



# ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΕΦΡΙΝΩΝ ΤΥΠΟΥ Α ΕΡΗ-Α1, -Α2, -Α4 ΚΑΙ -Α6 ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΘΥΜΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Χ. Μασσαούτης<sup>1,2</sup>, Π. Σαράντης<sup>1</sup>, Μ. Μπόμπος<sup>3</sup>, Ν. Τσουκαλάς<sup>1,4</sup>, Π. Αλεξάνδρου<sup>1</sup>, Δ. Ροντογιάννη<sup>2</sup>, Σ. Θεοχάρης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Πρώτο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. <sup>2</sup>Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα. <sup>3</sup>Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας Καρκίνου, Θεσσαλονίκη. <sup>4</sup>Ογκολογική Κλινική, Νοσηλευτικό Ίδρυμα Μετοχικού Ταμείου Στρατού (NIMTS), Αθήνα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ** Οι υποδοχείς των εφρινών (ERH), υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, εμπλέκονται στην ανάπτυξη και ομοίωση των ιστών και υπερεκφράζονται σε διαφορετικά νεοπλασμάτα. Η αναστολή τους σε ζωικά μοντέλα εμποδίζει την ανάπτυξη των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων χωρίς σημαντική τοξικότητα, φειδόμενη της Τ-Λεμφοκυτταρικής ωρίμανσης.

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ** Προσδιορισμός και κλινικο-παθολογοανατομικός συσχετισμός της έκφρασης ERH τύπου Α σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα.

**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ** Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός έκφρασης ERH-A1, -A2, -A4 και -A6 (H-score) σε μικροσυστοιχίες ιστών από 98 περιπτώσεις επιθηλιακών θυμικών νεοπλασμάτων. Στατιστική ανάλυση κατά Pearson  $\chi^2$  και Cox της συσχέτισης με ιστοπαθολογικές παραμέτρους και την επιβίωση των ασθενών, αντίστοιχα.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Διαπιστώνονται καθολική έκφραση ERH-A4 ποικίλλουσας έντασης, ποικίλλουσα επιθηλιακή κυτταροπλασματική έκφραση ERH-A2 και ERH-A6, λεμφοκυτταρική πυρηνική έκφραση ERH-A2 και λιγότερο ERH-A6, υψηλότερη κυτταροπλασματική έκφραση ERH-A6 στους πλουσιότερους σε επιθηλιακά κύτταρα υποτύπους (B2, B3, καρκίνωμα) (P<0.001) και συχνότερα έντονη έκφραση ERH-A4 σε θυμώματα B3 και καρκινώματα (P=0.011). Η υψηλή έκφραση ERH-A6 είναι ασυνήθης, αλλά πιθανότερη στον υπότυπο B1 (P=0.015).

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Οι ERH-A εκφράζονται σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα και σχετίζονται με τον ιστολογικό υπότυπο εμπλεκόμενοι ενδεχομένως στη θυμική νεοπλασία, και αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

## ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

ΣΤΑΜΑΤΙΟΣ ΘΕΟΧΑΡΗΣ  
Πρώτο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής ΕΚΠΑ  
Email: stamtheo@med.uoa.gr  
Τηλέφωνο: 210 746 2116

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι επιθηλιακοί όγκοι του θύμου, τα θυμώματα και τα θυμικά καρκινώματα, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων του πρόσθιου μεσοθωρακίου που ποικίλλουν ως προς τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, τις κλινικές εκδηλώσεις και την πρόγνωση. Η φυσική τους πορεία και η βιολογική συμπεριφορά κυμαίνεται από ήπια έως ιδιαίτερα επιθετική. Το 40% των ασθενών εμφανίζουν παρανεοπλασματικά σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένης της βαρείας μυασθένειας και της αμιγούς απλασίας της ερυθράς σειράς.

Οι εφρίνες (ehrins) και οι υποδοχείς τους (Ehrs) αποτελούν ένα σύστημα μεσοκυττάριας επικοινωνίας με κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και φυσιολογία πολλών ιστών, καθώς και στην παθογένεια νόσων. Υπάρχουν 9 υποδοχείς εφρινών τύπου Α (Erh-A1-8 και Erh-A10) που αλληλεπιδρούν με 5 εφρίνες τύπου Α (ehrfin-A1-5).

Όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την καρκινογένεση με διαταραχή της έκφρασης των εφρινών και των υποδοχέων τους, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, στην ενεργοποίηση ή καταστολή ογκογενετικών σημάτων και στο σχηματισμό της προμεταστατικής φωλεάς.

Η έκφραση των Ehrs τύπου Α, στους επιθηλιακούς όγκους του θύμου και ο ενδεχόμενος ρόλος τους στην παθογένεση των εν λόγω νεοπλασμάτων δεν έχει μελετηθεί. Σκοπός της παρούσας μελέτης, επομένως, είναι η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της έκφρασης των Erh-A1, Erh-A2, Erh-A4 και Erh-A6 σε 98 επιθηλιακούς όγκους του θύμου και η συσχέτισή της με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την επιβίωση των ασθενών.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κύβιοι παραφίνης από 98 επιθηλιακούς όγκους του θύμου αδένα, που εξαιρέθηκαν μεταξύ του 2009 και του 2019 συλλέχθηκαν από τα αρχεία των παθολογοανατομικών εργαστηρίων των ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» και «Λαϊκών».

Ένας αντιπροσωπευτικός κύβος παραφίνης επιλέχθηκε κατόπιν αξιολόγησης όλων των τομών Η&Ε. Κατασκευάστηκαν οκτώ μικροσυστοιχίες ιστών (TMAs) (TMA Model I, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, U.S.A.). Συμπεριλήφθηκαν τρεις έως πέντε ιστικοί κύλινδροι διαμέτρου 1,5 χιλ, αντιπροσωπευτικοί της ετερογένειας του κάθε όγκου.

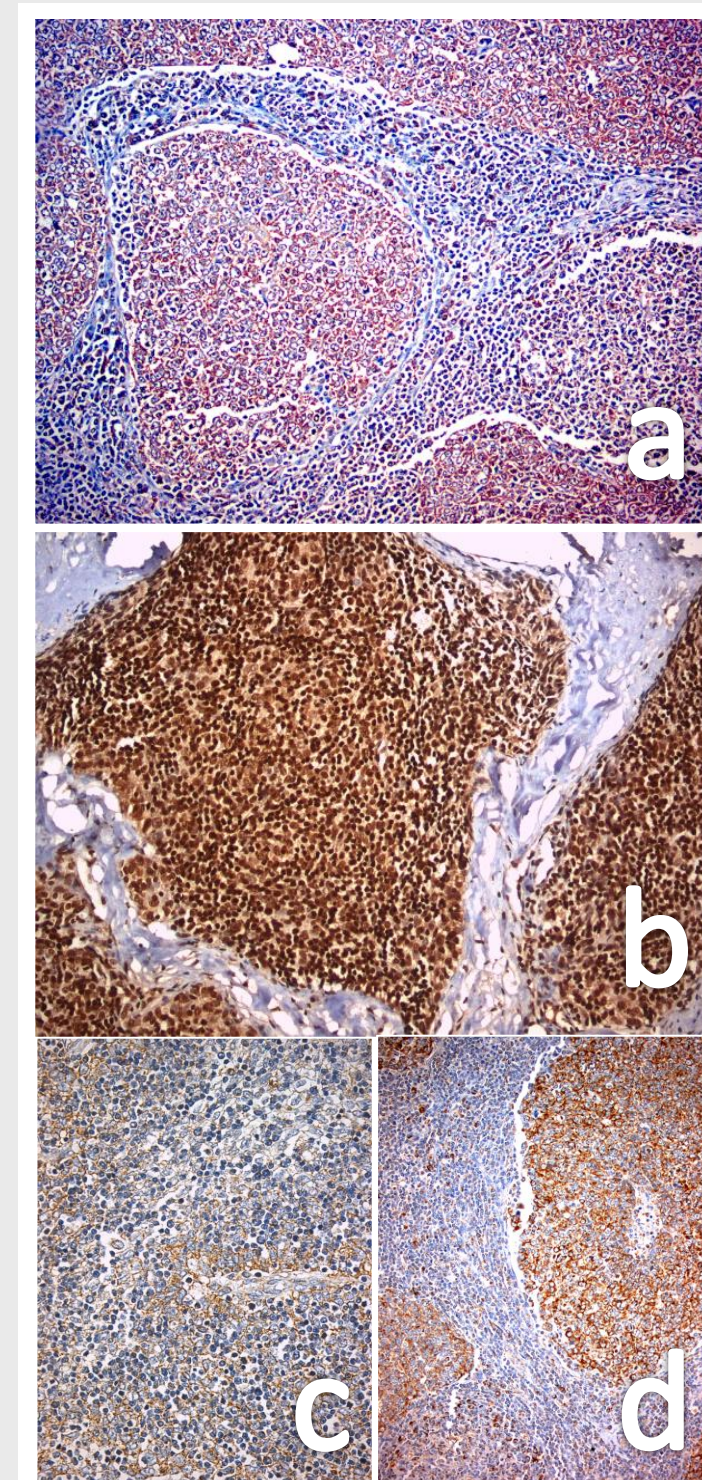
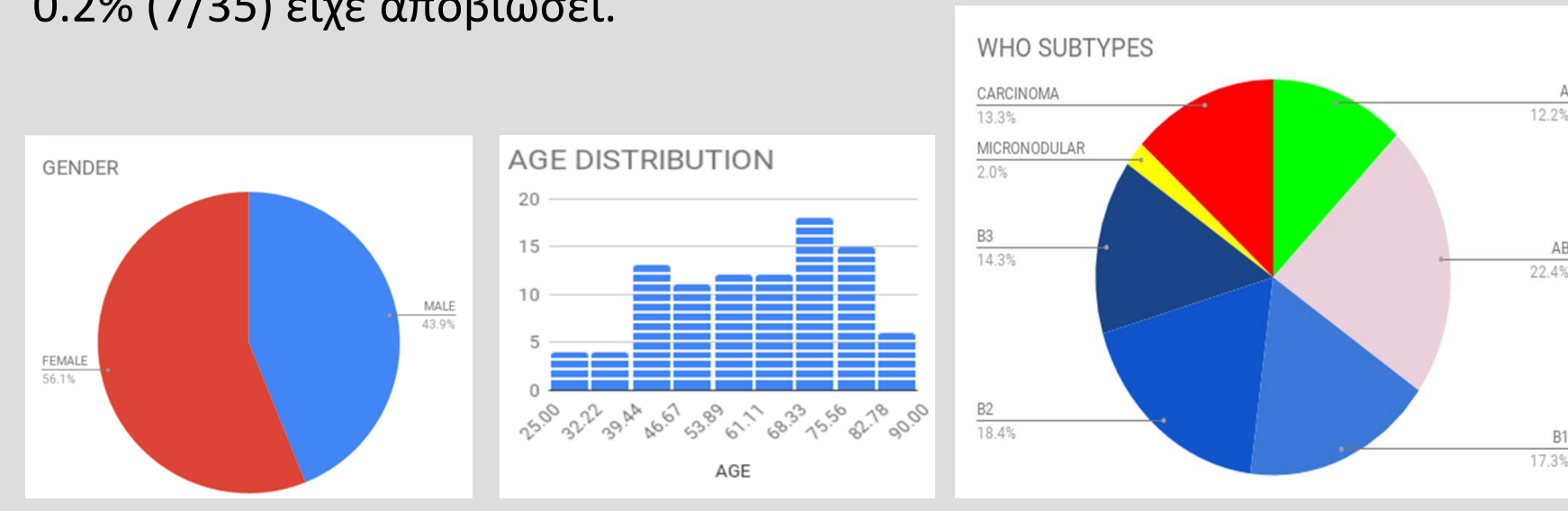
Διενεργήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τα αντισώματα έναντι των Erh-A1, Erh-A2, Erh-A4 και Erh-A6 με χρωμογόνο DAB και αντίχρωση αιματοξυλίνης.

Υπολογίστηκε το H-score για κάθε περιστατικό ως εξής: η ημιοσοτική αξιολόγηση της έντασης χρώσης (score 1 έως 3) πολλαπλασιάστηκε με το ποσοστό των θετικών κυττάρων. Η επιθηλιακή και η λεμφοκυτταρική συνιστώσα, καθώς και η πυρηνική και κυτταροπλασματική θετικότητα αξιολογήθηκαν χωριστά.

Η ηλικία, το φύλο, ο ιστολογικός υπότυπος, το στάδιο κατά Masaoka-Koga, η παρουσία βαρείας μυασθένειας, και η επιβίωση συσχετίστηκαν με το H-score με τις στατιστικές δοκιμασίες Mantel-Cox και Pearson's  $\chi^2$  κατόπιν ταξινόμησης των περιστατικών σε H-score<sup>high</sup> και H-score<sup>low</sup> βάσει της μέσης τιμής H-score.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

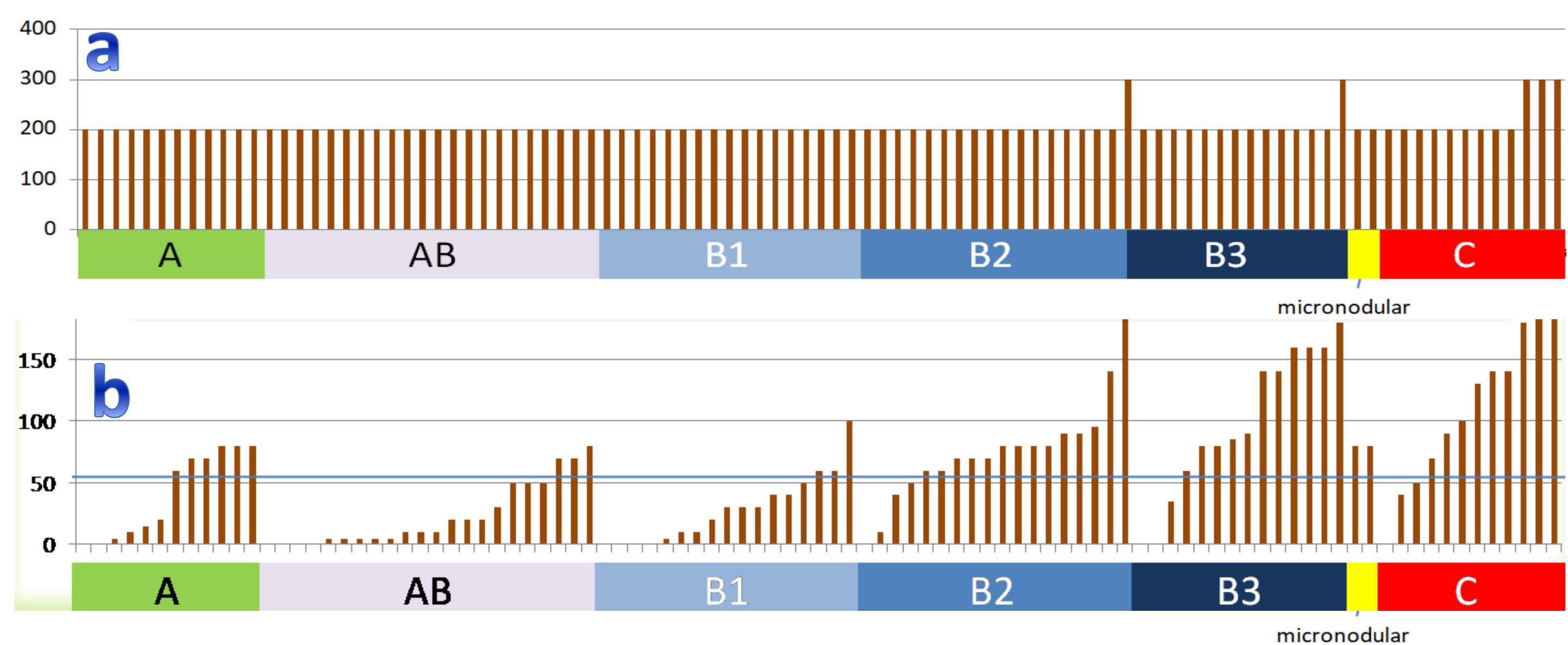
Το 56.1% (55/98) του δείγματος ήταν γυναίκες και το 43.9% (43/98) ήταν άνδρες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 61 έτη (εύρος: 27 – 88 έτη). Οι επιμέρους συχνότητες των υποτύπων κατά ΠΟΥ ήταν ως εξής: τύπου Α 12.2% (12/98), τύπου ΑΒ 22.4% (22/98), τύπου Β1 17.3% (17/98), τύπου Β2 18.4% (18/98), τύπου Β3 14.3% (14/98), μικροζώδες θύμωμα με λεμφοειδές στρώμα (MNT) 2% (2/98), τύπου C (καρκίνωμα) 13.3% (13/98). Τα στάδια κατά Masaoka-Koga stage ήταν: I στο 19.1% (17/89), IIa στο 38.2% (34/89), IIb στο 16.9% (15/89), III στο 19.1% (17/89), IVa στο 0.1% (3/89) και IVb στο 0.1% (3/89) των ασθενών. Τα χειρουργικά όρια εκτομής ήταν αρνητικά στο 70.2% (33/47) και θετικά στο 29.8% (14/47) των ασθενών. Βαρεία μυασθένεια συνυπήρχε στο 58.6% (34/58) των ασθενών, δύο εκ των οποίων εμφάνισαν επίσης πέμφιγα και αυτοάνοση θυρεοειδοπάθεια, 3 ασθενείς είχαν αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς και 2 είχαν υποθυρεοειδισμό. Χημειοθεραπεία χορηγήθηκε στο 26.3% (10/38) και ακτινοθεραπεία στο 48.6% (18/37) των ασθενών. Πέντε από αυτούς τους ασθενείς έλαβαν τόσο χημειο- όσο και ακτινοθεραπεία. Δεδομένα παρακολούθησης ήταν διαθέσιμα για 35 ασθενείς και κυμαινόνταν μεταξύ 5 και 134 μηνών (μέση διάρκεια παρακολούθησης: 42.6 μήνες). Το 71.4% (25/35) αυτών των ασθενών ήταν εν ζωή ελεύθεροι νόσου, το 0.1% (3/35) ήταν εν ζωή με νόσο και το 0.2% (7/35) είχε αποβιώσει.



**Εικόνα 1.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση Erh-A2 (a), Erh-A4 (b) και Erh-A6 (c, d).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΧΡΩΣΗΣ:** Η έκφραση Erh-A2 ήταν αποκλειστικά κυτταροπλασματική τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα. Η έκφραση Erh-A4 ήταν κυτταροπλασματική και πυρηνική στα επιθηλιακά κύτταρα, και πυρηνική στα λεμφοκύτταρα. Η έκφραση Erh-A6 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και σπάνια μόνον πυρηνική στα επιθηλιακά κύτταρα, και κυτταροπλασματική στα λεμφοκύτταρα. Έκφραση Erh-A1 δεν παρατηρήθηκε.
- ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:** Η έκφραση Erh-A2 ποίκιλλε ευρέως τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα (μέσοH-score=125; εύρος: 5-300) όσο και στα λεμφοκύτταρα (μέσο H-score=86; εύρος: 0-300). Ο Erh-A6 εκφραζόταν διάχυτα σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, με σπάνιες μόνο διακυμάνσεις στην ένταση της χρώσης μεταξύ των περιστατικών: όλα τα περιστατικά είχαν μέτριας έντασης επιθηλιακή έκφραση Erh-A6 εκτός από πέντε έντονα θετικά περιστατικά TETs: ένα τύπου B2, ένα τύπου B3 και τρία τύπου C (μέσο H-score=205; εύρος: 200-300). Η λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-A6 ήταν έντονη στην πλειονότητα των περιστατικών (μέσο H-score=277; εύρος: 100-300). Η κυτταροπλασματική επιθηλιακή έκφραση Erh-A6 παρουσίαζε εύρος διακύμανσης (μέσο H-score=59; εύρος: 0-190), ενώ η πυρηνική επιθηλιακή έκφραση Erh-A6 ήταν πολύ σπάνια, καθ' ότι παρατηρήθηκε μόνο σε 6 περιστατικά (μέσο H-score=3; εύρος: 0-140). Η λεμφο-κυτταρική έκφραση Erh-A6 ήταν σπάνια και εν γένει ασθενής (μέσοH-score=6; εύρος: 0-180).
- ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ:** Οι υπότυποι με μεγαλύτερη αναλογία επιθηλιακών κυττάρων (B2, B3 και C) είχαν υψηλότερο κυτταροπλασματικό Erh-A6 H-score (p<0.001). Η πυρηνική εντόπιση του Erh-A6 ήταν σπάνια και σχετιζόταν λιγότερο ισχυρά με τον ιστολογικό υπότυπο (p=0.097). Τα θυμώματα τύπου B3 και τα θυμικά καρκινώματα ήταν πιθανότερο να εκφράζουν έντονα τον Erh-A4 (p=0.011). Υψηλό λεμφοκυτταρικό Erh-A6 H-score ήταν ασύνθετος, αλλά πιο πιθανό να παρατηρηθεί τον υπότυπο B1 (p=0.015), ο οποίος είναι πλούσιος σε λεμφοκύτταρα. Η έκφραση Erh-A2 δεν συσχετίστηκε με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, ούτε στην επιθηλιακή ούτε στη λεμφοκυτταρική συνιστώσα, εντούτοις, παρατηρήθηκε μια τάση των θυμωμάτων τύπου B1 να εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση Erh-A2 (p=0.058). Δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης των εφρινών τύπου Α με το στάδιο Masaoka ή την επιβίωση.



**Εικόνα 2.** Υψηλότερο επιθηλιακό Erh-A4 (a) και κυτταροπλασματικό επιθηλιακό Erh-A6 (b) H-score στους υπότυπους πλούσιους σε επιθηλιακά κύτταρα. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει ένα περιστατικό, Τα περιστατικά έχουν τοποθετηθεί κατά αυζούμενο H-score ανά υπότυπο σε κάθε διάγραμμα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Erh-A4 και Erh-A6 εμφανίζουν υψηλότερη επιθηλιακή έκφραση στα θυμώματα τύπου B2 και B3, καθώς και στα θυμικά καρκινώματα συγκριτικά με τους τύπους Α και ΑΒ (p=0.011 και p<0.001 για Erh-A4 και Erh-A6 αντίστοιχα). Ο Erh-A6 δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό θύμο σύμφωνα με δεδομένα του The Cancer Genome Atlas, αλλά ήταν διάχυτα θετικός τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα όλων των τύπων θυμώματος σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο, επομένως ο Erh-A6 θα μπορούσε ενδεχομένως να θεωρηθεί ογκογενετικός παράγοντας της θυμικής νεοπλασίας. Οι Erh-A4 και Erh-A6 εμπλέκονται στη βιολογία ποικίλων καρκίνων. Αυξημένη έκφραση Erh-A6 έχει περιγραφεί ως ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού (Zhou et al. 2018) και έχει συσχετιστεί με πρόοδο νόσου σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (Li et al. 2015), όπου μπορεί να συμμετέχει στην αγγειογένεση και την αγγειακή διήθηση. Εντούτοις, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους ο Erh-A6 μπορεί ενδεχομένως να προάγει την ογκογένεση δεν έχουν διευκρινιστεί. Ομοίως, ο Erh-A4 υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος παγκρέατος και η σίγαση του Erh-A4 συσχετίζεται με μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Iizumi et al. 2006), γεγονός που τον καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο. Οι Miyazaki et al έχουν περιγράψει δυσμενή κλινικά συμβάντα, όπως απομακρυσμένες μεταστάσεις και υποτροπή, σε ασθενείς με καρκίνωμα στομάχου που υπερεκφράζει Erh-A4 (Miyazaki et al. 2013). Η έκφραση Erh-A4 έχει συσχετιστεί επίσης με ανθεκτικότητα στη χημειο- και ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου (Lin et al. 2017; de Marcondes et al. 2016).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι υποδοχείς των εφρινών τύπου Α εκφράζονται σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα και σχετίζονται με τον ιστολογικό υπότυπο εμπλεκόμενοι ενδεχομένως στη θυμική νεοπλασία, αποτελούν επομένως δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Iizumi, M et al. Eph-A4 Receptor, Overexpressed in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Promotes Cancer Cell Growth. *Cancer Sci.* 2006, 97, 1211–1216,  
Li, S et al. Eph-A6 Promotes Angiogenesis and Prostate Cancer Metastasis and Is Associated with Human Prostate Cancer Progression. *Oncotarget* 2015, 6, 22587–22597.  
Lin, C et al. High Expression of Eph-A4 Predicted Lesser Degree of Tumor Regression after Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *J. Cancer* 2017, 8, 1089–1096, doi:10.7150/jca.17471.  
de Marcondes, PG et al. Eph-A4-Mediated Signaling Regulates the Aggressive Phenotype of Irradiation Survivor Colorectal Cancer Cells. *Tumour Biol.* 2016, 37, 12411–12422  
Miyazaki, K.; Inokuchi, M.; Takagi, Y.; Kato, K.; Kojima, K.; Sugihara, K. Eph-A4 Is a Prognostic Factor in Gastric Cancer. *BMC Clin. Pathol.* 2013, 13, 19  
Zhou, D et al. Erythropoietin-Producing Hepatocellular A6 Overexpression Is a Novel Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Oncol. Lett.* 2018, 15, 5257–5263