

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РИСКА ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>Бутолина К. М. (*butkar.74@mail.ru*), <sup>1</sup>Штабинская Т. Т. (*shtabik@list.ru*),

<sup>1</sup>Басинский В. А. (*basinsk@gmail.com*), <sup>1</sup>Ляликов С. А. (*lalikov@tut.by*),

<sup>2</sup>Маршалэк А. (*amars@ump.edu.pl*)

<sup>1</sup>УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Университет им. Н. Коперника, Торунь, Польша

*Введение.* Метастазы ПРЩЖ в лимфоузлы шеи являются фактором риска рецидива заболевания. Иммунная клеточная инфильтрация в опухоли и вокруг нее играет важную роль в процессах опухолевой прогрессии и метастазирования.

*Цель.* дать иммуногистохимическую оценку характера иммунного клеточного инфильтрата в ПРЩЖ при наличии лимфогенных метастазов опухоли.

*Материал и методы.* Выполнено иммуногистохимическое исследование на серийных парафиновых срезах с использованием мышинных моноклональных антител к антигенам CD3, CD4, CD1a, CD23, CD25, CD8 и TGF-β.

*Выводы.* При уровне позитивности CD1a, равном 2,215, с чувствительностью 60% и специфичностью 100%, а также при уровне CD1a/CD3, равном 0,20 с чувствительностью 100% и специфичностью 71,4% можно прогнозировать лимфогенные метастазы ПРЩЖ у женщин младше 45 лет. В случае, когда экспрессия CD1a и уровень позитивности CD1a/CD3 выше или ниже указанных пороговых значений, для диагностики лимфогенных метастазов ПРЩЖ у женщин младше 45 лет можно использовать дискриминантное уравнение.

**Ключевые слова:** рак щитовидной железы, лимфогенные метастазы, иммуногистохимия, субпопуляции лимфоцитов.

### Введение

Рак щитовидной железы составляет 2,7% всех злокачественных опухолей у женщин в мире с ежегодной заболеваемостью 6,2% [1, 2]. Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) – наиболее распространенный тип дифференцированного рака щитовидной железы, 10- и 15-летняя выживаемость составляет 91,38 и 88,69%, соответственно [3]. Несмотря на благоприятный прогноз, в 30-40% случаев ПРЩЖ развиваются метастазы в лимфоузлы шеи, которые рассматриваются как фактор риска рецидива заболевания, что значительно ухудшает прогноз. Роль профилактической центральной и периферической диссекции лимфоузлов у пациентов с клинически отрицательными лимфогенными метастазами остается спорной из-за возможных осложнений. Ультразвуковое исследование шеи и компьютерная томография с контрастным усилением, широко используемые для предоперационной визуализации лимфогенных метастазов, не являются особо точными и характеризуются низкой чувствительностью: 23-53,2 и 41-66,7%, соответственно [4].

Убедительно доказано, что такие факторы, как возраст младше 45 лет, билатеральность и мультифокальность поражения щитовидной железы, гистологический тип ПРЩЖ, сосудистая инвазия, отсутствие капсулы опухоли и экстра-тиреоидное ее распространение, оказывают значительное влияние на развитие лимфогенных метастазов [5].

В процессах опухолевой прогрессии и метастазирования важную роль играют иммунные реакции [6]. Местным иммунным ответом организма является воспалительная клеточная инфильтрация в опухоли и вокруг нее. Преоб-

ладающими среди клеток иммунного воспалительного инфильтрата являются лимфоциты, представленные разными субпопуляциями Т-лимфоцитов и В-лимфоцитами. Рост опухоли контролируется главным образом с помощью CD4+ и CD8+ Т-клеток. Выраженная инфильтрация опухоли цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами, как правило, служит показателем благоприятного прогноза заболевания [7]. Небольшая субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов – регуляторные Т-клетки, экспрессирующие молекулы CD25 и Foxp3, – угнетают иммунную реакцию на опухоль. Увеличение количества регуляторных Т-лимфоцитов связано с плохим прогнозом во многих раках, включая рак яичников, молочных желез и лимфому [7]. Т-регуляторные клетки обнаруживаются внутри и вокруг опухолей щитовидной железы, их количество коррелирует с тяжестью заболевания и метастазами в лимфатические узлы [8, 9]. В опухолевом иммунном клеточном инфильтрате присутствуют дендритные клетки, которые активируют Т- и В-лимфоциты, представляя антигены на основных комплексах гистосовместимости I и II классов. В ряде исследований показано, что высокое количество дендритных клеток положительно влияет на исход злокачественных опухолей, в том числе и ПРЩЖ [7, 10].

**Цель исследования:** дать иммуногистохимическую оценку характера иммунного клеточного инфильтрата в ПРЩЖ при наличии лимфогенных метастазов опухоли.

### Материал и методы

Материалом для исследования стали 34 наблюдения ПРЩЖ у женщин, удаленного в Гродненской областной клинической больнице (Бе-

ларусь). Изучаемые случаи рассматривались в 2 группах. В 1-ю группу было отобрано 16 наблюдений ПРЦЖ у пациенток молодой возрастной группы (младше 45 лет), во 2-ю группу – 18 пациенток среднего и пожилого возраста с ПРЦЖ.

Выполнено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование на серийных парафиновых срезах с использованием мышиных моноклональных антител к антигенам CD3, CD4, CD1 $\alpha$ , CD23, CD25, CD8 и TGF- $\beta$  (фирма «Dako», Дания). Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 3 мкм и переносили на предметные стекла ultra frost+. Срезы высушивали 18 часов при комнатной температуре в вертикальном положении и помещали на 30 минут в термостат при температуре 60°C. После этого проводилась депарафинация в ксилоле (в батарее из 3 емкостей, по 3 минуты в каждой) и обработка в спирте (в батарее из трех емкостей спиртов в нисходящей крепости, по 3 минуты). Далее предметные стекла со срезами помещались в цитратный буфер pH 6.0 и ставились на 30 минут в водяную баню при температуре 98°C. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода в течение 5 минут. Затем наносились первичные антитела в разведении 1:50, и срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор EnVision (фирма «Dako», Дания). Для визуализации реакции применяли раствор диаминобензидина (DAB) (фирма «Dako», Дания), которым срезы обрабатывались в течение 10 минут. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера и заключали в полистирол под покровное стекло. Контрольный срез оставляли без первой инкубации. Позитивным критерием оценки реакции с антителами считали светло-коричневое и коричневое мембранное окрашивание лимфоцитов, а для маркера TGF $\beta$  – также цитоплазматическое окрашивание тиреоидных клеток.

Для количественной оценки результатов иммуногистохимической реакции микропрепараты фотографировали при помощи микроскопа Leica и цифровой камеры Leica 425C с использованием объектива  $\times 20$  с разрешением 1600 $\times$ 1200 пикселей в 7 неперекрывающихся полях зрения. Для интерпретации результатов в среде компьютерной программы «MashaCV» (свидетельство о регистрации № 452, 12.11.2012, РБ) определялся показатель «позитивность» – отношение коричневых пикселей к общему их числу. Для каждого случая рассчитывалось среднее значение позитивности всех изображений.

Статистический анализ данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q). При оценке достоверности воздействия одного из факторов с учетом одновременного влияния на изучаемые показатели ряда других факторов, а также для вычленения и оценки вклада каждого конкретного фактора и их композиций на величину дисперсии изучаемого показателя применялся многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Построение многофакторной модели диагностики лимфогенных метастазов проводилось с использованием дискриминантного анализа (прямым пошаговым методом). В качестве зависимых переменных использовались показатели позитивности изучаемых антигенов, в качестве группирующих (независимых) переменных – категория pN (pN0 и pN1 – отсутствие и наличие метастазов в лимфоузлы шеи, соответственно), установленная после оперативного вмешательства, и возраст (до 45 лет/45 лет и старше). Нулевая гипотеза (об отсутствии различий между переменными, отсутствии влияния группирующей переменной) отвергалась на уровне значимости  $\alpha=0,05$  ( $p \leq 0,05$ ) для каждого из использованных тестов. Прогностическая значимость переменных и критические значения (точки разделения) оценивали с помощью анализа характеристических кривых (receiver operating characteristic, ROC). Представление признака в работе приводилось в формате Me (LQ;UQ), где Me – медиана, LQ и UQ – нижний и верхний квартили, соответственно.

### Результаты и обсуждение

Анализ экспрессии изучаемых маркеров в зависимости от возраста пациенток с метастазами и без таковых показал, что статистически значимо в опухолевом узле различаются уровни CD1 $\alpha$  и соотношение CD1 $\alpha$ /CD3.

Установлена статистическая значимость вклада сочетания двух независимых переменных ( $F=5,27$ ;  $p=0,03$ ) в дисперсию CD1 $\alpha$  (рис. 1). В группе пациенток молодого возраста с метастазами в регионарных лимфатических узлах уровень CD1 $\alpha$  достоверно выше (3,02 (1,05-3,55)), чем у пациенток без метастазов (0,97 (0,26-1,755)),  $p=0,05$ . В группе 2 уровень CD1 $\alpha$  составил 1,358 (0,760-2,57) при pN0 и 1,07 (0,825-1,460) – если pN1. Однако эти различия не являются статистически значимыми ( $p=0,62$ ).

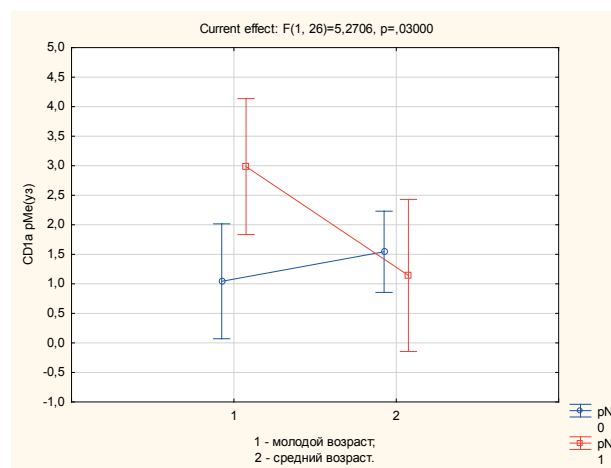


Рисунок 1. – Уровень CD1 $\alpha$  в опухоли в зависимости от категории pN у пациенток разных возрастных групп

Примечание: вертикальные отрезки обозначают 95% доверительные интервалы

ROC-анализ позволил определить точку разделения для диагностики лимфогенных метастазов у пациенток молодого возраста в зависимости от уровня CD1α в опухолевом узле (рис. 2). Площадь под ROC-кривой равняется  $0,80 \pm 0,15$  (достоверность различия с площадью под диагональю равна 0,039). Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности, установленное с помощью ROC-анализа, соответствует уровню CD1α, равному 2,215 (чувствительность – 60%, специфичность – 100%).

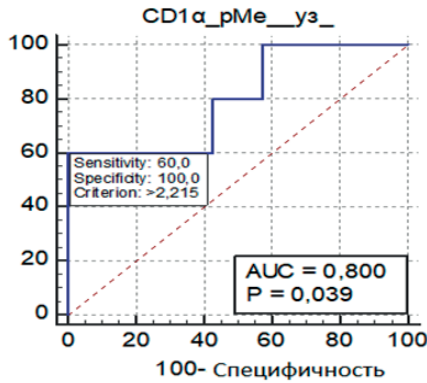


Рисунок 2. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при диагностике метастазов в зависимости от уровня CD1α в опухолевом узле у пациенток молодого возраста

При оценке влияния группирующих переменных на соотношение уровней CD1α и CD3 в опухолевом узле с помощью ANOVA установлено, что достоверен вклад как переменной pN ( $F=4,10$ ;  $p=0,05$ ), так и сочетания возраста и pN ( $F=3,54$ ;  $p=0,07$ ) (рис. 3). В группе пациенток в возрасте до 45 лет с метастазами в регионарных лимфатических узлах соотношение CD1α и CD3 в ПРЦЖ достоверно выше, чем без таковых (0,67 (0,49-1,59) и 0,09 (0,08-0,620, соответственно;  $p=0,04$ )). В группе пациенток 45 лет и старше соотношение изучаемых маркеров также выше в случаях с pN1, однако эти различия не значимы (0,51 (0,25-0,77) и 0,32 (0,07-0,73), соответственно;  $p=0,5$ ).

ROC-анализ позволил определить точку разделения для диагностики лимфогенных метастазов у пациенток молодого возраста в зависимости от соотношения CD1α и CD3 в опухолевом узле (рис. 4). Площадь под ROC-кривой равняется  $0,86 \pm 0,11$  (достоверность различия с площадью под диагональю = 0,001). Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности, установленное с помощью ROC-анализа, соответствует уровню CD1α/CD3, равному 0,20 (чувствительность – 100%, специфичность – 71,4%).

При построении математической модели диагностики лимфогенных метастазов (дискриминантной функции) обратным пошаговым методом у пациентов с ПРЦЖ были использованы

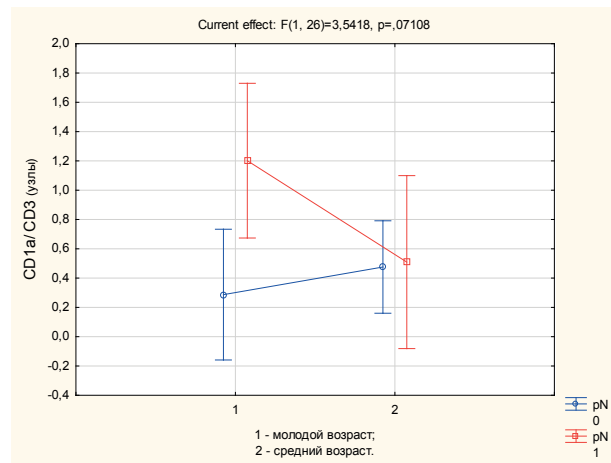


Рисунок 3. – Соотношение CD1α/CD3 в опухоли в зависимости от категории pN у пациенток разных возрастных групп

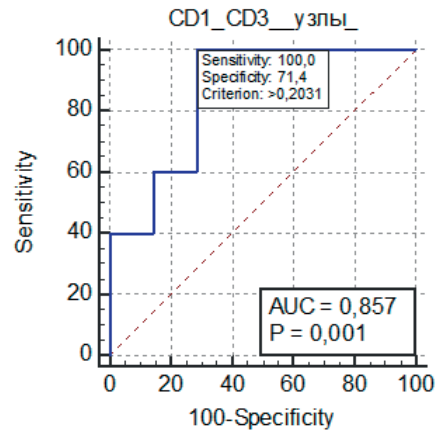


Рисунок 4. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при диагностике метастазов в зависимости от уровня CD1α/CD3 в опухолевом узле у пациенток молодого возраста

90 клинико-anamnestических и морфологических показателей. Однако установлено, что достоверно влияют на наличие метастазов всего 3 из них.

Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования, представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования

Переменные	Лямбда Уилкса	F-исключить	p
CD1α/CD3	0,779	26,97	0,003
CD4/CD3	0,505	15,71	0,01
CD25/CD3	0,346	9,18	0,029

Классификационная функция, полученная с использованием указанных переменных, представлена в таблице 2, классификационная матрица – в таблице 3.

**Таблица 2.** – Функция классификации для диагностики лимфогенных метастазов

Переменные	Коэффициенты Y
CD1 $\alpha$ /CD3	26,9189
CD4/CD3	0,7528
CD25/CD3	-0,0915
Константа	-20,5868

**Таблица 3.** – Классификационная матрица, полученная в результате применения классификационной функции для диагностики лимфогенных метастазов

	Доля правильных прогнозов	Неблагоприятный исход (случаев) (прогнозируемое состояние)	Благоприятный исход (случаев) (прогнозируемое состояние)
Неблагоприятный исход (наблюдаемое состояние)	80%	4	1
Благоприятный исход (наблюдаемое состояние)	100%	0	7
Всего	91,7%	4	8

Анализ классификационной матрицы, значение лямбды Уилкса, равное 0,12, значение F-критерия, равного 9,00 (при  $p < 0,0166$ ) позволяет сделать вывод, что данная классификация является корректной.

Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 80%, специфичность – 100%. Прогностическая значимость положительного результата (наличие лимфогенных метастазов) – 80%. Прогностическая значимость отрицательного результата (отсутствие лимфогенных метастазов) – 100%. Общая прогностическая значимость – 91,7%.

Для диагностики лимфогенных метастазов у пациентов до 45 лет с ПРЦЖ необходимо опре-

делить уровни CD1 $\alpha$ , CD3, CD4, CD25. Затем, используя полученные значения этих показателей, необходимо посчитать дискриминантное уравнение:

$$y = -20,5868 + 26,9189 m_1 + 0,7528 m_2 - 0,0915 m_3,$$

где  $m_1$  – уровень CD1 $\alpha$ /CD3;

$m_2$  – уровень CD4/CD3;

$m_3$  – уровень CD25/CD3.

Если  $y \leq 0$ , прогнозируют высокий риск наличия метастазов в регионарных лимфоузлах, если  $y > 0$ , прогнозируют отсутствие метастазов.

### Выводы

1. Морфологическая оценка местного иммунитета в щитовидной железе с иммуногистохимическим фенотипированием интраклеточных лимфоцитов имеет несомненное практическое значение для оценки метастатического потенциала папиллярного рака щитовидной железы.

2. При уровне позитивности CD1 $\alpha$ , равном 2,215, с чувствительностью 60% и специфичностью 100%, а также при уровне CD1 $\alpha$ /CD3, равном 0,20, с чувствительностью 100% и специфичностью 71,4% можно прогнозировать лимфогенные метастазы ПРЦЖ у женщин младше 45 лет.

3. В случае, когда одно из условий не выполняется (экспрессия CD1 $\alpha$  и уровень позитивности CD1 $\alpha$ /CD3 в ПРЦЖ выше или ниже указанных пороговых значений), для диагностики лимфогенных метастазов ПРЦЖ у женщин младше 45 лет можно использовать дискриминантное уравнение:

$$y = -20,5868 + 26,9189 m_1 + 0,7528 m_2 - 0,0915 m_3,$$

где  $m_1$  – уровень CD1 $\alpha$ /CD3;

$m_2$  – уровень CD4/CD3;

$m_3$  – уровень CD25/CD3.

Если  $y \leq 0$ , прогнозируют высокий риск наличия метастазов в регионарных лимфоузлах, если  $y > 0$ , прогнозируют отсутствие метастазов. Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 80%, специфичность – 100%.

### Литература

1. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay [et al.] // Int. J. Cancer. – 2010. – Vol. 127, iss. 12. – P. 2893-2917. – doi: 10.1002/ijc.25516.
2. Cancer statistics, 2009 / A. Jemal [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2009. – Vol. 59, iss. 4. – P. 225-249. – doi: 10.3322/caac.20006.
3. Papillary Thyroid Carcinoma: Factors Influencing Recurrence and Survival / A. Toniato [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2008. – Vol. 15, iss. 5. – P. 1518-1522. – doi: 10.1245/s10434-008-9859-4.
4. Miccoli, P. Application of Molecular Diagnostics to the Evaluation of the Surgical Approach to Thyroid Cancer / P. Miccoli // Curr. Genomics. – 2014. – Vol. 15, iss. 3. – P. 184-189. – doi: 10.2174/1389202915999140404101257.
5. Predictive factors for central lymph node metastasis in patients with cN0 papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis / B. Ma [et al.] // Int. J. Surg. – 2016. – Vol. 28. – P. 153-161. – doi: 10.1016/j.ijso.2016.02.093.
6. Liotti, F. Inflammation in thyroid oncogenesis / F. Liotti, C. Visciano, R. M. Melillo // Am. J. Cancer Res. – 2012. – Vol. 2, iss. 3. – P. 286-297.
7. Леенман, Е. Е. Клеточное микроокружение злокачественных опухолей и его значение в их прогнозе / Е. Е. Леенман, М. С. Мухина // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59, № 4. – С. 444-452.

8. Ward, L. S. Immune Response in Thyroid Cancer: Widening the Boundaries / L. S. Ward // *Scientifica*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 125450. – doi: 10.1155/2014/125450.
9. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma / C. Ugolini [et al.] // *Thyroid*. – 2007. – Vol. 17, iss. 5. – P. 389-393. – doi: 10.1089/thy.2006.0306.
10. CD1a-positive dendritic cell density predicts disease-free survival in papillary thyroid carcinoma / O. Hilly [et al.] // *Pathol. Res. Pract.* – 2015. – Vol. 211, iss. 9. – P. 652-656. – doi: 10.1016/j.prp.2015.05.009.
5. Ma B, Wang Y, Yang S, Ji Q. Predictive factors for central lymph node metastasis in patients with cN0 papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Surg.* 2016;28:153-161. doi: 10.1016/j.ijsu.2016.02.093.
6. Liotti F, Visciano C, Melillo RM. Inflammation in thyroid oncogenesis. *Am. J. Cancer Res.* 2012;2(3):286-297.
7. Leenman EE, Muchina MS. Kletochnoe mikrookruzhenie zlokachestvennyh opuholej i ego znachenie v ih prognoze [The cellular microenvironment of malignant tumors and its significance in their prognosis]. *Voprosy onkologii* [Problems in oncology]. 2013;59(4):444-452. (Russian).
8. Ward LS. Immune response in thyroid cancer: widening the boundaries. *Scientifica*. 2014;2014:125450. doi: 10.1155/2014/125450.
9. Ugolini C, Basolo F, Proietti A, Vitti P, Elisei R, Miccoli P, Toniolo A. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2007;17(5):389-393. doi: 10.1089/thy.2006.0306.
10. Hilly O, Rath-Wolfson L, Koren R, Mizrahi A, Hamzany Y, Bachar G, Shpitzer T. CD1a-positive dendritic cell density predicts disease-free survival in papillary thyroid carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 2015;211(9):652-656. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.009.

### References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010;127(12):2893-2917. doi: 10.1002/ijc.25516.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 2009;59(4):225-249. doi: 10.3322/caac.20006.
3. Toniato A, Boschini I, Casara D, Mazzarotto R, Rubello D, Pelizzo M. Papillary Thyroid Carcinoma: Factors Influencing Recurrence and Survival. *Ann. Surg. Oncol.* 2008;15(5):1518-1522. doi: 10.1245/s10434-008-9859-4.
4. Miccoli P. Application of Molecular Diagnostics to the Evaluation of the Surgical Approach to Thyroid Cancer.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL RISK ASSESSMENT OF THE LYMPHOGENOUS METASTASIS OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA

<sup>1</sup>Butolina K. M., <sup>1</sup>Shtabinskaya T. T., <sup>1</sup>Basinsky V. A., <sup>1</sup>Lyalikov S. A., <sup>2</sup>Marshalek A.

<sup>1</sup>Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

<sup>2</sup>Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

*Background.* Metastatic papillary thyroid carcinoma to the cervical lymph nodes is a risk factor for disease recurrence. Immune cell infiltration in and around the tumor plays an important role in the processes of tumor progression and metastasis.

*Objective.* To assess the nature of the immune cell infiltration in papillary thyroid cancer with lymphogenous metastases.

*Material and methods.* An immunohistochemical study was performed on serial paraffin sections using monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD1a, CD23, CD25, CD8 and TGF- $\beta$  antigens.

*Conclusions.* It was noted that in a CD1a positivity of 2.215 with a sensitivity of 60% and a specificity of 100%, as well as in a CD1a / CD3 level of 0.20 with a sensitivity of 100% and a specificity of 71.4%, lymphogenous metastases of papillary thyroid carcinoma can be predicted in women under 45 years of age. In cases when CD1a expression and CD1a / CD3 positivity in papillary thyroid carcinoma are above or below the threshold values, a discriminant equation may be used to diagnose lymphogenous metastases in women under 45 years of age.

**Keywords:** thyroid cancer, lymphogenous metastases, immunohistochemistry, lymphocyte subpopulations.

Поступила: 02.10.2018

Отрецензирована: 05.11.2018