

## Protinádorová reakcia v mikroprostredí kolorektálneho karcinómu

Erika Gaálová<sup>1,4\*</sup>, Kristína Mosná<sup>1</sup>, Pavel Babál<sup>1,2</sup>, Andrea Janegová<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Trnava

<sup>3</sup>Patologickoanatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

<sup>4</sup>Medicyt, s. r. o., Bratislava

Kolorektálny karcinóm patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkologické choroby s vysokou mortalitou. Dôležitú úlohu v správaní a progresii nádoru zohráva imunitný systém a protinádorová imunitná reakcia sprostredkovaná lymfocytmi infiltrujúcimi tumor. Cieľom predloženej štúdie bolo posúdiť aktiváciu imunitného systému v nádoroch hrubého čreva so zameraním na fenotyp zápalových buniek. Hodnotili sme infiltráciu zápalových buniek v 23 vzorkách nádorov hrubého čreva. Analyzovali sme prítomnosť a hustotu infiltrácie cytotoxických (CD8+) a pomocných (CD4+) T-lymfocytov a histiocytov (CD68+) v oblastiach s nádorovým rastom aj v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom. Vzorky boli spracované metódou microarray a farbené imunohistochemicky. Výsledky sme hodnotili kvantitatívne morfolometricky pomocou počítačovej analýzy obrazu. Predložená štúdia naznačuje, že v súvislosti so zvyšujúcim sa gradingom nádoru dochádza k poklesu intenzity protinádorovej imunitnej odpovede. Tento pokles môže byť následkom, ale aj príčinou progresie tumoru. Ovplyvnenie protinádorovej imunitnej odpovede predstavuje preto veľmi zaujímavý potenciálny terapeutický prístup.

**Kľúčové slová:** kolorektálny karcinóm, imunitná odpoveď, nádorové mikroprostredie

### *An antitumoral reaction in micro-environment of colorectal cancer*

Colorectal cancer is one of the most common oncological diseases with high mortality. The immune system and the tumour-related immune response mediated by tumour-infiltrating lymphocytes play an important role in tumour behaviour and progression. The presented study aimed to assess the activation of the immune system in colorectal tumours with a focus on the inflammatory cell phenotype. The inflammatory cell infiltration was evaluated in 23 colorectal cancer samples. The presence and density of infiltration of cytotoxic (CD8+) and helper (CD4+) T-lymphocytes and histiocytes (CD68+) were analyzed inside tumours as well as in the surrounding non-neoplastic tissue. The samples were processed to microarray and immunohistochemically stained. The positivity was evaluated quantitatively by computer image analysis. The present study showed that the intensity of the antitumour immune response decreases in connection with increasing tumour grading. The decrease might be due to tumour progression. But it also might be the cause of this decrease. The influencing of the anti-tumour immune response represents a very interesting potential therapeutic approach.

**Keywords:** colorectal carcinoma, immune response, tumor microenvironment

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 72 – 76

### Úvod

Zhubné nádory hrubého čreva patria medzi najpočetnejšie malígne ochorenia vo vyspelých štátoch sveta. Slovenská republika sa nachádza na jednom z popredných miest v celosvetovom rebríčku, v Európe má po Maďarsku a Nórsku tretiu najvyššiu incidenciu a je na prvom mieste v mortalite na kolorektálny karcinóm<sup>(1)</sup>. Na vzniku kolorektálneho karcinómu sa podieľajú environmentálne aj genetické faktory. Nádorová transformácia je výsledkom postupného hromadenia genetických a epigenetických zmien, ktoré vedú k transformácii povrchového epitelu hrubého čreva a ovplyvňujú jeho biologické správanie vrátane malígneho potenciálu.

Solídne tumory vrátane nádorov hrubého čreva sú často infiltrované bunkami imunitného systému. Za spúšťanie imunitnej odpovede zodpovedajú aj antigény vzniknuté v procese nádorovej transformácie hromadením bunkových mutácií, tzv. nádorové neoantigény. Vplyv protinádorového imunitného mikroprostredia na prognózu nádorov je v súčasnosti pred-

metom štúdia mnohých vedeckých prác. Ukazuje sa, že práve mikroprostredie transformovaných nádorových buniek má význam ako prognostický faktor a podieľa sa na karcinogéze, a to v štádiu iniciácie aj progresie nádorového rastu<sup>(2,3)</sup>.

Za normálnych okolností sa imunitný systém snaží potlačiť nádorovú progresiu buď zničením nádorových buniek, alebo inhibíciou ich rastu. Na druhej strane môže imunitný systém podporiť aj nádorovú progresiu vyselektovaním rezistentných nádorových buniek alebo sa paradoxne podieľa na vytvorení imunosupresívneho nádorového mikroprostredia. Práve schopnosť nádorových buniek kontrolovať imunitný systém a vznik imunitnej rezistencie umožňuje nádorovým bunkám uniknúť spod kontroly a podieľa sa na progresii nádorovej choroby<sup>(2,4)</sup>.

Cieľom predloženej štúdie je zhodnotiť aktiváciu imunitného systému v nádoroch hrubého čreva v závislosti od stupňa diferenciácie nádoru a v porovnaní s okolitým nádorovo nepostihnutým tkanivom hrubého čreva.

## Materiály a metódy

Analyzovali sme archívne tkanivové vzorky nádorov hrubého čreva fixované formalínom a zaliaté v parafíne, pochádzajúce z terapeutických a diagnostických bioptických odberov a archivované v Ústave patologickkej anatómie LF UK v Bratislave. Vzorky boli histopatologicky posúdené a bola stanovená patologická diagnóza v zmysle platných kritérií WHO.

Základný súbor tvorilo 23 prípadov kolorektálneho karcinómu, z toho 4 prípady dobre diferencovaného (G1), 12 prípadov stredne diferencovaného (G2) a 3 prípady nízкодiferencovaného (G3) adenokarcinómu a 4 prípady hlienotvorného adenokarcinómu. Samostatne sme hodnotili miesta s nádorovým rastom a okolité tkanivo nepostihnuté nádorom.

Hodnotili sme infiltráciu tkaniva zápalovými bunkami so zameraním na cytotoxické T-lymfocyty (CD8+), pomocné T-lymfocyty (CD4+) a histiocyty (CD68+). Ich prítomnosť bola hodnotená imunohistochemicky; v krátkosti odparafínované preparáty boli prepláchnuté 5 minút v PBS (vo fyziologickom soľnom roztoku pufrovanom fosfátmi s 10 mM, pH 7,4). Tkanivové epitopy boli následne demaskované procesom revitalizácie s použitím Dako PT Link (Agilent, Santa Clara, CA, USA); rezy boli inkubované v roztoku TRIS-EDTA (10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 9) pri teplote 98 °C počas 20 minút. Preparáty boli následne inkubované 60 minút s myšacou monoklonálnou protilátkou proti CD8 (ready to use, Agilent, Santa Clara, CA, USA), proti CD4 (ready to use, DAKO, Carpinteria, USA) a proti CD68 (ready to use, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Po 3-násobnom prepláchnutí v PBS, boli preparáty inkubované 30 minút s polymérom Histofine proti myšacím proteínom (Nichirei Biosciences, Japonsko) a po opakovanom 3-násobnom prepláchnutí v roztoku PBS farbené 5 minút diaminobenzidínom

(DAB+, DAKO, Carpinteria, USA). Preparáty boli následne krátko dofarbené hematoxylínom, aby sa zvýraznili jadrá buniek.

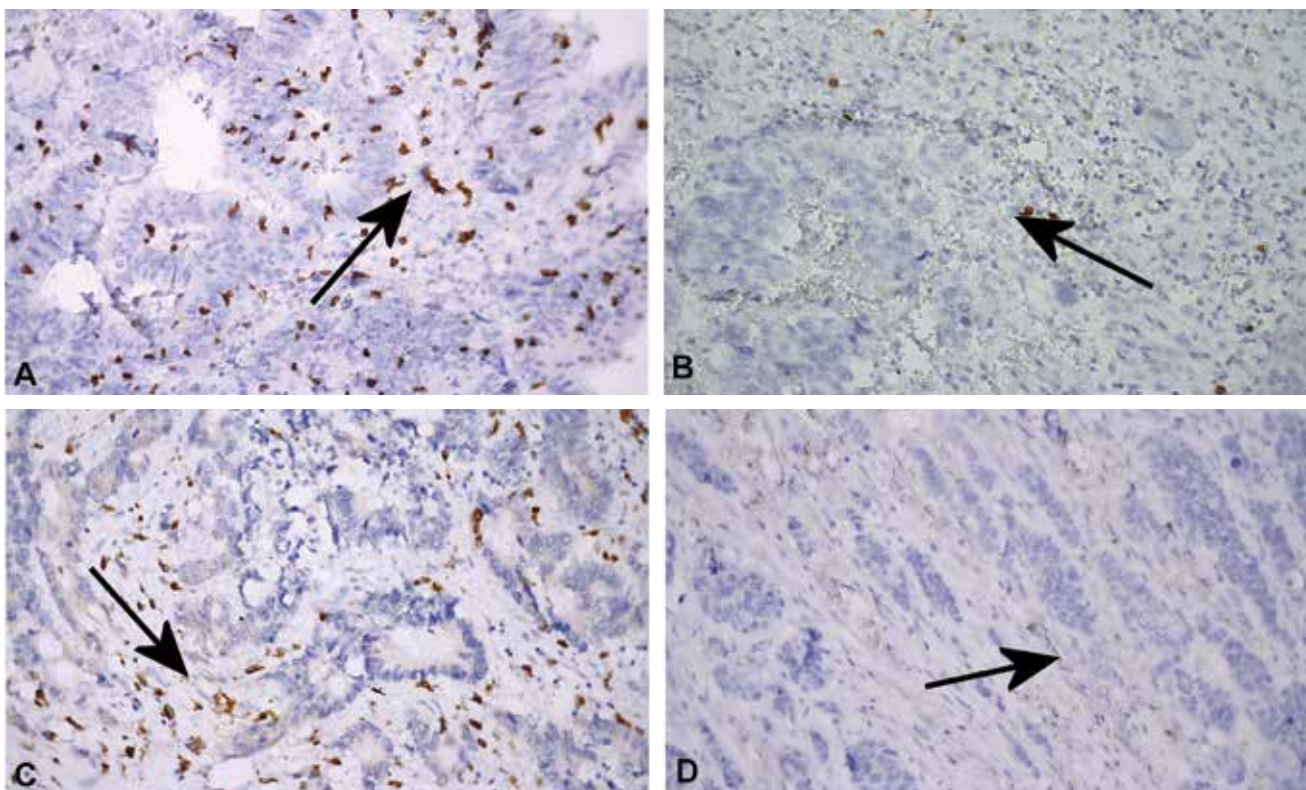
Preparáty boli hodnotené vo svetelnom mikroskope. Miera infiltrácie tkaniva zápalovými bunkami s príslušným fenotypom bola hodnotená kvantitatívne v 3 náhodných poliach s použitím histomorfometrického softvéru ImageJ, v. 1,51 g<sup>(5)</sup> a vyjadrená ako percento proti celkovej ploche. Výsledky boli vyhodnotené štatisticky použitím štatistického softvéru Graph Pad Prism s použitím one-way ANOVA testu s následným Turkey post-testom, hodnoty  $p < 0,05$  boli považované za významné.

## Výsledky

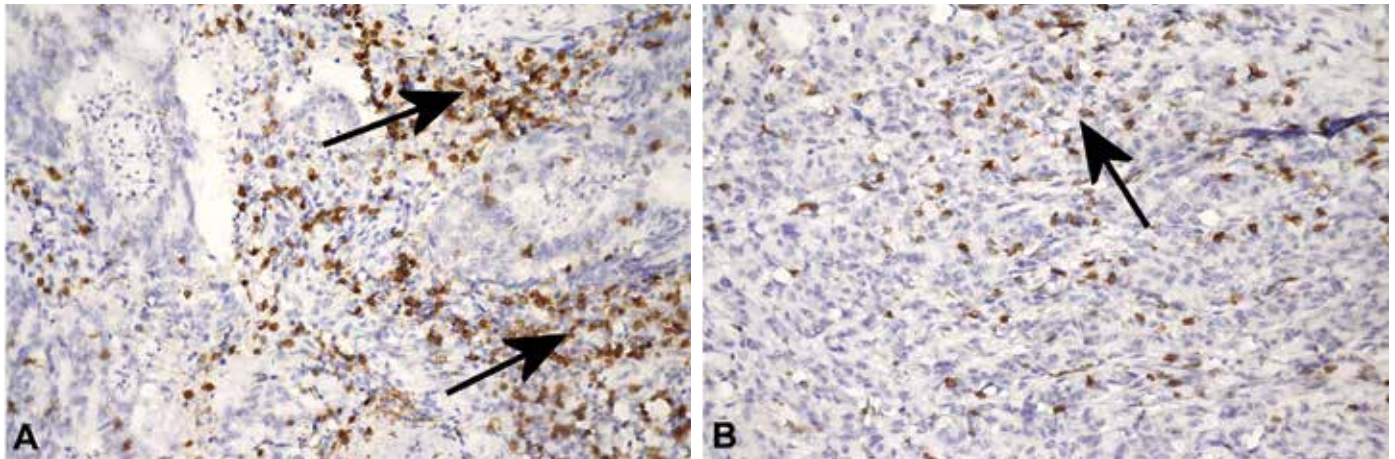
V nádoroch hrubého čreva aj v okolitom nepostihnutom tkanive pozorujeme prítomnosť CD8+ cytotoxických T-lymfocytov, CD4+ pomocných T-lymfocytov (**obrázok 1**) aj CD68+ histiocytov (**obrázok 2**), s dominanciou CD68+ buniek. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali významný pokles CD4+ (1,6 ± 0,43 % v G1 verus 0,33 ± 0,08 % v G2, verus 0,42 ± 0,17 % v G3, G1/G2  $p < 0,001$ , G1/G3  $p < 0,05$ ) aj pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov (3,1 ± 0,38 % v G1 verus 1,7 ± 0,3 % v G2 verus 0,61 ± 0,14 % v G3, G1/G2  $p < 0,05$ , G1/G3  $p < 0,01$ ). Pokles CD68+ histiocytov (5,3 ± 0,46 % v G1 verus 4,1 ± 0,51 % v G2 verus 3,44 ± 0,67 % v G3, G1/G2  $p = 0,05$ ) bol na hranici významnosti (**graf 1**).

Nepozorovali sme žiadne zmeny v podiele jednotlivých typov lymfocytov v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom (**graf 2**). Nepozorovali sme odlišný profil zápalových buniek v súvislosti s mucinóznou diferenciáciou nádoru, tá dosahovala úroveň približne rovnakú ako nádory so strednou diferenciáciou (G2).

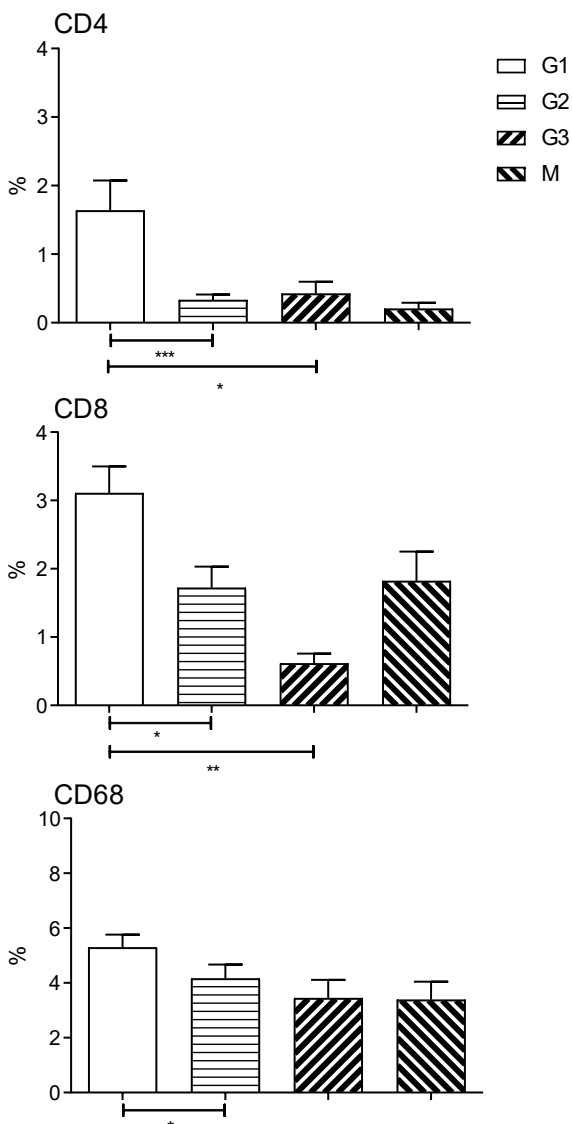
**Obrázok 1.** Infiltrácia adenokarcinómu hrubého čreva CD8+ cytotoxickými a CD4+ pomocnými T-lymfocytmi. So stúpajúcim gradingom nádoru pozorujeme významný pokles CD8+ cytotoxických a CD4+ pomocných T-lymfocytov (šípka) v tkanive adenokarcinómu hrubého čreva; G1 adenokarcinóm (A, resp. C), G3 adenokarcinóm (B, resp. D), IHC-Px, DAB, 200x



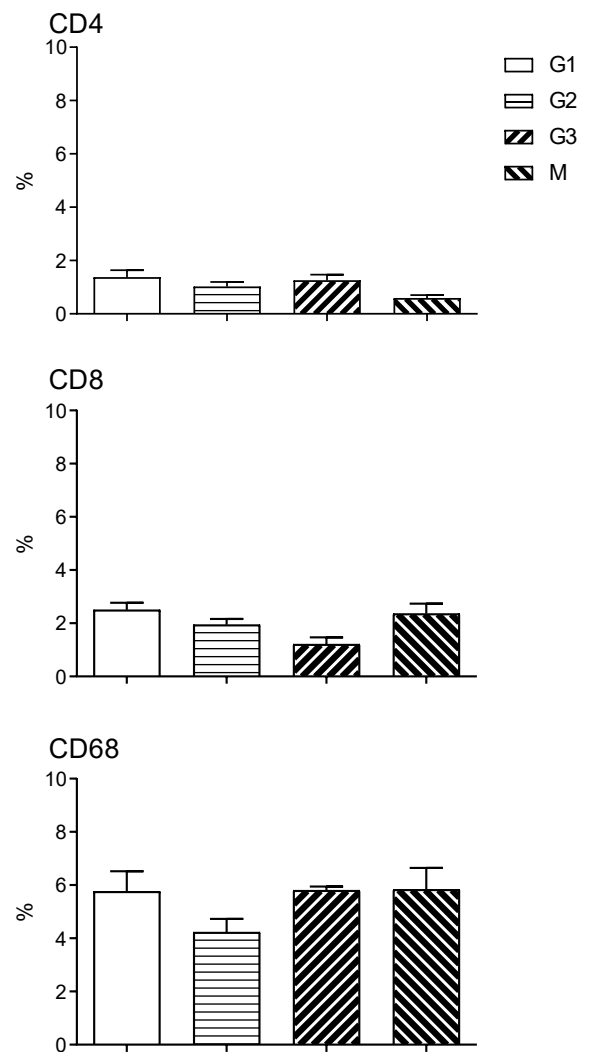
**Obrázok 2.** Infiltrácia adenokarcinómu hrubého čreva CD68+ histiocytmi. So stúpajúcim gradingom nádoru pozorujeme pokles CD68+ histiocytov (šípka) v tkanive adenokarcinómu hrubého čreva, ktorý je na hranici signifikantnosti; G1 adenokarcinóm (A), G3 adenokarcinóm (B), IHC-Px, DAB, 200x



**Graf 1.** Prítomnosť zápalových buniek v nádore hrubého čreva v závislosti od gradingu. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali signifikantný pokles CD4+ pomocných T-lymfocytov, CD68+ histiocytov aj pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov. \*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,01$ , uvedené %  $\pm$  SEM



**Graf 2.** Prítomnosť zápalových buniek v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom, v závislosti od gradingu pôvodného nádoru, uvedené %  $\pm$  SEM



## Diskusia

Kolorektálny adenokarcinóm patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce gastrointestinálne malignity s vysokou mortalitou napriek dostupnej liečbe. Ukazuje sa, že samotný staging založený na TNM klasifikácii kolorektálneho karcinómu nie je dostatočne presný z hľadiska predikcie prognózy pri všetkých štádiách choroby<sup>(6)</sup>. Súčasný výskum vedie k hľadaniu prognostických markerov, ktoré by lepšie stratifikovali pacientov. Prospešné by mohlo byť aj hodnotenie pacientov založené na imunologickom profile nádorového mikroprostredia<sup>(7)</sup>.

Počet vedeckých dôkazov podporujúcich význam imunitnej odpovede pri nádorových chorobách neustále rastie<sup>(3)</sup>. Súčasná terapeutická metóda používaná v liečbe kolorektálneho karcinómu (cytotoxická chemoterapia, anti-EGFR protilátky, anti-angiogénne molekuly) čiastočne súvisia s imunomodulujúcimi mechanizmami a imunoterapia preukázala svoj potenciál aj v prípadoch, keď zlyháva klasická liečba<sup>(8-10)</sup>. Kolorektálny karcinóm je známy tvorbou vysokoimunogénnych nádorových neoantigénov a je sprevádzaný zvýšenou infiltráciou tkaniva zápalovými bunkami, ktorú sme pozorovali aj v našej štúdií. Tento mechanizmus je mimoriadne zaujímavý najmä v prípade nádorov s mikrosatelitovou instabilitou (MSI), kde vznikajú presne definované nádorové neoantigény v dôsledku známych molekulárnych dráh zasiahnutých mutáciou (tzv. frameshift peptidy)<sup>(11)</sup>.

Lymfocyty infiltrujúce tumor (TIL) a makrofágy asociované s nádorom (TAM) sú lokalizované v zápalovom infiltráte okolo nádorových ostrovčekov a taktiež v perinádorovej TAM patria medzi dominantné zápalové bunky v nádorovej stróme. Správajú sa ako modulátory mikroprostredia pomocou vylučovania cytokínov, chemokínov, rastových faktorov a angiogénnych faktorov<sup>(12)</sup>. To súhlasí aj s dominanciou CD68+ zápalových buniek v nádorovom tkanive nami pozorovanou. Úloha TAM v nádore je dvojitá. TAM môžeme deliť do dvoch podskupín: M1 makrofágy zabezpečujú protinádorovú

odpoveď a cytotoxicitu a M2 makrofágy, ktoré, naopak, potlačením protinádorovej imunitnej odpovede podporujú nádorovú progresiu<sup>(13,14)</sup>. Z TIL majú kľúčovú úlohu cytotoxické T-lymfocyty CD8+, ktoré môžu rozpoznať nádorové antigény prezentované APC bunkami. Cytotoxické T-lymfocyty sa následne aktivujú pomocou kostimulátorových molekúl a syntetizujú a vylučujú cytotoxické proteíny podieľajúce sa na priamej deštrukcii nádorových buniek. Vysoká hustota CD8+ lymfocytov v nádorovom tkanive je spojená s lepšou prognózou choroby<sup>(12)</sup>.

Je zaujímavé, že v našom súbore sme pozorovali pokles CD8+ lymfocytov aj ostatných pozorovaných zápalových buniek v závislosti od rastúceho gradingu a stúpajúcej agresivity tumoru. Môže to podporovať predstavu o imunopresívnom pôsobení nádorového mikroprostredia<sup>(4)</sup>, ktoré môže byť dôležitým faktorom progresie choroby aj pri vzniku vzdialených metastáz<sup>(15)</sup>. Viaceré štúdie preukázali, že imunitná odpoveď koreluje s lepším prežívaním pacientov s kolorektálnym karcinómom<sup>(16,17)</sup>.

Predložená štúdia naznačuje, že v súvislosti so zvyšujúcim sa gradingom nádoru dochádza k poklesu intenzity protinádorovej imunitnej odpovede. Tento pokles môže byť následkom, ale aj príčinou progresie tumoru. Práve ovplyvnenie protinádorovej imunitnej odpovede môže predstavovať potenciálne zaujímavý terapeutický prístup.

**Podakovanie:** Štúdia bola realizovaná s podporou projektu APVV-14-0318 „Analýza mikroRNA a charakterizácia expresie vybraných proteínov v cirkadiálnom kontexte ako prognostický biomarker pre kolorektálny karcinóm“. Štúdia bola parciálne realizovaná ako súčasť práce výskumného centra vybudovaného vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj preprojekt: „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaná zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. ECIS – European Cancer Information System. 2019; European Union.
2. Curtis NJ, Primrose JN, Thomas GJ, et al. The adaptive immune response to colorectal cancer: from the laboratory to clinical practice. *Eur J Surg Oncol* 2012; 38(10): 889-96.
3. de la Cruz-Merino L, Henao Carrasco F, Vicente Baz D, et al. Immune microenvironment in colorectal cancer: a new hallmark to change old paradigms. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 174149.
4. Naidoo J, Page DB, Wolchok JD. Immune modulation for cancer therapy. *Br J Cancer* 2014; 111(12): 2214-9.
5. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004; 11(7): 36-42.
6. Liu Q, Luo D, Cai S, et al. P-TNM staging system for colon cancer: combination of P-stage and AJCC TNM staging system for improving prognostic prediction and clinical management. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 2303-2314.
7. Nearchou A, Pentheroudakis G. The significance of tumor-associated immune response in molecular taxonomy, prognosis and therapy of colorectal cancer patients. *Ann Transl Med* 2016; 4(14): 271.
8. Pernot S, Terme M, Voron T, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3738-50.
9. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015; 5(1): 43-51.
10. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010; 28(19): 3167-75.
11. Kloor M, von Knebel Doeberitz M. The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. *Trends in Cancer* 2016; 2(3): 121-133.
12. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, et al. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017; 1867(1): 1-18.
13. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017.
14. Grizzi F, Basso G, Borroni EM, et al. Evolving notions on immune response in colorectal cancer and their implications for biomarker development. *Inflamm Res* 2018; 67(5): 375-389.

15. Donahue T, Lee CY, Sanghvi A, et al. Immunosuppression is an independent prognostic factor associated with aggressive tumor behavior in cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2015; 73(3): 461-6.

16. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20): 6412-20.

17. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, et al. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137(4): 1270-9.

---

**MUDr. Erika Gaálová**

Medicyt, s. r. o.

Galvaniho 17/C, P.O.Box 145, 820 16 Bratislava

e-mail: erika.gaalova@medicyt.sk