
ELEVATED SERUM LEVEL OF INTERLEUKIN-10 IN ADULT NEWLY DIAGNOSED NON-HODGKINS'S LYMPHOMA

Sheniz Yuzeir

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, shenizyuzeir@abv.bg

Trifon Chervenkov

Department of Medical Genetics, Medical University in Varna, Bulgaria, tuckata@gmail.com

Liana Gercheva

Clinic of Hematology, Acibadem City Clinic Tokuda Hospital in Sofia, Bulgaria,
lianagercheva@gmail.com

Abstract: Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is a group of lymphoproliferative malignant disorders with heterogeneous histological and clinical characteristics. Non-Hodgkin's lymphoma is characterized by abnormal proliferation or accumulation of B or T lymphocytes. Cytokines are low-molecular-weight proteins with a wide variety of functions. They are involved in the regulation of both the immune and inflammatory response and also play significant roles in the pathogenesis of lymphoma.

Aims: We aimed to investigate serum levels of Interleukin -10 in newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients and their relationship with clinicopathological characteristics and prognostic parameters. **Methods:** Serum level of IL-10 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay in 60 patients with pathologically verified NHL before chemotherapy, and in 20 healthy controls.

Results: A total of 60 patients with NHL, 32 men and 28 women. 24 were with Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), 8 with Mantel cell lymphoma(MCL), 2 with Peripheral T-cell lymphoma (PTCL), 9 with Marginal zone lymphoma (MZL), 10 with Follicular lymphoma(FL), 1 patient with Plasmoblastic lymphoma(PBL) and 6 with Small-cell lymphoma(SCL). There was significant differences in the serum IL-10 between NHL patients and controls ($p < 0.001$). Serum IL-10 levels were significantly different in the group of patients with aggressive NHL compared with the group of patients with inolent NHL (respectively $p = 0.016$). Also, serum IL-10 levels were elevated in the group of patients with high level LDH ($p = 0.015$) compared with the group of patients with a normal level. Multivariate analysis showed a significant difference between the two study groups in terms of IPI ($p = 0.005$), with a moderate correlation between the type of lymphoma and the risk profile of patients ($r = 0.399$; $p = 0.002$). In the group of patients with intermediate and high risk and elevated IL-10 levels have an unfavorable prognosis and short overall survival.

Conclusion: Elevated levels of IL-10 are associated with increased tumor growth with poor prognosis and overall survival. Our data suggest that higher serum IL-10 levels could be an independent negative prognostic factor and correlates to poor survival.

Keywords: Cytokines, IL-10, Non-Hodgkin's lymphoma

ВИСОКИ СЕРУМНИ НИВА НА ИНТЕРЛЕВКИН-10 ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С НЕХОЧКИНОВИ ЛИМФОМИ

Шениз Юзеир

Клиника по Хематология, УМБАЛ “Света Марина“, Медицински университет, Варна, България,
shenizyuzeir@abv.bg

Трифон Червенков

Катедра по Медицинска генетика, УМБАЛ“Света Марина“, Медицински университет, Варна,
България, tuckata@gmail.com

Лиана Герчева

Клиника по Хематология, Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда, София, България,
lianagercheva@gmail.com

Резюме: Нехочкиновите лимфоми (НХЛ) са група лимфопролиферативни заболявания с хетерогенен спектър от клинични и патологични характеристики. НХЛ се характеризират с абнорбна пролиферация или акумулация на В и Т лимфоцити. Цитокините са протеини с ниско молекулно тегло и с множество различни

функции. Те участват в регулацията, както на имунния и възпалителния отговор, а също така играят сигнификантна роля в патогенезата на Нехочкиновите лимфоми.

Цел на изследването: да се изследват серумните нива на IL-10 при новодиагностицирани пациенти с агресивни и индолентни НХЛ и да се потърси връзката с клинично-патологичните характеристики и прогностични параметри.

Методи: Серумните нива на IL-10 са изследвани чрез метода ELISA при 60 пациенти с хистологично верифицирани НХЛ преди химиотерапевтично лечение и при 20 здрави контроли.

Резултати: От общо изследваните 60 пациенти с НХЛ, 32 са мъже и 28 жени. Разпределението според вида на лимфома е както следва: 24 са с Дифузен В-едроклетъчен НХЛ, 8 с Мантелноклетъчен НХЛ, 2 пациенти с Периферен Т-клетъчен НХЛ, 9 с Маргинално зонов НХЛ, 10 с Фоликуларен НХЛ, 1 пациент с Плазмобластен и 6 с Дребноклетъчни НХЛ. Установяваме статистически значима корелационна зависимост между групата пациенти с НХЛ и групата от здравите контроли ($p < 0.001$). В групата пациенти с агресивни НХЛ се регистрират три пъти по-високи нива на IL-10 в сравнение с групата на индолентните НХЛ ($p = 0.016$). Значима сигнификантна зависимост се установява и в групата пациенти с високи стойности на ЛДХ ($p = 0.015$), в сравнение с контролната група. Мултивариационният анализ доказва съществена разлика между двете изследвани групи по отношение на IPI ($p = 0.005$), като се установи умерена корелация между вида на лимфома и рисковия профил на пациентите ($r = 0.399$; $p = 0.002$). Пациентите с НХЛ с интермедиерен и висок риск и повишени нива на IL-10 имат неблагоприятна прогноза и кратка обща преживяемост. Заключение: Повишените нива на IL-10 се асоциират с неблагоприятно въздействие върху прогнозата на пациентите и общата им преживяемост. Основавайки се на получените резултати нашата хипотеза е, че високите нива на IL-10 играят ролята на независим негативен прогностичен фактор върху общата преживяемост.

Ключови думи: Цитокини, IL-10, Нехочкинови лимфоми

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Цитокините са гликопротеини, които се секретират от кръвните клетки и регулират функцията на различни клетъчни групи. Те се разделят на три групи: хемопоеични растежни фактори, медиатори на имунната система и регулатори на лимфоцитната активация, диференциация и пролиферация (Brocker et al, 2010). Това са малки протеини (~15-25 kD), които се произвеждат от различни клетки и медиатират сигналите и комуникациите между тях (Li N, Grivennikov et al, 2011). Те не само участват в регулацията на имунния и възпалителния отговор (Roncarolo et al, 2003), но също така контролират процесите на клетъчна активация, пролиферация, диференциация и апоптоза (Culig et al, 2005). Отдавна е известна ролята на възпалителните цитокини в патогенезата на лимфопролиферативните заболявания (Ohshima et al, 2000), както и че високите серумни нива на интерлевкините могат да се използват като прогностичен фактор при малигнените заболявания (Mosser and Zhang, 2008). Интерлевкин 10 (IL-10) е имуномодулиращ цитокин, синтезиран от широк спектър от клетъчни типове, включително Т и В лимфоцити, моноцити, макрофаги, НК клетки (Mocellin et al, 2005) и неопластични В лимфоцити (Commins et al, 2008). Той регулира туморния растеж, участва в клетъчния мотилитет, миграция и възстановяване, както и в придобиване на клетъчна ефекторна функция и е тясно свързан с малигнените хемопатии (Culig et al, 2005). Спада към групата на цитокините с хомодимерни рецептори с известни имуносупресивни и противовъзпалителни свойства (Howard et al, 1993). Основната биологична функция на IL-10 е да ограничава възпалителните реакции и да регулира пролиферацията на имунни клетки като Т-клетки, В-клетки, естествени клетки-убийци, антиген-представящи клетки, мастоцити и гранулоцити (Fiorentino et al, 1989). Той участва в патогенезата на лимфопролиферативните заболявания чрез два основни механизма (Contasta et al, 2001). От една страна стимулира пролиферацията на В клетките, увеличава експресията на bcl-2 и предпазва туморните клетки от апоптоза (Moore et al, 2001) със секреция на големи количества имуноглобулини от различни класове (Ig G, Ig A и Ig M). От друга страна инхибиращият ефект на IL-10 върху макрофагите и антиген-специфичен Т-клетъчен отговор допринася за прогресията на лимфома *in vivo* (Del Prete et al, 1993). В това проучване нашата цел е да оценим значимостта на серумните нива на IL-10 при новодиагностицирани пациенти с NHL и връзката им с клинично-патологичните характеристики и прогностичните параметри.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пациентска популация: В проучването са включени общо 60 новодиагностицирани пациенти с хистологично верифицирана диагноза Нехочкинови лимфоми, съобразно патолого-анатомичните критерии за поставяне на диагнозата. Пациентската популация е със съотношение мъже: жени 32/28, със средна възраст 59,1 г. (39-79), като 35 от пациентите са с агресивни НХЛ, а 25 с индолентни лимфоми. В

изследването са включени и 20 здрави доброволци като контролна група. Основните характеристики на пациентите са посочени в таблица 1.

Методи: Нивата на IL-10 са определени в кръвен серум чрез готов тестов набор Human IL-10 Immunoassay, Quantikine ELISA Kit, каталожен номер D1000B, на фирмата R&D Systems, USA, с чувствителност (праг на откриване) 3,9 pg/ml и линеен обхват 7,8 – 500 pg/ml. Материалът за изследване е серум, взет със затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Beckton Dickinson. След венепункцията кръвта е оставена за 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 15 минути при 1 000×g и е съхранен при температура –80 °С до извършването на анализа. Анализът на IL-10 е осъществен според протокола на производителя. **Статистически анализ:** Всичките данни са анализирани чрез статистически метод SPSS v. 20.0, като са използвани, дисперсионен, вариационен, сравнителен и корелационен анализи. За ниво на значимост приемаме $p < 0.05$.

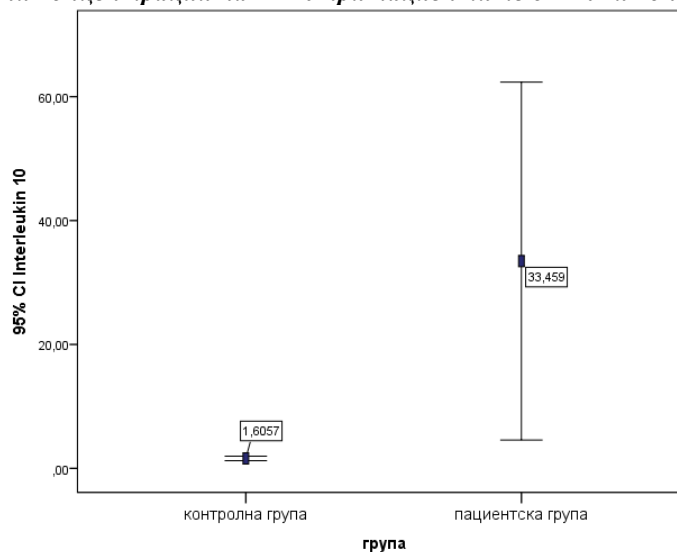
3. РЕЗУЛТАТИ

При анализирани резултатите се установяват високи серумни нива на IL-10 при новодиагностицираните пациенти с НХЛ в сравнение с контролната група ($p < 0.001$) (Фигура 1), като средните стойности на IL-10 са над 30 пъти по-високи. Също така съществена разлика се регистрира между двете групи агресивни и индолентни НХЛ, като статистическият анализ показва три пъти по-високи нива на IL-10 при агресивните лимфоми. По отношение на постигнат терапевтичен отговор не се установява значима статистическа разлика. В проучването използваните химиотерапевтични режими са предимно R-CHOP и CHOP, като 30 пациенти са постигнали пълен отговор, 6 частичен отговор, 3 много добър частичен отговор, 7 са прогресирали и 5 са починали.

Таблица 1. Сравнителен мултивариационен анализ между нивата на IL-10 при агресивни и индолентни НХЛ и клинично-патологичните характеристики.

Показател	Идолентни лимфоми		Агресивни лимфоми		P-value
	Брой / %		Брой / %		
Пол	Мъж	11/ 44.0 %	21/ 60.0%		0.168
	Жена	14/ 56.0 %	14/ 40.0 %		
Възраст	mean±SD (range)		61.6 ± 11.4 (39-79)	59.4±13.9 (28-88)	0.506
Стадий	I	3/ 12.0 %	2/ 5.7 %		0.237
	II	4/ 16.0 %	4/ 11.4 %		
	III	2/ 8.0 %	10/ 28.6 %		
	IV	16/ 64.0 %	19/ 54.3 %		
IPi риск	Нисък	11/ 44.0 %	3/ 8.6 %		0.005
	Интермедиерен	7/ 28.0 %	12/ 34.3 %		
	Висок	7/ 28.0 %	20/ 57.1 %		
В симптоми	ДА	8/ 32.0 %	16/ 45.7 %		0.212
	НЕ	17/ 68.0 %	19/ 54.3 %		
Хемоглобин	mean±SD (range)		116.6 ± 28.5 (43-161)	116.4 ± 19.3 (62-151)	0.969
Левкоцити	mean±SD (range)		11.6 ± 10.9 (2.64-41.54)	11.7 ± 17.8 (2.01-82.81)	0.969
Тромбоцити	mean±SD (range)		195.8±92.1 (72-479)	264.2±193.9 (62-1117)	0.108
ЛДХ	mean±SD (range)		492.6±292.5 (143-1352)	848.4±1289.8 (289-5935)	< 0.05
Бета 2 мик	mean±SD (range)		4.14±1.98 (1.7-8.2)	3.79±2.12 (1.6-8.5)	0.524
IL-10	mean±SD (range)		14.03±32.91 (0.46-152.82)	47.34±143.07 (2.04-687.14)	< 0.001
Терапевтичен отговор	Пълен отговор	12/ 48.0 %	18/ 51.4 %		0.094
	Частичен отговор	2/ 8.0 %	4/ 11.4 %		
	Проследяване	4/ 16.0 %	1/ 2.9 %		
	Прогресия	-	7/ 20.0 %		
	Стабилна болест	3/ 12.0 %	1/ 2.9 %		
	Много добър частичен отговор	2/ 8.0 %	1/ 2.9 %		
	Починал	2/ 8.0 %	3/ 8.6 %		

Фигура 1. Серумни концентрации на IL-10 при пациентите с НХЛ и контролната група.



Статистическата обработка на данните показва значима позитивна корелационна зависимост между изследваните нива на IL-10 и прогностичния риск IPI ($p\text{-value} < 0.005$), както и със стойностите на ЛДХ ($p\text{-value} < 0.05$) (Таблица 1). Сравнителният анализ според риска (IPI) установява сигнификантна разлика между групите пациенти с интермедиерен и висок риск и вида на лимфома, както и умерена зависимост между изследваните показатели ($r=0.399$; $p=0.008$). При анализа на останалите прогностични параметри (стадий на заболяването, В симптоми, бета2-микроглобулин, стойности на хемоглобин, левкоцити, лимфоцити и тромбоцити) не се установява значима връзка (Таблица 1).

4. ОБСЪЖДАНЕ

Настоящите резултати показват значително високи нива на IL-10 при пациенти с NHL в сравнение с контролна група, като подобни резултати са докладвани и от други изследователски групи (Kozowski et al, 2017). В проспективното ни проучване IL-10 не показва значима връзка с анализирания клинично-биологични параметри, като възраст, пол, наличие на В симптоми, стадий на заболяването, кръвни показатели и $\beta 2$ -микроглобулин, с изключение на биологичните прогностични фактори като LDH и IPI- риска. В сравнение с другите източници (Gunev et al, 2009) при нашите пациенти не установихме сигнификантна разлика по отношение на постигнат терапевтичен отговор. Прави впечатление, че пет от изследваните пациенти с индолентни НХЛ с висок риск и високи нива на IL-10 са починали по време на проследяването, което корелира с негативното въздействие на този цитокин върху прогнозата и общата преживяемост. Според литературните данни обикновено IL-10 се определя като неблагоприятен прогностичен фактор при Нехочкиновите лимфоми (Ozdemir et al, 2004). В едно от проучванията (Blay et al, 1993) са установени високи нива на IL-10 при 46% от пациентите с активност на лимфома, което се свързва с много кратка преживяемост, като подобни резултати са цитирани и от други изследователски групи (Lech-Maranda et al, 2006) и (Nacinovic-Duletic et al, 2008). Базирайки се на горесцитираните данни и нашите резултати можем да констатираме, че високите нива на IL-10 при Нехочкиновите лимфоми моделират клиничното протичане, терапевтичното повлияване и в повечето случаи скъсяват преживяемостта на пациентите.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашият опит показва, че високите серумни нива на IL-10 се асоциират с неблагоприятна прогноза и играят ролята на независим негативен прогностичен фактор върху общата преживяемост на пациентите и биологичната активност на лимфома.

БИБЛИОГРАФИЯ

Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot M C, (1993). Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. Blood 82: 2169-2174.

- Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert D, Vasiliou V. (2010). [Evolutionary divergence and functions of the human interleukin \(IL\) gene family](#), Human Genomics 5 (1) 30-55.
- Contasta I, Pellegrini P, Berghella AM, Adorno D, (2001). *Cancer Biother Radiopharmaceut*, 16, 63-71
- Commins S, Steinke JW, Borish L, (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* ;121:1108-1111
- Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A, (2005), *J Cell Biochem.*, 95, 497-505
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*;150:353-360
- Florentino DF, Bond MW, Mosmann TR, (1989). Two types of mouse helper T cells, TH2 secretes a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med* 170:2081
- Guney N, Soydic HO, Basaran M, Bavbek S, Derin D, Camlica H, Yasasever V, Topuz E, (2009). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 in Turkish patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Asian Pac J Cancer Prev*;10:669-674
- Kozowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ, (2003). Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst* 48: 82-84
- Lech-Maranda E, Bienvenu J, Michallet AS, Houot R, Robak T, Coiffier B, Salles G, (2006). Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur Cytokine Netw*;17:60-66.
- Li N, Grivennikov SI, Karin M (2011). The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT 3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell*;19(4):429-431. [PMC free article] [PubMed]
- Nacinovic-Duletic A, Stifter S, Dvornik S, Skunca Z, Jonjic N, (2008). Correlation of serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels with clinicopathological features and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Lab Hematol*;30:230-239.
- Howard M, O'Garra A, (1992). Biological properties of IL-10. *Immunol Today* 13:198,
- Mocellin S, Marincola FM, Young HA, (2005). Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 78: 1043-1051
- Moore KW, de Waal MR, Coffman RL and O'Garra A, (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19:683–765
- Mosser DM and Zhang X, (2008). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine *Immunol Rev.* 226:205–218. , Pubmed
- Ohshima K, Haraoka S, Suzumiya J, Kawasaki C, Kanda M, Kikuchi K, (2000). *Leuk Lymphoma*, 38 (5-6), 541-545
- Ozdemir F, Aydin F, Yilmaz M, Kavgaci H, Bektas O, Yavuz MN, Yavuz A, (2004) The effects of IL-2, IL-6 and IL-10 levels on prognosis in patients with aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). *J Exp Clin Cancer Res* 23: 485-488
- Roncarolo MG, Battaglia M, Gregori S (2003). The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun* ;20:269-272