

OPTIMALISATIE VAN DE REGULATOIRE T-CEL IMMUNOFENOTYPERING BIJ CANIENE LYMFOMA

DEEL 2: ONDERZOEKSARTIKEL

Aantal woorden: 2969

Tine Haesebrouck

Studentennummer: 01810780

Promotor: Drs. Anna Blockeel

Promotor: Prof. dr. Evelyne Meyer

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2023 – 2024

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

1 Voorwoord

Tijdens een intensieve periode van drie jaar heb ik mijn masterproef geschreven over regulatoire T-cellen bij honden met lymfoom. Graag maak ik van deze gelegenheid gebruik om mijn dankbaarheid te uiten aan de mensen die hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit project.

Allereerst wil ik mijn oprechte dank betuigen aan mijn promotor, Drs. Anna Blockeel, wiens toewijding en begeleiding tijdens de labo-experimenten hebben bijgedragen aan het vormgeven van de inhoud van mijn onderzoek. Haar advies en expertise hebben een cruciale rol gespeeld bij het succesvol afronden van mijn masterproef.

Verder wil ik mijn waardering uitspreken aan Prof. dr. Evelyne Meyer voor haar kritische opmerkingen en waardevolle verbeterpunten tijdens het schrijven van deze thesis. Haar feedback heeft mijn werk verrijkt.

Tenslotte gaat mijn oprechte dank uit naar Georgi Baklicharov. Met jouw deskundige hulp heb ik de statistische analyses van deze masterproef kunnen uitvoeren. Jouw bijdrage was van onschatbare waarde en heeft mijn onderzoek versterkt.

2 Inhoudstafel

1	Voorwoord	3
2	Inhoudstafel	4
3	Samenvatting	5
4	Inleiding.....	6
5	Materiaal en methoden	8
5.1	Studiepopulatie	8
5.2	Histopathologie	8
5.3	Immunohistochemie.....	8
5.4	Evaluatie van de immunohistochemische expressie	9
5.5	Statistische analyse merkerdensiteit.....	9
6	Resultaten	10
6.1	Densiteitsonderzoek.....	10
6.1.1	Merker CD3	10
6.1.2	Merker FoxP3	11
6.1.3	Merker PD-L1	12
6.2	Lokalisatieonderzoek.....	13
6.2.1	Merker CD3	13
6.2.2	Merker FoxP3	14
6.2.3	Merker PD-L1	15
7	Discussie.....	16
7.1	Densiteitsonderzoek.....	16
7.1.1	Merker CD3	16
7.1.2	Merker FoxP3	16
7.1.3	Merker PD-L1	16
7.2	Lokalisatieonderzoek.....	17
7.2.1	Merker CD3	17
7.2.2	Merker FoxP3	17
7.2.3	Merker PD-L1	18
7.3	Beperkingen onderzoek.....	18
8	Conclusie	19
9	Literatuurlijst.....	20
10	Bijlage: Clinicopathologische gegevens.....	23

3 Samenvatting

Lymfoom is één van de meest voorkomende hematopoëtische tumoren bij honden. Ondanks vooruitgang in diagnose en behandeling blijft diepgaand onderzoek naar de tumor-micro-omgeving (TMO) een uitdaging. De TMO omvat cellen en moleculen rondom een tumor, die de ontwikkeling en progressie van lymfomen beïnvloeden. Het manipuleren van deze TMO, waarbij regulatoire T-cellen (Tregs) beschermende antitumorreacties kunnen onderdrukken, kan in de toekomst nieuwe behandelstrategieën opleveren.

Deze thesis onderzoekt de TMO van caniene B-cellymfomen door immunohistochemische analyse van CD3-positieve T-cellen, FoxP3-positieve Tregs en PD-L1-positieve cellen, met nadruk op dichtheid en lymfeknooplokalisatie. Lymfeknoopstalen van dertig honden, waaronder zes gezonde, acht reactieve, vier laaggradige en twaalf hooggradige lymfomen, werden onderzocht.

De CD3-resultaten wijzen subjectief op een lagere expressie en meer diffuus patroon van CD3-positieve cellen bij lymfoom-lymfeknopen, wat wijst op verdringing door neoplastische cellen. Het potentieel van CD3-kleuring als diagnostische tool is nog onduidelijk. Statistisch is FoxP3-expressie significant hoger in reactieve en lager in maligne lymfeknopen, dit suggereert dat maligne populaties FoxP3-positieve cellen verdringen, of maligne B-lymfocyten cytokines produceren die FoxP3-expressie moduleren. De klinische implicaties van FoxP3-expressie voor diagnostische en prognostische doeleinden zijn nog onhelder. PD-L1-expressie is, hoewel niet significant, lager in lymfoom-lymfeknopen en afhankelijk van lymfoom-subtype en -agressiviteit. Het wijst op een mogelijke beperking van “checkpoint-inhibitors”-immunotherapie bij caniene lymfomen.

De beperkingen van dit onderzoek benadrukken de noodzaak aan grootschaligere en strengere studies van kanker- en immuuncellen binnen een lymfeknoop. Verder onderzoek kan leiden tot nieuwe diagnostische, prognostische en therapeutische strategieën ter verbetering van de behandeling van caniene lymfomen.

Kernwoorden: Canien B-cellymfoom; FoxP3; Immunohistochemie; PD-L1; Regulatoire T-cel

4 Inleiding

Canine lymfomen vormen een diverse groep van neoplasieën waarbij lymfocyten in de lymfeknopen, milt, tonsillen, lymfatische venen en/of niet-lymfoïd weefsel aangetast zijn (Vail et al., 2019; Barbara en Jennifer, 2022). Lymfoom is één van de meest voorkomende hematopoëtische tumoren bij honden (Dobson et al., 2002; Impellizeri et al., 2018), waarbij het kan worden onderverdeeld op basis van immunofenotype, zowel B-cel- als T-cellymfoom (Zandvliet, 2016; Vail et al., 2019; Barbara en Jennifer, 2022).

Het immunofenotype van een lymfocyt wordt bepaald door de expressie van specifieke eiwitmarkers: “cluster of differentiation” CD79a, CD20 en CD21 voor B-cellen, en CD3 (pan T-cel), CD4 (helper T-cel) en CD8 (cytotoxische T-cel) voor T-cellen (Seelig et al., 2016; Vail et al., 2019). Immunofenotypebepaling gebruikt antilichamen tegen deze eiwitmarkers via immunohistochemie (IHC) op lymfeknoopbiopsies, en immunocytochemie of flowcytometrie op lymfeknoop fijne naald aspiraten of geïsoleerde cellen uit bloed.

Ondanks vooruitgang in diagnose en behandeling van canine lymfoom, blijven grote uitdagingen bestaan. Met name het gebrek aan voldoende informatie over de tumor-micro-omgeving (TMO) is momenteel een lacune. De TMO omvat cellen en moleculen rondom een (lymfoom)tumor, bestaande uit ontstekingscellen, fibroblasten, bloedvaten, cyto- en chemokinen. Het speelt een cruciale rol in de ontwikkeling en progressie van lymfoom (Bilotta et al., 2022; Cook en Dunleavy, 2022).

Een belangrijke celpopulatie in de TMO van canine lymfoom zijn regulatoire T-cellen (Tregs). Tregs, gekenmerkt door expressie van transcription factor forkhead box P3 (FoxP3), CD3, CD4, CD25 en immunosuppressieve receptoren, als programmed death 1 (PD-1) en cytotoxisch T-lymfocytgeassocieerd eiwit 4 (CTLA-4), spelen een immunosuppressieve rol (Duggleby et al., 2018; Kamira et al., 2022, Katsuya et al., 2023). In gezond weefsel onderdrukken ze auto-immunreacties door het induceren van immunotolerantie (Baek et al., 2017), maar bij kanker zijn deze cellen ontregeld en onderdrukken ze anti-tumor reacties, waardoor tumorcellen het immuunsysteem kunnen ontsnappen (Pinheiro et al., 2014; Baek et al., 2017; Duggleby et al., 2018; Kamira et al., 2022; Katsuya et al., 2023).

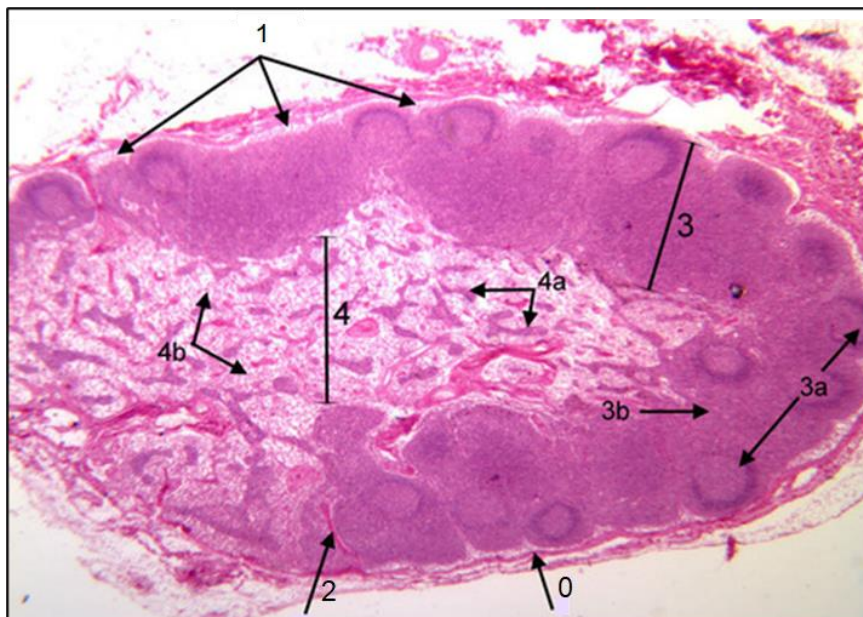
FoxP3 is een belangrijke transcriptiefactor voor de ontwikkeling en functie van Tregs en wordt gebruikt als exclusieve nucleaire merker voor Tregs bij honden (Maeda et al., 2016; Munhoz et al., 2016; Colamatteo et al., 2020; Deng et al., 2020). FoxP3 speelt een cruciale rol bij het handhaven van immuuntolerantie, het onderdrukken van immunoresponsen en het voorkomen van auto-immuunziekten (Munhoz et al., 2016; Muir et al., 2017).

Kankercellen manipuleren de TMO om het gastheer-immuunsysteem te omzeilen (Sznol en Chen, 2013; Maekawa et al., 2016; Kumar et al., 2017; Menter et al., 2021). PD-1 op T-cellen kan de T-cel uitschakelen en de productie van cytokines als interferon gamma (IFN- γ), interleukine 2 (IL-2), en tumor necrose factor alpha (TNF α) remmen (Maekawa et al., 2016; Menter et al., 2021), waardoor cytotoxische T-cellen niet geactiveerd en anti-tumorreacties onderdrukt worden. Programmed deathligand 1 (PD-L1), het ligand van PD-1, wordt tot expressie gebracht op diverse celtypen, inclusief niet-hematopoëtische cellen. Hoewel PD-L1 minder aanwezig is in gezond weefsel, wordt het vaak gezien op kankercellen, wat het tot een immuno-evasief mechanisme bij kanker maakt (Sznol en Chen, 2013; Maekawa et al., 2016; Kumar et al., 2017; Menter et al., 2021). Immunotherapie met “immune checkpoint”-inhibitoren toonden reeds veelbelovende effecten bij de behandeling van humane lymfomen, er is echter beperkt onderzoek naar de PD-1/PD-L1 bij honden waardoor de associatie met canine lymfoom nog moet worden opgehelderd.

Het hoofddoel van deze masterthesis is inzicht te verschaffen in de TMO van caniene lymfomen door immunohistochemische analyse van CD3-positieve en FoxP3-positieve Tregs, en PD-L1-positieve cellen, gericht op densiteit en lokalisatie binnen de lymfeknoop. Het densiteitsonderzoek omvat kwantificatie van de merkers, terwijl het lokalisatieonderzoek de verdeling van merkers binnen de complexe architectuur van de lymfeknoop (Figuur 1) onderzoekt.

Er wordt vergeleken tussen vier lymfeknoopclassificaties (normale, reactieve, laaggradige en hooggradige lymfeknopen) om verbanden en verschillen te identificeren. Een reactieve lymfeknoop is een lymfeknoop die vergroot als immunoreactie op een infectie, ontsteking, of andere niet-neoplastische stimuli in het lichaam. Ze zijn goedaardig en ontzwellen zodra de onderliggende oorzaak is behandeld of verdwenen is (Hung et al., 2023). Hooggradige en laaggradige tumoren vertonen significante verschillen in morfologie en gedragskenmerken. Hooggradige lymfomen worden gekenmerkt door slecht gedifferentieerde cellen, een hoge proliferatiesnelheid en een verhoogde neiging tot metastasering. In tegenstelling hiermee manifesteren laaggradige lymfomen zich als minder agressief, met een tragere progressie, beperkte metastatische potentie, betere celdifferentiatie en langere overlevingstijd (Valli et al., 2013; De Leval en Jaffe, 2020).

Deze thesis streeft ernaar waardevolle inzichten te verschaffen in de ruimtelijke organisatie van Tregs en PD-L1-positieve cellen in canien lymfoom, en de mogelijke functionele implicaties voor diagnostiek, immunotherapie en prognose te belichten.



Figuur 1: Lymfeknoopanatomie. Lymfeknopen vertonen een complexe anatomie bestaande uit een buitenste cortex en een binnenste medulla, omgeven door een fibreus kapsel (0), subcapsulaire sinus (1) en fibreuse trabekels (2). De cortex (3) bestaat hoofdzakelijk uit B-cellen die georganiseerd zijn in follikels, waarbij blootstelling aan antigenen kan leiden tot de ontwikkeling van een germinaal centrum (3a). Hoewel B-lymfocyten de dominante populatie vormen in de follikels, kunnen ook T-cellen aanwezig zijn. Deze T-cellen zijn voornamelijk CD4+ helper T-cellen, maar enkele CD8+ cytotoxische T-cellen kunnen ook voorkomen. De diepere cortex, bekend als de paracortex (3b), bestaat voornamelijk uit T-cellen. De medulla (4) omvat koorden (4a) en sinussen (4b) waarbij de medullaire koorden bestaan uit plasmacellen, macrofagen en B-cellen, terwijl de medullaire sinussen vasculaire ruimtes zijn tussen de koorden waarin histiocyten en reticulair cellen aanwezig zijn (Willard-Mack, 2006; Bozkurt et al., 2014; Rui-Cheng, 2017; Barbara en Jennifer, 2022).

5 Materiaal en methoden

5.1 Studiepopulatie

Deze studie omvat een groep van dertig honden. Een uitgebreide weergave van de clinicopathologische gegevens is te vinden in tabel 1 in bijlage. Lymfeknoopstalen werden van zes gezonde honden, acht honden met reactieve lymfeknopen, vier honden met laaggradig B-cellymfoom en twaalf honden met hooggradig B-cellymfoom verzameld. Deze stalen werden retrospectief verzameld via het Algemeen Medisch Laboratorium (AML) tussen 2019-2022.

5.2 Histopathologie

De lymfeknoopstalen werden gefixeerd in 4 % formaldehyde alvorens te worden ingebed in paraffine. 2 µm dikke paraffine-gekapselde secties werden op een APES-gecoate slides bevestigd. Deze stalen werden vooraf gediagnosticeerd en gegradeerd door een board-certified veterinaire patholoog, Hilde De Cock, waardoor een onderscheid tussen laag- en hooggradig lymfoom kon gemaakt worden.

5.3 Immunohistochemie

De gebruikte antilichamen omvatten anti-CD3 voor T-lymfocyt-visualisatie, anti-FoxP3 voor Treg-visualisatie en anti-PD-L1 voor de visualisatie van PD-L1-expressie op cellen.

De 2 µm dikke formaline-gefixeerde en paraffine-gekapselde stalen werden routinematig gedeparaffineerd en gerehydrateerd. Antigenretrieval werd bekomen door de secties te verhitten bij 95°C in Tris-ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) buffer (pH 9, 10mM Tris, 1mM EDTA (Thermo Fisher Scientific)), met gebruik van een Decloaking Chamber NxGen (Biocare Medical, CA, USA). Endogene peroxidase-activiteit werd geblokkeerd door incubatie met 3% waterstofperoxide in methanol in een kamer bevochtigd met tris-gebufferde zoutoplossing (TBS, Biocare Medical).

De primaire antilichamen (Tabel 2) werden toegevoegd en de stalen incubeerden gedurende 60 minuten bij kamertemperatuur. De secties werden vervolgens geïncubeerd met het secundaire "horseradish peroxidase" gelabeld antilichaam. Voor PD-L1 en CD3 was dit een anti-konijn antilichaam, voor FoxP3 een anti-rat antilichaam.

Tabel 2: Overzicht primaire antilichamen.

Primair antilichaam	Origine	Kloon	Dilutie	Producent
CD3	Rat	CD3-12	1/100	Biorad
FoxP3	Rat	FJK-16s	1/100	Thermo Fisher
PD-L1	Konijn	JC071	1/100	Absolute Antibody

Voor immunodetectie werden de stalen gekleurd met behulp van Diamidofosfaat-reagens (DAB (Dako)) bij kamertemperatuur. De secties ondergingen een tegenkleuring met hematoxyline. Na een routinematige dehydratie werden de stalen microscopisch geëvalueerd.

5.4 Evaluatie van de immunohistochemische expressie

De immunohistochemische kleuring werd door één onderzoeker beoordeeld, blind voor de clinicopathologische gegevens. De lymfeknoopcoupes werden vooraf niet macroscopisch bekeken om te voorkomen dat visuele aanwijzingen voor een tumoraal proces de studie zouden beïnvloeden. Daarnaast werden alle regio's van de lymfeknoop geëvalueerd.

De hoeveelheid CD3-, PD-L1- en FoxP3-expressie werd als volgt gescoord: er werd gekeken naar het gemiddeld aantal aangekleurde cellen per 6 high power fields (HPF) bij een 40x vergroting. Zo kregen alle coupes respectievelijk een score 1 (gemiddeld 0-2 aangekleurde cellen), score 2 (gemiddeld 3-5 aangekleurde cellen), score 3 (gemiddeld 5-10 aangekleurde cellen) of een score 4 (gemiddeld >10 aangekleurde cellen).

De lokalisatie van de positieve expressie werd op eenzelfde manier beoordeeld, waarbij de coupe geheel werd beoordeeld en zo alle zones van de lymfeknoop werden afgegaan. Er werd hierbij geen scoresysteem gebruikt.

5.5 Statistische analyse merkerdensiteit

Voor de statistische analyse per merker werd de Fisher's Exact Test in R gebruikt, om de associatie tussen categorische variabelen bij een kleine steekproefgrootte te onderzoeken. Als nulhypothese werd gesteld geen verband te zien tussen de merkerdensiteit en ziekte-toestand van de patiënt. De test werd voor elke merker afzonderlijk uitgevoerd, waarbij het aantal coupes met een specifieke score in een kruistabel werd uitgezet tegen lymfeknoop-classificatie ("type").

6 Resultaten

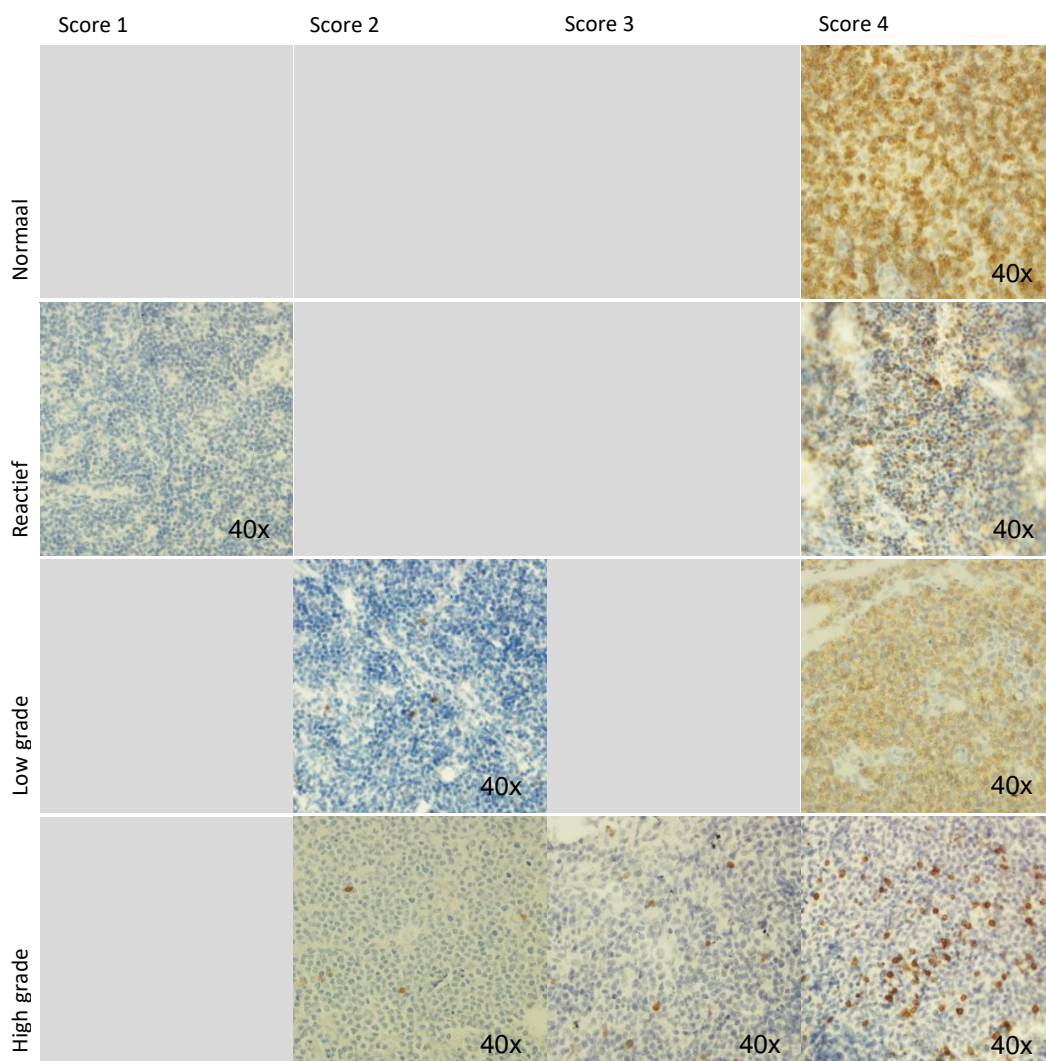
6.1 Densiteitsonderzoek

6.1.1 Merker CD3

Bijna alle lymfeknoopstalen, ongeacht de categorie, tonen een aanzienlijke dichtheid aan CD3-positieve cellen (Tabel 3) (Figuur 2). Een analyse met de Fisher's Exact Test toont met een p-waarde van 0,7237 geen correlatie aan tussen de CD3 dichtheid en het type lymfeknoop.

Tabel 3: Densiteit CD3. Het aantal coupes met een specifieke score wordt uitgezet tegen de lymfeknoop-classificatie ("type").

Type	Score			
	1	2	3	4
Normaal	0	0	0	6
Reactief	1	0	0	5
Low grade	0	1	0	3
High grade	0	1	1	6
	1	2	1	20



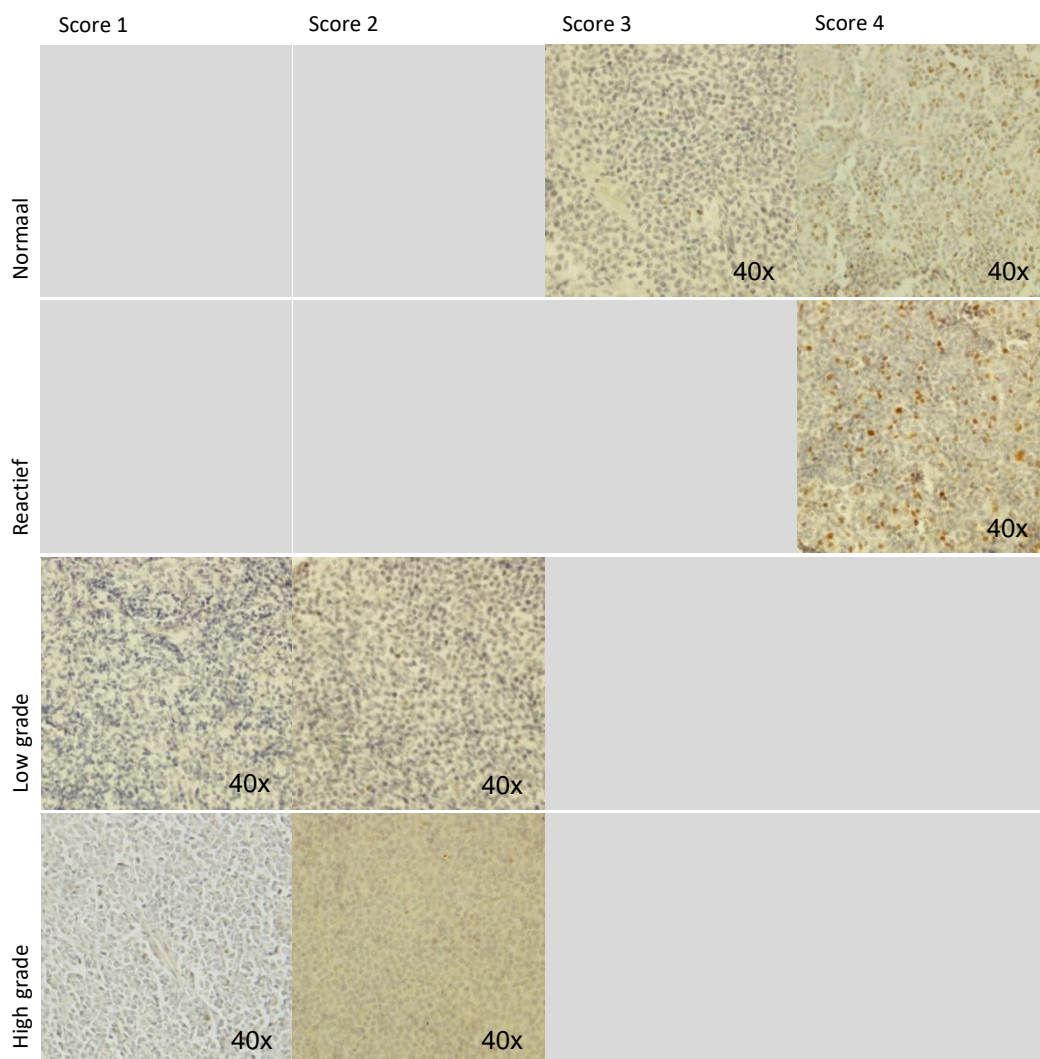
Figuur 2: Densiteit CD3: IHC. De grijze vakken hebben geen corresponderende histologische coupes.

6.1.2 Merker FoxP3

Het resultaat van de Fisher's Exact Test-analyse laat met een p-waarde van 1.044e-6 een significante correlatie zien tussen de FoxP3-merkerdensiteit en lymfeknoopclassificatie (Tabel 4). De nulhypothese wordt verworpen en toont aan dat een lage FoxP3-densiteit wordt gecorreleerd met lymfoom van lage of hoge graad, terwijl een hogere FoxP3-densiteit geassocieerd wordt met een normale of reactieve lymfeknoop (Figuur 3).

Tabel 4: Densiteit FoxP3. Het aantal coupes met een specifieke score wordt uitgezet tegen de lymfeknoop-classificatie ("type").

Type	Score			
	1	2	3	4
Normaal	0	0	3	2
Reactief	0	0	0	7
Low grade	1	2	0	0
High grade	5	1	0	0
	6	3	3	9



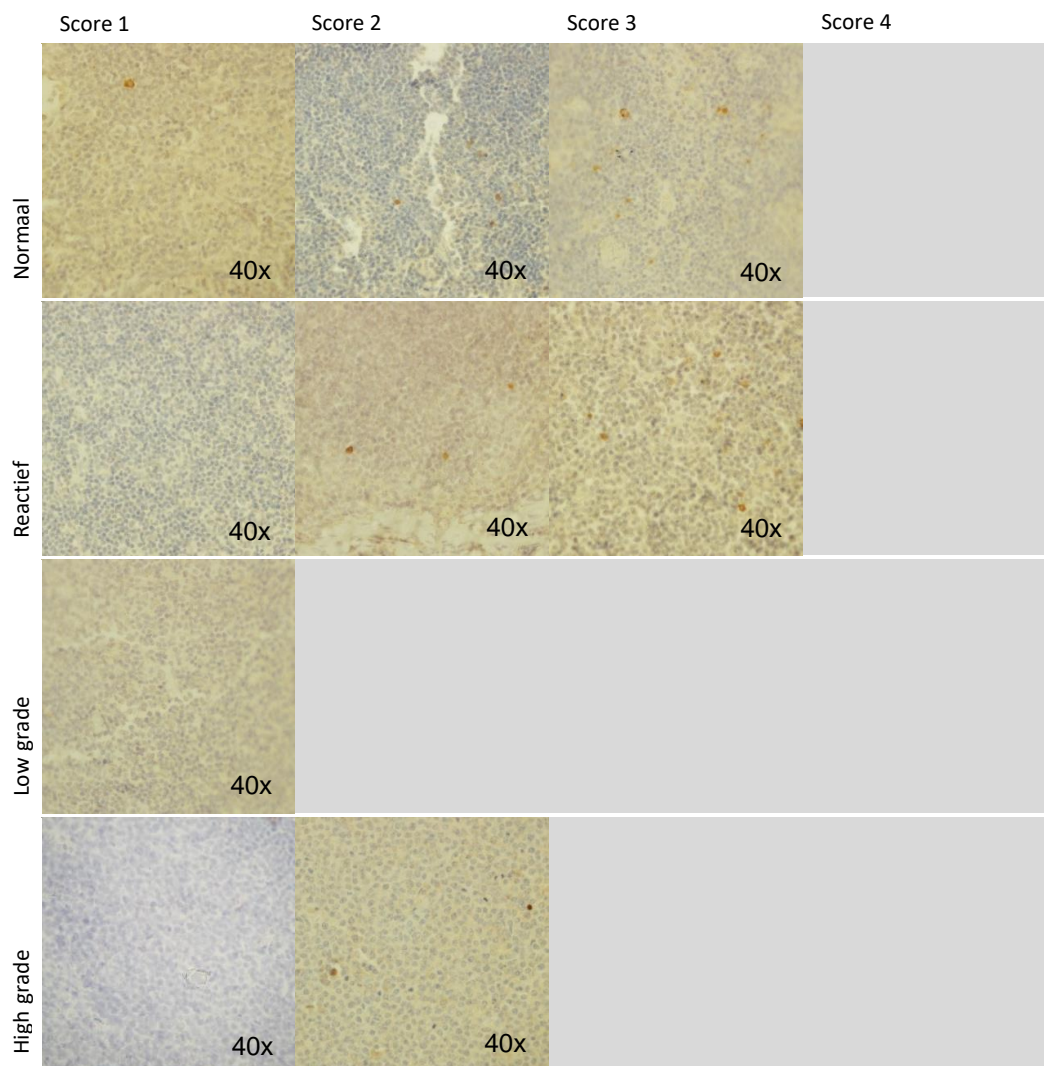
Figuur 3: Densiteit FoxP3: IHC. De grijze vakken hebben geen corresponderende histologische coupes.

6.1.3 Merker PD-L1

De meerderheid van de lymfeknoopstalen tonen een (zeer) lage expressie voor PD-L1 (Tabel 5) (Figuur 4). Daarnaast heeft een analyse met de Fisher's Exact Test geen correlatie kunnen bewijzen tussen de PD-L1-densiteit en lymfeknoopclassificatie, geïllustreerd door de verkregen p-waarde van 0,4299.

Tabel 5: Densiteit PD-L1. Het aantal coupes met een specifieke score wordt uitgezet tegen de lymfeknoop-classificatie ("type").

Type	Score			
	1	2	3	4
Normaal	2	1	2	0
Reactief	3	3	1	0
Low grade	3	0	0	0
High grade	5	1	0	0
	13	5	3	0

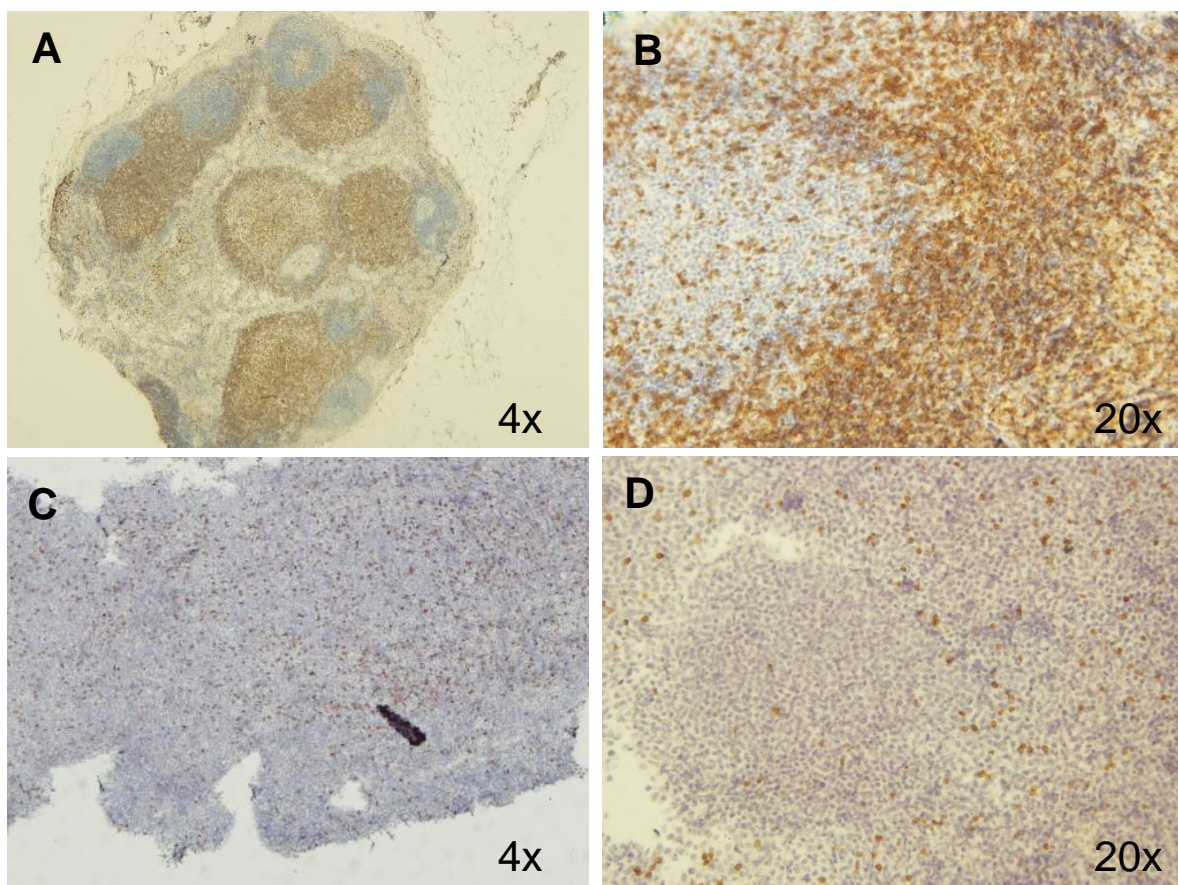


Figuur 4: Densiteit PD-L1: IHC. De grijze vakken hebben geen corresponderende histologische coupes.

6.2 Lokalisatieonderzoek

6.2.1 Merker CD3

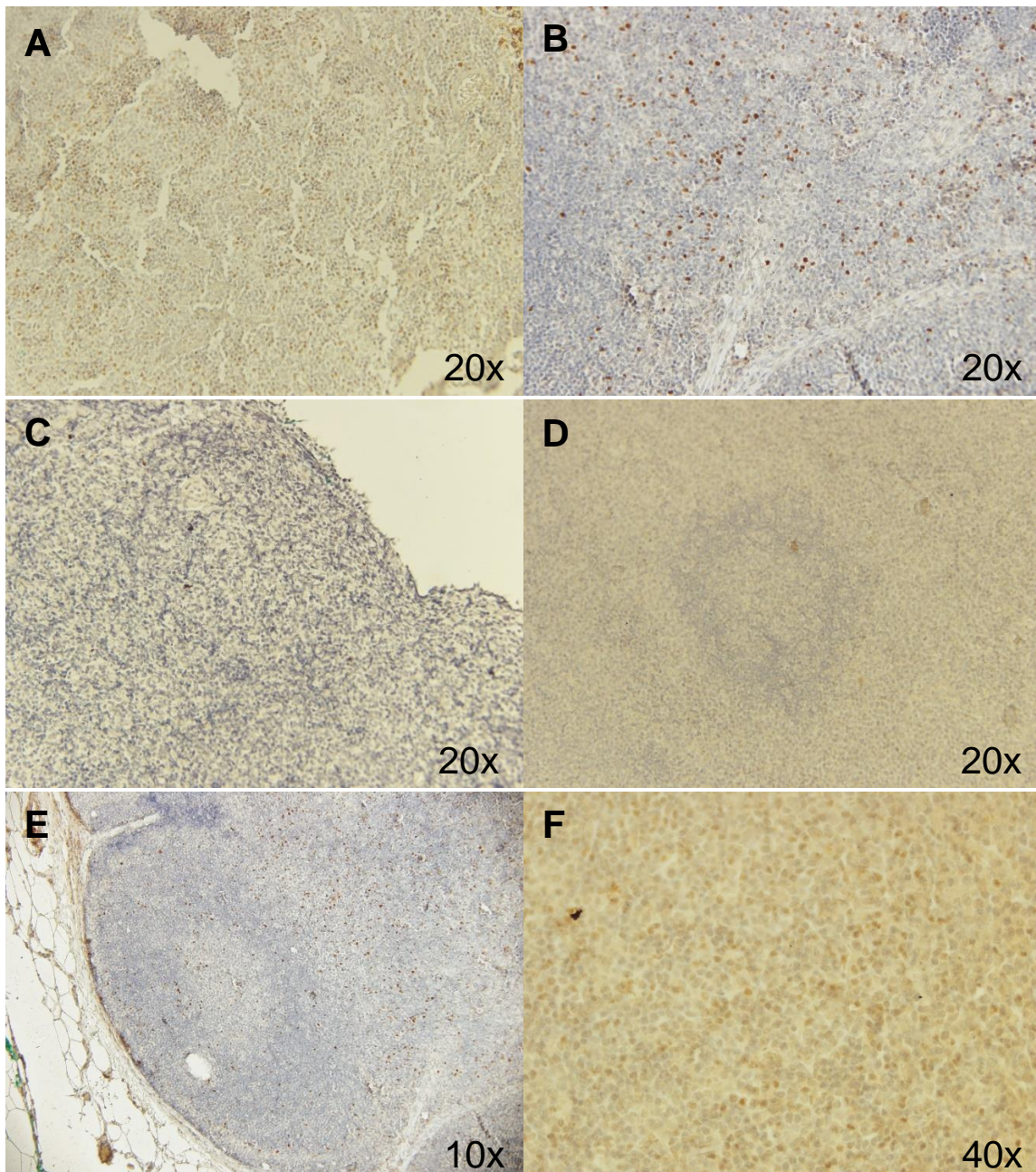
Naast het onderzoek naar de densiteit van merkers wordt in deze studie specifiek gekeken naar de lokalisatie van de merkers binnen de lymfeknooparchitectuur (Figuur 1). De resultaten laten zien dat bij normale en reactieve lymfeknopen de CD3-positieve cellen doorgaans hevig geclusterd zijn in de interfolliculaire regio's, met name in de paracortex en medulla (Figuur 5 A-B). Dit staat in contrast met de laag- en hooggradige lymfoomstalen, waarbij het celaantal binnen de interfolliculaire clusters lager ligt (Figuur 5 C-D) en de lymfeknooparchitectuur minder duidelijk te onderscheiden is (Figuur 5C). In alle lymfeknooptypes worden sporadisch positieve cellen in de follicels aangetroffen.



Figuur 5. Histologische CD3-lokalisatie. A. Normale lymfeknoop met duidelijke lymfeknooparchitectuur. B. Reactieve lymfeknoop met hevige interfolliculaire clustering en enkele positieve cellen in de follicel. C. Low grade lymfoom-lymfeknoop met onduidelijke lymfeknooparchitectuur. D. High grade lymfoom-lymfeknoop met milde interfolliculaire clustering en enkele positieve cellen in de follicel.

6.2.2 Merker FoxP3

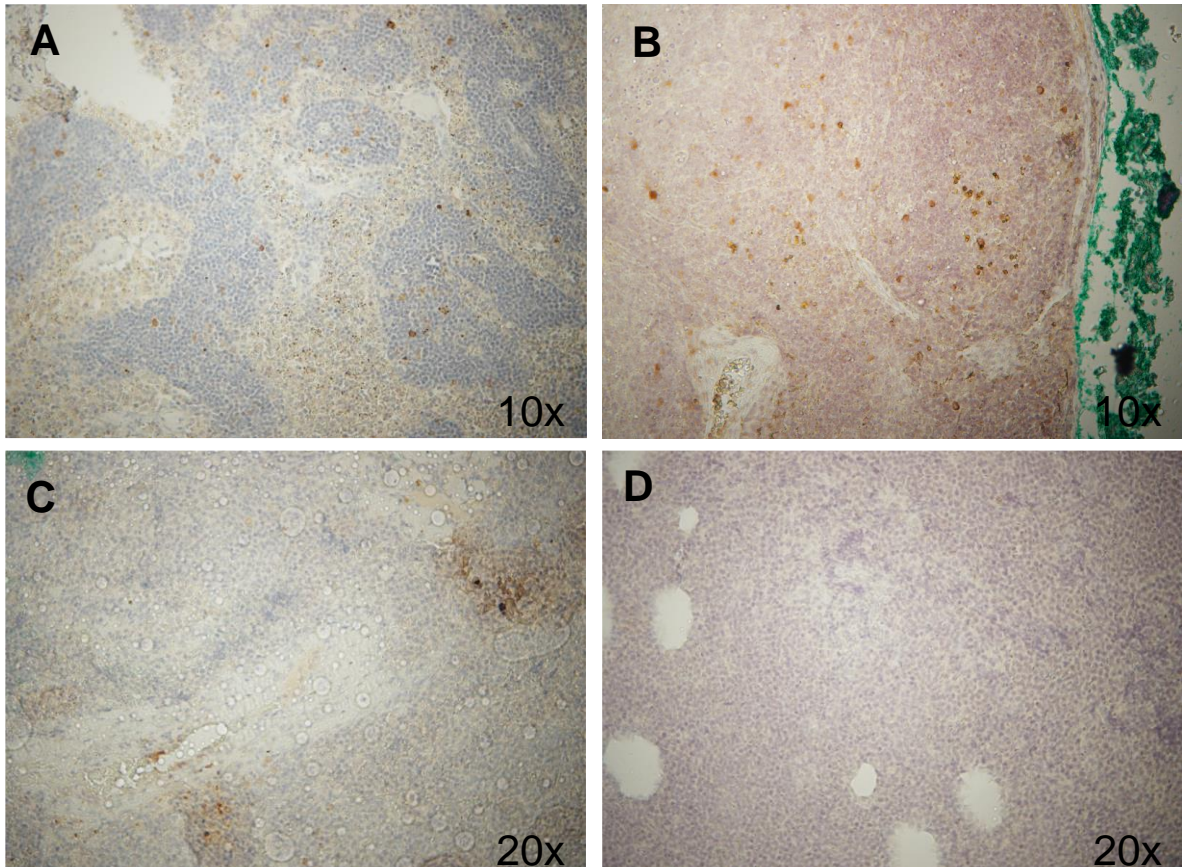
FoxP3-positieve cellen liggen vaak diffuus verspreid over de lymfeknoop. Dit geldt voor alle lymfeknoopcategoriën (Figuur 6 A-F). Er wordt bij één reactieve lymfeknoop (Figuur 6E) een en één high grade lymfoom-lymfeknoop (Figuur 6F) respectievelijk een aanzienlijke en een milde clustering bij de paracortex opgemerkt.



Figuur 6: Histologische FoxP3-lokalisatie. A. Normale lymfeknoop met diffuus verspreid FoxP3-patroon. B. Reactieve lymfeknoop met diffuus verspreid FoxP3-patroon. C. Low grade lymfoom-lymfeknoop met diffuus verspreid FoxP3-patroon. D. High grade lymfoom-lymfeknoop met diffuus verspreid FoxP3-patroon. E. Reactieve lymfeknoop met FoxP3-clustering ter hoogte van de paracortex. F. High grade lymfoom-lymfeknoop met FoxP3-clustering ter hoogte van de paracortex.

6.2.3 Merker PD-L1

PD-L1-positieve cellen worden in deze studie in een diffuus verspreid patroon waargenomen, ongeacht de lymfeknoopcategorie (Figuur 7 A-D). Een opvallende clustering bij de paracortex wordt echter subtiel waargenomen in één reactieve lymfeknoop.



Figuur 7: Histologische PD-L1-lokalisatie. A: Normale lymfeknoop met diffuus verspreid PD-L1-patroon. B: Reactieve lymfeknoop met diffuus verspreid PD-L1-patroon. C: Low grade lymfoom-lymfeknoop met diffuus verspreid PD-L1-patroon. D: High grade lymfoom-lymfeknoop met diffuus verspreid PD-L1-patroon.

7 Discussie

7.1 Densiteitsonderzoek

7.1.1 Merker CD3

Voor CD3 is er geen statistisch significant verband met de lymfeknoopclassificatie, wat in deze beperkte studie aantoont dat beide parameters onafhankelijk van elkaar zijn zoals vooropgesteld in de nulhypothese.

Over het algemeen tonen de coupes een aanzienlijke dichtheid aan CD3-positieve cellen, wat resulteert in de meest frequente score van 4, die niet onderscheidend is. Echter, het aantal CD3-positieve cellen is wel occasioneel lager in de niet-normale-lymfeknopen, al is dit slechts een trend. Dit kan erop wijzen dat kankercellen mogelijk in variabele mate lokaal de CD3-positieve cellen verdringen of de influx ervan verhinderen.

7.1.2 Merker FoxP3

De bevindingen met betrekking tot FoxP3 in deze studie sluiten aan bij recente veterinaire en humane literatuur, die aangeven dat een verhoogde dichtheid van FoxP3 vaak wordt waargenomen in reactieve lymfeknopen. Deze veterinaire en humane studies suggereren tevens dat slechts een beperkt aantal FoxP3-positieve cellen geïdentificeerd kan worden tussen de snel delende neoplastische cellen (El-Dien et al., 2017; Muir et al., 2017; Lundberg et al., 2019).

De afname van FoxP3-expressie in laaggradige en hooggradige lymfoom-lymfeknopen kan volgens veterinaire en humane studies worden toegeschreven aan de snelle proliferatie van maligne populaties die de resterende FoxP3+ cellen verdringen (Pinheiro et al., 2014; Fortuna et al., 2016; Muir et al., 2017). Een alternatieve verklaring suggereert dat maligne B-lymfocyten cytokines produceren die de FoxP3-expressie door Tregs of andere componenten van de TMO kunnen moduleren (Scott en Gascoyne, 2014; Muir et al., 2017).

Eerdere humane studies hebben aangetoond dat milde tot hoge FoxP3-expressie in diffuus grootcellig B-cellymfoom geassocieerd is met een vroeg stadium, de centroblastische variant en de afwezigheid van miltmetastases en necrose (El-Dien et al., 2017).

7.1.3 Merker PD-L1

Deze studie identificeerde, ondanks dat de nulhypothese niet werd verworpen, een verminderde PD-L1-expressie in lymfeknopen van honden met laaggradig en hooggradig lymfoom in vergelijking met gezonde honden. Dit staat in contrast met eerder onderzoek dat bij (B-cel) lymfoma een verhoogde PD-L1-expressie observeerde. Dit onderzoek kaderde in de context van kanker-geïnduceerde immunosuppressie (Greaves et al., 2013; Baek et al., 2017; Muir et al., 2017; Wang et al., 2018; Kamira et al., 2022; Katsuya et al., 2023; Taylor et al., 2023). Niettemin tonen humane studies aan dat PD-L1-overexpressie sterk varieert afhankelijk van het subtype lymfoom. Overexpressie komt vaker voor bij

klassieke Hodgkin-lymfomen en primaire mediastinale B-cellymfomen (Greaves et al., 2013; Menter et al., 2016; Wang et al., 2018). In tegenstelling brengt de meerderheid van de tumorcellen in folliculair lymfoom, geen PD-L1 tot expressie (Szumera-Ciećkiewicz et al., 2020). Deze variabiliteit in PD-L1 expressie kan worden toegeschreven aan kankerinvasiviteit (Yang en Hu, 2019; Ameli et al., 2022), waarbij agressieve kankers, zoals mediastinaal B-cellymfoom, een hogere PD-L1-expressie vertonen.

De geringe PD-L1-expressie bij caniene lymfoom in deze studie kan mogelijk worden verklaard door een vergelijkbare variabiliteit, waarbij slechts weinig agressieve lymfoomvormen in de erg beperkte studiepopulatie waren opgenomen. Daarnaast kan het zijn dat caniene lymfoom inherent een lage PD-L1-expressie heeft, wat suggereert dat immunotherapie via checkpoint-inhibitors mogelijk minder effectief is bij honden.

7.2 Lokalisatieonderzoek

7.2.1 Merker CD3

Het resultaat van dit onderzoek betreffende de lokalisatie van CD3-positieve T-cellen komt overeen met eerdere onderzoeken naar normale lymfeknopen. Bij normale en reactieve lymfeknopen worden CD3-positieve T-lymfocyten geobserveerd in de germinale centra van de lymfefollikels, de paracortex en de medulla, met een clustering in de paracortex (Bozkurt et al., 2014; Aydemir et al., 2020).

Dit staat in contrast met lymfoom-lymfeknopen waar het celaantal algemeen lager ligt, de cellen meer diffuus verspreid zijn en de lymfeknooparchitectuur minder duidelijk te onderscheiden is. Volgens humane literatuur is de vervaging van de zones binnen de lymfoom-lymfeknopen te wijten aan diffuse infiltratie van neoplastische cellen, waardoor de normale structuur verloren gaat (Margaret et al., 2016; Townsend et al., 2020).

7.2.2 Merker FoxP3

Hoewel deze studie geen duidelijke conclusies kon trekken over FoxP3-positieve cellen in lymfeknoopstalen, suggereren sommige veterinaire studies een specifieke lokalisatie. In hyperplastische lymfeknopen bij honden bevindt FoxP3-expressie zich vooral in de paracortex, met minder positieve cellen in mantelcelzones en medullaire sinussen, en slechts sporadisch in germinale centra. Dit verschilt van diffuus grootcellig B-cellymfoom, waar FoxP3-expressie discreet is en slechts een vage folliculaire architectuur toont bij lage vergroting (Muir et al., 2017). Deze vage architectuur kan, net als bij CD3, worden toegeschreven aan infiltratie van snel delende neoplastische cellen.

Dual staining van CD3 met FoxP3 is efficiënt om CD3-positieve T-cellen in een staal te identificeren en FoxP3-positieve Tregs daarbinnen te onderscheiden, waardoor de verhouding Tregs ten opzichte van het totale aantal T-cellen nauwkeurig kan worden bepaald. Flowcytometrie zou aanzienlijke voordelen kunnen bieden door meerdere celpopulaties in één run te definiëren met uitgebreide antilichaampanelen, wat minder tijdsintensief is dan IHC. Bovendien detecteert het subtiele expressieverschillen en multipale merkers op individuele cellen, resulterend in een diepere karakterisering van immuuncelpopulaties in de TMO (Riondato en Comazzi, 2021; Barbara en Jennifer, 2022).

7.2.3 Merker PD-L1

Er is nauwelijks diergeneeskundige of humane literatuur over de lokalisatie van PD-L1-expressie binnen een lymfeknoop beschikbaar. Toch toonden humane studies voor lymfoom-lymfeknopen aan dat de meerderheid van de lymfocyten binnen de interfolliculaire T-celrijke gebieden en in de B-celrijke secundaire follikels weinig tot geen specifieke kleuring voor PD-L1 vertoonden, met slechts sporadische kleuring van lymfoïde cellen binnen reactieve germinale centra (Chen et al., 2013).

Verder droegen niet-maligne cellen, voornamelijk intratumorale macrofagen, bij aan de expressie, waarbij net als lymfoomcellen hun membraan werd aangekleurd (Chen et al., 2013; Ameli et al., 2022; Yang et al., 2024). In deze studie werd geen dubbele immunostaining uitgevoerd om onderscheid te maken tussen PD-L1-positieve kankercellen en PD-L1-positieve macrofagen.

Bovendien toonden deze humane studies een sterke correlatie tussen PD-L1-expressie door maligne cellen en door tumorinfiltrerende macrofagen binnen een tumor aan, ongeacht het tumortype. Dit wijst op gecoördineerde regulatie van PD-L1 tussen deze twee celtypen (Chen et al., 2013; Ameli et al., 2022).

7.3 Beperkingen onderzoek

De beperkte omvang van de steekproef en de onevenwichtige verdeling van patiënten over verschillende ziektestadia in deze studie vormen een uitdaging voor het uitvoeren van betrouwbare statistische analyses. Er wordt tevens geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende celtypen die PD-L1 tot expressie brengen, wat het vermogen om betekenisvolle vergelijkingen te maken verder beperkte. Bovendien ontbreekt een grondige validatie van het PD-L1-antilichaam voor veterinaire doeleinden.

Deze factoren benadrukken de noodzaak aan grootschaligere en methodologisch rigoureuzere studies om meer solide conclusies te kunnen trekken.

8 Conclusie

Deze studie werpt licht op de complexe interactie tussen immuunmerkers en lymfeknoopclassificatie bij canien lymfoom. Hoewel CD3-positieve cellen overvloedig aanwezig zijn, blijkt dit onvoldoende onderscheidend voor differentiatie tussen lymfeknooptypen, waardoor er geen statistisch verband is gevonden. Subjectief wordt echter een lager aantal en meer diffuus verspreid patroon van CD3-positieve cellen waargenomen in lymfoom-lymfeknopen. Deze cellen zijn geconcentreerd in de paracortex van normale en reactieve lymfeknopen, terwijl ze in lymfoom-lymfeknopen een meer verspreid diffuser patroon vertonen, wat wijst op verdringing door snel delende neoplastische cellen. Het benadrukt de behoefte aan een gedetailleerder scoresysteem en een grotere steekproef om significante verschillen tussen de onderzochte groepen te identificeren, om zo het potentieel van CD3 als diagnostische tool te onderzoeken.

Statistisch is FoxP3-expressie hoger in reactieve en lager in maligne lymfeknopen. Deze expressie komt voornamelijk voor in de paracortex van hyperplastische lymfeknopen, met minder aanwezigheid in lymfoom-lymfeknopen. Dit suggereert dat maligne populaties FoxP3-positieve cellen verdringen of dat maligne B-lymfocyten cytokines produceren die FoxP3-expressie door Tregs of andere componenten van de TMO moduleren (Scott en Gascoyne, 2014; Muir et al., 2017). Verder onderzoek naar FoxP3-associaties binnen lymfoomsclassificaties is nodig om de prognostische en diagnostische waarde van FoxP3 bij canien lymfoom te bevestigen.

PD-L1-expressie is, hoewel niet statistisch significant, lager in lymfoom-lymfeknopen dan in gezonde. De meeste lymfocyten en intratumorale macrofagen vertonen weinig PD-L1-expressie, met slechts sporadische kleuring in reactieve germinale centra. Dit contrasteert met eerdere bevindingen van hogere PD-L1-expressie in sommige lymfomen. Humane studies suggereren dat PD-L1-expressie varieert met subtype en agressiviteit van lymfoom, wat wijst op beperkingen van immunotherapie via checkpoint-inhibitoren bij caniene lymfomen. Dit benadrukt de noodzaak voor meer studies naar PD-L1-expressie om de klinische implicaties voor prognose en therapie beter te begrijpen.

De beperkingen van dit onderzoek benadrukken de noodzaak aan grootschaliger en methodologisch strengere studies voor gedetailleerde lokalisatiestudies van kanker- en immuuncellen binnen een lymfeknoop. Verder onderzoek naar de TMO, het immuunsysteem van honden en de interactie van Tregs met lymfoomcellen kan waardevolle informatie opleveren over de immuunsysteem-tumorinteractie en de mogelijke Treg-betrokkenheid bij de progressie van lymfoom. Deze kennis kan leiden tot nieuwe diagnostische, prognostische en therapeutische strategieën ter verbetering van de behandeling van caniene lymfomen.

9 Literatuurlijst

- Ameli, F., Shajareh, E., Mokhtari, M. et al., 2022. Expression of PD1 and PDL1 as immune-checkpoint inhibitors in mantle cell lymphoma. *BMC Cancer* 22, 848 - 856.
- Aydemir, I., Özbey, C., Özkan, O., Kum, Ş., Tuğlu, M., 2020. Investigation of the effects of bisphenol-A exposure on lymphoid system in prenatal stage. *Toxicology and Industrial Health* 36, 502-513.
- Baek, D., Chung, T., Kim, Y., Oh, S., So, K., Park, C., 2017. Changes in regulatory T cells in dogs with B-cell lymphoma and association with clinical tumor stage. *Veterinárni medicína* 62, 647-653.
- Barbara, C. en Jennifer, B., 2022. Chapter 65 Classification and General Features of Lymphoma and Leukemia. In: *Schalm's Veterinary Hematology, Seventh Edn.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 528-537.
- Bilotta, M., Antignani, A., Fitzgerald, D., 2022. Managing the TME to improve the efficacy of cancer therapy. *Frontiers In Immunologie* 13, 1-10.
- Bozkurt, Y., Kuş, S., Kozlu, T., Başak, F., 2014. Histological and immunohistochemical studies of the structure of lymph nodes in Kilis goats. *Biotechnic & Histochemistry* 89, 440–445.
- Chen, B., Chapuy, B., Ouyang, J., Sun, H., Roemer, M., Xu, M., Yu, H., Fletcher, C., Freeman, G., Shipp, M., Rodig, S., 2013. PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clinical Cancer Research* 19, 3462–3473.
- Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G., Di Rella, F., de Candia, P., De Rosa, V., 2020. Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Frontiers in Immunology* 10, 1-20.
- Cook, M. en Dunleavy, K., 2022. Targeting The Tumor Microenvironment in Lymphomas: Emerging Biological Insights and Therapeutic Strategies. *Current Oncology Reports* 24, 1121-1131.
- De Leval, L. en Jaffe, E., 2020. Lymphoma Classification. *The Cancer Journal* 26, 176-185.
- Deng, G., Song X., Greene, M., 2020. FoxP3 in Treg cell biology: a molecular and structural perspective. *Clinical & Experimental Immunology* 199, 255-262.
- Dobson, J., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43, 240-246.
- Duggleby, R., Danby, R., Madrigal, J., Saudemont, A., 2018. Clinical Grade Regulatory CD4+ T Cells (Tregs): Moving Toward Cellular-Based Immunomodulatory Therapies. *Frontiers In Immunology* 9, 1-13.
- El-Dien, M., Abdou, A., Asaad, N., Abd El-Wahed, M., Kora, M., 2017. Intratumoral FOXP3+ Regulatory T Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 25, 534-542.
- Fortuna, L., Relf, J., Chang, Y., Hibbert, A., Martineau, H., Garden, O., 2016. Prevalence of FoxP3(+) Cells in Canine Tumours and Lymph Nodes Correlates Positively with Glucose Transporter 1 Expression. *Journal of Comparative Pathology* 155, 171-180.
- Greaves, P., Clear, A., Owen, A., Iqbal, S., Lee, A., Matthews, J., Wilson, A., Calaminici, M., Gribben, J., 2013. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood* 122, 2856–2863.

- Hung, N., Thanh, N., Minh, T., Chuong, T., Khuy, D., Luan, D., & Ngoc Mai, H., (2023). Malignancy-like subtle histological changes and misdiagnosis pitfalls in reactive hyperplastic lymph nodes. *Biomedical Research and Therapy* 10, 5960-5971.
- Impellizeri, J., Gavazza, A., Greissworth, E., Crispo, A., Montella, M., Ciliberto, G., Lubas, G., Aurisicchio, L., 2018. *Journal of Translational Medicine* 16, 349-356.
- Kamira, M., Angimar, U., Eva, S. en Javier, P., 2022. Regulatory T cells (Tregs) in lymphoid malignancies and the impact of novel therapies. *Frontiers in Immunology* 13, 1-13.
- Katsuya, H., Suzumiya, J., Kimura, S., 2023. Clinical PD-1/PD-L1 Blockades in Combination Therapies for Lymphomas. *Cancers* 15, 5399-5414.
- Kumar, S., Kim, D., Henry, C., Bryan, J., Robinson, K., Eaton, A., 2017. Programmed death ligand 1 is expressed in canine B cell lymphoma and downregulated by MEK inhibitors. *Veterinary and Comparative Oncology* 15, 1119-1613.
- Lundberg, J., Berglund, D., Molin, D., Kinch, A., 2019. Intratumoral expression of FoxP3-positive regulatory T-cells in T-cell lymphoma: no correlation with survival. *Upsala Journal of Medical Sciences* 124, 105-110.
- Maeda, S., Ohno, K., Fujiwara-Igarashi, A., Uchida, K., Tsujimoto, H., 2016. Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology* 53, 102-112.
- Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2016. Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PLoS One* 11, 1-13.
- Margaret, R., Penny, W., Dennis., W., 2016. *Diagnostic Lymph Node Pathology*. Third Edn., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 113-121.
- Menter, T., Bodmer-Haecki, A., Dirnhofer, S., Tzankov, A., 2016. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Human Pathology* 54, 17-24.
- Menter, T., Alexandar Tzankov, A., Dirnhofer, S., 2021. The tumor microenvironment of lymphomas: Insights into the potential role and modes of actions of checkpoint inhibitors. *Hematological Oncology* 39, 3-10.
- Muir, C., Priestnall, S., Hibbert, A., Brown, C., Garden, O., Scase, T., 2017. Prevalence of FoxP3+ Cells Does Not Correlate With Ki67 Expression in Canine Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Journal of Comparative Pathology* 157, 15-22.
- Munhoz, T., Anai, L., Fonseca, D., Semolin, L., Sueiro, F., Tinucci-Costa, M., 2016. Regulatory T cells in dogs with multicentric lymphoma: peripheral blood quantification at diagnosis and after initial stage chemotherapy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 68, 1-9.
- Pinheiro, D., Chang, Y., Bryant, H., Szladovits, B., Dalessandri, T., et al., 2014. Dissecting the Regulatory Microenvironment of a Large Animal Model of NonHodgkin Lymphoma: Evidence of a Negative Prognostic Impact of FOXP3+ T Cells in Canine B Cell Lymphoma. *PLoS One* 9, 1-15.
- Riondato, F. en Comazzi, S., 2021. Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 1-9.

- Rui-Cheng, J., 2017. Lymph Nodes and Cancer Metastasis: New Perspectives on the Role of Intranodal Lymphatic Sinuses. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 51-86.
- Scott, D., en Gascoyne, R., 2014. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nature Reviews Cancer* 14, 517-534.
- Seelig, D., Avery, A., Ehrhart, E., et al., 2016. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary Sciences* 3, 11.
- Sznol, M. en Chen L., 2013. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clinical Cancer Research* 19, 1021–1034.
- Szumera-Ciećkiewicz, A., Poleszczuk, J., Kuczkiewicz-Siemion, O., Paszkiewicz-Kozik, E., Rymkiewicz, G., Sokół, K., Borysiuk, A., Kotarska, M., Kawecka, M., Owczarek, D., Pytlak, B., Walewski, J., Prochorec-Sobieszek, M., 2020. PD1 distribution pattern, regardless of the cell origin, is an independent microenvironmental prognostic factor for progression-free survival in follicular lymphoma. *Pathology-Research and Practice* 216, 1-6.
- Taylor, J., Truelove, E., Clear, A., Calaminici, M., Gribben, J., 2023. PDL1 shapes the classical Hodgkin lymphoma microenvironment without inducing T-cell exhaustion. *Haematologica* 108, 1068-1082.
- Townsend, W., Pasikowska, M., Yallop, D., Phillips, E., Patten, P., Salisbury, J., Marcus, R., Pepper, P., Devereux, S., 2020. The architecture of neoplastic follicles in follicular lymphoma; analysis of the relationship between the tumor and follicular helper T cells. *Haematologica* 105, 1593-1603.
- Vail, D., Douglas, H., Julias, M., 2019. Chapter 33 Hematopoietic Tumors. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, sixth edition, Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 688-772.
- Valli, V., Kass, P., San Myint, M., Scott, F., 2013. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology* 50, 738-48.
- Wang, Y., Wu, L., Tian, C., Zhang, Y., 2018. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in malignant lymphomas. *Annals of Hematology journal* 97, 229–237.
- Willard-Mack, C., 2006. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicologic Pathology* 34, 409-424.
- Yang, C., Yu, Y., Wang, S., Chen, Y., Chen, T., Hsu, C., Medeiros, L., Chang, K., 2024. Frequent expression of PD-L1 in BLS-type diffuse large B-cell lymphoma: implications for aggressiveness and immunotherapy. *Pathology* 56, 367-373.
- Yang, J. en Hu, G., 2019. Significance of PD-L1 in the diagnosis and treatment of B-cell malignant lymphoma. *Oncology Letters* 17, 3382-3386.
- Zandvliet, M., 2016. Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly* 36, 76-104.

10 Bijlage: Clinicopathologische gegevens

Tabel 1: De clinicopathologische gegevens van de dieren per staal. Deze gegevens omvatten het ras, geslacht, leeftijd, en de classificatie van de lymfeknoop.

Nummer	Ras	Geslacht	Leeftijd	Classificatie lymfeknoop
19w00279	Amerikaanse Cocker Spaniël	Vrouwelijk	9 jaar	Normaal
19w00545	Boomer	Vrouwelijk	8 jaar	Normaal
19w00767	Shih Tzu	Vrouwelijk	5 jaar	Normaal
19w00800	Maltezer	Vrouwelijk	10 jaar	Normaal
21w001042	Yorkshire Terriër	Vrouwelijk, gesteriliseerd	13 jaar	Normaal
22w00412	Kruising St. Bernard	Vrouwelijk, gesteriliseerd	6 jaar	Normaal
19w00791	Border Collie	Mannelijk	1 jaar	Reactief
21w03256	Amerikaanse Bulldog	Mannelijk	1 jaar	Reactief
22w00335	Cairn terriër	Vrouwelijk	9 jaar	Reactief
22w00835	Flatcoated Retriever	Vrouwelijk	6 jaar	Reactief
22w00921	English Bulldog	Mannelijk	12 jaar	Reactief
22w01570	Weimarse Staande Hond	Vrouwelijk	3 jaar	Reactief
22w01946	Staffordshire Terriër	Vrouwelijk	1 jaar	Reactief
22w03463	Labrador Retriever	Vrouwelijk, gesteriliseerd	Ongekend	Reactief
19w09637	Chihuahua	Vrouwelijk, gesteriliseerd	13 jaar	Low grade

21w03756	Berner Sennen	Vrouwelijk, gesteriliseerd	6 jaar	Low grade
21w04023	Border Collie	Mannelijk	12 jaar	Low grade
22w10924	Chihuahua	Ongekend	12 jaar	Low grade
19w01152	Dobberman	Vrouwelijk	10 jaar	High grade
19w01999	Canis Vulgaris	Mannelijk, gesteriliseerd	6 jaar	High grade
19w02528	Duitse Herder	Mannelijk, gesteriliseerd	5 jaar	High grade
19w02600	Maltezer	Vrouwelijk, gesteriliseerd	9 jaar	High grade
19w02601	Cocker spaniël	Vrouwelijk	13 jaar	High grade
19w05372	Alaska Malamute	Vrouwelijk, gesteriliseerd	10 jaar	High grade
19w09639	Yorkshire Terriër	Mannelijk, gesteriliseerd	7 jaar	High grade
21w03226	Beagle	Mannelijk	10 jaar	High grade
21w04764	Newfoundlander	Vrouwelijk	9 jaar	High grade
21w08305	Duitse Herder	Ongekend	6 jaar	High grade
21w09242	Jack Russel Terriër	Vrouwelijk, gesteriliseerd	9 jaar	High grade
22w02494	Tibetaanse Terriër	Mannelijk	11 jaar	High grade