzenie przerzutów i złe rokowania w raku oskrzeli, glioblastoma i raku jajnika. Podobnie badacze japońscy, po przebadaniu dwudziestu kobiet z rakiem szyjki macicy, wskazali na krótsze ich przeżycie z wysokimi poziomami IL-8 (> 1000 pg/mg białka). Natomiast przy niższych poziomach IL-8 (< 1000 pg/mg białka) przeżycie dwuletnie sięgało 67% [9]. Takiej zależności nie wykazaliśmy wśród dzieci z guzami mózgu. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań wskazują na istotną rolę IL-8 na czas przeżycia chorych w niektórych chorobach nowotworowych. Przeciwną rolę do IL-8 wykazuje IL-12, która poprzez hamowanie procesów angiogenezy może mieć znaczenie ochronne w rozwoju choroby nowotworowej [11,13,27,28], jak również poprzez aktywację komórek układu immunologicznego przyczyniać się do wydłużania czasu przeżycia chorych [29]. Znalazło to odzwierciedlenie na modelach zwierzęcych, w których po zastosowaniu IL-12 obserwowano wydłużenie czasu przeżycia myszy [14]. W badaniach własnych nie wykazano jednak statystycznej zależności pomiędzy stężeniem IL-12 a czasem przeżycia dzieci z chorobą nowotworową. Nie stwierdzono także istotnej statystycznie zależności pomiędzy wartościami IL-12 u ogółu dzieci z chorobą nowotworową ($p = 0,64$), jak również z guzami mózgu ($p = 0,27$) i nowotworami o lokalizacji pozamózgowej ($p = 0,23$) a grupą kontrolną. Być może wynika to z krótkiego okresu półtrwania IL-12 w surowicy krwi. Jak dotąd nie oceniano jednak okresu półtrwania endogennej

IL-12. Natomiast czas półtrwania IL-12 badano na modelach zwierzęcych po jej dożylnym podaniu. Był on bardzo zróżnicowany i wynosił od 2 do 5 godzin u gryzoni i od 13 do 19 godzin u małp [30]. Badania nad rolą cytokin w patogenezie, rokowaniu i leczeniu chorób nowotworowych są bardzo złożone i nie do końca poznane. Jednym z mechanizmów immunologicznych, prowadzącym do zapobiegania rozwojowi nowotworu, jest wydzielanie przez limfocyty pomocnicze (Th) cytokin, które bezpośrednio lub pośrednio, poprzez aktywację innych komórek układu immunologicznego, niszczą klony komórek nowotworowych. Należą do nich między innymi: IL-3, IL-4, IL-5 i MCP₁, IFN γ i GM-CSF [8,11,13]. W naszych badaniach wykazano wysoce statystycznie istotnie wyższe stężenie IL-4 ($p < 0,001$) GM-CSF ($p = 0,007$) i IFN γ ($p = 0,006$) u dzieci z grupy kontrolnej w porównaniu do dzieci z chorobą nowotworową (tab. III). Na znaczenie przeciwnowotworowe IL-4 wskazał Akashi i wsp., którzy wykazali, że u chorych z przewlekłą białaczką mielomonocytową oraz z białaczką limfoblastyczną typu B podawanie IL-4 hamowało tworzenie kolonii komórek blastycznych [31]. Podobnie Heslop i wsp. stwierdzili zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych po umieszczeniu w nich genów dla IL-4, IFN γ i GM-CSF [32]. Cytokiny te podane chorym z nowotworem mogą bezpośrednio likwidować komórki nowotworowe lub poprzez wpływ na układ odpornościowy organizmu niszczyć je. Znaczenie przeciwnowotworowe GM-CSF polega między innymi na aktywacji procesów chemotaksji, fagocytozy lub poprawie prezentacji antygeny [21]. W literaturze opisuje się poprawę odporności chorych z nowotworami poprzez stymulację monocytów krwi obwodowej przez GM-CSF i inkubację ich z białkami nowotworowymi, które po przeto-

czeniu choremu pobudzają limfocyty T. W wyniku takiej terapii Plautz ze wsp. u 10 chorych z guzem mózgu o charakterze glejaka uzyskał zmniejszenie masy guza [33]. W naszych badaniach niskie stężenia GM-CSF i IFN γ u dzieci z chorobą nowotworową mogą przyczyniać się do słabszej eliminacji komórek nowotworowych. Dlatego też IFN γ znalazł obecnie zastosowanie kliniczne w leczeniu białaczki włochatokomórkowej, przewlekłej białaczki szpikowej, chłoniaków złośliwych i innych nowotworów u ludzi dorosłych [11,13,21,34,35]. Pomimo podobnego działania IL-3 do GM-CSF, w badaniach własnych stężenie IL-3 kształtowało się odmiennie. W porównaniu do grupy kontrolnej, u dzieci z guzami mózgu ($p < 0,001$) i u dzieci z guzami o lokalizacji pozamózgowej ($p = 0,036$) stwierdzono statystycznie znamienne wyższe stężenia IL-3, które trudno w chwili obecnej wytłumaczyć. Być może odmiennie wyniki naszych badań wynikają z niejednorodnej grupy badanych dzieci z chorobą nowotworową (tab. II.). Działania cytokin zależą nie tylko od ich stężenia w surowicy krwi, ale także od ekspresji bądź defektu receptora na komórkach docelowych. Stąd nabyte uszkodzenia receptorów dla cytokin mają znaczenie w patogenezie nowotworów. W naszych założeniach nie określano receptorów dla poszczególnych cytokin.

W podsumowaniu naszej pracy stwierdziliśmy, że podwyższone stężenie IL-8 w surowicy krwi u dzieci z chorobą nowotworową jest złym czynnikiem prognostycznym przebiegu choroby. Przeżywalność dzieci z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego i niskim stężeniem IL-8 w surowicy krwi jest gorsze, co wskazuje na większe znaczenie oznaczeń jej stężenia w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Praca finansowana z Grantu N° 3P05E 15222

Piśmiennictwo

- McKinney PA. Brain tumours: incidence, survival and aetiology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75 (suppl. 2): 12-17.
- Rickert CH. Extraneural metastases of paediatric brain tumours. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 309-327.
- MacDonald TJ, Rood BR, Santi MR i wsp. Advances in the Diagnosis, Molecular Genetics, and Treatment of Pediatric Embryonal CNS Tumors. *Oncologist* 2003; 8: 174-186.
- Nygren C, Holst H, Ericson K i wsp. Patients with primary brain tumours have elevated serum titres of antibodies to the myelin glycolipid sulphatide. *European Neurology* 2001; 45: 38-42.
- Merlo A, Juretic A, Zuber M i wsp. Cytokine gene expression in primary brain tumours, metastases and meningiomas suggests specific transcription patterns *Eur J Cancer* 1993; 29A: 2118-2125.
- Wojciechowski C, Asadullah K, Nestler D i wsp.: Different release of cytokines into the cerebrospinal fluid following surgery for intra- and extra-axial brain tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139: 619-624.
- Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 67-172.
- De Larco JE, Beverly RK, Wuertz Karen A i wsp. Potential role for Interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 639-646.
- Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I i wsp. Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 2632-2635.
- Galfy G, Mohammed Kamal A, Dowling PA i wsp. Interleukin 8 an autocrine Growth Factor for malignant mesothelioma. *Cancer Research* 1999; 59: 367-371.
- Jakóbiński M, Lasek W. Immunologia nowotworów. w: Immunologia. Praca zbiorowa pod redakcją Marka Jakóbińskiego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995; 634-676.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL i wsp. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science (Washington DC)* 1992; 258: 1798-1801.
- Robak T. Interleukina-8, rozdział 11, 143-149, Biologia i farmakologia cytokin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Łódź, 1995.
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR i wsp. Antitumor and Antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; 178: 1223-1230.

15. Herbert LA. IL-8 a review. *Cancer Invest* 1993; 11: 743-750.
16. Masztalerz A, Van Rooijen N, Den Otter W i wsp. Mechanismus of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12-mediated tumour regression. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 235-242.
17. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA i wsp. Role of C-X-C chemokine as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leuk Biol* 1995; 57: 752-762.
18. Lissoni P, Mengo S, Mandala M i wsp. Physiopathology of IL-12 in human solid neoplasms: blood levels of IL-12 in early or advanced cancer patients and their variations with surgery and immunotherapy. *J Biol Reg Homeos Ag* 1998; 12: 38-41.
19. Luca M, Hung S, Gershenwald JE i wsp. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1105-1113.
20. Singh RK, Gutman M, Radinsky R i wsp. Expression of Interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Research* 1994; 54: 3242-3247.
21. Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 423-435.
22. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N i wsp. Up regulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis and angiogenesis. *J Exp Med* 1997; 186: 1201-1212.
23. Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S i wsp. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3711-3721.
24. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL i wsp. Inhibition of interleukin-8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med* 1994; 179: 1409-1415.
25. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA i wsp. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 447-454.
26. Xu L, Xie K, Mukaida N i wsp. Hypoxia induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 5822-5829.
27. Soiffer RJ, Robertson MJ, Murray C i wsp. Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral blood lymphocytes from patients with hematologic and solid malignances. *Blood* 1993; 82: 2790-2796.
28. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS i wsp. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 581-589.
29. Wolf SF, Sieburth D, Sypek J. Interleukin-12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 1994; 12: 154-168.
30. Robak T. Interleukina-12, rozdział 15, 175, *Biologia i farmakologia cytokin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Łódź, 1995.
31. Akashi K, Shibuya T, Harada M i wsp. Interleukin 4 suppresses the spontaneous growth of chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest* 1991; 88: 223-230.
32. Heslop HE, Roskrow M. Gene transfer for the therapy of hematologic malignancy. *Curr Opin Hematol* 1999; 2: 417-422.
33. Plautz GE, Barnett GH, Miller DW. Systemic adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg* 1988; 89: 42-51.
34. Kulczkowski K, Podolak-Dawidziuk M. Immunoterapia i stosowanie biologicznych modyfikatorów odpowiedzi. *Onkologia Kliniczna, pod patronatem Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej*, redakcja Maciej Krzakowski, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 231-244.
35. Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 2003; 97: 2440-2452.