

## Ιστοική εκτίμηση ανοσολογικής ενεργοποίησης στα καρκινώματα ενδομητρίου και τραχήλου της μήτρας

Α.Χ. Λάζαρης\*, Ε.Β. Χατζηγιάννη, Γεώργιος Ξυδιάς, Π.Δ. Αναστασόπουλος, Ζ. Βούλγαρης, Π.Σ. Δάβαρης

### *Tissue evaluation of immune responsiveness in endometrial and cervical carcinomas*

Lazaris Ch.A., Chatzigianni B.E., Xidias G., Anastassopoulos D.P., Voulgaris Z., Davaris S.P.  
Dept. of Pathology, Athens National University Medical School

**Aim:** Major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) associate with peptides, derived from antigens, for presentation to CD4(+) T cells. Functional and adhesion assays have shown that CD4 interacts with MHC class II molecules, leading to enhanced responses of CD4(+) T cells after the activation of a specific tyrosine kinase. In the present study we examined the tissue expression of HLA-DR antigens and the quantitative variance of T4 lymphocytes in a series of 50 usual "endometrioid" adenocarcinomas and 35 conventional cervical squamocellular carcinomas.

**Material-Methods:** A three-step, avidin-biotin immunoperoxidase staining method was applied. As primary antibodies we used the TAL.1B5 monoclonal anti-human HLA-DR alpha chain antibody and the OPD4 mouse antihuman antibody which mainly identifies benign T4 lymphocytes.

**Results:** Twenty-four per cent of women with endometrial cancer were high immune responders, while the relative percentage in women with cervical cancer was 40%. These patients' tumours were of early clinical stages. HLA-DR determinants were predominantly expressed in membranes of stromal cells (i.e. macrophages-monocytes), usually around HLA-DR(+) lymphoid cells, as well as on endothelial cells. When the tumour stroma was rich in HLA-DR(+) cells, greater numbers of OPD4(+) lymphocytes aggregated. Epithelial elements, either cancerous or benign, were seldom HLA-DR(+); in these samples positive immunolabeling was often confined intercellularly and did not seem to enable an effective host immune response against neoplastic cells.

**Conclusions:** High expression of HLA-DR molecules in professional antigen presenting stromal cells may be used as a lymphocyte activation marker in en-

ometrial and cervical carcinomas; this activation appears to be an early event in the evolution of invasive endometrial and cervical carcinomas.

**Key words:** Antigenes HLA-DR, T4 lymphocytes, endometrial carcinoma, uterine cervical carcinoma.

**Σκοπός:** Τα "κλασικά" HLA μόρια τάξης II (DR, DQ και DP) αποτελούν μόρια αναγνώρισης που επιτρέπουν στα ανοσοϊκανά κύτταρα, τα συνεργαζόμενα στην ανοσολογική απάντηση, να αναγνωρίζονται μεταξύ τους. Τα βοηθητικά T4 λεμφοκύτταρα με τους υποδοχείς τους αναγνωρίζουν ανοσογόνα μόρια στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων σε συνδυασμό με αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HLA) τάξης II κι έτσι ενεργοποιείται μια σειρά ανοσοαρμόδιων κυττάρων. Η ανάπτυξη των όγκων συνοδεύεται από την εμφάνιση νέων, "ξένων" επιτόπων στα εξαλλαγέντα κύτταρα που, υπό προϋποθέσεις, μπορούν να διεγείρουν την κυτταροτοξικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος. Σκοπός της μελέτης μας ήταν η ιστοική εκτίμηση του βαθμού ανοσολογικής ενεργοποίησης σε γυναίκες με καρκινώματα του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας. **Υλικό-Μέθοδος:** Μελετήσαμε 50 συνήδη αδenoκαρκινώματα ενδομητρίου και 35 επιδερμοειδή καρκινώματα τραχήλου μήτρας σε επίπεδο πρωτοπαδούς εστίας ως προς την ιστοική παρουσία των αντιγόνων HLA-DR και των T4 λεμφοκυττάρων και αναζητήσαμε στατιστικές διαφορές στην έκφρασή τους σε συνάρτηση με προγνωστικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των αντιστοιχών ασθενών. Χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της α-άλυσου του μονόμορφου HLA-DR μορίου (κλώνος TAL.1B5) και έναντι των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν βοηθητικό/επαγωγικό φαινότυπο (κλώνος OPD4) σε ανοσοϊστοχημική τεχνική τριών σταδίων συνδυασμένη με αβιδίνη-βιοτίνη. **Αποτελέσματα:** Τα HLA-DR ανιχνεύθηκαν μεμβρανικώς κατ' εξοχήν σε μακροφάγα, σε ενδοθήλια και λιγότερο συχνά σε επιθηλιακά στοιχεία, κυρίως στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα των τελευταίων. Η συνάδρωση OPD4 (+) κυττάρων παρουσίαζε εμφανή συσχέτιση με τη δετική έκφραση των HLA-DR στα κύτταρα του στρώματος των όγκων και δε φαινόταν να επηρεάζεται από την παρουσία των HLA-DR στις καρκινικές βλάστες. Υψηλή ανοσολογική ενεργοποίηση αναδείχθηκε σε όγκους πρώιμου σταδίου, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στο 24% των ενδομητρικών και στο 40% των τραχηλικών καρκινωμάτων. Ειδικότερα, για τα επιδερμοειδή καρκινώματα του τραχήλου, η υψηλή ανοσοαπανητικότητα συσχετίσθηκε με περιορισμένη έκταση της νόσου σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Συμπεράσματα. Η έκφραση των HLA-DR σε κατάλληλα, "εξ επαγγέλματος" αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του στρώματος των όγκων είναι συνυφασμένη με τη συνάδρωση των T4 λεμφοκυττάρων και μερικώς αντικατοπτρίζει την ικανότητα του κάθε ξενιστή οργανισμού να οργανώνει ανοσολογική απόκριση ενάντια στην αναπτυχθείσα κακοήγη εξεργασία. Η ανοσολογική ενεργοποίηση φαίνεται να χαρακτηρίζει πρώιμα στάδια εξέλιξης των διηθητικών καρκινωμάτων του ενδομητρίου και κυρίως του τραχήλου της μήτρας. **Λέξεις κλειδιά:** αντιγόνα HLA-DR, T4 λεμφοκύτταρα, καρκίνος ενδομητρίου, καρκίνος τραχήλου μήτρας, στάδιο

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κάθε ανθρώπινος οργανισμός δεν είναι γενετικά ικανός να δημιουργήσει μια ανοσολογική απάντηση, χυμική ή κυτταρική, έναντι του οποιουδήποτε "ξένου" αντιγόνου. Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ ή σύστημα HLA) αντιστοιχεί σε μια γενετική περιοχή του χρωμοσώματος 6 με πάνω από 200 γονίδια<sup>1</sup>, ορισμένα των οποίων κωδικοποιούν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών επιφανείας τάξης I και τάξης II και συμμετέχουν στην ανοσοαπάντηση ως γενετικοί ρυθμιστές της. Η κύρια λειτουργία των μορίων HLA τάξης I και II εστιάζεται στην παρουσίαση πεπτιδίων αντιγονικής προέλευσης στα CD8+ και CD4+ λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Από τα γονίδια που περιλαμβάνει η περιοχή τάξης II, τα "κλασικά" γονίδια HLA-DR υπεισέρχονται στην ανοσορρύθμιση των υποπληθυσμών των βοηθητικών (CD4+ ή T4) λεμφοκυττάρων μέσω διαφοροποιήσεων στην έκφραση των μορίων HLA-DR σε κατάλληλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ). Τα βοηθητικά (T4) λεμφοκύτταρα, όταν έλθουν σε κατάλληλη επαφή με το αντίστοιχο αντιγόνο μέσω των μορίων HLA τάξης II, διεγείρονται, συνδέονται κι εκκρίνουν δραστικές κυτταροκίνες ρυθμίζοντας τη δράση κάθε είδους ανοσοαρμόδιου κυτταρικού πληθυσμού που μετέχει στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή οργανισμού<sup>2</sup>.

Στην πλειονότητα των νεοπλασμάτων του ανθρώπου έχουν εξακριβωθεί γενετικές μεταβολές (μεταλλαγές, γονιδιακές ενισχύσεις, χρωμοσωμικές απώλειες ή αντιμεταθέσεις), τουλάχιστον μερικές από τις οποίες συνεπάγονται έκφραση νέων, αλλοιωμένων πρωτεϊνών στα κακοήδη κύτταρα. Οι τελευταίες θα μπορούσαν εύλογα να αποτελέσουν αντιγονικά ερεθίσματα για ανοσολογική απάντηση από τον ξενιστή. Γενικά, μια πρωτεΐνη είναι δυνατό να επεξεργαστεί και με τις δύο οδούς επεξεργασίας [ενδογενή (ή τάξης I) και εξωγενή (ή τάξης II) οδό]. Στη συνέχεια, ανάλογα με την οδό επεξεργασίας που ακολουθήθηκε, τα προερχόμενα από την ίδια πρωτεΐνη αντιγονικά πεπτιδία μπορούν να συνδεθούν, άλλα με ένα μόριο τάξης I του ΜΣΙ κι άλλα με ένα μόριο τάξης II του ΜΣΙ. Υπάρχουν στοιχεία για ανοσολογικές αντιδράσεις εναντίον ανθρωπίνων όγκων που περιορίζονται από την τάξη II του ΜΣΙ<sup>3</sup>, αλλά λιγότερο ξεκάθαρα είναι τα πράγματα όσον αφορά την αναγνώριση συνοδών των όγκων αντιγόνων μέσω της τάξης II του ΜΣΙ<sup>4</sup>.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μεγάλο πρόβλημα δημόσιας υγείας και στην αιτιοπαθογένεσή του απαραίτητος παράγων είναι η λοίμωξη από τον ιό του ανθρωπίνου δηλώματος (HPV). Τα συστατικά του τελευταίου αξίζει να ερευνηθεί κατά πόσο αποτελούν ανοσογόνα ερεθίσματα. Η παθογένεση του ενδομητρικού καρκίνου και η συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτήν παραμένουν ασαφείς. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήσαμε σε ιστικό επίπεδο σε καρκινώματα ενδομητρίου και τραχήλου την παρουσία των μορίων HLA-DR και τη διακύμανση των T4 λεμφοκυττάρων ως δείκτες της ανοσοαπόκρισης των ασθενών εναντίον των όγκων αυτών και αναζητήσαμε πιθανές συσχετίσεις με γνωστικές παραμέτρους.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήσαμε 50 καρκινώματα ενδομητρίου, τα οποία εξ ολοκλήρου αντιστοιχούσαν ιστολογικά σε συνήδη αδενοκαρκινώματα ("ενδομητριοειδή"). Όλες οι ασθενείς είχαν υποστεί κοιλιακή ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων μεταξύ των ετών 1993-1996. Σε κάθε όγκο εκτιμήσαμε την ηλικία της ασθενούς προή μετεμμηνοπαυσιακή, το κλινικό στάδιο βάσει των κριτηρίων της Διεθνούς Γυναικολογικής Ομοσπονδίας<sup>5</sup> (FIGO - Στάδια 0-IV), την κατάσταση πνευλικών και παραορτικών λεμφαδένων, τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας του αδενικού στοιχείου (βάσει του συστήματος τριών βαθμίδων της FIGO), την παρουσία εστιών πλακώδους επιθηλίου, καλοήθους ή ατύπου, το βάθος διήθησης του μυομητρίου (περισσότερο ή λιγότερο από το ήμισυ), την ύπαρξη μικροσκοπικής διήθησης αγγειακών κλάδων, την παρουσία 8 ή περισσότερων μτώσεων ανά 10 οπτικά πεδία ισχυρής μεγέθυνσης (ΟΠΙΜ), την πιθανή επέκταση στο κατώτερο τμήμα της μήτρας, την παρουσία συνοδού υπερπλασίας του ενδομητρίου, την ύπαρξη ανοσοϊστοχημικών υποδοχέων προγεστερόνης (PgR) στα κακοήδη κύτταρα και το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης του περιτοναϊκού εκπλύματος.

Συμπεριλάβαμε 35 ασθενείς που χειρουργήθηκαν κατά το ίδιο διάστημα με επιδερμοειδή καρκινώματα τραχήλου μήτρας, εκ των οποίων τα 4 ήταν μικροδιηθητικά (σταδίου Ia κατά FIGO)<sup>6</sup> από παρασκευάσματα κωνοειδούς εκτομής. Τα μικροδιηθητικά καρκινώματα εντο-

πίζονταν στο πρόσδιο χείλος του τραχήλου και αξιολογήθηκαν ανάλογα με το βάθος διήθησής τους (κάτω των 3 χιλ. και μεταξύ 3,1-5 χιλ.) και το επιφανειακό τους εύρος (λιγότερο ή περισσότερο των 10 χιλ.). Τα υπόλοιπα, σαφώς διηθητικά, επιδερμοειδή καρκινώματα (σταδίου Ib ή II κατά FIGO)<sup>6</sup> σε παρασκευάσματα υστερεκτομής ταξινομήθηκαν ανάλογα με την ύπαρξη ή τη μη ύπαρξη πλακώδους διαφοροποίησης, δηλ. κερατινοποίησης των καρκινικών κυττάρων καθώς και ανάλογα με τη μορφολογία των νεοπλασματικών κυττάρων σε δύο κατηγορίες [από μεγάλα πλακώδη κύτταρα ή από μικρότερα (χωρίς νευροενδοκρινική διαφοροποίηση)]. Αξιολογήσαμε ακόμη την ηλικία των γυναικών, την κατάσταση των επιχωρίων λεμφαδένων, την επέκταση στο ενδομήτριο καθώς και τη μικροσκοπική διήθηση αγγειακών κλάδων. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε συνολικά 10 τομές ξεσμάτων ενδομητρίου και βιοψιών τραχήλου χωρίς διαγνωστικά παθολογικά ευρήματα.

Για την ανάδειξη των αντιγόνων HLA-DR και των T4 λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήσαμε ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα αντιστοίχως έναντι της α-αλύσου του μονόμορφου μορίου HLA (τάξης II)-DR (κλώνος TAL.1B5, Dako) κι έναντι των φυσιολογικών T κυττάρων που εκφράζουν βοηθητικό/επαγωγικό φαινότυπο (κλώνος OPD4, Dako). Το τελευταίο αντίσωμα μέχρι πρόσφατα θεωρείται ότι αναγνωρίζει κατ'εξοχήν τα (καλοήγη) T4 λεμφοκύτταρα σε ιστολογικές τομές παραφίνης<sup>7</sup>. Για την ανίχνευση προγεστερονικών υποδοχέων κάναμε χρήση του προδιαλελυμένου μονοκλωνικού αντισώματος από το kit PgR-ICA της εταιρείας Abbott Laboratories. Για όλα τα αντισώματα χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική τεχνική του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης υπεροξειδάσης (AB-Complex) σε τομές παραφίνης πάχους 4 μm, από υλικό συμβατικά μονιμοποιημένο σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης για 24 ώρες. Όσες τομές προορίζονταν για προσδιορισμό ορμονοϋποδοχέων επεξεργάστηκαν με διάλυμα πρωτεάσης VII (Sigma) 0,1% για 15' λεπτά προκειμένου να απελευθερωθούν οι αντίστοιχες ανοσοδραστικές περιοχές και να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορισμού των PgR. Για τα αντισώματα έναντι των HLA-DR και των T4 κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις 1:200 και 1:250 αντίστοιχα, με ολονύχτιες επωάσεις σε 4οC.

Σε κάθε περίπτωση εξετάσθηκε η κατανομή

των παραγόντων HLA-DR χωριστά στον καρκινικό κυτταρικό πληθυσμό και χωριστά στα κύτταρα του στρώματος κάθε όγκου όπου, επιπλέον, εκτιμήθηκε και η παρουσία των OPD4-δεδεικτών λεμφοκυττάρων. Η ανοσοϊστοδετικότητα για το OPD4 περιορίστηκε σε λεμφοκυτταρικά στοιχεία και μόνο σε δύο καρκινώματα αφορούσε και σπάνια ιστοκύτταρα, προφανώς λόγω ανοσοαντιδραστικής αλληλοεπικάλυψης του χρησιμοποιηθέντος πρωτογενούς αντισώματος. Μετά από τη συνολική εκτίμηση των χρωσθέντων πλακιδίων, οι ασθενείς διακρίθηκαν σε υψηλούς ή χαμηλούς "απαντητές" ανάλογα με το εάν στα νεοπλάσματά τους παρατηρούσαμε στρωματική κυτταρική έκφραση των μορίων HLA-DR σε έκταση μεγαλύτερη από 50% κάθε τομής με επακόλουθο, συνυπάρχουσα ή μη, αισθητή στρωματική παρουσία λεμφοκυττάρων δετικών στο OPD4 (σε ποσοστά πάνω από 30% του συνόλου των περικλειόμενων λεμφοκυττάρων ανά τομή).

Ως προς την ποσοτική εκτίμηση της ανοσοϊστοδετικότητας για τους PgR, οι όγκοι με ποσοστά PgR-δεδεικτών νεοπλασματικών πυρήνων άνω του 10% θεωρήθηκαν εντόνως δετικοί, εκείνοι με αντίστοιχα ποσοστά 0,1% έως 10% θεωρήθηκαν μετρίως δετικοί και οι υπόλοιποι αρνητικοί για PgR. Τα παραπάνω όρια δετικότητας είναι ταυτόσημα με εκείνα παρόμοιων ανοσοϊστοχημικών μελετών<sup>8</sup>.

Η αναζήτηση πιδανών ποιοτικών διαφορών μεταξύ του βαθμού ανοσοαπόκρισης και των διαφόρων κλινικοπαθολογοανατομικών προγνωστικών παραμέτρων των ασθενών έγινε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  στο στατιστικό πρόγραμμα MINITAB.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι γυναίκες με ενδομητρικά καρκινώματα επέδειξαν υψηλή ανοσολογική ενεργοποίηση κατά των όγκων τους σε ποσοστό 24% (12/50), ενώ εκείνες με καρκινώματα του τραχήλου σε ποσοστό 40% (14/35). Οι εν λόγω περιπτώσεις ενδομητρικών καρκινωμάτων αφορούσαν συχνότερα σε όγκους πρώιμου κλινικού σταδίου, με περιορισμένο βάθος διήθησης του μυομητρίου, χωρίς επέκταση στον ισθμό, με αρνητικούς λεμφαδένες και αρνητικά κυτταρολογικά εκπλύματα. Ωστόσο, οι ως άνω διαφορές δεν απέβησαν στατιστικώς σημαντικές (Πίνακας 1). Οι όγκοι του τραχήλου που συνοδεύονταν από υψηλή ανοσοαπόκριση ήταν επίσης αρχομέ-

**Πίνακας 1.** Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι των ενδομητρικών αδενοκαρκινωμάτων σε συνδυασμό με την ανοσολογική απόκριση των ασθενών

Παράμετρος	Βαθμός ανοσοαπόκρισης			Σύνολο
	Υψηλός	Χαμηλός	Τιμή P	
Ηλικία				
Προεμμηνοπαυσιακή	3	9	0,926	12
Μετεμμηνοπαυσιακή	9	29		38
Κλινικό στάδιο				
I	11	29	0,247	40
II-III	1	9		10
Βάθος διήθησης του μυομητρίου				
≤1/2	6	12	0,247	18
>1/2	6	26		32
Επέκταση στον ισθμό				
Όχι	9	22	0,287	31
Ναι	3	16		19
Λεμφαδένες				
Αρνητικοί	11	31	0,406	42
Θετικοί	1	7		8
Ενδοπεριτοναϊκή νόσος				
Αρνητική κυτταρολογική	9	24	0,450	33
Θετική κυτταρολογική	3	14		17
Βαθμός κακοήθειας				
Grade 1	5	19	0,875	24
Grade 2	5	14		19
Grade 3	2	5		7
Παρουσία πλακώδους στοιχείου				
Ναι	7	21	0,852	28
Όχι	5	17		22
Διήθηση αγγείων				
Ναι	4	10	0,637	14
Όχι	8	28		36
Μιτωτική δραστηριότητα				
<8 ανά 10 ΟΠΙΜ	8	24	0,825	32
>8 ανά 10 ΟΠΙΜ	4	14		18
Προγεστερονικοί υποδοχείς				
Αρνητικοί	3	8	0,958	11
Μετρίως δετικοί	4	13		17
Εντόνως δετικοί	5	17		22
Συνοδός ενδομητρική υπερπλασία				
Ναι	7	20	0,730	27
Όχι	5	18		23

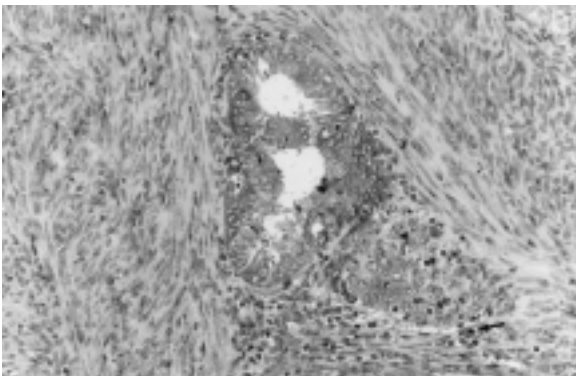
νων σταδίων ( $p=0,042$ ) χωρίς επέκταση στο ενδομήτριο ( $p=0,017$ ) ή λεμφαδενικές μεταστάσεις ( $p=0,011$ ) (Πίνακας 2), αλλά εδώ οι ως άνω διαφορές απεδείχθησαν στατιστικώς σημαντικές. Η παρουσία PgR στα ενδομητρικά καρκινώματα, ο βαθμός κακοήθειας ή άλλα ιστολογικά γνωρίσματα των όγκων δε φάνηκαν να έχουν κάποιου είδους επίδραση στην έκφραση των αντιγόνων HLA-DR, ούτε στην παρουσία των OPD4-δετικών κυττάρων.

Τα αντιγόνα HLA-DR εντοπίσθηκαν κατ'εξοχήν στις κυτταρικές μεμβράνες επιθηλια-

κών ή στρωματικών κυττάρων (μακροφάγων-μονοκυττάρων), ευρισκομένων συνήθως ανάμεσα ή γύρω από HLA-DR-δετικά λεμφοειδή κύτταρα. Σε αισθητά μικρότερη ποσότητα, τα HLA-DR εκφράσθηκαν σε καλοήγη, υπερπλαστικά ενδομητρικά ή κακοήγη επιθηλιακά στοιχεία και μάλιστα στα κύτταρα αυτά περιορίζονταν συχνότατα στα ενδοκυττάρια διαμερίσματά τους (Εικ. 1). Τα λιποειδοφόρα μικροκενοτοπίωδη κύτταρα στο δεσμοπλαστικό στρώμα των ενδομητρικών όγκων, ήταν πάντοτε αρνητικά ως προς τα HLA-DR. Γενικά, στους όγκους

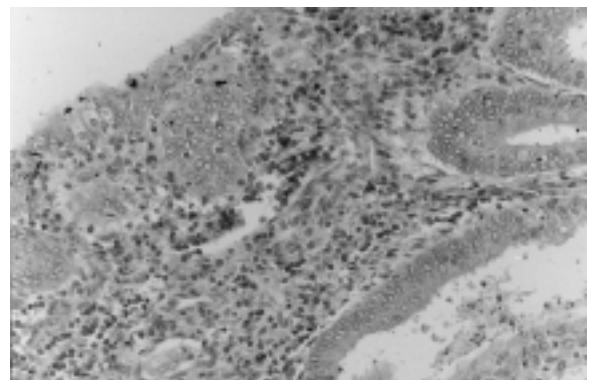
**Πίνακας 2.** Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι των επιδερμοειδών καρκινωμάτων του τραχήλου σε συνδυασμό με την ανοσολογική απόκριση των ασθενών

Παράμετρος	Βαθμός ανοσοαπόκρισης			Σύνολο
	Υψηλός	Χαμηλός	Τιμή P	
Ηλικία				
>40 έτη	10	16	0,752	26
<40 έτη	4	5		9
Στάδιο				
Ia	3	1	0,075	4
Ib	9	10		19
II	2	10		12
Στάδιο (άλλη ομαδοποίηση)				
I	12	11	0,042	23
II	2	10		12
Επέκταση στο ενδομήτριο				
Όχι	10	6	0,017	16
Ναι	3	12		15
Λεμφαδένες				
Αρνητικοί	12	9	0,011	21
Θετικοί	2	12		14
Στοιχεία κερατινοποίησης				
Παρόντα	6	7	0,686	13
Απόντα	7	11		18
Μορφολογία				
Από μεγάλα κύτταρα	8	12	0,768	20
Από μικρά κύτταρα	5	6		11
Διήθηση αγγείων				
Ναι	4	6	1,000	10
Όχι	10	15		25



**Εικόνα 1.** Κυτταροπλασματική ανοσοαντίδραση για το μόριο HLA-DR σε καρκινική βλάστη από ένα καλά διαφοροποιημένο ενδομητριοειδές καρκίνωμα. Διακρίνονται και μεμονωμένα στρωματικά κύτταρα με δετική ανοσοχρώση για το μόριο HLA-DR (βέλος) (ABCComplex, X250).

του ενδομητρίου ή του τραχήλου με διάμεσο υπόστρωμα πλούσιο σε HLA-DR-δετικά κύτταρα, συναδρούζονταν πάντοτε άφθονα OPD4-δετικά λεμφοκύτταρα, διάσπαρτα (Εικ. 2) ή σε



**Εικόνα 2.** Θετική ανοσοχρώση με το αντίσωμα OPD 4 σε λεμφοκύτταρα από το στρώμα ενός ενδομητριο-ειδούς καρκινώματος (ABCComplex, X250).

αδρούσεις, καθ' όλη την έκταση των όγκων και ανεξάρτητα από την παρουσία των μορίων HLA-DR στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ειδικότερα, στα μικροδιηθητικά επιδερμοειδή καρκινώματα του τραχήλου, παρά την πυκνή συνυπό φλεγμονώδη διήθηση του υποστρώματος, η παρουσία των HLA-DR στα κερατινοκύτταρα ήταν γενικά ελάχιστη, ενώ στα κύτταρα του στρώματος (λεμφικής ή ιστιοκυτταρικής αρχής) και στα ενδοθήλια ήταν εντονότερη. Η ίδια παρατήρηση ίσχυε και σε δύο σαφώς "αφοριζόμενα" διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου με επιφανειακή εξέγκωση και έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση στις παρυφές των επιδερμοειδών καρκινικών αδρούσεων. Σε 12 από τα υπόλοιπα, γνησίως διηθητικά καρκινώματα του τραχήλου είχαμε τη δυνατότητα να εκτιμήσουμε την έκταση των δύο ανοσοδεικτών σε υπολειμματικές (προδιηθητικές) ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου, υψηλού βαθμού κακοήθειας (HG SIL). Σε πέντε από τις παραπάνω περιπτώσεις διαπιστώσαμε ανοσοαντίδραση για τα HLA-DR στα δυσπλαστικά πλακώδη κύτταρα και μάλιστα σε δύο από αυτές η χρώση αφορούσε σε όλο το πάχος του επιθηλίου.

Αξίζει να επισημάνουμε ότι στους φυσιολογικούς μάρτυρες η έκφραση των μορίων HLA-DR ήταν ελαχίστη. Συγκεκριμένα, τα τραχηλικά πλακώδη κύτταρα ήταν αρνητικά, ενώ τα κύτταρα του Langerhans και τα υποεπιθηλιακά ενδοθήλια σταθερά εξέφραζαν το δείκτη. Στο φυσιολογικό ενδομήτριο τα κύτταρα του αδενικού επιθηλίου επέδειξαν ασθενή ανοσοχρώση μόνο σε ένα δείγμα, με παραγωγικού τύπου ενδομήτριο. Αντίθετα, κύτταρα εντός του ενδομητρικού στρώματος βρέθηκαν να εκφράζουν τα μόρια HLA-DR.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την ειδική ανοσολογική απάντηση η πλειονότητα των αντιγόνων απαιτεί τη συμμετοχή μακροφάγου και T-βοηθητικού (T4) κυττάρου προκειμένου να επιτευχθεί τελικά η παραγωγή αντισωμάτων. Τα κύτταρα που παραλαμβάνουν και παρουσιάζουν το αντιγόνο (ΑΠΚ) συγκροτούν μια ετερογενή ομάδα με πρωταρχικά "εξ επαγγέλματος" αντιγονοπαρουσιαστικά μέλη τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των φλεβιδίων. Αρκετοί από τους πα-

ραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς επέδειξαν ανοσοϊστοδοτικότητα στα HLA-DR και στην παρούσα μελέτη. Ως ΑΠΚ χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που έχουν στην επιφάνεια της μεμβράνης τους μόρια τάξης II του ΜΣΙ και παρουσιάζουν το ξένο αντιγονικό πεπτίδιο στα T4 λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, στην ομάδα των ΑΠΚ κατατάσσονται και ορισμένοι άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί (π.χ. ενεργοποιημένα T4 λεμφοκύτταρα) στους οποίους έχει προηγηθεί επίδραση ορισμένων κυτταροκινών, οπότε οι πληθυσμοί αυτοί αποκτούν σαν σκοπό τη διατήρηση και τη μεταφορά του μηνύματος της ανοσοαπόκρισης με απευθείας επαφή κυττάρου προς κύτταρο<sup>9-13</sup>.

Η πρόσφατη βιβλιογραφία διαδέχεται ορισμένες μελέτες που εστιάζονται στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των HLA-DR, δηλ. των παραγόντων που κατεχοχίν καθορίζουν την αντιγονοπαρουσίαση στις νεοπλασίες του ενδομητρίου<sup>14</sup> και του τραχήλου της μήτρας<sup>15</sup>. Οι Hachisuga και συν. καταλήγουν ότι τα κύτταρα του Langerhans μπορούν να δράσουν ως ΑΠΚ στα ενδομητρικά καρκινώματα, αλλά δεν ξεκαθαρίζουν κατά πόσο αυτά ενεργοποιούνται από την επιθηλιακή έκφραση μορίων HLA-DR<sup>14</sup>. Οι Coleman και Stanley, από την άλλη πλευρά, αμφισβητούν κατά πόσο η συσχέτιση της ανοσοέκφρασης των HLA-DR στα κερατινοκύτταρα με τη λεμφοκυτταρική διήθηση αντικατοπτρίζει όντως μια αποτελεσματική ανοσοαπάντηση σε βαριά δυσπλαστικές αλλοιώσεις του τραχήλου<sup>15</sup>.

Πρέπει να τονίσουμε ότι η ενεργοποίηση του T4 (βοηθητικού) κυττάρου προϋποθέτει τη συναναγνώριση του αντιγόνου με στοιχεία HLA μορίων τάξης II στη μεμβράνη των ΑΠΚ. Τα T4 λεμφοκύτταρα, εφόσον βέβαια έχουν ενεργοποιηθεί από τα μόρια τάξης II του ΜΣΙ, είναι δυνητικώς ικανά να παράγουν κυτταροκίνες που επιδρούν σε κάθε είδους ανοσοαρμόδιο κυτταρικό πληθυσμό για την κυτταρική ή χυμική ανοσοαπάντηση του ξενιστή<sup>12,13,16-18</sup>. Άρα, η συνδυαστική μελέτη της παρουσίας των T4 κυττάρων με την έκφραση των HLA-DR σε κατάλληλους κυτταρικούς πληθυσμούς μπορεί να προσδιορίσει σε κάποιο βαθμό την ανοσολογική ενεργοποίηση κάθε καρκινοπαθούς κατά του όγκου του. Για να σχηματισθεί πληρέστερη εικόνα της εν λόγω ενεργοποίησης απαιτείται ο παράλληλος ορολογικός προσδιορισμός των κυτταροκινών στην κυκλοφορία, καθώς επίσης και η αναζήτηση του επι-

διωκομένου αποτελέσματος από αυτήν την ενεργοποίηση, δηλαδή της απόπτωσης των κακοήθων κυττάρων. Πάντως, η παρουσίαση πεπτιδίων προερχομένων από τα υψηλού κινδύνου στελέχη του HPV, εφόσον επιτευχθεί τεχνητά μέσω της τάξης II του ΜΣΙ, έχει βρεθεί ότι είναι σε θέση να αυξήσει την απαντητικότητα των T κυττάρων έναντι αυτολόγων νεοπλασματικών κυττάρων<sup>16</sup>, ιδιαίτερα εφόσον τα τελευταία τυχαίνει να στερούνται μορίων τάξης I του ΜΣΙ, κάτι που συμβαίνει συχνά κατά την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας<sup>19</sup>.

Το βασικό εύρημά μας, ότι τουλάχιστον τα επιδερμοειδή τραχηλικά καρκινώματα προχωρημένων σταδίων χαρακτηρίζονταν σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό από απουσία μορίων HLA-DR σε "εξ επαγγέλματος" ΑΠΚ υποδηλώνει ότι στους εν λόγω ασθενείς έχει παύσει η ενεργοποίηση των T βοηθητικών κυττάρων - τα τελευταία έχουν προφανώς κατασταλεί - έχει δε ακόμα σταματήσει και η συνεργασία T-B κυττάρων προς παραγωγή αντισωμάτων (καθώς δεν επιτελείται πλέον συναναγνώριση τάξης II μορίων και αντιγόνου από τον υποδοχέα ανοσοσφαιρίνης στις μεμβράνες των B κυττάρων). Κοντολογίς, η ανοσολογική απάντηση υπολείπεται σημαντικά. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς, καθώς και εν γένει όσοι επιδεικνύουν χαμηλή ανοσοαπόκριση στους όγκους τους, θα μπορούσαν να ωφεληθούν από ενίσχυση του ανοσοποιητικού τους συστήματος μέσω πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας, καθώς παρατηρήσεις σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι η τοπική χορήγηση κατάλληλων κυτταροκινών, είτε απευθείας με ένεση, είτε με γονιδιακή θεραπεία, μπορεί να προκαλέσει έντονη ανοσοαπόκριση κατά του νεοπλασματος και, σε μερικές περιπτώσεις, να προκαλέσει ακόμη και την εξάλειψη του όγκου.

Η έλλειψη συσχέτισης του βαθμού ανοσολογικής ενεργοποίησης με το βαθμό διαφοροποίησης ή άλλα μορφολογικά γνωρίσματα των καρκινικών βλαστών υπογραμμίζει το ρόλο του ΜΣΙ ως ανοσογενετικό σύστημα δηλ. σύστημα που σε γενετική βάση, εξατομικευμένη για κάθε οργανισμό, ρυθμίζει και καθορίζει τη δυνατότητα ανοσοαπάντησης, άσχετα από το βαθμό αντιγονικότητας των κακοήθων κυττάρων (ο οποίος, βέβαια, πρέπει να παίζει κι αυτός ένα ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα). Ρόλο γονιδίων καθορισμού ανοσιακής απαντητικότητας παίζουν και τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, του

υποδοχέα T κι άλλων μεσολαβητών. Ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν τα γονίδια ΜΣΙ στον καθορισμό αυτό φαίνεται πως σχετίζεται με βοηθητικούς και κατασταλτικούς μηχανισμούς. Η ειδικότητα των γονιδίων καθορίζεται από τις πολυμορφικές αλυσίδες των μορίων HLA, μερικές από τις οποίες υπερτερούν άλλων σε επαγωγή αντιδραστικότητας. Αν η καθοριζόμενη από τα γονίδια των αλυσίδων αυτών δομή ενός αντιγόνου HLA μπορέσει να κάνει τον απαραίτητο συνδυασμό με το ξένο αντιγόνο για να αναγνωρισθούν μαζί από τον υποδοχέα των T κυττάρων, το πιθανό επακόλουθο θα είναι να υποαντιδράσει το άτομο προς το συγκεκριμένο αντιγόνο και, να εμφανίσει νόσο ή να χάσει τον έλεγχο της νόσου. Έτσι, εξειδικευμένοι απλότυποι της τάξης II του ΜΣΙ φαίνεται πως καθορίζουν για κάθε οργανισμό την ανοσοαπάντηση τουλάχιστον έναντι ειδικών επιτόπων κωδικοποιούμενων από τον HPV και, κατ'επέκταση, τον κίνδυνο μετάπτωσης σε βαρεία δυσπλασία ή διηθητικό καρκίνωμα μετά τη λοίμωξη από τα υψηλού κινδύνου στελέχη του HPV<sup>20-22</sup>.

Αξίζει να τονίσουμε ότι η συσσώρευση T4 λεμφοκυττάρων συνδυαζόταν, όπως αναμένετο, με αισθητή παρουσία των μορίων HLA-DR σε στρωματικά στοιχεία τα οποία μάλιστα ήταν "εξ επαγγέλματος" αντιγονοπαρουσιαστικά (λεμφοϊστοκυτταρικής αρχής). Έτσι, τα στρωματικά, αφρώδη, αρνητικά για βλέννη, λιποειδοφόρα κύτταρα ήταν πάντοτε HLA-DR-αρνητικά, γεγονός που είναι συμβατό με την προέλευσή τους από το στρώμα του ενδομητρίου και το σχηματισμό τους συνεπεία της νεκρωτικής δραστηριότητας του όγκου<sup>23</sup>. Ακόμα, τα καρκινικά κύτταρα εξέφραζαν τα αντιγόνα HLA-DR σαφώς σπανιότερα σε σύγκριση με τα κύτταρα του στρώματος των όγκων και μάλιστα η ανοσοϊστοχημική χρώση στα κακοήδη κύτταρα εστιαζόταν κυρίως στο πρωτόπλασμα κι όχι στις μεμβράνες τους. Η συγκέντρωση των OPD4-θετικών κυττάρων δε φαινόταν να επηρεάζεται από την έκφραση των HLA-DR στα νεοπλασματικά κύτταρα και το αρνητικό αυτό εύρημα υποβαθμίζει την όποια αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργική ικανότητα των κακοήθων κυττάρων. Η κυτταροπλασματική χρώση για τα HLA-DR έχει αναφερθεί βιβλιογραφικώς<sup>24,25</sup>, δικαιολογείται δε και λειτουργικά αφού το μόριο HLA τάξης II ακολουθεί ενδοκυττάρια διαδρομή για να συνδεθεί μέσα στο διαμέρισμα των ενδοσωμάτων με το αντιγονικό πεπτίδιο και στη συνέ-

χεια το σύμπλεγμα ΜΣΙ-II/αντιγονικό πεπτιδίο εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη του ΑΠΚ<sup>26</sup>. Επιπροσθέτως πρέπει να τονισθεί ότι τα μόρια τάξης II του ΜΣΙ που βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μπορούν να εισέλθουν ξανά στο πρωτόπλασμα, αλλά τότε δε φαίνεται να διαδέχονται τη δυνατότητα να εξέλθουν για δεύτερη φορά στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης<sup>27</sup>. Τέλος, η ανίχνευση μορίων HLA-DR στα κακοήδη κύτταρα μπορεί να οφείλεται σε απλή τοπική επαγωγή και υπερπαρουσία τους λόγω δράσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών απελευθερωμένων από ανοσοϊκανά κύτταρα. Έτσι ή αλλιώς, η παρουσία HLA-DR στα καρκινικά κύτταρα δε φαίνεται ικανή να διεγείρει από μόνη της μια αποτελεσματική ανοσοαπάντηση του ξενιστή οργανισμού κατά των ιδίων των καρκινικών κυττάρων.

Συνοψίζοντας, τα μόρια HLA τάξης II, εκφραζόμενα σε κατάλληλα ανοσοϊκανά κύτταρα, αποτελούν μόρια αναγνώρισης τα οποία επιτρέπουν στα κύτταρα που συνεργάζονται στην ανοσολογική απάντηση να αναγνωρίζονται μεταξύ τους, η δε παρουσία μορίων HLA τάξης II είναι απαραίτητη για την επαφή και συνεργασία μεταξύ μακροφάγων, T και B λεμφοκυττάρων που φαίνεται να λαμβάνει χώρα στα πρώιμα κλινικά στάδια των καρκινωμάτων του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας. Μετά την ολοκλήρωση της παρακολούθησης της επιβίωσης και των υποτροπών αξίζει να διερευνηθεί και η πιθανή άμεση προγνωστική σημασία του βαθμού ανοσιακής ενεργοποίησης στις ασθενείς αυτές.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς ευχαριστούν θερμώς τη Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν. Αθηνών "Αλεξάνδρα" Κα Σ. Μαρκάκη για την προθυμία της στη διάθεση του υλικού.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bodmer W. HLA today. *Hum Immunol* 17:490, 1986.
- Accola SR, Adorini L, Sartoris S, Sinigaglia F, Guardiola J. MHC: Orchestrating the immune response. *Immunol Today* 16:8-11, 1995.
- Beverly P. Tumour immunology. In: Roit I, Brostoff J, Male D (eds) *Immunology*, 3rd edition, Mosby, St.Louis 17.1-12, 1993.
- Concha A, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Nogales F, Collado A, Garrido F. Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesions of the breast. *Eur J Immunogenet* 22(4):299-310, 1995.
- Cancer Committee Report to the General Assembly of FIGO: Classification and staging of malignant tumor in the female pelvis. *Int J Gynaecol Obstet* 9:172-179, 1971.
- Nelson JH, Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ and early cervical cancer. *CA* 34:306-327, 1984.
- Chadburn A. Monoclonal antibody OPD4 detects neoplastic T cells but does not distinguish between CD4 and CD8 neoplastic T cells in paraffin tissue sections. *Hum Pathol* 23:940-947, 1992.
- Gaffney EV, Halpin DP, Moody WE, Elliott CB. Immunocytochemical analysis of hormone receptors with malignant cells separated from human mammary tumors. *Am J Clin Pathol* 102(1):68-71, 1994.
- Brandtzaeg P, Sollid T, Thrane S, Kvale P, Bjerke L, Scott L, et al. Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut* 29:1116-1130, 1988.
- Ledbetter JA, Deans JP, Aruffo A, Grosmaire LS, Kanner SB, Boley JB et al. CD4, CD8 and the role of CD45 in T cell activation. *Curr Opin Immunol* 5:334-340, 1993.
- Kuby J. Major histocompatibility complex. In: *Immunology*, 2nd edition. Freeman WH and Company, New York 245-270, 1992.
- O'Garra A. Interleukins and the immune system. *Lancet* 1-2i:943-947, 1003-1005, 1989.
- Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-27. *Nature* 353:326-329, 1991.
- Hachisuga T, Fukuda K, Nakamura S, Iwazaka T, Sugimori H. Local immune response in endometrial carcinomas. *Br J Obstet Gynaecol* 104:110-114, 1997.
- Coleman N, Stanley MA. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 56:314-319, 1994.
- de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, et al. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: A longitudinal study. *Cancer Res* 58:1700-1706, 1998.
- Arrai KI, Lee F, Migajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokine coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem* 59:783-836, 1990.

18. Rees RC. Cytokines as biological response modifiers. *J Clin Path* 45:93-98, 1992.
19. Hohn H, Pilsh H, Gunzel S, et al CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol* 163:5715-5722, 1999.
20. Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM, Erlich HA. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87:427-436, 1995.
21. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 6:157-162, 1994.
22. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. *Int J Cancer* 67:595-602, 1996.
23. Fechner RE, Bossart MI, Spjut HJ. Ultrastructure of endometrial stroma foam cells. *Am J Clin Pathol* 72:628-633, 1979.
24. Rognum TO, Brandtzaeg P, Thorud E. Is heterogeneous expression of HLA-DR antigens and CEA along with DNA-profile variations evidence of phenotypic instability and clonal proliferation in human large bowel carcinomas? *Br J Cancer* 48:543-551, 1983.
25. Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Aroni K, Saitta A, Davaris PS. Immunohistochemical expression of C-myc oncogene, heat shock protein 70 and HLA-DR molecules in malignant cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 426:461-467, 1995.
26. Neefjes JJ, Momburg F. Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 5:27-34, 1993.
27. Neefjes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Gueze HJ, Ploegh HL. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61:171-183, 1990.

---

*Corresponding author*

Lazaris A.

*Depart of Pathology*

*Athens University Medical School*

*75 M. Asias str.*

*115 27 Goudi Athens*