

DOI: 10.26693/jmbs03.06.188

УДК 616.441-006.04.-092-071(075.8)

Черненко О. В.¹, Сулаєва О. М.², Чуба В. Я.², Огризько Т. В.¹, Ларін О. С.¹

РОЛЬ МАКРОФАГІВ У ПРОГРЕСУВАННІ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

¹Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин, Відділ патології, Київ, Україна

²“CSD Health Care”, Патоморфологічна лабораторія, Київ, Україна

oksana.sulaieva@gmail.com

Метою даного дослідження була оцінка можливих імунно-опосередкованих механізмів розвитку та прогресування папілярного раку щитоподібної залози, а саме оцінка кількості та виду макрофагів, асоційованих з пухлинами та їх асоціацію з характеристиками папілярного раку щитоподібної залози. Згідно отриманих даних, папілярний рак щитоподібної залози був пов'язаний з великою кількістю макрофагів ($P < 0,0001$). Також був виявлений тісний зв'язок між кількістю M2-макрофагів і метастазами в лімфатичні вузли ($OR=8,56$; $95\%CI$ 2,46-28,22; $P=0,0004$). Кількість M2 макрофагів була пов'язана з виразним ангиогенезом та зростанням кількості мікросудин ($P=0,006$) та експресією VEGF ($P < 0,0001$). Експресія VEGF варіювала від низької до високої, та корелювала зі ступенем інфільтрації ($r=0,677$; $P < 0,001$) та кількістю M2 макрофагів ($r=0,812$; $P < 0,0001$). Таким чином, зростання кількості CD163+ макрофагів у межах папілярного раку щитоподібної залози асоційоване з підвищенням ризику метастазування у регіональні лімфатичні вузли за рахунок посиленої експресії VEGF, активації ангиогенезу та підвищення інвазивності пухлинних клітин.

Ключові слова: папілярний рак щитоподібної залози, метастази, макрофаги.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи «Механізми пухлинної прогресії: молекулярна генетика, мікрооточення та метаболізм пухлинних клітин» (№ держреєстрації 01-18U000554)

Вступ. Рак щитоподібної залози (РЩЗ) у всьому світі на сьогодні є найбільш швидко зростаючим різновидом ендокринних неоплазій, що посідає 5 місце за поширеністю серед жінок [1]. На сьогодні загально визнано, що окрім таких факторів, як стать і вік хворих, розмір та сонографічних характеристики пухлини, важливу роль у визначенні кінцевого діагнозу, прогнозування перебігу пухлинно-

го процесу та тактики лікування важливу роль відіграє визначення гістологічного типу папілярного раку щитоподібної залози (ПРЩЗ) [2, 7]. Незважаючи на відносно сприятливий прогноз, у багатьох випадках ПРЩЗ метастазує у регіональні лімфатичні вузли, що впливає на об'єм оперативного втручання, та подальшу якість життя хворих [8]. Багаторічне вивчення та спостереження хворих на ПРЩЗ дозволило достовірно визначити роль запалення у прогнозуванні перебігу РЩЗ [5, 14]. При цьому запалення з одного боку відбиває реакцію організму на пухлинний процес, а з іншого може сприяти розвитку та прогресуванню злоякісного пухлинного процесу [13]. Відомо, що стромальні та рекрутовані клітини в межах пухлини формують особливе мікрооточення, що може модулювати біологічну поведінку пухлинних клітин [4, 6]. Важливим представником пухлинного мікрооточення є макрофаги [5]. Ці клітини є джерелом широкого спектру речовин, включаючи трансформуючий фактор росту β (TGF- β), фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкін 10 (IL-10), фактор росту судинного ендотелію (VEGFs) тощо [7]. Ці речовини можуть впливати на розвиток та прогресування пухлин, модулюючи швидкість проліферації, міграційну активність, рівень диференціювання, ангиогенез та ін. Проте, як впливають різні типи макрофагів на прогресування ПРЩЗ та через які механізми, відомо мало.

Метою даного дослідження було вивчення кількості та розподілу різних видів макрофагів у межах ПРЩЗ та їх зв'язок з клініко-морфологічними характеристиками.

Матеріали та методи дослідження. До дослідження були включені пацієнти з гістологічно підтвердженим ПРЩЗ ($n=60$) та фолікулярною аденомою ($n=27$), які проходили обстеження та лікування на базі Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України. На першому етапі було проведено збір клініко-демографічних даних, включаючи вік, стать, локалізацію та розмір пухли-

ни. До дослідження були включені пацієнти віком від 21 до 75 років. Серед пацієнтів з ПРЦЗ, включених у дослідження, було 48 жінок (80%) та 12 (20%) чоловіків. Середній вік хворих складав $43,2 \pm 0,9$ років і не відрізнявся від такого від групи порівняння – пацієнтів з ФА. Середній розмір пухлин серед пацієнтів з ПРЦЖ складав $1,53 \pm 0,28$ см і був дещо вищим у хворих чоловічої статі ($1,68 \pm 0,14$ см) порівняно з жінками ($1,46 \pm 0,15$ см). При цьому у 9 хворих (15%) було визначено метастази у регіонарні лімфатичні вузли.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964–2013 рр.), ІСН GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

Діагностику гістологічного ПРЦЗ проводили відповідно до оновленої класифікації ВООЗ (2017) [2] та імуногістохімічне дослідження були виконані у патоморфологічній лабораторії CSD Health Care. При стадіюванні ПРЦЗ використовували 8th edition AJCC [3]. Всі зразки патогістологічного матеріалу оцінювали на предмет наявності капсули, ознак екстракapsулярного поширення, лімфоваскулярної інвазії, ступеня лейкоцитарної інфільтрації всередині пухлини та за її межами [13]. Для аналізу кількості та розподілу макрофагів, асоційованих з ПРЦЗ було проведено імуногістохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл до CD68 (DAKO, клон KP1) та CD163 (Cell Marque, клон MRQ-26). Крім того, для оцінки взаємозв'язку між різними типами макрофагів та ангиогенезом була проведена оцінка експресії VEGF (DAKO клон VG1), як провідного стимулятора ангиогенезу. Отримані результати обробляли статистично у пакеті MedCalc.

Результати дослідження та їх обговорення. Морфологічне дослідження виявило, що ПРЦЗ був асоційований з наявністю інтратуморозної інфільтрації, виразність якої значно варіювала. Проте в будь-якому випадку при ПРЦЗ визначено статистично значуще збільшення кількості CD68+ клітин, яка перевищувала аналогічний показник не тільки в інтактних ділянках ЦЗ ($P < 0,0001$), а й в фолікулярній аденомі ($P < 0,001$). CD68+ клітини були розташовані в межах пухлини, а в деяких випадках – в капсулі навколо неї. Значна кількість CD68+ макрофагів була асоційована з інвазією пухлини у оточуючі тканини. Характерне, що кількість макрофагів корелювала з виразністю інтра- та перипухлинної інфільтрації ($r = 0,718$, $P < 0,001$).

Оцінка CD163+ макрофагів продемонструвала збільшення кількості цих клітин у ПРЦЗ порівняно

з інтактними ділянками щитовидної залози (рис. 1) тих же пацієнтів та ФА ($P = 0,002$). Ці клітини превалювали у стромі папілярних структур та в межах інфільтратів.

В роботі не було визначено взаємозв'язків між виразністю інфільтрації CD68+ і CD163+ клітинами та такими показниками, як вік і стать пацієнтів. Крім того, нами не було встановлено факту взаємозв'язку між кількістю макрофагів та білатеральністю та/чи мультифокальністю ПРЦЗ. Закономірно, що висока щільність M2-макрофагів була асоційована з підвищенням кровопостачання. Визначено прямий зв'язок між кількістю CD163+ клітин і мікросудин ($P = 0,006$), а також експресією VEGF ($P < 0,0001$). Імунопозитивна реакція на VEGF була виявлена в пухлинних клітинах та у клітинах стромы, що за своїм розташуванням відповідали локалізації M2-макрофагів і характеризувалися високою інтенсивністю (рис. 2).

В пухлинних клітинах експресія VEGF варіювала від низької до високої і корелювала зі ступенем інфільтрації ($r = 0,677$; $P < 0,001$) та кількістю M2 макрофагів ($r = 0,812$; $P < 0,0001$). Така знахідка підтверджує відомі факти про стимулюючий вплив M2-макрофагів на ангиогенез. Враховуючи роль ангиогенезу в пухлинній прогресії, закономірним був зв'язок між кількістю CD163+ клітин та ризиком лімфоваскулярної інвазії ($P = 0,03$), що свідчить про роль M2-макрофагів в прогресуванні ПРЦЗ (рис. 1). Крім того, визначено асоціацію між високою кількістю CD163+ клітин та наявністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли (OR = 8,56, 95% ДІ 2,46–28,22; $P = 0,0004$). Більш того, імуногістохімічне дослідження лімфатичних вузлів виявило статистично значуще зростання кількості CD163+ клітин в лімфатичних вузлах з метастатичним ураженням порівняно з такими без ознак метастазів (рис. 3).

Отримані результати по факту свідчать про роль макрофагів пухлинного мікрооточення у прогресуванні ПРЦЗ та розвитку метастазів. Макрофаги – одні з найважливіших клітин мікрооточення пухлини. Відомо, що джерелом формування пухлино-асоційованих макрофагів є моноцити, які трансформуються у два ключових типи макрофагів – M1 та M2 [4]. M1-тип макрофагів активується за класичним шляхом при дії патоген-асоційованих молекулярних патернів та прозапальних цитокинів (в першу чергу ФНП α та ІНФ γ) [7]. На відміну від цього, M2 макрофаги активуються за альтернативним шляхом у відповідь на екстраклітинні подразники чи за умов дії ІЛ-4 та ІЛ-13. M2 макрофаги є декількох фенотипів (M2a, M2b, M2c, M2d), вони продукують широкий спектр регуляторів, включи фактори росту, цитокини, металопротеїнази та хемоаттрактанти, і вважаються основним різновидом макрофагів асоційованих з

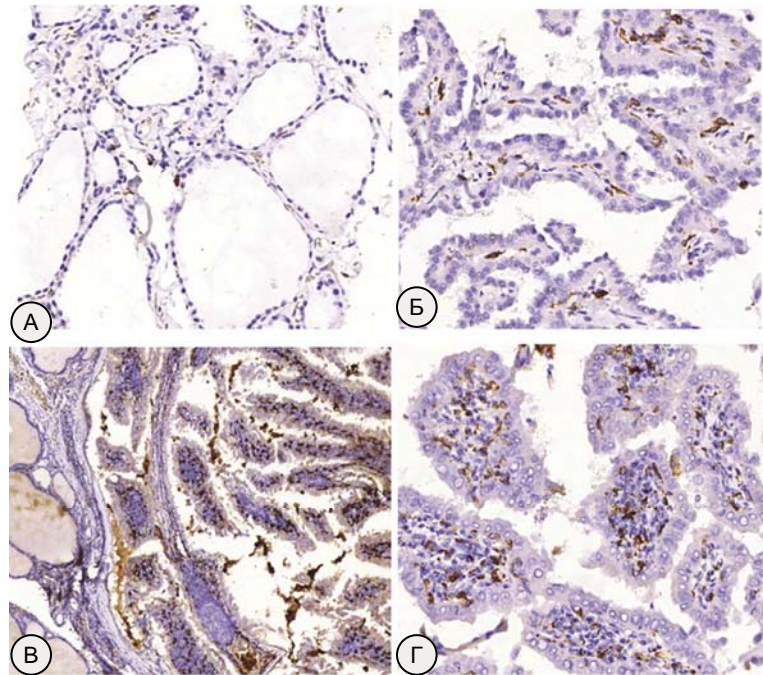


Рис. 1. Кількість CD163+ клітин у щитоподібній залозі:

А – інтактна щитоподібна залоза, Б – Папілярна карцинома без метастазів, В і Г – папілярна карцинома, метастазуюча до регіонарних лімфатичних вузлів. В – інтра- та перипухлинний розподіл значної кількості CD163+ клітин при метастазуючій папілярній карциномі ЩЗ. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до CD163+. 3б. А, Б, Г × 200; В – × 50

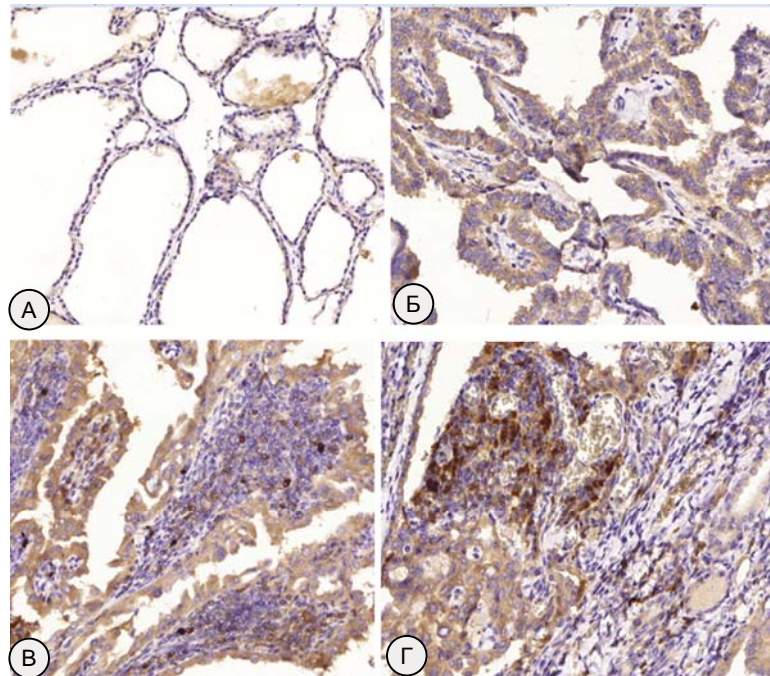


Рис. 2. Експресія VEGF у інтактній щитоподібній залозі (А) та ділянках папілярної карциноми без метастазів (Б) та с метастазами (В і Г). Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до VEGF. 3б. 200.

А – відсутня експресія VEGF у інтактній ЩЗ. Б – слабка експресія VEGF у фолікулярних клітинах та поодиноких стромальних клітинах у папілярній карциномі без ознак метастазів. В і Г – помірна експресія VEGF у фолікулярних клітинах та виразна експресія у клітинах пухлино-асоційованих інфільтратів в ділянці папілярної карциноми з ознаками метастазів у регіонарні лімфатичні вузли

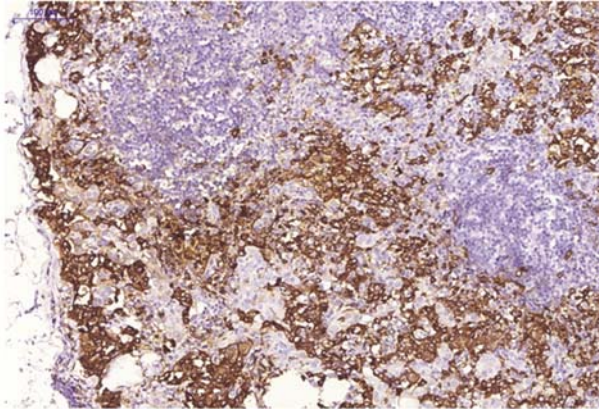


Рис. 3. Значна кількість CD163+ клітин у лімфатичному вузлі з ознаками метастазів папілярної карциноми. Імуногістохімічне дослідження. ЗБ. 100

пухлинами [4, 5, 8]. В карциномах ЩЗ M2 макрофаги можуть бути виявлені завдяки експресії CD68 (також експресується і M1 макрофагами), CD163,

CD206 та CD204 [6, 7]. На сьогодні вже продемонстрований зв'язок між кількістю M2-макрофагів та виразністю дедиференціювання клітин карциноми (анапластична та низькодиференційована карцинома ЩЗ) та агресивним характером росту [8, 9, 10]. В межах даної роботи ми виявили також асоціацію високої кількості M2-макрофагів з ознаками лімфоваскулярної інвазії та ризиком метастазів у лімфатичні вузли.

Висновки. Зростання кількості CD163+ макрофагів у межах ПРЩЗ асоційоване з підвищенням ризику інвазивного росту, інтенсифікацією експресії VEGF та метастазуванням у регіональні лімфатичні вузли.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення ролі макрофагів на розвиток пухлинного процесу, а також механізмів поляризації макрофагів є перспективним напрямком розробки новітньої стратегії імунотерапії в онкології.

References

- Laryn AS, Cherenko SM, Krushynskaya ZG, Chernenko EV, Sulaeva ON. Sovremennye trendy optimyzatsyy dyagnostyky raka shchytovydnoy zhelezy. *Klinichna endokrynologiya ta endokrynnna khirurgiya*. 2017; 2(58): 19-28. [Russian]
- Sulaeva ON, Belemets NY, Seleznev AA, Chuba VYa, Chernenko EV. Morfoloicheskaia y molekulyarnaia dyagnostyka opukholey shchytovydnoy zhelezy v sootvetstvyi s mezhdunarodnymy protokolamy y rekomendatsyyamy. *Klinichna endokrynologiya ta endokrynnna khirurgiya*. 2018; 1(61): 7-14. [Russian]
- 8th Edition AJCC Cancer Staging Manual. Available from: <https://cancerstaging.org/CSE/general/Pages/articles.aspx>
- Can NY, Ayturk S, Celik M, Sezer YA, Ozyilmaz F, Tastekin E, et al. Histological perspective on the effects of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment surrounding papillary thyroid carcinoma. *Pol J Pathol*. 2016; 67(4): 332-44. doi: 10.5114/pjp.2016.65865.
- Galli F, Iodice V, Lauri C, Signore A. New approaches to image thyroid cancer cells and microenvironment. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2015; 59(2): 184-96. PMID:25737425
- Herrmann G, Schumm-Draeger PM, Muller C, Atai E, Wenzel B, Fabian T, et al. T lymphocytes, CD68-positive cells and vascularisation in thyroid carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994; 120(11): 651-6. PMID: 7525593. <https://doi.org/10.1007/BF01245376>
- Ivanova K, Manolova I, Ignatova MM, Gulubova M. Immunohistochemical Expression of TGF- β 1, SMAD4, SMAD7, TGF β RII and CD68-Positive TAM Densities in Papillary Thyroid Cancer. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018; 6(3): 435-41. PMID: 29610597. PMID: PMC5874362. doi: 10.3889/oamjms.2018.105.
- Kim TH, Kim YN, Kim HI, Park SY, Choe JH, Kim JH, et al. Prognostic value of the eighth edition AJCC TNM classification for differentiated thyroid carcinoma. *Oral Oncol*. 2017; 71: 81-6. PMID: 28688696. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.06.004
- Miyauchi A, Ito Y, Oda H. Insights into the Management of Papillary Carcinoma of the Thyroid. *Thyroid*. 2018; 28(1): 23-31. PMID: 28629253. PMID: PMC5770127. DOI: 10.1089/thy.2017.0227
- Pusztaszeri MP, Faquin WC, Sadow PM. Tumor-Associated Inflammatory Cells in Thyroid Carcinomas. *Surg Pathol Clin Clin*. 2014; 7(4): 501-14. PMID: 26837551. doi: 10.1016/j.path.2014.08.006.
- Qing W, Fang WY, Ye L, Shen LY, Zhang XF, Fei XC, et al. Density of tumor-associated macrophages correlates with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2012; 22(9): 905-10. PMID: 22870901. PMID: PMC3429273. doi: 10.1089/thy.2011.0452.
- Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 15(4): 1069-74. PMID: 18719091. PMID: PMC2648614. doi: 10.1677/ERC-08-0036.
- Sulaeva ON, Chernenko OV. Correlations between tsh level and morphological features of thyroid tumours. *European Thyroid Journal*. 2017; 6: 85-6.
- Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 9294018. PMID: 28197019. PMID: PMC5286482. doi: 10.1155/2017/9294018.

УДК 616.441-006.04.-092-071(075.8)

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Черненко А. В., Сулаева О. Н., Чуба В. Я., Огрызко Т. В., Ларин А. С.

Резюме. Целью данного исследования была оценка возможных иммуно-опосредованных механизмов развития и прогрессирования папиллярного рака щитовидной железы, а именно оценка количества и вида макрофагов, ассоциированных с опухолями и их ассоциации с характеристиками папиллярного рака щитовидной железы. Согласно полученным данным, папиллярный рак щитовидной железы был связан с большим количеством макрофагов ($P < 0,0001$). Также была обнаружена тесная связь между количеством M2-макрофагов и метастазами в лимфатические узлы ($OR = 8,56$; 95% CI 2,46-28,22; $P = 0,0004$). Количество M2 макрофагов было связано с выраженным ангиогенезом и ростом количества микрососудов ($P = 0,006$) и экспрессией VEGF ($P < 0,0001$). Экспрессия VEGF варьировала от низкой до высокой, и коррелировала со степенью инфильтрации ($r = 0,677$; $P < 0,001$) и количеством M2 макрофагов ($r = 0,812$; $P < 0,0001$). Таким образом, рост количества CD163 + макрофагов в пределах папиллярного рака щитовидной железы ассоциирован с повышением риска метастазирования в региональные лимфатические узлы за счет усиленной экспрессии VEGF, активации ангиогенеза и повышения инвазивности опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, метастазы, макрофаги.

UDC 616.441-006.04.-092-071(075.8)

Role of Macrophages in the Progression of Papillary Thyroid Carcinoma

Chernenko O. V., Sulaieva O. M., Chuba V. Ya., Ogryzko T. V., Larin O. S.

Abstract. Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malignant thyroid neoplasia. It is postulated that genetic alterations and tumor antigens can stimulate immune response, orchestrating tumor immune microenvironment. In its turn, immune microenvironment can facilitate cancer progression. It is well known that macrophages are the most important players in tumor development and progression. However, it is still unclear whether there are any relations between number and type of macrophages in progression of papillary thyroid carcinoma.

The purpose of this study was to evaluate possible immune-mediated mechanisms of development and progression of papillary thyroid carcinoma, namely estimating the number and type of tumor-associated macrophages and their association with the characteristics of PTC.

Material and methods. 60 patients with histopathologically confirmed PTC and 27 patients with follicular adenoma (FA) were enrolled in the study. We considered the tumor size, extra thyroidal extension (ETE), lymphovascular invasion, regional lymph nodes metastases, histological variant of PTC, as well as intensity of inflammatory infiltration and vascularization. To assess tumor associated macrophages and their role in tumor progression immunohistochemical investigation was conducted with the following markers: CD68 to assess the whole set of macrophages and CD163 to evaluate M2-type macrophages. In addition, angiogenesis was considered using VEGF and blood vessels number was evaluated using semi-quantitative score system.

Results and discussion. According to the obtained data, PTC was associated with increased number of macrophages, comparing with normal thyroid and follicular adenoma ($P < 0.0001$). Number of macrophages correlated with degree of inflammatory infiltration. These cells were located in tumor and in some cases they were in capsule and around it. In addition, the number of CD163 cells was much higher in patients with invasive growth, demonstrating the possible role of M2 macrophages in PTC progression. Tight relationship was found between the number of M2 macrophages and metastases in the lymph nodes ($OR=8.56$; 95% CI 2.46-28.22; $P=0.0004$). Macrophages count was related with high microvascular density ($P=0.006$), VEGF expression ($P < 0.0001$), intrathyroid invasion ($P=0.03$) and lymph node dissemination ($P=0.005$). In addition, the strong correlation between count of CD163+ and MCT+ cells in tumor and lymph nodes was found. We suppose the inflammatory mediated signaling pathways activation in PTC metastasis development. Expression of VEGF was found in tumor cells and in stroma. VEGF expression in tumor cells varied from low to high and correlated with degree of infiltration ($r=0.677$; $P < 0.001$) and number of M2 macrophages ($r=0.812$; $P < 0.0001$). In addition there were numerous VEGF positive cells inside infiltrates. Their accumulation around malignant nodules was associated with features of invasion.

Conclusions. Thus, increased number of PTC-associated CD163+ macrophages is associated with an increased risk of metastasis to regional lymph nodes due to overexpression of VEGF and tumor cell invasiveness.

Keywords: papillary thyroid carcinoma, metastases, macrophages.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 09.08.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування