



ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΕΦΡΙΝΩΝ ΤΥΠΟΥ Β ΕΡΗ-B1, -B2, -B4 ΚΑΙ -B6 ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΘΥΜΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Χ. Μασαούτης^{1,2}, Π. Σαράντης¹, Μ. Μπόμπος³, Ν. Τσουκαλάς^{1,4}, Π. Αλεξάνδρου¹, Δ. Ροντογιάννη², Σ. Θεοχάρης¹

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

ABSTRACT

ΕΙΣΑΓΩΓΗ Οι υποδοχείς των εφρινών (ERH), υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, εμπλέκονται στην ανάπτυξη και ομοίωση των ιστών και υπερεκφράζονται στη νεοπλασία. 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 σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός έκφρασης ERH (H-score) σε μικροσυστοιχίες ιστών από 98 παρασκευάσματα επιθηλιακών θυμικών νεοπλασμάτων. Στατιστική ανάλυση κατά Pearson χ^2 και Cox της συσχέτισης με ιστοπαθολογικές παραμέτρους και την επιβίωση αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Παρατηρούνται πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση ERH-B1 καθολικά στο επιθηλιακό και με διακυμάνσεις στο λεμφοκυτταρικό στοιχείο, ασθενής εστιακή ERH-B2 έκφραση κυρίως στο λεμφοκυτταρικό, λιγότερο στο επιθηλιακό στοιχείο στα μισά περίπου περιστατικά, ποικίλλουσα πυρηνική έκφραση ERH-B6 στα 2/3 των περιστατικών, συχνότερη στα άωρα λεμφοκύτταρα των υποτύπων AB/B1 και σπάνια στα συνοδά ώριμα λεμφοκύτταρα των καρκινωμάτων (P<0.001). Αντίθετα, αναγνωρίζεται υψηλότερη λεμφοκυτταρική έκφραση ERH-B1 στα καρκινώματα (P=0.026). Σημειώνεται υψηλότερη λεμφοκυτταρική (P=0.043) και χαμηλότερη επιθηλιακή έκφραση (P=0.010) ERH-B6 στους όγκους σταδίου Masaoka I/II· η λεμφοκυτταρική έκφραση ERH-B1 σχετίζεται ασθενέστερα με το στάδιο (P=0.059).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Οι ERH-B εκφράζονται σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα και σχετίζονται με προγνωστικές παραμέτρους (υπότυπος, στάδιο Masaoka), εμπλεκόμενοι ενδεχομένως στη θυμική νεοπλασία, και αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

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 εμποδίζεται από ήπια έως ιδιαίτερα επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Το 40% των ασθενών εμφανίζουν παρανεοπλασματικά σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένης της βαρείας μυασθένειας και της αμιγνούς απλασίας της ερυθράς σειράς.

Οι υποδοχείς εφρινών (Ehrs) και οι προσδέτες τους, εφρίνες (ehrgins) αποτελούν ένα σύστημα μεσοκυττάριας επικοινωνίας με κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και φυσιολογία πολλών ιστών, καθώς και στην παθογένεια νόσων. Υπάρχουν 5 Ehrs τύπου Β (Erh-B1 έως -4 και Erh-B6) που αλληλεπιδρούν με 3 ehrhrgins τύπου Β (ehrgin-B1 έως -3).

Όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την καρκινογένεση με διαταραχή της έκφρασης του συστήματος Ehrs/ehrgins, 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 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-B1, Erh-B2, Erh-B4 και Erh-B6 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 διαγνωστήκαν μεταξύ του 2009 και του 2019 συλλέχθηκαν από τα αρχεία των παθολογοανατομικών εργαστηρίων των ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός» και «Λαϊκόν».

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.

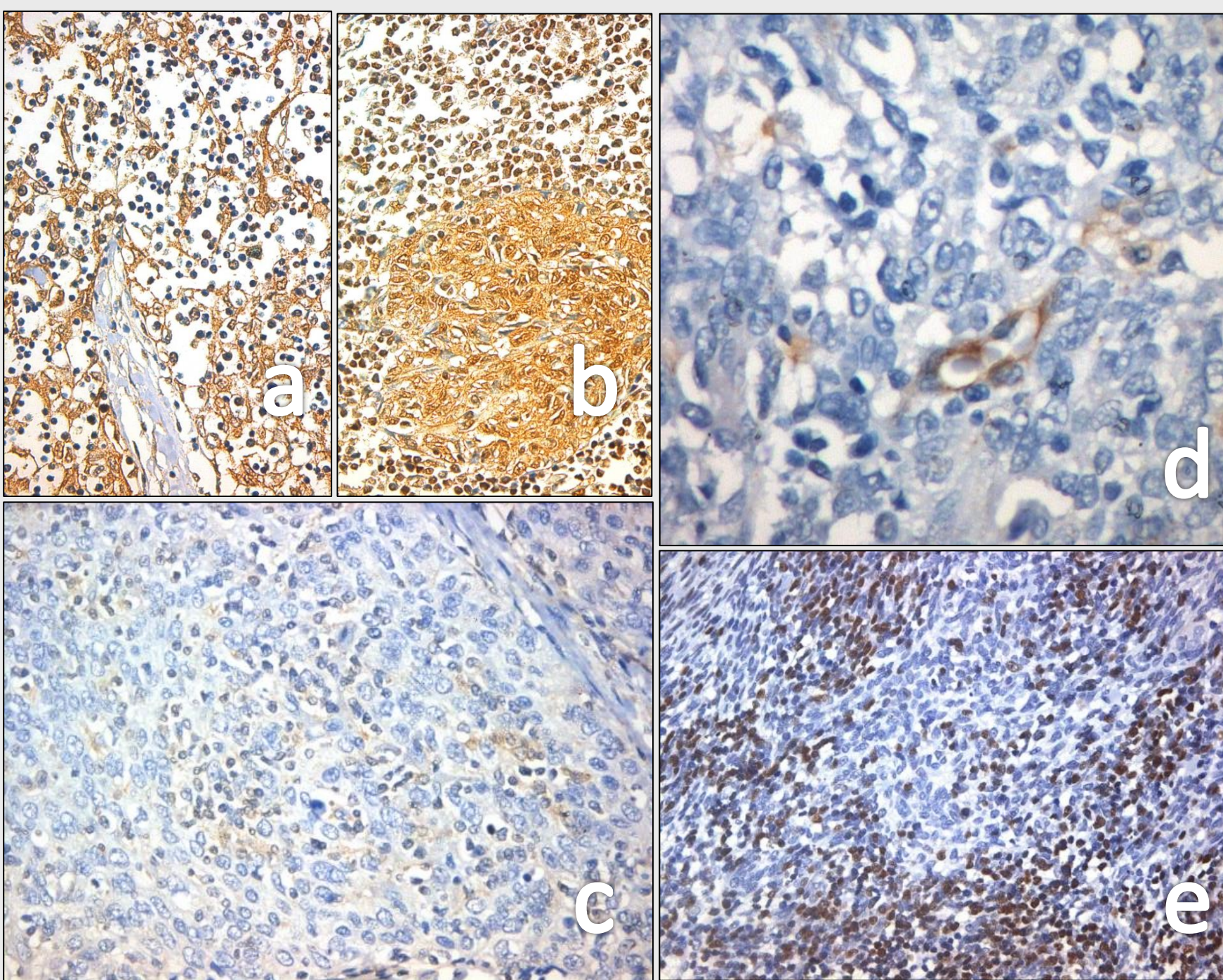
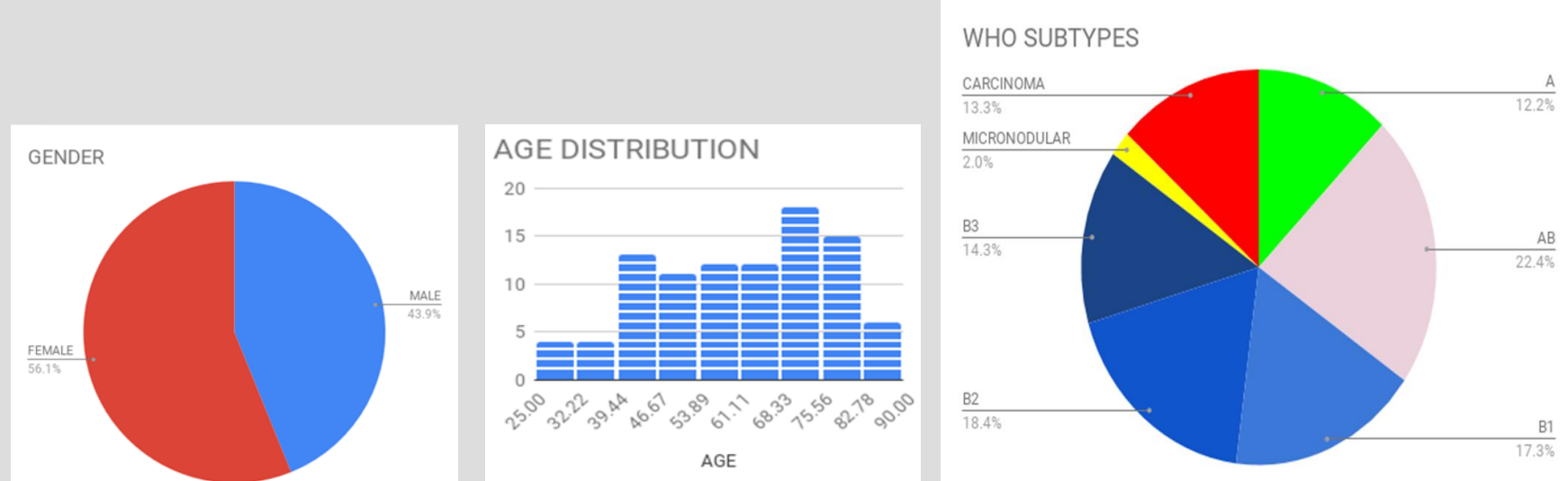
Διενεργήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τα αντισώματα έναντι των ErhB1, ErhB2, ErhB4 και ErhB6 με χρωμογόνο DAB και αντίχρωση αιματοξυλίνης.

Υπολογίστηκε το H-score για κάθε περιστατικό ως εξής: η ημιποσοτική 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 χ^2 κατόπιν ταξινόμησης των περιστατικών σε H-score^{high} και H-score^{low} βάσει της μέσης τιμής H-score.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

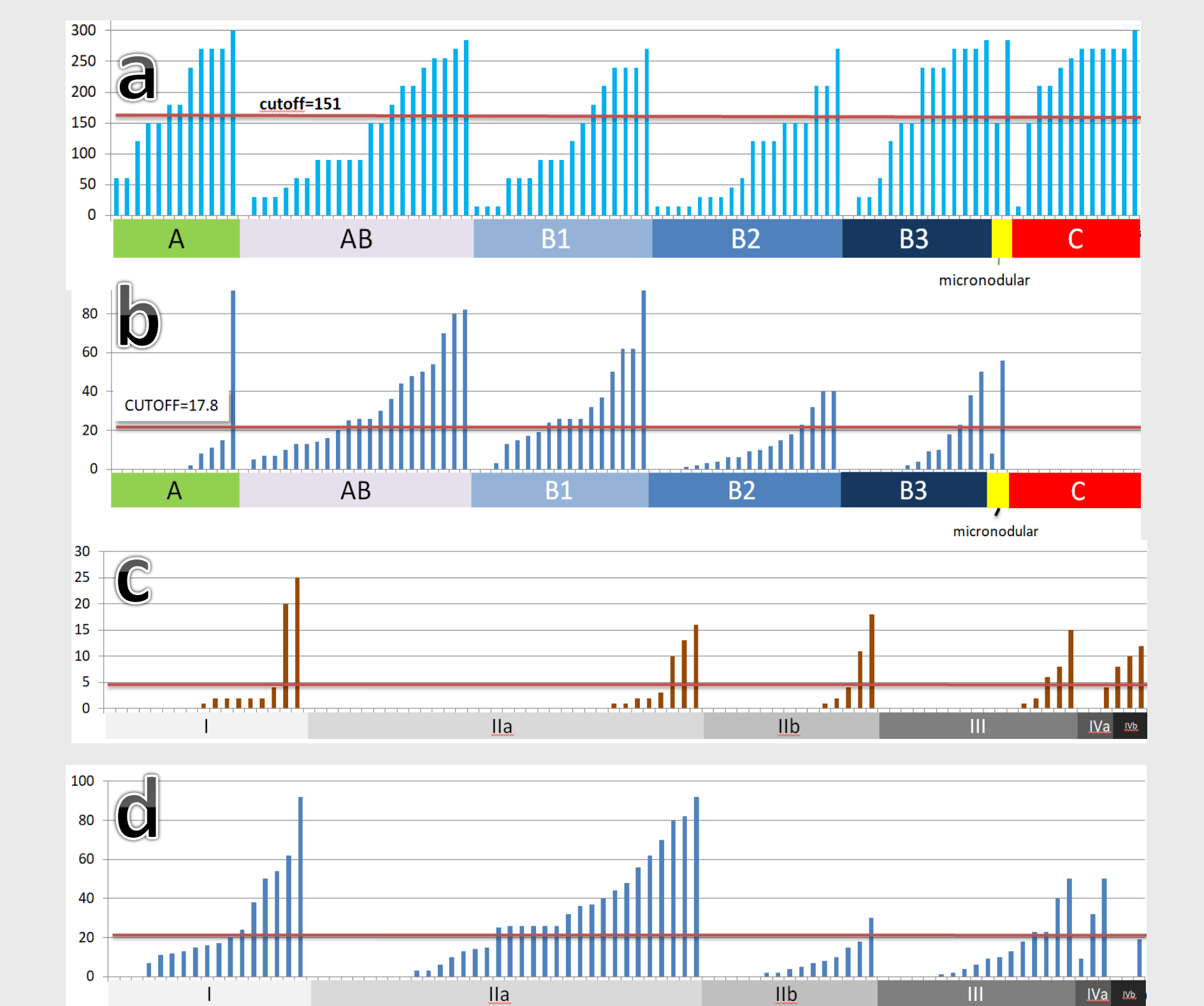
Το 56.1% (55/98) του δείγματος ήταν γυναίκες και το 43.9% (43/98) ήταν άνδρες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 61 έτη (εύρος: 27 – 88 έτη). Οι επιμέρους συχνότητες των υποτύπων κατά ΠΟΥ ήταν ως εξής: τύπου A 12.2% (12/98), τύπου AB 22.4% (22/98), τύπου B1 17.3% (17/98), τύπου B2 18.4% (18/98), τύπου B3 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 θυροειδοπάθεια, 3 ασθενείς είχαν αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς και 2 είχαν υποθυροειδισμό. 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 κυμαίνονταν 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. Immunohistochemical expression of Eph-B1 (a, b), Eph-B2 (c), Eph-B4 (d) and Eph-B6 (e).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΧΡΩΣΗΣ:** Ο Erh-B1 ήταν θετικός στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς επίσης και στους πυρήνες των λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του Erh-B2 ήταν κυτταροπλασματική, σπάνια και εν γένει ασθενής, τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα. Η έκφραση του Erh-B6 ήταν αποκλειστικά πυρηνική και στις δύο κυτταρικές συνιστώσες, πιο συχνή όμως στη λεμφοκυτταρική. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση του Erh-B4 ούτε στα επιθηλιακά κύτταρα ούτε στα λεμφοκύτταρα, σημειώθηκε, εντούτοις ασθενής ενδοθηλιακή έκφραση στις περισσότερες περιπτώσεις (87.7%).
- ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:** Υψηλή επιθηλιακή έκφραση Erh-B1 παρατηρήθηκε στη μεγάλη πλειονότητα των περιστατικών, τόσο κυτταροπλασματική (μέσο H-score=276; εύρος: 30-300) όσο και πυρηνική (μέσο H-score=278; εύρος: 60-300). Η λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B1 ποίκιλλε περισσότερο (μέσο H-score=151; εύρος: 0-300). Η έκφραση του Erh-B2 ήταν πολύ χαμηλή τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα (μέσο H-score=2; εύρος: 0-30) όσο και στα λεμφοκύτταρα (μέσο H-score=6; εύρος: 0-120, όπου η ακραία τιμή με H-score=120 αφορά ένα μικροζώδες θύμωμα). Η έκφραση Erh-B6 ήταν χαμηλή στα επιθηλιακά κύτταρα (μέσο H-score=3; εύρος: 0-29) και ελαφρώς υψηλότερη στα λεμφοκύτταρα (μέσο H-score=18; εύρος: 0-92).
- ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ:** Ο λεμφοκυτταρικός πληθυσμός των θυμωμάτων (κυρίως των υποτύπων AB και B1), που αποτελείται από συνοδά άωρα Τ-λεμφοκύτταρα παρουσίασε υψηλότερο Erh-B6 H-score συγκριτικά με τα λεμφοκύτταρα των θυμικών καρκινωμάτων (p<0.001), τα οποία αποτελούν άνοση περινεοπλασματική αντίδραση. Αντίστροφα, η λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B1 ήταν υψηλότερη στα καρκινώματα (p=0.026). Τα θυμώματα με χαμηλό στάδιο Masaoka (I και II) εμφάνισαν υψηλότερο λεμφοκυτταρικό (p=0.043) και χαμηλότερο επιθηλιακό (p=0.010) Erh-B6 H-score. Η λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B1 συσχετίστηκε λιγότερο ισχυρά με το στάδιο Masaoka (p=0.059). Δεν ανευρέθηκε συσχέτιση με την επιβίωση.



Εικόνα 2. Υψηλότερο λεμφοκυτταρικό Erh-B1 H-score στα θυμικά καρκινώματα (a). Υψηλότερο λεμφοκυτταρικό Erh-B6 H-score στους τύπους A και AB, χωρίς έκφραση στα καρκινώματα (b). Χαμηλότερο επιθηλιακό (c) και υψηλότερο λεμφοκυτταρικό (d) Erh-B6 H-score συσχετίζεται με στάδια Masaoka <II. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει ένα περιστατικό. Τα περιστατικά έχουν διαταχθεί κατά αυξούμενο H-score ανά υπότυπο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι λιγότερο επιθετικοί υπότυποι (θυμώματα A και AB) συσχετίστηκαν με υψηλότερη λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B6 σε αντίθεση με το θυμικό καρκίνωμα, που δεν παρουσίασε έκφραση (p<0.001). Επιπρόσθετα, υψηλότερη λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B6 συσχετίστηκε με χαμηλότερα στάδια κατά Masaoka (p=0.046), σε αντίθεση με τη λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B6, που ήταν χαμηλότερη σε όγκους σταδίου Masaoka I και II (p=0.01), ευρήματα που υποδηλώνουν ότι η λεμφοκυτταρική έκφραση Erh-B6 συμμετέχει στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των λιγότερο επιθετικών θυμικών επιθηλιακών όγκων. Ο Erh-B6, που αποτελεί τον υποδοχέα με την υψηλότερη έκφραση μεταξύ των Ehrs στο φυσιολογικό θύμο, αποτελεί βασικό ρυθμιστή της λεμφοκυτταρικής ωρίμανσης και διαφοροποίησης στο θύμο και εμπλέκεται σε προ-αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, σημαντικά στην απομάκρυνση επιβλαβών κλώνων (Freywald et al. 2003). Η απώλεια έκφρασης Erh-B6 έχει συσχετιστεί με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα, το μελάνωμα και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Mateo-Lozano et al. 2017; Yu et al. 2010; Hafner et al. 2003). Άλλες μελέτες, ωστόσο, συσχετίζουν τον Erh-B6 με μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης του όγκου όπως στον καρκίνο του μαστού (Toosi et al. 2018). Η διαταραχή της φυσιολογικής έκφρασης Erh-B6 στα θυμοκύτταρα θα μπορούσε επομένως να συμβάλλει στην διαμόρφωση ενός επιθετικότερου φαινότυπου. Στα περισσότερα περιστατικά, παρατηρήθηκε υψηλή επιθηλιακή και ποικίλη λεμφοκυτταρική θετικότητα στον Erh-B1, η τελευταία πιο συχνά στα θυμικά καρκινώματα. Δεδομένης της απουσίας έκφρασης Erh-B1 στο φυσιολογικό θύμο, ο Erh-B1 θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ογκογένεση του εν λόγω οργάνου. Προκλινικές μελέτες σε ποντίκια με σίγαση των Erh-B έχουν καταδείξει διαταραχές στο θυμικό επιθήλιο (García-Ceca et al. 2015) και μείωση του αριθμού των διπλά θετικών (CD4+ CD8+) θυμοκυττάρων και επιθηλιακών θυμικών κυττάρων, καθώς και μειωμένη σηματοδότηση του υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων TCR (Alfaro et al. 2008; Alfaro et al. 2007). Έχει παρατηρηθεί αναστολή της ωρίμανσης από το στάδιο του διπλά αρνητικού στο διπλά θετικό θυμοκύτταρο σε πειραματόζωα με υπερέκφραση Erh-B2 και Erh-B3 (García-Ceca et al. 2009). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πολύ σπάνια και ασθενής χρώση έναντι του Erh-B2. Ο Erh-B2 εκφράζεται στον ανθρώπινο θύμο, αν και ασθενέστερα σε σχέση με τα ποντίκια (Muñoz et al. 2018). Στον καρκίνο του μαστού η έκφραση Erh-B2 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική κινητικότητα *in vitro*, έχει δε αναφερθεί ως ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας (Chukkapalli et al. 2014). Πειραματικά *in vivo* μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου έχουν δείξει ότι υπερέκφραση του Erh-B2 σχετίζεται με μειωμένη αιμάτωση και μειωμένο ρυθμό αύξησης του όγκου (Liu et al. 2004).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι Erh-B υπερεκφράζονται σε επιθηλιακά θυμικά νεοπλασμάτα και σχετίζονται με τον ιστολογικό υπότυπο και στο στάδιο κατά Masaoka, εμπλεκόμενοι ενδεχομένως στη θυμική νεοπλασία, αποτελούν επομένως δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alfaro, D et al. Immunology 2008, 125, 131–143 – Alfaro, D et al. Eur. J. Immunol. 2007, 37, 2596–2605 – Chukkapalli, S et al. Exp. Cell Res. 2014, 320, 233–246 – Freywald, A et al. J. Biol. Chem. 2003, 278, 10150–10156 – García-Ceca, J et al. Int. J. Dev. Biol. 2009, 53, 971–982 – García-Ceca, J et al. Front. Immunol. 2015, 6, 333 – Hafner, C et al. Int. J. Oncol. 2003, 23, 1553–1559 – Liu, W et al. Br. J. Cancer 2004, 90, 1620–1626 – Mateo-Lozano, S et al. Sci. Rep. 2017, 7, 43702 – Muñoz, JJ et al. Front. Endocrinol – 2018, 9, 135. Toosi, BM et al. Oncogene 2018, 37, 4073–4093 – Yu, J et al. Clin. Cancer Res. 2010, 16, 2275–2283.