

*Klinika Hematologii

**Zakład Immunologii Klinicznej AM w Lublinie

MARIA B. ADAMCZYK-CIOCH*, ANNA DMOSZYŃSKA*,
MARTYNA KANDEFER-SZERSZEŃ*, IWONA HUS*,
DARIUSZ JAWNIAK*, JACEK ROLIŃSKI**

*Znaczenie prognostyczne wytwarzania czynnika martwicy
nowotworów (TNF α) w hodowli blastów białaczek
typu M4 i M5 według FAB*

Prognostic significance of production of tumor necrosis factor (TNF α) in culture
of leukaemic blasts of type M4 and M5 after FAB

WSTĘP

Czynnik martwicy nowotworów (Tumor Necrosis Factor α – TNF α , kachektyna) jest cytokiną wytwarzaną głównie przez monocyty i makrofagi aktywowane lipopolisacharydami (LPS), jakkolwiek jego źródłem mogą być także limfocyty T i B, komórki NK, neutrofile, a także komórki wielu linii nowotworowych – szpiczak plazmocytowy, ostre i przewlekłe białaczki (2, 5, 10). Pod względem budowy jest to polipeptyd o masie cząsteczkowej 17 kDa, występujący w postaci dimeru, trimeru lub pentameru. Gen dla TNF α zlokalizowany jest na ramieniu krótkim chromosomu 6 w pobliżu genu dla TNF β (limfotoksyny) oraz genów dla antygenów głównego układu zgodności tkankowej (HLA) (14).

TNF α odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu wielu procesów fizjologicznych; kontroluje wzrost i dojrzewanie komórek szpiku, stymuluje fagocytozę; wzmacnia odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (24). W stanach patologicznych znany jest udział TNF α w stanach zapalnych, zwłaszcza we wstrząsie endotoksycznym. Na podstawie obserwacji klinicznych i badań doświadczalnych wykazano jego silne działanie przeciwnowotworowe, także w odniesieniu do komórek ostrych białaczek. TNF α działa nie tylko bezpośrednio na komórkę po połączeniu się z właściwym receptorem (p75, p55), lecz także pośrednio poprzez układ cytokin (20, 23).

Celem pracy było poszukiwanie współzależności między poziomem TNF α wytwarzanym przez blasty białaczkowe a następującymi wskaźnikami kliniczno-laboratoryjnymi: leukocytozą, rodzajem

powikłań infekcyjnych, fenotypem immunologicznym z uwzględnieniem ekspresji antygenów o negatywnym znaczeniu rokowniczym, opornością na pierwszoliniowe leczenie cytostatyczne.

Do badań wybrano przypadki ostrej białaczki szpikowej typu M4 i M5 FAB, gdzie poziom spontanicznie wytwarzanego TNF α z racji zachowania przez blasty monocytoidalne zdolności do produkcji tej cytokiny jest wyższy niż w innych typach białaczek.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 23 chorych ze świeżo rozpoznaną białaczką typu M4 lub M5 według klasyfikacji FAB. Wiek chorych (14 kobiet i 9 mężczyzn) wahał się od 19 do 76 lat (średnio 45,3). Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych dawców krwi w wieku od 18 do 48 lat (średnio 42,0). Charakterystykę kliniczną badanych chorych przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna chorych na ostre białaczki typu M4 i M5
Clinical characteristics of patients ill from acute leukemia of type M4 and M5

Nr	Wiek i płeć	Typ białaczki wg FAB	Leukocytoza $\times 10^6/l$	Leczenie	Wynik leczenia
1	43 (K)	M4	191,0	nieleczona	
2	19 (M)	M4	45,4	EPR+HiAra-C+VP-16	RC
3	36 (M)	M4	99,0	EPR+HiAra-C+VP-16	RC
4	30 (M)	M5	99,2	EPR+Ara-C+VP-16	WZ
5	62 (K)	M4	46,8	EPR+Ara-C+VP-16	RC
6	30 (K)	M4	24,3	EPR+Ara-C+VP-16	RC
7	28 (M)	M5	123,2	EPR+Ara-C+VP-16	RC
8	70 (K)	M4	4,3	LoAra-C	RCz
9	76 (M)	M5	14,6	LoAra-C	RCz
				EPR+Ara-C+VP-16	0
10	40 (K)	M4	230,0	Mit+HiAra-C	
11	45 (K)	M5	15,4	EPR+HiAra-C+VP-16	0
12	60 (K)	M4	37,1	EPR+Ara-C+VP-16	RC
13	63 (K)	M4	21,4	EPR+Ara-C+VP-16	0
14	19 (K)	M5	26,7	nieleczona	
15	67 (K)	M4	80,5	EPR+Ara-C	WZ
16	26 (K)	M5	7,4	Ida+Ara-C+VP-16	RC
17	56 (K)	M4	2,1	EPR+Ara-C+VP-16, Mit+Ara-C	0
18	73 (M)	M4	10,9	LoAra-C	RCz
19	55 (M)	M4	32,5	EPR+Ara-C+VP-16	RC
20	18 (M)	M4	52,5	EPR+Ara-C+VP-16	WZ
21	37 (K)	M4	117,0	EPR+HiAra-C+VP-16, Mit+VP-16	0
22	50 (M)	M4	18,9	EPR+Ara-C+VP-16	WZ
23	38 (K)	M4	15,7	EPR+Ara-C+VP-16	WZ

EPR – epirubicyna, Ida – idarubicyna, Mit – mitoksantron, Ara-C – arabinozyd cytozynowy, HiAra-C – duże dawki, LoAra-C – małe dawki, VP-16 – etopozyd, RC – remisja całkowita, RCz – remisja częściowa, O – oporność, WZ – wczesny zgon.

Oznaczenia TNF α wykonywano po ustaleniu rozpoznania i przed rozpoczęciem leczenia cytostaticznego. U żadnego z chorych w tym momencie nie zanotowano klinicznych objawów infekcji w stopniu ponad I według WHO (niewielkie).

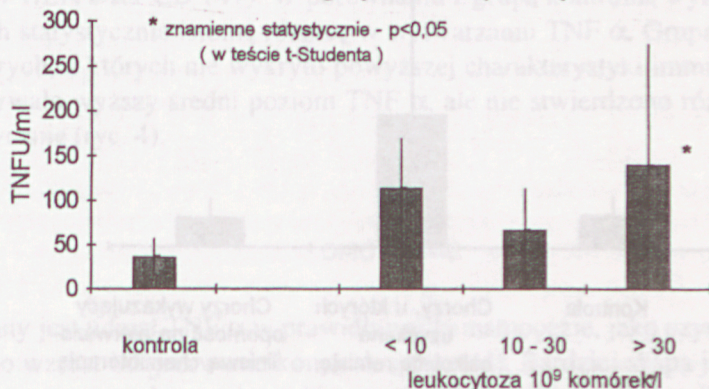
Do probówki zawierającej heparynę (10 j/m – Heparinum Polfa) pobierano 5 ml krwi. Mieszano ją w proporcji 1:5 z płynem Eagle'a, do którego dodawano 2mM L-glutaminę, penicylinę 100 j/ml i streptomycynę $100 \mu\text{g/ml}$. Z uwagi na to, iż komórkowość próbek była duża (od $1,4 \times 10^6$ do 50×10^6 komórek/ml), w drugiej części doświadczenia krew była rozcieńczona płynem Eagle'a wzbogaconym 10% surowicą cielęcą do koncentracji 1×10^6 komórek/ml.

Rozcieńczoną krew wlewano do małych probówek o objętości 1 ml i dodawano induktora TNF α w objętości $50 \mu\text{l/ml}$. Hodowlę inkubowano w 5% CO_2 przez 4 godz. w zależności od stosowanego induktora i zbierano supernatant. Jako induktora TNF α użyto lipopolisacharydów (LPS ze szczepu *E. coli*, serotyp 0111:B4) w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$. Miano TNF oznaczano w hodowli fibroblastów L 929 (otrzymanych od prof. Ingłot z Wrocławia). Próbkę supernatantu rozcieńczono 3-krotnie na oddzielnych mikropłytkach i po napromieniowaniu dawką ultrafioletu 5000 J/m^2 przez 30 min. przenoszono po $50 \mu\text{l}$ do hodowli L 929, do której dodano $50 \mu\text{l}$ świeżego płynu Eagle'a zawierającego aktynomycynę D (Sigma, USA) w stężeniu $2 \mu\text{g/ml}$. Po 4 godz. inkubacji w temp. 37°C efekt cytotoksyczny TNF określano pod mikroskopem i potwierdzano metodą barwną z użyciem MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2, 5 diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (25). Rozcieńczenie powodujące 50% destrukcję komórek uznano jako 1 j. TNF.

TNF α identyfikowano za pomocą testu neutralizacji przy pomocy króliczych przeciwciał poliklonalnych (rozcieńczenie 1:10) (Genzyme, USA). Za pozytywny wynik testu neutralizacji uznano obniżenie miana czynnika cytotoksycznego poniżej 6 j/ml (granica czułości metody). Jako standardu użyto rekombinowanego TNF α produkowanego przez Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu testu t-Studenta.

WYNIKI

Jednym z najważniejszych parametrów klinicznych o znaczeniu rokowniczym w ostrych białaczkach jest wyjściowa wartość leukocytozy (11). Przedstawiono wytwarzanie TNF α w trzech grupach chorych (ryc. 1): z leukocytozą do

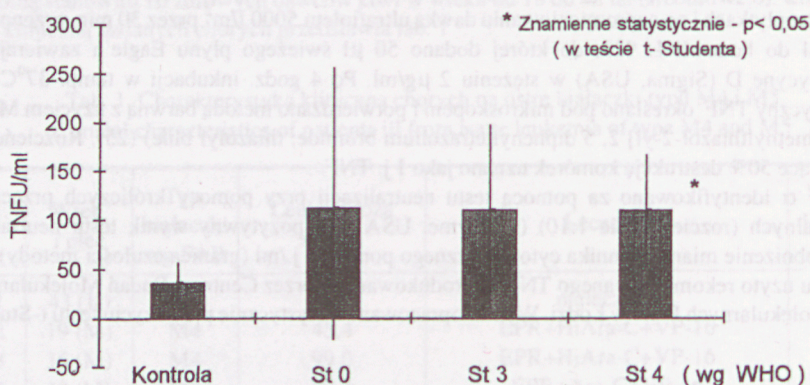


Ryc. 1. Wydzielanie TNF α przez komórki białaczkowe w 4-godzinnej hodowli stymulowanej LPS w trzech grupach chorych o różnej wartości leukocytozy

TNF α secretion by leukaemic cells in 4h culture after LPS stimulation in 3 groups of patients with different counts of leukocytes

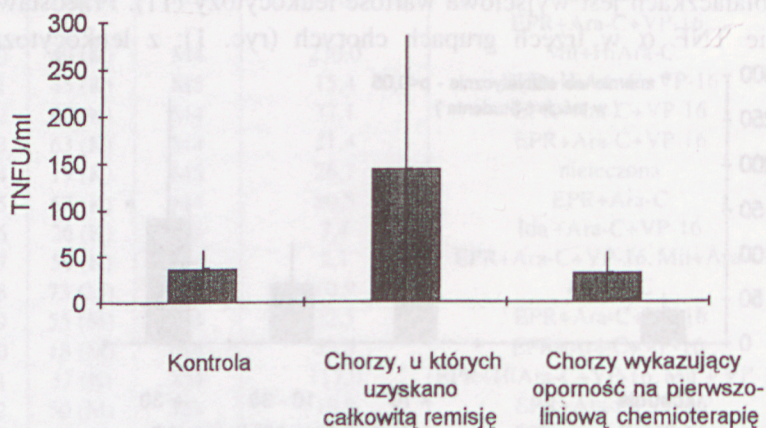
$10,0 \times 10^9/l$ (3 chorych), od $10,0 \times 10^9/l$ do $30,0 \times 10^9/l$ (8 chorych) i powyżej $30,0 \times 10^9/l$ (12 chorych). Wykazano istotną statystycznie różnicę w porównaniu z grupą kontrolną u chorych z leukocytozą powyżej $30,0 \times 10^9/l$.

Z uwagi na brak u chorych objawów infekcji w stopniu wyższym niż 1 według skali WHO w momencie określania poziomu TNF α , dokonano porównania wyników oznaczeń z wystąpieniem powikłań zakaźnych w późniejszym czasie: w okresie chemioterapii i 10 dni od jej zakończenia. Oceniając nasilenie infekcji według czterostopniowej skali WHO istotny statystycznie podwyższony poziom TNF α wykryto w grupie 6 chorych z najcięższymi powikłaniami zakaźnymi (stopień 4 – ciężkie zakażenia z objawami hipotonii) (ryc. 2).



Ryc. 2. Wydzielanie TNF α przez komórki białaczkowe w 4-godzinnej hodowli stymulowanej LPS u chorych z zakażeniami o różnym nasileniu (skala WHO)

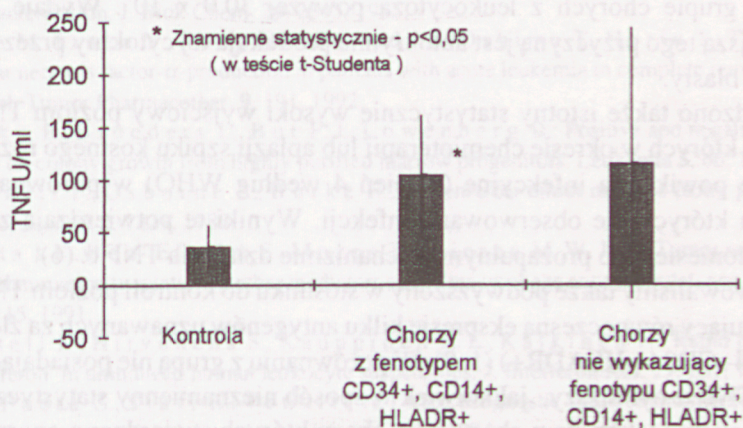
TNF α secretion by leukaemic cells in 4h culture after LPS stimulation in patients with different infections (acc. to WHO)



Ryc. 3. Wydzielanie TNF α przez komórki białaczkowe w 4-godzinnej hodowli stymulowanej LPS w grupie chorych na ostrą białaczkę szpikową oporną na chemioterapię pierwszoliniową

TNF α secretion by leukaemic cells in 4h culture after LPS stimulation in patients with acute myeloid leukaemia resistant to first line chemotherapy

Dokonano porównawczej analizy grupy 8 chorych, u których pod wpływem standardowego leczenia uzyskano całkowitą remisję, i grupy 5 chorych wykazujących oporność na leczenie cytostatyczne (tab. 1). Stwierdzono niższe wytwarzanie $\text{TNF } \alpha$ w przypadku białaczek pierwotnie opornych na chemioterapię, ale różnica nie była istotna statystycznie (ryc. 3).



Ryc. 4. Wyzdzielanie $\text{TNF } \alpha$ przez komórki białaczkowe w 4-godzinnej hodowli stymulowanej LPS w grupie chorych, których blasty wykazywały koekspresję CD34, CD14, HLA DR
 $\text{TNF } \alpha$ secretion by leukaemic cells in 4h culture after LPS stimulation in patients with coexpression CD34, CD14, HLA DR on leukaemic blasts

W badanej grupie chorych wyodrębniono 8 pacjentów, u których na powierzchni komórek blastycznych wykryto równoczesną ekspresję trzech antygenów uważanych w piśmiennictwie za posiadające negatywne znaczenie rokownicze ($\text{CD34}^+ \text{HLA DR}^+ \text{CD 14}^+$). W porównaniu z grupą kontrolną wykazano u tych chorych statystycznie istotną różnicę w wytwarzaniu $\text{TNF } \alpha$. Grupa pozostałych 15 chorych, u których nie wykryto powyższej charakterystyki immunologicznej, wykazywała wyższy średni poziom $\text{TNF } \alpha$, ale nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie (ryc. 4).

OMÓWIENIE

Znany jest udział $\text{TNF } \alpha$ w prawidłowej hematopoezie, jako czynnika kontrolującego wzrost i dojrzewanie komórek szpiku (4). Bardziej skąpa jest natomiast wiedza na temat wpływu tej cytokiny na proliferację białaczkową. Wykazano, że komórki blastyczne obs typu M4 i M5 według FAB w przeciwieństwie do innych postaci białaczek wytwarzają spontanicznie $\text{TNF } \alpha$ i produkcja ta może być jeszcze spotęgowana pod wpływem stymulacji LPS (9). Zjawisko to tłumaczono działa-

niem kilku mechanizmów: stymulacją monocytów przez LPS uwalnianie z przewodu pokarmowego, aktywacją TNF α przez inne cytokiny zaangażowane w proces nowotworowy, autokrynną produkcją TNF α przez białaczkowe monocyty (3, 22).

W naszych badaniach stwierdziliśmy istotny statystycznie wysoki poziom TNF α w grupie chorych z leukocytozą powyżej $30,0 \times 10^9$. Wydaje się, że najważniejszą tego przyczyną jest autokrynną produkcja tej cytokiny przez monocytoidalne blasty.

Stwierdzono także istotny statystycznie wysoki wyjściowy poziom TNF α u chorych, u których w okresie chemioterapii lub aplazji szpiku kostnego rozwinęły się ciężkie powikłania infekcyjne (stopień 4 według WHO) w porównaniu do chorych, u których nie obserwowano infekcji. Wyniki te potwierdzają znane z literatury doniesienia o prozapalnym mechanizmie działania TNF α (6).

Obserwowaliśmy także podwyższony w stosunku do kontroli poziom TNF α w obs wykazujący równoczesną ekspresję kilku antygenów uznawanych za źle rokujące (CD14+CD34+HLADR+) (1, 8). W porównaniu z grupą nie posiadającą tego fenotypu TNF α był niższy, jakkolwiek w sposób nieznamienny statystycznie.

Wykazaliśmy także, że u chorych na obs, u których stwierdzono oporność na pierwszoliniowe leczenie cytostatyczne, poziom TNF α był obniżony, choć nie w sposób istotny statystycznie.

W piśmiennictwie pojawiają się często przeczące sobie doniesienia o różnym wpływie TNF α na proliferację białaczkową. Wynika to głównie z faktu, że jest to cytokina o działaniu pleiotropowym. TNF α wywiera bezpośredni cytotoksyczny wpływ na blasty, jak również za pośrednictwem IFN γ i IL-2 (7, 16). Wzmaga także cytotoksyczność makrofagów (18). Wykazano również, że TNF α zwiększa ekspresję antygenów HLA klasy I i II na komórkach białaczkowych (19). Według wielu badaczy zasadniczy mechanizm wpływu TNF α na białaczkę polega na indukowaniu produkcji i działania innych cytokin. Stwierdzono, że TNF α pobudza wzrost blastów obs poprzez synergizm z IL-3 i GM-CSF, natomiast jest silnymi inhibitorem G-CSF i EPO (12, 13). Murohashi i wsp. (15) w warunkach hodowli komórek obs wykazali ich istotny wzrost pod wpływem IL-1 β , IL-3 i TNF α , jak również wzrost mRNA dla TNF α i IL-1 β oraz genów c-fos i c-jun. Zastosowanie przeciwciał anti-TNF α blokowało wzrost hodowli (15). Obecnie uważa się, że wektor działania TNF α związany jest z transmodulacją receptorów dla hematopoetycznych czynników wzrostu (HGF – *Hematopoietic Growth Factors*) (12, 21).

Mimo wielu wątpliwości dotyczących wpływu TNF α na wzrost komórek białaczkowych podjęto próby kliniczne I i II fazy z terapeutycznym zastosowaniem tej cytokiny. Wstępne wyniki badań przeczą wartości TNF α w samodzielnym hamowaniu rozwoju białaczki w warunkach *in vivo*. Wydaje się, że lepszy efekt można uzyskać przez łączne zastosowanie TNF i cytostatyków (17). Dla ostatecznego rozstrzygnięcia tego problemu konieczne będą dalsze badania zarówno laboratoryjne, jak kliniczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamczyk - Cioch M. B., Dmoszyńska A., Hus M., Hus I.: Charakterystyka kliniczna i immunologiczna ostrej białaczki szpikowej CD34 dodatniej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **94**, 40, 1995.
2. Aggarwal B. B., Kohr W. J.: Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **26**, 2345, 1985.
3. Aiso M., Izuka Y., Kang H.L., Sawada S., Oshima T., Horie T.: The monocyte tumor necrosis factor- α -production in patients with acute leukemia in complete remission. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* **9**, 191, 1992.
4. Backx B., Broeders L., Bot F. J., Lowenberg B.: Positive and negative effects of TNF on colony growth from highly purified marrow progenitors. *Leukemia* **5**, 66, 1991.
5. Bakwill F., Osborne R., Burke F.: Evidence for tumor necrosis factor production in cancer. *Lancet* **2**, 1229, 1987.
6. Bonta I. L., Ben-Efraim S., Mozes T., Flieren M. W. J. A.: Tumor necrosis factor in inflammation in relation in other mediators and to macrophage antitumor defence. *Pharm. Res.* **24**, 115, 1991.
7. Cantell K., Hirvonens S., Kauppinen H. L., Kalkinen N.: Rapid production of interferon in uninduced human leukocyte suspensions. *J. Interferon Res.* **11**, 231, 1991.
8. Del Poeta G., Stasi R., Venditi A. i wsp.: Prognostic value of cell marker analysis in *de novo* acute myeloid leukemia. *Leukemia* **3**, 388, 1994.
9. Dmoszyńska A., Kandefer-Szerszeń M., Borowska L., Adamczyk - Cioch M. B., Hus I., Hus M., Roliński J.: Spontaniczne i indukowane wytwarzanie czynnika martwicy nowotworów (TNF) przez leukocyty krwi obwodowej chorych na ostrą białaczkę typu M4 i M5 wg FAB. *Acta Haematol. Pol.* **26**, 205, 1995.
10. Dubravac D. B., Spriggs D. R., Mannick J. A., Rodrick M. L.: Circulating human peripheral blood granulocytes and secrete tumor necrosis alfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6758, 1990.
11. Geller R. B.: Post remission therapy of acute myelocytic leukemia in adults: Curability breeds controversy. *Leukemia* **6**, 915, 1992.
12. Lowenberg B., Tuow I.: Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* **81**, 281, 1993.
13. Mayani H., Guilbert L. J., Sych I., Janowska-Wieczorek A.: Production of tumor necrosis factor- α in human long-term marrow cultures from normal subjects and patients with acute myelogenous leukemia: effect of recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Leukemia* **6**, 11481, 1992.
14. Mizuno D.: Significance of endogenous production of TNF [in:] *Tumor Necrosis Factor. Structure, Function, Relationship and Clinical Application*. Ed. Basel, Karger 1, 1992.
15. Murohashi I., Tohola S., Imai Y.: Growth potentating activity of endogenous production of IL-1 and TNF alfa in blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol* **21**, 846, 1993.
16. Nara N.: Combined effect of Interferon- γ and tumor necrosis factor- α causing suppression of leukemic blast progenitors in acute myeloblastic leukemia. *Leuk. Lymph.* **10**, 201, 1993.
17. Nemunaitis J.: Growth factors of the future. *Leuk. Lymph.* **9**, 329, 1993.
18. Oster W., Lindemann A., Horn S., Mertelsmann R., Hermann F.: Tumor necrosis factor (TNF α) but not TNF β induces secretion of colony stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. *Blood* **70**, 1700, 1987.
19. Pfizenmaier K., Scheurich P., Schluter C., Kronke M.: Tumor necrosis enhances HLA-A, B, C and HLA DR gene expression in human myeloid leukemia cells. *J. Immunol.* **138**, 975, 1987.

20. Płużńska A.: Rekombinowany ludzki czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF): badania przedkliniczne i próby zastosowania w klinice. *Acta Haematol. Pol.* **25** (supl), 148, 1994.
21. Rusten L. S., Jacobsen F. W., Lesslauer W., Loetscher H., Smeland E. B., Jacobsen S. E. W.: Bifunctional effects of TNF α on growth of mature and primitive hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p 75 TNF receptors. *Blood* **83**, 3152, 1994.
22. Takamatsu Y., Akashi K., Havada M., Teshina T. i wsp.: Cytokine production by peripheral blood monocytes and T cells during haematopoietic recovery after intensive chemo-therapy. *Brit. J. Hemat.* **83**, 21, 1993.
23. Tchórzewski H.: TNF α (kachektyna) jako limfokina regulacyjna. *Acta Haematol. Pol.* **25** (supl. 1), 56, 1994.
24. Vassalli P.: The pathophysiology of tumor necrosing factor. *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 411, 1992.
25. Wilson B. M. G., Severn A., Rapson N. T., Chona J., Hopkins P.: A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumor necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol. Methods* **239**, 233, 1991.

SUMMARY

The role of tumor necrosis factor (TNF α) in acute myeloid leukemia (AML) is still controversial. The authors have undertaken the present study to evaluate the prognostic significance TNF α in patients with AML, t. M4 and M5, acc. to FAB. 23 patients and 10 control subjects were studied. Leukaemic cells released a markedly higher level of TNF α in 4h culture stimulated by LPS than control cells. We also noticed the relationship between the high count of leukocytes, the incidence of infection (bad prognostic factors) and high secretion of TNF α .