

Protinádorová imunita v nádoroch štítnej žľazy

Barbora Šajbidorová¹, Pavol Janega^{2,3}

¹Euromedix, a. s., Bratislava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Vznik nádorov je sprevádzaný aktiváciou protinádorovej imunity, ktorá má potenciál ovplyvňovať biologické správanie vzniknutého tumoru. Cieľom predloženej práce bolo opísať imunitnú odpoveď v nádorovo transformovanom tkanive štítnej žľazy. Hodnotili sme 40 histologických vzoriek rôznych typov folikulárnych lézií štítnej žľazy zahrňujúcich vzorky benígnych folikulárnych adenómov, malígnych folikulárnych karcinómov, ako aj nenádorových folikulárnych strúm. V práci sme sa zamerali na imunofenotypizáciu jednotlivých zložiek imunitnej odpovede. Ukazuje sa, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná. V nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali zmiešanú chronickú zápalovú infiltráciu s dominanciou histiocyto-
v a B-lymfocytov s nižším podielom T-lymfocytov, a to najmä v benígnych adenómoch. Napriek celkovo nízkemu podielu T-lymfocytov výsledky realizovanej štúdie ukázali významný vzostup infiltrácie tkaniva malígneho folikulárneho karcinómu CD4+ pomocnými T-lymfocytmi v porovnaní s benígnym adenómom a kontrolnou skupinou. Ukazuje sa, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná. Rozšírenie znalostí o úlohe jednotlivých buniek imunity môže predstavovať dôležitú cestu výskumu v pochopení nádorových procesov v tkanive štítnej žľazy.

Kľúčové slová: štítna žľaza, nádory štítnej žľazy, protinádorová imunita

Antitumour immunity in tumours of the thyroid gland

Tumour genesis is accompanied by the activation of antitumour immunity, which has the potential to influence the biological behaviour of the tumour. The present study aimed to describe the immune response in transformed thyroid tissue. We evaluated 40 histological samples of different thyroid follicular lesions, including benign follicular adenomas, malignant follicular carcinomas, and non-neoplastic follicular goitre. The study focused on immunophenotyping of the various components of the immune response. It appears that the antitumor immune response in follicular thyroid lesions is only weak and insignificant. The mixed chronic inflammatory infiltration in thyroid tumours with a predominance of histiocytes and B-lymphocytes were observed. T lymphocytes were less prominently represented. The study showed a significant increase in tissue infiltration by CD4+ helper T-lymphocytes in malignant follicular carcinomas compared to benign adenomas and control goitres. Expanding the knowledge of the role of individual immune cells may represent an important perspective of research in understanding neoplastic transformation in thyroid tissue.

Keywords: thyroid, thyroid tumours, anti-tumour immunity

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 9 – 13

Úvod

Nádory štítnej žľazy patria medzi závažné onkologické choroby endokrinného systému. Postihujú najmä ženskú populáciu. Zahrňujú široké spektrum nádorov, kde skorá diagnostika má význam pre prognózu pacientov. Problém predstavujú pacienti s neskoro diagnostikovanou chorobou so vzdialenými orgánovými metastázami, prípadne diagnostikovaní v inoperabilnom štádiu. Z histologického pohľadu je problematická najmä diferenciálna diagnostika benígnych a malígnych nádorov s folikulárnou diferenciáciou⁽¹⁾.

Nádorové mikroprostredie významnou mierou ovplyvňuje biologické vlastnosti nádoru. Dôležitou súčasťou nádorového mikroprostredia je aj protinádorová imunita. Prítomnosť lymfocytov infiltrujúcich tumor (TIL) sa ukazuje ako potenciálne zaujímavý prognostický a prediktívny marker inváziv-

neho správania mnohých nádorov. Pochopenie úlohy imunitnej odpovede na progresiu malignity môže mať významný klinický dosah. Tieto znalosti sú stavebným kameňom imunomodulačnej terapie a potenciálnej prevencie invázivného rastu nádorov. Ovplyvnenie vzájomného pôsobenia medzi nádorom a imunitou jedinca predstavuje sľubnú oblasť výskumu onkologickej terapie⁽²⁾.

Dôležité efektorové bunky imunitného systému zasahujúce priamo nádorové bunky predstavujú najmä skupiny NK buniek (NK) a cytotoxických T-lymfocytov. Svoju úlohu zohráva aj nešpecifická imunita, zahrňujúca skupiny makrofágov, dendritických buniek a polymorfonukleárov. Tá predstavuje prvú obrannú líniu v boji proti transformovaným bunkám⁽³⁾. Je dôležitá aj pri iniciácii a nasmerovaní adaptívnej imunitnej odpovede sprostredkovanou lymfocytmi. Klinické štúdie

ukazujú, že schopnosť malígnych buniek uniknúť pred imunitným systémom a tumorom vyvolaná imunosupresia predstavujú vážnu prekážku úspešnej terapie. Prostredníctvom tzv. krycích mechanizmov sú nádorové bunky schopné spoľahlivo uniknúť imunitnej odpovedi.

Cieľom práce bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunitnej odpovede vo folikulárnych tumoroch štítnej žľazy. Práve folikulárne tumory predstavujú zaujímavý model nádorovej transformácie zahrňujúce spektrum histologicky a fenotypicky podobných chorobných zmien, s benígnym ako aj malígnym správaním. Práca bola parciálnou súčasťou diplomovej práce „Chorobné zmeny štítnej žľazy, úloha sialyzácie a imunity v nádoroch štítnej žľazy“ obhájenej na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave v roku 2021⁽⁴⁾.

Metodika

Základný súbor pre analýzu imunoprofilu buniek protinádorovej imunity v nádoroch štítnej žľazy tvorili prípady folikulárnych adenómov a folikulárnych karcinómov. Ako kontrola boli hodnotené vzorky parenchymatóznej folikulárnej strumy. Súbor zahrňoval 12 prípadov benígnych folikulárnych adenómov, 18 prípadov malígnych folikulárnych karcinómov a 10 prípadov folikulárnych strúm bez nádorovej transformácie hodnotených ako kontrolná skupina.

Preparáty sme farbili imunohistochemicky na prítomnosť CD4+ pomocných a CD8+ cytotoxických T-lymfocytov, CD20+ B-lymfocytov a CD68+ histiocytov. Odparafínované rezy boli opláchnuté 3x 5 minút v PBS (fosfátmi pufovanom fyziologickom roztoku, 0,005 % Tween s pH 7,2) a revitalizované s použitím Dako PT Link (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) pri pH 8.0. Preparáty boli následne inkubované 1 hodinu s roztokom primárnej protilátky pri izbovej teplote.

Použili sme:

- CD4 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD8 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD20 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD68 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use

Po prepláchnutí 3x 5 minút v PBS boli preparáty inkubované 20 minút so sekundárnou protilátkou tvorenou polymérom proti králičím a myšacím proteínom konjugovaným s chrenovou peroxidázou Envision (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) a po prepláchnutí 3x 5 minút v PBS farbené 5 minút roztokom diaminobenzidínu. Preparáty boli následne dofarbené 40 sekúnd v roztoku hematoxylínu.

Infiltrácia tkaniva príslušnými bunkami bola vyjadrená počtom buniek na 1 zorné pole (200x zväčšenie), rátané v 5 zorných poliach. Výsledky boli normalizované voči priemernému počtu zápalových buniek v kontrolnej parenchymatóznej strume.

Výsledky boli vyhodnotené štatisticky pomocou Graph Pad Prism (ver. 9.0). Výsledky boli analyzované použitím Kruskal-Wallisovho neparametrického testu s následným Dunnovým posttestom a vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM. Hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

V nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali zmiešanú chronickú zápalovú infiltráciu s dominanciou najmä CD68+ histiocytov a následne CD20+ B-lymfocytov. CD4+ a CD8+ T-lymfocyty boli zastúpené menej nápadne.

Hodnotenie zastúpenia CD8+ cytotoxických T-lymfocytov preukázalo slabú a ložiskovú infiltráciu vo vzorkách benígneho folikulárneho adenómu a kontrolnej parenchymatóznej strumy. Nižší stupeň infiltrácie tkaniva CD8+ lymfocytmi prítomný vo vzorkách folikulárneho karcinómu, kde boli zachytené len nepočtetné CD8+ cytotoxické T-lymfocyty, nebol štatisticky významný.

Vo vzorkách kontrolnej parenchymatóznej strumy a benígneho folikulárneho adenómu boli pozorované len nepočtetné CD4+ pomocné T-lymfocyty. Signifikantne významnejšiu infiltráciu pomocných T-lymfocytov, a to najmä s vnútronádorovou lokalizáciou, sme zachytili v prípadoch malígneho folikulárneho karcinómu.

Hodnotenie zastúpenia CD20+ B-lymfocytov nepreukázalo významné rozdiely medzi skupinami, CD20+ lymfocyty boli prítomné len ojedinele, fokálne sme zachytili konglomeráty CD20+ B-lymfocytov, lokalizované najmä perivaskulárne.

Tkanivo štítnej žľazy bolo najvýraznejšie infiltrované CD68+ histiocytmi, ktoré vykazovali difúznú pozitivitu. Vo vzorkách folikulárneho adenómu bola badateľná pravidelná a stredne silná infiltrácia histiocytmi, a to najmä v okolí ciev. Nepozorovali sme rozdiely medzi hodnotenými skupinami.

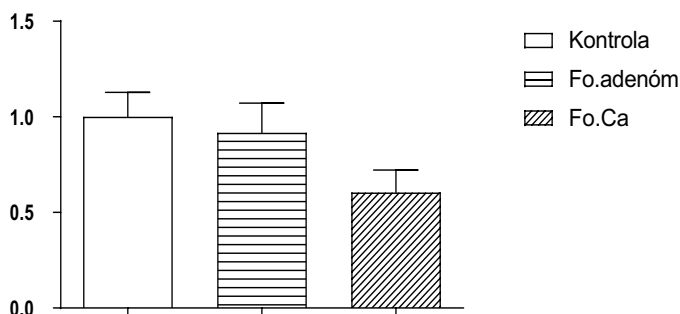
Diskusia

Viaceré vedecké štúdie už v minulosti preukázali, že nádorová transformácia vedie k vzniku nových proteínov, ktoré nie sú vlastné samotnému organizmu. Organizmus ich vníma ako cudzorodé a dochádza k aktivácii imunitného systému. Pochopenie princípov protinádorovej imunity sa v súčasnosti stáva výzvou pre vedecký výskum a otvára nové možnosti terapie nádorových chorôb. Realizovaná práca mala za cieľ posúdiť protinádorové imunitné mikrostredie v rôznych nádoroch štítnej žľazy. Výhodou práce boli poznatky o zmenách sialyzácie bunkových glykokonjugátov počas patologických zmien v tkanive štítnej žľazy^(1,5), keďže práve povrchová sialyzácia výraznou mierou ovplyvňuje schopnosť imunitného systému rozpoznávať antigény.

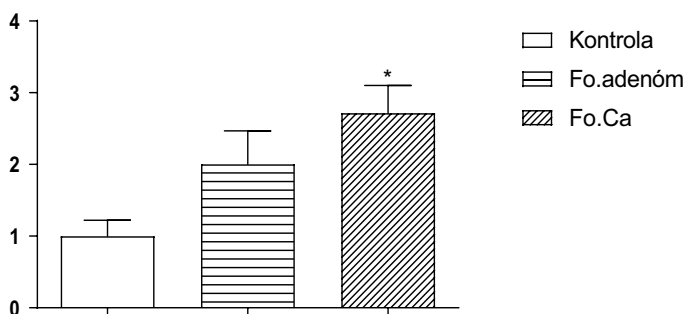
Infiltrácia štítnej žľazy zápalovými bunkami je známy fenomén sprevádzajúci pomerne časté autoimunitné zápaly štítnej žľazy. Imunitný systém zohráva úlohu aj v patogenéze nádorových chorôb. Pomalá progresia nádorového procesu pri diferencovaných karcinómoch môže byť sčasti vysvetlená podielom imunitnej odpovede, ktorá limituje rast tumoru a proces metastázovania⁽⁶⁾. V našej štúdii sme však ukázali, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná.

Pri hodnotení zastúpenia buniek imunity pri nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali klesajúci trend infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi v závislosti od nádorovej transformácie. Prípady folikulárneho karcinómu vykazovali len veľmi slabú a nepravidelnú infiltráciu. Rozdiel síce nebol štatisticky významný, ide však o zaujímavý nález, ktorý môže mať význam pri regulácii imunitnej odpovede v organizme. Jednou z príčin môže byť práve vzostup sialyzácie bunkových glyko-

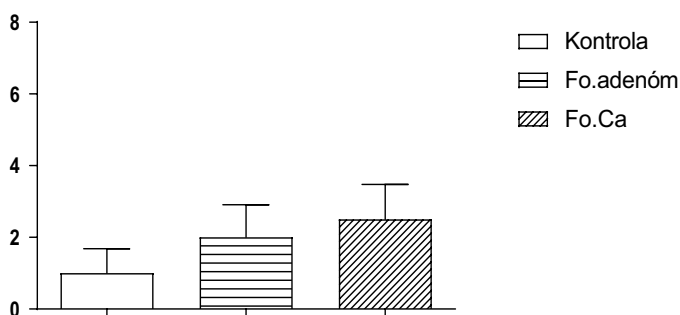
Obrázok 1. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD8+ cytotoxickými T-lymfocyty. CD8+ cytotoxické T-lymfocyty boli prítomné v tkanive len ojedinele. Nepozorovali sme signifikantný rozdiel v infiltrácii medzi jednotlivými skupinami.



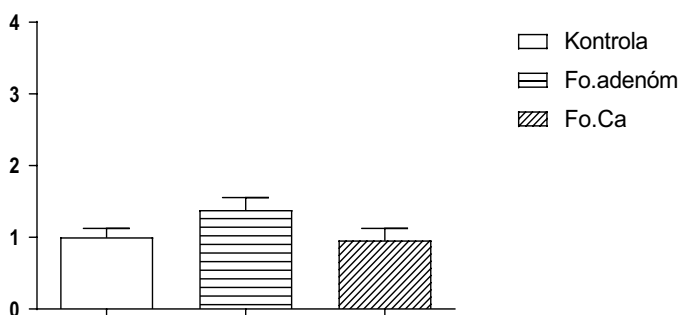
Obrázok 2. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD4+ pomocnými T-lymfocyty. Vo vzorkách folikulárneho karcinómu sme pozorovali signifikantne vyššiu infiltráciu tkaniva v porovnaní s kontrolnou parenchymatóznou folikulárnou strumou.



Obrázok 3. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD20+ B-lymfocyty. Nepozorovala som signifikantné rozdiely v infiltrácii tkaniva CD20+ B-lymfocytov medzi jednotlivými skupinami.



Obrázok 4. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD68+ histiocytmi. Nepozorovala som signifikantné rozdiely v infiltrácii tkaniva CD68+ histiocytmi medzi jednotlivými skupinami.



konjugátov v malígnych nádoroch štítnej žľazy, ktorá dokáže maskovať ich rozpoznávacie miesta⁽¹⁾.

Infiltrácia tumorov štítnej žľazy bunkami protinádorovej imunity je podľa realizovaných výskumov asociovaná s lepším prežívaním pacientov^(7,8). CD8+, CD4+ T-lymfocyty ako aj infiltrácia B-lymfocyty sa dáva do spojitosti s menšími rozmermi nádorovej masy⁽⁸⁾. Uvažuje sa, že by nižšia infiltrácia tkaniva lymfocyty pri karcinómoch mohla byť asociovaná s horšou prognózou prežívania ako aj väčšími nádorovými léziami z dôvodu deprívácie protinádorovej imunity. Na druhej strane však predstavuje prítomnosť CD8+ T-lymfocytov nezávislý rizikový faktor recidívy choroby⁽⁹⁾. Autori uvažujú že práve ich vysoký podiel vedie k tomu, že sa stávajú nereaktívnymi proti nádorovému antigénu a neparticipujú na deštrukcii nádorových buniek. Z toho hľadiska nemusí nami pozorovaný trend poklesu infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocyty naznačovať nevyhnutne schopnosť malígnych buniek unikať pred rozpoznávacou schopnosťou imunitných mechanizmov jedinca a môže skôr poukazovať na zmenenú reguláciu protinádorovej imunity v tkanive.

Opačný nález ako pri CD8+ cytotoxických T-lymfocytov sme pozorovali pri analýze CD4+ pomocných T-lymfocytov, kde infiltrácia tkaniva bola, naopak, signifikantne vyššia v prípade folikulárneho karcinómu v kontraste s nízkymi hodnotami v prípade folikulárneho adenómu a nenádorovej parenchymatóznej strumy. Práve CD4+ T-bunky sú ústrednou zložkou v riadení imunitnej odpovede. Naivné CD4+ T-bunky majú schopnosť di-

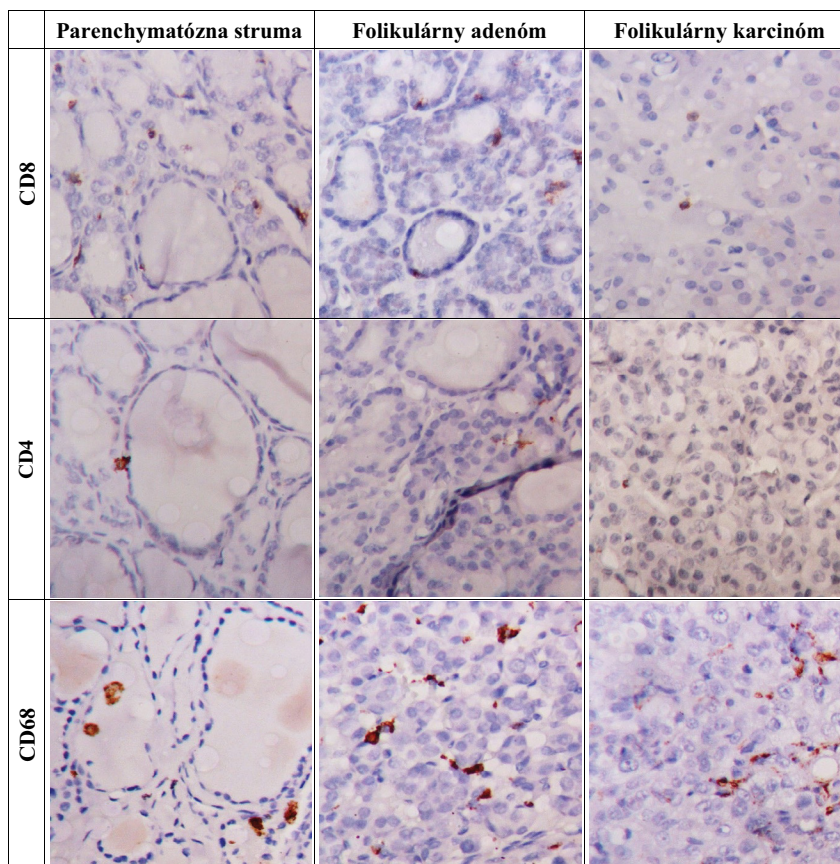
ferenciácie na jednu zo 4 odlišných funkčných skupín. Th1 diferenciácia je dôležitá najmä pre podporu cytotoxickej odpovede sprostredkovej CD8+ T-lymfocyty. Navyše produktom týchto buniek je IFN- γ , ktorý významne ovplyvňuje imunogenézu nádorových buniek, a teda je významný pri rozpoznávaní a eliminácii malígne transformovaných buniek⁽¹⁰⁾.

Práve CD4+ T-lymfocyty sa ukazujú dominantné aj v malígnom papilárnom karcinóme. Vysoké zastúpenie CD4+ T-lymfocytov bol pozorovaný najmä v tumoroch väčších rozmerov⁽¹¹⁾. Tieto poznatky by mohli podporovať aj vyšší podiel CD4+ T-lymfocytov v prípade malígneho folikulárneho karcinómu opísaného v našej štúdii.

CD20+ B-lymfocyty ani CD68+ histiocytmi nejavili nápadnejšie rozdiely pri porovnaní sledovaných skupín a prevažne vykazovali len ojedinelú ložiskovú pozitivitu lokalizovanú najmä perivaskulárne, menšie zastúpenie som pozorovala v prípade parenchymatóznej folikulárnej strumy a v prípade folikulárneho karcinómu bolo základnou spoločnou črtou vzoriek zhlukovanie histiocytov.

Bychkov a spol. poukázali na rozdiely v percentuálnom zastúpení membránovej expresie CD20+ v prípade malígneho papilárneho karcinómu (8,4 %) a v prípade benígneho folikulárneho adenómu, v ktorom uviedli kompletnú absenciu imunoreaktivity⁽¹²⁾. V našom prípade hodnotenie zastúpenia CD20+ B-lymfocytov nepreukázalo signifikantné rozdiely medzi skupinami, CD20+ lymfocyty boli prítomné ložiskovo a v minimálnych intenzitách.

Obrázok 5. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy imunitnými bunkami. Vo folikulárnych léziách štítnej žľazy sme pozorovali len slabú a nepravidelnú infiltráciu CD8+ cytotoxickými a CD4+ pomocnými T-lymfocyty. V tkanive dominovala najmä prítomnosť CD68+ histiocytov. IHC -Px, 200x



Publikované vedecké práce zdôrazňujú prevahu infiltrácie tkaniva CD68+ histiocytmi v malígnych nádoroch. Opísaná bola signifikantne výraznejšia pozitivita aj v prípadoch malígneho folikulárneho karcinómu v porovnaní s benígnym folikulárnym adenómom. Otázna zostáva miera dôležitosti týchto buniek v procese progresie a invázie tumoru⁽¹³⁾. V našom súbore sme takéto zmeny nepotvrdili.

Blížšie pochopenie imunitného mikroprostredia je žiaduce najmä z hľadiska možnosti využitia týchto poznatkov v rám-

ci diagnostického a terapeutického plánu. Je dokázané, že rôzne bunky imunity hrajú významnú úlohu v procese tumorigenézy a ovplyvňujú prognózu prežívania pacientov. Aj keď naša práca nepreukázala výraznú aktiváciu protinádorovej imunity vo folikulárnych léziách štítnej žľazy, ponúka nový pohľad na imunitné procesy pri nádorovej transformácii. Tieto poznatky majú význam pre výskum nových metód cielej imunoterapie pri onkologických léziách štítnej žľazy v budúcnosti.

LITERATÚRA

1. Babal P, Janega P, Cerna A, et al. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem* 2006; 108(2): 133-40.
2. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 991-8.
3. Liu Y, Zeng G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother* 2012; 35(4): 299-308.
4. Sajbidorova B. Chorobné zmeny štítnej žľazy, úloha sialyzácie a imunity v nádoroch štítnej žľazy. In: *Institute of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine*. 2021; Comenius University: Bratislava.
5. Janega P, Cerna A, Kholova I, et al. Sialic acid expression in autoimmune thyroiditis. *Acta Histochem* 2002; 104(4): 343-7.
6. French JD, Haugen BR. Thyroid-Specific T Cells in Patients With Differentiated Thyroid Cancer: Implications for Immune-Based Therapies? *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(7): 2131-2132.
7. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565-70.
8. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77(6): 918-25.
9. Cunha LL, Marcello MA, Nonogaki S, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and COX2 expression may predict relapse in differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 83(2): 246-53.
10. Dighe AS, Richards E, Old LJ, et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994; 1(6): 447-56.
11. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, et al. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(5): 2325-33.

12. Bychkov A, Jung CK. Aberrant expression of CD20 in thyroid cancer and its clinicopathologic significance. *Hum Pathol* 2018; 71: 74-83.

13. Proietti A, Ugolini C, Melillo RM, et al. Higher intratumoral expression of CD1a, tryptase, and CD68 in a follicular variant of papillary thyroid carcinoma compared to adenomas: correlation with clinical and pathological parameters. *Thyroid* 2011; 21(11): 1209-15.

MUDr. Barbora Šajbidorová

Plickova 5, 831 06 Bratislava

e-mail: barb.sajbidorova@gmail.com