

# SHPREHJA E CITOKERATINAVE SI TREGUES I PROGRESIONIT NEOPLAZIK NË KARCINOMËN ME QELIZA SKUAMOZE TË EZOFAGUT

LUTFIALIA\*

## Summary

### CYTOKERATIN EXPRESSION PATTERNS AS AN INDICATOR OF TUMOUR PROGRESSION IN OESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Recent studies point out that cytokeratins (CKs) are involved in dynamic cell remodeling during cancer progression and particularly, CK expression patterns have been associated with invasion and metastasis. In oesophageal squamous cell carcinoma (ESCC), lymph node metastasis (LM) is an important step in disease progression, invariably associated with an ominous prognosis. To assess whether specific CK expression patterns could represent reliable markers of tumour progression, a series of 111 ESCC (59 lymph node – positive and 52 cases negative) derived from the high-incidence area of Linxian (Northern China), were subjected to immunohistochemical (IHC) analysis with an extensive panel of CK antibodies. Statistically significant differences were observed for CK18 ( $p = 0,01$ ), CK19 ( $p = 0,04$ ) and PKK1 ( $p = 0,02$ ) expression between the LNN-negative and LM-positive ESCCs. Furthermore, significant correlation between specific cytokeratins distribution pattern and progressive disease (i.e. LN metastases) was evidenced.

The results suggest that CK8, CK18 and CK19 expression and distribution pattern could be of predictive value as a marker of disease progression as defined by the appearance of lymph node metastases in ESCCs. We therefore conclude that the pattern of expression of cytokeratins in oesophageal squamous cell carcinomas is different from that in normal oesophageal epithelia and varies with differentiation.

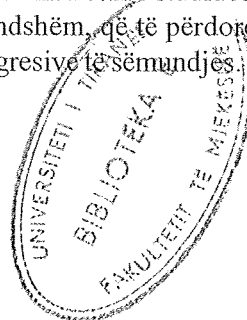
Neoplazitë e stomakut dhe të ezofagut janë ndër sëmundjet me komune në botë, të karakterizuara dhe me diferenza sinjifikative në përhapje e në prevalencë në zona të ndryshme gjeografike (1,2,3). Incidenca e vdekshmëria nga KQSE janë veçanërisht të larta në disa zona si Kina, Irani, Afganistani, Japonia, Afrika e Jugut, Brazili, Kanada etj, ndërsa në Europë rastiset shumë më rrallë, me një shpeshtësi relativisht me evidente në Zvicër, Francë e në vendet Ballkanike (1,4). KQSE përbën mbi 90% të të gjitha neoplazive të këtij organi (1,2).

Në Kinë, sidomos në kontean e Linxian, KQSE është patologji e shpeshtë, me indeks vdekshmërie 22.34% të vdekjeve të përgjithshme nga neoplazitë, duke u renditur në vendin e dytë pas karcinomës së stomakut (5,6,7).

Krahas vështirësive në diagnozën e mjekimin dhe prognoza e të sëmurëve është e keqe dhe KQSE mbetet ende një kërcënim për jetën, për çka gjithmonë ka nxitur interesin e studiuesve të evidentojnë marker të mundshëm, që të përdoren për të vlerësuar ecurinë progresive të sëmundjes.

\* Dërguar në Redaksi në Janar 2007, miratuar për botim Shtator 2007.

Nga Department of Pathology, University of Siena - Italy  
Adresa për letërkëmbim: Alia L. Department of Pathology,  
University of Siena - Italy



Studime të shumta imunohistokimike kanë provuar se ekziston një varësi ndërmjet mekanizmave të ndryshëm që nxisin e zhvillojnë transformimin malinj të epitelit, me progresimin e neoplazisë, ku rol me rëndësi në këtë aspekt luan citoskeleti dhe skeleti i membranës. Së bashku me mikrotubujt dhe mikrofilamentet në përbërje të citoskletonit qelizor marrin pjesë dhe filamentet intermediare, struktura polipeptidike me diametër 10nm, që marrin pjesë në formimin e rrjetës së dendur fibrilare rreth bërthamës qelizore, që shtrihet deri në membranën qelizore. Në përbërje të këtyre strukturave bëjnë pjesë dhe citokeratinat, që janë filamente proteinike të patreteshme të kodifikuara nga shumë gene. Citokeratinat përfaqësojnë grupin me konsistent të familjes të filamenteve intermediare të qelizave epiteliale (8,9,10,13).

CK janë familje polipeptidesh me peshë molekulare në kufijt 40-68 kDa. Janë identifikuar rreth 30 polipeptid-keratina, nga të cilat 20 i përkasin qelizave epiteliale, ku ndjekin një shpërndarje specifike sipas epiteleve.

Klasifikimi dhe numrat e citokeratinave (CK1-CK20) bazohen në katalogun e Moll (9,10,13). Në familjen e CK, 12 prej tyre (CK9-CK20) i përkasin klasës I, janë të tipit acid, ndërsa 8 citokeratina (CK1-CK8) janë të tipit B, klasa II, bazike-neutrale. Në strukturën e tyre filamentoze, citokeratinat polipeptidike janë gjithmonë në çifte, pra çdo tip të veçantë të citokeratinash të tipit A, i përkon një kompleks me citokeratina të tipit B, duke krijuar kështu struktura heterodimere në përbërje të citoskletonit (13,14) (shih tabelën nr.1).

**Tabela nr.1 Karakteristikat e shprehjes të citokeratinave në qelizat epiteliale**

	Tipi B (cell II) CK Neutrale - Bazike	Tipi A (cell I) CK Acide.
Epiteli kornifikuar, i shtresëzuar (epiderma)	CK2e	CK1 — CK10 CK3 — CK12
Kornea		CK9
Epiteli i shtresëzuar i pa keratinizuar (ezofagu)	CK4	CK13
Turnoveri i lartë qelizor (epiteli shumë shtresor i pakkeratinizuar)	CK6	CK16
Qelizat bazale	CK5	CK14
Epitelet e thjeshtë (njështresor)	CK7	CK19
	CK8	CK18
		CK17 — CK15 — CK20

Siç shihet, çdo tip qelize përmban së paku dy grupe CK me topografi e ndryshueshmëri shprehjeje. Përbërja qelizore në CK reflekton së bashku si tipin e qelizës ashtu dhe statusin e diferencimit. Në këtë kontekst rezulton se çifte citokeratinash janë të vetme për qelizat e një tipi epiteli si p.sh CK3 (63 kDa) dhe CK12 (55 kDa) janë identifikuar vetëm në epitelin e korneas. Tipi B i CK (bazike-neutrale), janë me peshë

molekulare 7-9 kDa më të madhe se CK acide të grupit A. Fijet citokeratinike mund të bashkëshprehën dhe me tipe filamentesh të tjera intermediare. Ka rëndësi të theksohet se citokeratinat janë marker fundamental për diferencimin e qelizave epiteliale.

Citokeratinat acide (katalogu i Moll CK 10 e 12-19), janë me peshë molekulare 40,000 deri 56,500 kDa; ndërsa citokeratinat bazike (katalogu i Moll CK

1-8) janë me peshë molekulare nga 53,000 në 67,000 kDa. Në epitelin normal të pakërtinuar të ezofagut, janë karakteristike CK4, CK13, CK6, shprehja e shpërndarja e të cilave ndryshon sipas stadit të diferencimit qelizor, fazës së zhvillimit e të gjendjes patologjike të qelizave (12,13,14). Krahas këtyre CK, në qelizat neoplazike dhe displazike, shfaqen dhe CK aberrante, çka dëshmon se këto struktura ndërhyjnë në transformimin malinj të qelizave, në proceset e diferencimit e të progresimit të neoplazisë (4,10,11). Kësisoj, shëmbëlltyrat e shprehjes së CK në KQSE, ndryshojnë nga ato të epitelit normal të ezofagut dhe variojnë sipas shkallëve të diferencimit të qelizave neoplazike. Studime të shumta kanë evidentuar variacione dramatike në shprehjen e shpërndarjen e CK në neoplazi të ndryshme malinje (9,14) dhe ndërkohë është sugjeruar përdorimi i tyre potencial si marker molekular për të vlerësuar shkallën e diferencimit dhe gradën e malinjitetit në disa neoplazi malinje si psh në karcinomën me qeliza skuamozë të columbia uteri (15,16). Studime të tjera kanë evidentuar implikimin e CK në rimodelimin dinamik të qelizave gjatë zhvillimit të fenotipit neoplazik (14), në invazion (6) në metastazat (3,5), ndërsa në kancerin e gjirit, shprehja e CK përkon me progresimin e neoplazisë dhe metastazat në limfonoduj (9). Në këtë mënyrë, vlerësimi i shprehjes së CK është bërë një element i rëndësishëm shtesë për studimin dhe diagnozën histologjike të neoplazive malinje, si dhe për vlerësimin e stadit e të prognozes të shumë semundjeve neoplazike (14,15). Veçoritë e shprehjes të CK në karcinomat e ezofagut (3,5,6) dhe në lezionet displazike (4,11) janë studiuar gjerësisht, madje analiza e CK është përdorur si tregues potencial për të ndjekur dinamikën e dëmtimeve displazike (follow-up) dhe njëkohësisht është përdorur si marker për të vlerësuar diferencimin e KQSE (7).

Prania e metastazave në limfonodujt rajonal është konsideruar një shkallë e rëndësishme e progresimit të KQSE, që shoqërohet dhe me prognozë të keqe të sëmurit (3,4,5). Për të vlerësuar në se shëmbëlltyrat e shprehjes të CK, mund të përdoren si marker për të vlerësuar progresimin e neoplazisë, kryem studimin imunohistokimik të 111 rasteve me KQSE (ndër të cilët 59 raste me limfonoduj pozitiv për metastaza dhe 52 raste me limfonoduj negative për metastaza),

që i përkasin të njëjtit numër të semurësh nga kontea Linxian, provinca Henan (Kina veriore), që është zona me incidencën më të lartë në botë me këtë neoplazi.

Analiza imunohistokimike e materialit u realizua me një panel të gjere antitropash mono-klonal anti-citokeratina. Bazuar në pattern të reaktivitetit, antitropat anticitokeratina ndahen në katër grupe: 1. antitropa për CK me peshë molekulare të madhe dhe të ulët të pranishëm në epitelin skuamoz, në epitelin e duktuseve gjenderror dhe epitelet e thjeshtë, gjerësisht reaktive; 2. antitropa për CK me peshë molekulare të madhe, të pranishëm në epitelin skuamoz; 3. antitropa për CK me peshë molekulare të ulët, të pranishëm në epitelet e thjeshta dhe epiteley duktale; 4. antitropa për CK me peshë të madhe molekulare, të pranishëm në të dy tipat e epiteleve, në atë skuamoz dhe në epitelin e duktuseve gjenderror (12,15).

#### Materiali dhe metoda

Analiza IHK u krye në 111 kampione KQSE, që i përkasin të njëjtit numër të sëmurësh, të cilët i janë nënshtruar ezofagektomisë të shoqëruar me rezeksion të gjërë të limfonodeve rajonal, në Anyang Tumour Hospital të provincës Henan (Kina). Të gjithë të sëmurët janë banorë nga kontea e Linxian, një zonë e njohur për incidencën e lartë të KQSE, në Kinë dhe në botë (3,5,6). Nga këta pacienta 80 raste janë burra (72%) dhe 31 raste gra (28%), me range 35-72 vjeç (media 54 vjeç). Prania e metastazave karcinomatose në limfonodujt regjional u verifikua në 59 raste (52,3%).

**Histopatologjia:** Kampionet indore u fiksuan në formalinë 10%, u derdhën në parafinë dhe për çdo rast u morën prerje të shumta me trashësi 3-5  $\mu$ m, një prej të cilëve u ngjyros me teknikën haematoxylin-eosin për ekzaminimin në mikroskop fotonik për diagnozën e histotipit të karcinomës dhe për vlerësimin e gradës së diferencimit të neoplazisë në bazë të kriterëve standarte (3,7). Njëkohësisht, në 59 pacientë u morën kampione indore nga epiteli ezofageal jo neoplazik fqinj me neoplazinë (ENN). Seksionet indore nga këto materiale u ngjyrosën me H&E dhe u ekzaminuan në mikroskop fotonik për të diagnostikuar dhe vlerësuar gradën e displazisë.

**Imunohistokimia:** Për studimin imunohistokimik të CK-ave, seksionet nga indet neoplazike të derdhura

në parafinë, i analizuam me metodën Biotin-Streptavidina e Amplifikuar (BSA). Kampionet e dyta të seksioneve të prera nga blloku i parafinës me trashësi 3-5 im, u çparafinizuan në ksilol, u rihidratuan me pasazhe në gradë zbritëse alkoli dhe pasi u shpërllanë me TBS, u inkubuan në seri reagentesh: serum joimun i miut, me antitrupa monoklonal anticitokeratina (parësor), antitrupa anti-imunoglobulina biotinilate (dytësore) të ngarkuar me proteina dhe me fosfataza alkaline labelled-streptavidina. Si substrat ngjyruet u përdor Fuksina e Re. Pasi u shpërllanë në TBS, seksionet u

kundërngjyrosën me hematoksilinën e Mayer-it dhe pas rishpëllarjes me TBS, u montuan me glicerinë. Për demaskimin e epitopeve të citokeratinave, seksionet u inkubuan në pronazë (0,10% -Sigma, Snt. Luis - USA) në 37°C për 10 minuta.

Ky studim u krye për të analizuar pattern-et e shprehjes të citokeratinave dhe ndërvarësit e tyre me shkallët e diferencimit të KQSE. Për të studiuar shprehjen e CK në materialin tonë kemi përdorur një panel prej 6 antikorpesh monoklonal kundër citokeratinave që po i prezantojmë në tabelën e mëposhtme:

Atitrupat	Nr. Katalogut sipas Moll	*PM (KD)	PI**	Burimi i furnizimit
CK8	8	50	6, 1	BIOGENEX
CK18	18	43		BIOGENEX
CK13	13	51		BIOGENEX
CK19	19	40		BIOGENEX
AE1	10	56, 5	5, 3	BIOGENEX
	14 / 15	50	5 - 5, 3	
16		48	5, 1	
	19	40	5, 2	
AE1-AE3	10 - 14 / 15 - 16 - 19			BIOGENEX
	1, 2	65 - 67		
	3	64		
	4	59		
	5	58		
	6	56		
	7	54		
	8	52		

\*PM – pesha molekulare, \*\*PI – pika izoelektrike e CK, që përkojnë me katalogun e Moll.

**Klasifikimi i imunongjyrim:** Epiteli skuamoz i ezofagut normal është i ndërtuar me tre shtresa qelizash, të cilat janë: shtresa bazale, shtresa ndërmjetëse dhe shtresa sipërfaqësore, ku këto dy të fundit emërtohen të unifikuara si shtresa suprabazale. Ky tip stratifikimi qelizor ruhet në KQSE e diferencuar mirë e në ato me diferencim të moderuar, por nuk ruhet, ose më saktë prishet në karcinomat e padiferencuara. Bazuar në këtë karakteristikë morfologjike, shprehjen imunologjike të CK-ve e analizuam në grupin e unifikuar të KQSE të mirë diferencuara dhe me diferencim të moderuar (KQSE-MMD). Pra, nga ky studim kemi përjashtuar KQSE

e padiferencuara, pasi epiteli neoplazik duke qënë i dizorganizuar e humb vendosjen e stratifikuar të qelizave neoplazike, çka vështirëson vlerësimin e shëmbëlltyrave të shprehjes së CK sipas kriterëve të parastabilizuara.

Për të vlerësuar karakteristikat e shpërndarjes të CK në epitelin neoplazik të ezofagut kemi përdorur kriterin e klasifikimit në 5 pattern të ndryshme imunongjyrimi:

I- të gjitha shtresat qelizore të epitelit rezultojnë negative në imunongjyrim,

II- imunongjyrimi rezulton pozitiv vetëm në shtresën bazale

III- imunongjyrimi rezulton pozitiv vetëm në shtresën sipërfaqësore

IV- imunongjyrimi rezulton pozitiv në shtresat suprabazale (e ndërmjetme + sipërfaqësore)

V- imunongjyrim pozitiv në mënyrë homogjene në të gjitha shtresat

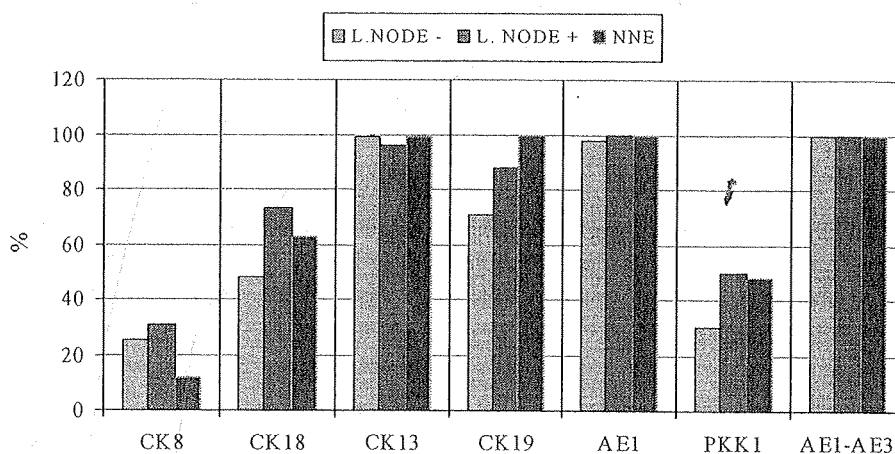
VI- imunongjyrim pozitiv por në mënyrë dishomogjene në të gjitha shtresat.

**Metoda statistikore:** Analizën statistikore e kemi realizuar duke përdorur SPSS – statistical software package. Diferencat në shprehjen e shpërndarjen e CK-ve i analizuar duke përdorur testin Chi-square dhe testin ekzakt të Fisher-it. Diferencat e shprehjes së CK, u analizuan ndërmjet KQSE-MMD dhe ENN si dhe të këtyre dy patologjive me rastet që kanë limfonoduj me metastaza të KQSE (LM pozitive) dhe të KQSE me limfonoduj pa prani metastazash (LN

negative). Niveli i sinjifikancës statistike është pranuar kur  $p < 0, 05$ .

## Rezultatet

**Histopatologjia:** Në përfundim të studimit histopatologjik, rastet u klasifikuan: 102 raste (91,89%) KQSE të mirë diferencuara dhe 9 raste KQSE të diferencuara në mënyrë të moderuar (8,11%). Në 52 raste (46,80%) u verifikua prania e metastazave karcinomatoze në limfonodujt rajonal, të cilat i kodifikuam LM pozitive dhe kur mungon konfirmimi histopatologjik i metastazës, i kodifikuam LN negative. Në 59 raste është identifikuar dhe u ekzaminua epiteli joneoplazik fqinj me neoplazinë parësore (ENN), që rezulton i shoqëruar me shkallë mesatare dukurish inflamatore dhe hiperplazi, ndërsa zonat e displazisë janë identifikuar në 4/59 raste



**Imunohistokimia:** Rezultatet përmblendhëse të shprehjes në përqindje dhe të shpërndarjes së CK në KQSE me limfonodujt me metastaza dhe pa metastaza, si dhe në indin joneoplazik fqinj, janë

prezantuar në diagramën nr.1. Rezultatet e analizës statistikore për shprehjen e imunoreaktivitetit të CK dhe pattern-et e shpërndarjes të CK në ENN dhe në KQSE janë prezantuar respektivisht në tabelat nr.2 dhe nr.3.

LN -	25 %	48 %	99 %	71 %	98 %	30 %	100 %
LN +	31 %	73 %	96 %	88 %	100 %	50 %	100 %
ENN	12 %	63 %	99 %	100 %	100 %	48 %	100 %

Diagrama 1. Shprehja e tipave të citokeratinave në epitelin neoplazik.

*Antitruapat anti - CK8*, shprehen me imunoreaksion pozitiv 25% në LN që janë negative për metastaza, 31% në LM pozitive për KQSE dhe vetëm 12% të

ENN (diferenca jo sinjifikative  $p=0.17$ ,  $p=0.07$  dhe  $p=0.54$ ) (tabela nr.2). Limfonodujt pozitive për metastaza të KQSE shprehin mbizotërim të pattern-

it difuz (V), limfonodujt negativ paraqesin pattern bazal dhe sipërfaqësor (tipi II, III), ndërsa në ENN mbizotëron shpërndarja suprabazale (tipi IV). Diferencat e pattern të

shprehjes të CK ndërmjet ENN dhe KQSE dhe ndërmjet LN pozitive me LN negative janë statistikisht sinjifikative ( $p = 0,03$ ;  $p = 0,03$ ;  $p = 0,02$  respektivisht) (tabela nr.3).

**Tabela nr.2 Shprehja e CK në ENN dhe në KQSE**

	ENN kundrejt		LN – kundrejt
	LN –	LM +	
CK 8	0.17	0.07	0.54
CK18	0.25	0.43	0.01*
CK13	-	0.28	0.12
CK19	0.003*	0.07	0.04*
AE1	0.52	-	0.3
PKK1	0.11	0.7	0.02*
AE1-AE3	-	-	-

**Tabela 3. Patterni i CK në ENN dhe në KQSE**

	ENN kundrejt		LN – kundrejt
	LN –	LM +	
CK 8	0.03*	0.03*	0.02*
CK18	0.13	0.025*	0.07
CK13	0.19	0.12	0.21
CK19	0.001*	0.0001**	0.02*
AE1	0.03*	0.07	0.39
PKK1	0.004*	0.0007**	0.11
AE1-AE3	0.2	0.37	0.23

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.001$

*Antitruapat anti - CK18*, shprehin imunongjyrim në 48% të LN negative, 73% të LM pozitive për KQSE dhe 63% të ENN. Nga analiza statistikore rezultojnë diferenca sinjifikative ndërmjet LN negative dhe LM pozitive të KQSE ( $p = 0.01$ ). Gjithashtu, në shëmbëlltyrat (pattern) të shprehjes të CK18, shihen diferenca statistikisht sinjifikative ndërmjet ENN dhe LM pozitive me metastaza të KQSE ( $p = 0.025$  (tabela nr.3). Shprehja e CK18 prezantohet me imunongjyrim pozitiv mbizotërues në shtresat suprabazale (pattern IV) dhe difuze (pattern V)

*Antitruapat anti - CK13* shprehin imunoreaktivitet në pothuajse të gjitha rastet e KQSE me dhe pa metastaza si dhe në ENN, duke u prezantuar me pattern të tipit V, shpërndarje difuze në të gjitha shtresat. Në analizën statistikore nuk rezultojnë diferenca sinjifikative në shprehjen e CK13 ndërmjet KQSE dhe ENN dhe as ndërmjet LM pozitive me LN negative për KQSE (shih tabelen nr. 2, nr.3).

*Antitruapat anti - CK19* shprehin pozitivitetin imunongjyrimin në 71% të KQSE me LN negative për metastaza, në 88% të KQSE me LM pozitive dhe në të gjitha kampionet e ENN (100%). Shprehja e CK19 paraqitet me diferenca statistikisht sinjifikative ndërmjet ENN, me LN negative për KQSE ( $p =$

0,003), dhe ndërmjet LM pozitive me LN negative për KQSE ( $p = 0,04$ ) (tabela nr.2). Gjithashtu, diferenca sinjifikative janë evidente në pattern e shpërndarjes të CK19 ndërmjet LM pozitive me LN negative për KQSE ( $p = 0.0001$ ) dhe ndërmjet KQSE dhe ENN ( $p = 0.02$ ) (tabela nr.3). Në 4% të rasteve imunongjyrimi është prezantuar në qelizat e shtresës bazale (pattern II), në 76% në ENN, por është negativ në KQSE me LN negative.

*Antitruapat anti - PKK1* (CK 8,18 e 19). Ky antitrupe krijon imunongjyrim në 30% të LN negative për KQSE, 50% në LM pozitive dhe 48% të ENN. Në shprehjen e PKK1 rezultojnë diferenca statistikisht sinjifikative ndërmjet KQSE me LM pozitive dhe LN negative ( $p = 0.02$ ) (tabela nr.2). Gjithashtu, diferenca sinjifikative rezultojnë në shpërndarjen e pattern ndërmjet ENN dhe KQSE me LN negative e LM pozitive ( $p = 0.004$  dhe  $0.0007$  respektivisht) (tabela nr.3). Shëmbëlltyrat ndryshojnë sipas epitelit, kështu që në seksionet e ENN shohim imunongjyrim të fortë të qelizave të shtresës bazale, ndërsa në indin neoplazik karcinomatoshihet imunongjyrim difuz (pattern V).

*Antitruapat anti AE1* (njohin CK10, CK14/15, CK16 e CK19). Prezantojnë imunoreaktivitet pozitiv në pothuajse të gjitha rastet me KQSE dhe në ENN.

Diferenca statistikisht sinjifikative janë evidente në shëmbëlltyrat e shpërndarjes të imunoreaksionit ndërmjet ENN dhe KQSE me LN negative ( $p < 0,03$ ). Në 13% të ENN shihet pattern II, ndërsa në indin neoplazik të KQSE imuno- ngjyrimi shprehet me pattern V.

*Antitruapat anti AE1-AE3.* Ky cocktail antitruapash njih një grup të madh CK acide e bazike duke u shprehur në mënyrë homogjene si në epitelin normal ashtu dhe në atë neoplazik të KQSE, prandaj siç pritet imunoreaktiviteti është pozitiv dhe difuz në të gjitha shtresat si të KQSE ashtu dhe të ENN (tipi V).

### Diskutimi

Ky punim përfaqëson një pjesë të studimit multidisiplinor të KQSE të kryer në pacientë nga kontea Linxian, provinca Henan – Kina, një zonë me incidencë të lartë me këtë neoplazi.

Studimi imuno-histokimik, që bënë pjesë në kompleksin e hulumtimeve për mekanizmat morfopatogjenetik të kësaj sëmundjeje, u realizua me një panel të gjerë e karakterizues antitruapash anticitokeratina, që evidentoi ndryshime të dukshme të shprehjes dhe të shpërndarjes së CK në indin neoplazik të KQSE me dhe pa metastaza dhe në ENN. Nga përgjithësimi i rezultateve, mund të sugjerojmë se CK ndërhyjnë në transformimin malinj dhe në progresionin e KQSE.

Në raport me tipat e CK që u kërkuan të individualizohen me imunohistokimi, rezultatet e studimit të materialit tonë i kemi sistemuar në tre grupe:

- shprehje e çrregullt e CK8 dhe CK18 (karakteristikë për epitelet e thjeshta).
- shprehje e çrregullt e CK19 e AE1 (karakteristikë për qelizat e shtresës bazale).
- shprehje e çrregullt e CK13 (e lidhur me diferencimin qelizor të epitelit).

CK8 dhe CK18 janë një çift citokeratinash të shprehura në epitelet të thjeshtë të indeve normale gjëndërrore (8,12,13,14). Në studime të kombinuara të imunohistokimisë me biologjinë molekulare (hibridacionin in situ), është vërtetuar shprehja e këtyre CK në lezionet e displazisë dhe në epitelin skuamoz neoplazik (4,6,11,16). Në studimin imunohistokimik të materialit tonë kemi gjetur

shprehje të dallueshme dhe variacione të shëmbëlltyrave të këtyre dy citokeratinave, si në indin karcinomatоз ashtu dhe në ENN. Këto të dhëna dëshmojnë se qelizat e epitelit joneoplazik fqinj me masën neoplazike, kanë pësuar ndryshime të citoskeletit, çka orienton implikim të CK8 dhe CK18 në transformimin neoplazik të epitelit të ezofagut.

Nga analiza e materialit tonë kemi gjetur se shprehja CK18 është sinjifikativisht e rregullt në varësi me progresionin e neoplazisë e zhvillimin e metastazave rajonale ( $p = 0,01$ ). Njëkohësisht kemi konstatuar se antitruapat monoklonal anti CK18 manifestohen me shprehje më intensive e me diferenca sinjifikative në krahasim me shëmbëlltyrat e shpërndarjes të CK8 në KQSE me LM pozitive ndaj LN negative për metastaza ( $p = 0,02$ ). Rezultate të njëjta referojnë dhe autorë të tjerë, që kanë konstatuar se imunoreaktiviteti i CK18 është më intensiv se i CK8 (18,20,21). Ky çift CK manifestohet me çrregullime në shprehje e në shpërndarje dhe në neoplazi të tjera malinje epiteliale me dukuri invazive e me metastaza (16,17,18). Në adenokarcinomën e mushkërive është verifikuar se ekziston varësi ndërmjet shprehjes së CK18 e pranisë të invazionit e të metastazave në limfo-nodujt rajonal (5). Në mënyrë të ngjashme qelizat L të miut të transinfektuara me CK8 e CK18, tregojnë aktivitet migrator dhe potencial invaziv më të lartë, në krahasim me klonet parentale dhe me ato të grupit të kontrollit (6).

Shprehjet e CK8 dhe CK18 në epitelin KQSE janë interpretuar si “interface phenomenon”, që implikon bashkëveprimin e qelizave karcinomatозe me mikromjedisin stromal, duke nxitur proliferimin e invazionin e qelizave neoplazike (17,21). Mendohet se CK18 vepron në aktivizimin e plasminogenit, një proteazë e fuqishme që tret lamininen dense të membranës bazale e matriksin interqelizor, duke krijuar çarje që favorizojnë depërtimin e qelizave neoplazike në thellësi të indeve (22,23,24). Ky sugjerim mbështetet dhe në faktin se deficitet në CK8 dhe CK18 si në qelizat normale dhe në ato neoplazike malinje, e bëjnë qelizën të jetë 100 herë më e ndjeshme ndaj TNF, që si dihet implikohet në apoptozë (eliminimi efektiv të qelizave neoplazike) (18,19,31). Nga interpretimi i të dhënave tona, rezulton se shprehja e CK8 dhe CK18 dhe shpërndarja e tyre në

menyrë të kryqëzuar në spektrin e KQSE me LM pozitive, me LN negative dhe në ENN, përfaqësojnë një epifenomen të humbjes të aftësisë diferencuese të qelizave epiteliale, proces karakteristik i fenotipit malinj, që shoqërohet me invazion e metastaza të KQSE në limfonoduj rajonal dhe në indet periezofageale.

Grupi i dytë i rasteve të studiuara shoqërohen me shprehjen e citokeratinave të njohura nga antitrukat AE1 (CK10,14/15,16 dhe 19), që siç dihet, njohin komponentët e familjes së CK acide me shprehje karakteristike në qelizat e shtresës bazale të epiteleve skuamoze (12,13,14). Në materialin tonë kemi konstatuar imunoreaktivitet pozitiv për AE1 në qelizat e shtresës bazale të epitelit jo neoplazik fqinj me masën parësore (tabela nr.2), në ndryshim me rastet e KQSE, ku shprehja e antitrupeve anti AE1 është difuze në shtresat suprabazale ( $p = 0,03$ ). Dhe CK19 është një tjetër citokeratine e qelizave të shtresës bazale, e cila është njohur marker e malinjitetit dhe e diferencimit epitelial (8). Në materialin tonë, CK19 rezulton e shprehur në qelizat e shtresës bazale në 76% të ENN dhe vetëm 2% në epitelin neoplazik të KQSE ( $p = 0.0001$ ) (tabela nr.2). Mbishprehja në shtresat suprabazale të CK19 dhe e AE1, është tregues që karakterizon transformimin neoplazik të qelizave të epitelit ezofageal. Në epitelin normal si AE1 dhe CK19 janë tipike për qelizat e shtresës bazale, ndërsa prania e tyre në shtresat suprabazale të KQSE, informon për natyrën progresive të neoplazisë e njëkohësisht është tregues i humbjes së aftësisë së diferencimit terminal të qelizave neoplazike, që në këto rrethana konservojnë karakteristikat imunofenotipike të qelizave bazale. Të dhënat tona për citokeratinat AE1 dhe CK 19, përkojnë me ato të komunikuar nga Yang (25), i cili sugjeron se gjatë zhvillimit të KQSE ndodhin ndryshime në shëmbëlltyrat e shprehjes të CK 19.

Pra, siç shihet CK18 dhe CK19, të quajturit marker të epiteleve të thjeshta ndeshen në shumicën e KQSE-ve dhe prania e metastazave në limfonoduj është një faktor i rëndësishëm prognostik për këto sëmundje. Vitet e fundit, është verifikuar se dhe në limfonodet, të cilat në mikroskopinë fotonike janë negative për metastaza, me përdorimin e antitrupeve anti AE1 rezultojnë positive për këto citokeratina, për

çka i kanë quajtur depozitime citokeratinash, ose më saktë mikrometastaza (12,15,20,32,33).

Grupi i tretë i rezultateve të studimit tonë përfaqësojnë shprehjen dhe shpërndarjen e CK13, e njohur si CK e zakonshme për epitelin e ezofagut dhe marker për epitelet skuamoze të pakeratini-zuara. Antitrukat anti CK13 reagojnë fuqishëm me CK13 (me PM 51 KD), e cila ka shprehje tipike në shtresat suprabazale të epitelit ezofageal, duke përjashtuar qelizat e shtresës bazale (5,7,26). Në shëmbëlltyrat epiteliale të CK13 të rasteve tona nuk kemi gjetur diferenca sinjifikative në shpërndarjen ndërmjet LM pozitive e LN negative për KQSE ( $p = 0,21$ ). Vlen të theksohet se në studime recente të kryera në KQSE dhe në inde paraneoplazike me hibridacion in situ, disa autorë kanë konstatuar shprehje fokale të mRNA-CK13, por të pa shoqëruar me të njëjtat karakteristika në shprehjen e CK13 (12,13,27). Natyrisht, në punimin tonë të realizuar me imunohistokimi nuk kemi kërkuar të evidentojmë vendin ku bëhet sinteza e mRNA-CK13, pasi ky është aspekt tjetër studimi i neoplazive në përgjithësi, por kemi studiuar vetëm grumbullimin dhe shprehjen citoplazmike të CK13, që siç dihet është e pranishme si në epitelin normal të ezofagut, ashtu dhe në fazat e diferencimit qelizor të epitelit neoplazik (KQSE). Shprehja dhe modelet e shpërndarjes të CK13 në rastet tona me KQSE, përkon me atë që kanë komunikuar dhe shumë autorë të tjerë (28,29,30,32).

Rezultatet e studimit tonë imuno-histokimik, në bazë të veçorive të patterns në shprehjen e në shpërndarjen e CK në epitelin neoplazik të KQSE na orientuan në konkluzionet në vazhdim:

1. Ndryshimet e modelit të shprehjes së CK në qelizat e shtresës bazale (CK19 dhe AE1), janë tepër sinjifikative për modifikimet që pësojnë gjatë proceseve të karcinogjenezës të epitelit të ezofagut. CK19 dhe AE1, janë biomarker për të vlerësuar transformimin malinj të qelizave epiteliale.

2. Shëmbëlltyrat e shprehjes e të shpërndarjes së CK8, CK18 e CK19 në epitelin neoplazik, janë biomarker me vlera për të vlerësuar progresionin e KQSE, që përkufizohet me invazionin dhe praninë e metastazave në limfonodujt rajonal. CK18 dhe CK19, të quajturit marker të epiteleve të thjeshta ndeshen në shumicën e KQSE-ve dhe prania e metastazave në

limfonoduj është një faktor i rëndësishëm prognostik për këto sëmundje.

3. CK8 dhe CK18 dhe shpërndarja e tyre në mënyrë të kryqëzuar në spektrin e KQSE me LM pozitive e me LN negative, si dhe në ENN, përfaqësojnë një epifenomen të humbjes të aftësisë diferencuese të qelizave epiteliale, proces

karakteristik i fenotipit malinj, që shoqërohet me invazion e metastaza të KQSE në limfonodujt rajonal.

4. Shprehjet dhe pattern-et e ndryshëm të këtyre tre grupe citokeratinash në epitelin e KQSE, janë parametra imuno-morfologjike që dëshmojnë për prognozë të keqe të sëmurit.

## BIBLIOGRAFIA

1. Parkin D., Pisani P., Ferlay J.: Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Intern. Journ. Cancer. 54: 594-606, 1993.
2. Benamouzig R., Ezratty V., Munoz N.: Etiological factors and mechanisms of esophageal squamous cell carcinoma. exogenous factors. Gastroenterol Clin Biol 17: 944-54, 1993.
3. Dawsey SM, Lewin J., Wang GQ, Liu FS, Neiberg R., Li Jy., Blot W., Li B., Taylor PR.: Squamous oesophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the oesophagus. A prospective follow-up study from Linxian, China. Cancer 15; 1686, 1994.
4. Jacob JH, Riviere A., Mandard AM: Prevalence survey of precancerous lesions of the oesophagus in a high-risk population for oesophageal cancer in France. Eur Journ Cancer 2: 53-60, 1993.
5. Chang F., Syrjänen S., Wang L., Shen Q., Syrjänen K.: p53 overexpression and human papillomavirus (HPV) infection in oesophageal squamous cell carcinomas derived from a high-incidence area in China. Anticancer Res 17: 709-715, 1997.
6. Chu YW, Runyan RB, Oshima RG, Hendrix MJ.: Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. J Pathol. 150: 483-95, 1997.
7. Cintorino M., Tripodi S., Santopietro R., Perrone A., Alia L., Chang F., Syrjänen S., Shen Q., Tosi P., Syrjänen K.: Cytokeratin Expression Patterns as an Indicator of Tumoral Progression In Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Research. 21: 4195, 2001.
8. Makino H., Tajiri T., Onda M., Sasajima K., Miyashita M., Nomura T., Maruyama H., Nagasawa S., Tsuchiya Y., Hagiwara N., Yamashita K., Yamaguchi T., Noyama T.: Detection of lymph node micrometastasis in esophageal carcinoma. Hepatogastroenterology. 50,1407 revealed by monospecific monoclonal antibodies. Histochem J 18: 565-575, 2003.
9. Brothrick L., Robson N., Browell A., Shenfine J., White D., Cunliffe WJ, Shenton BK, Egan M., Web LA, Lunt LG, Yung RJ, Higgs MJ.: Cytokeratin expression in breast Cancer Phenotyp change associated with disease progression. Cytometry, 32, 301-308, 1998.
10. Debus E., Moll R., Franke W., Weber K.: Osborn Immunohistochemical distinction of human carcinomas by CK typing with monoclonal antibodies. Am J Pathol 114: 121, 1984.
11. Itakura Y., Sasano H., Abe K., Furukawa Y., Mori S., Nagura H.: Cytokeratin immunolocalization and lectin binding studies in esophageal squamous dysplasia. Histopat (1996). 29:3-10.
12. Doki Y., Ishikawa O., Mano M., Hiratsuka M., Sasaki Y., Kameyama M., Ohigashi H., Murata K., Yamada T., Miyashiro I., Yokoyama S., Ishiguro S., Imaoka S.: Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. Journ. Surg. Res. 2002 Sep;107(1):75-81.
13. Moll R., Franke W., Schiller DL, Geiger B., Krepler R.: The catalog of human CKs:

- patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-2415, 1982.
14. Osborn M, Weber K (1982) Intermediate filaments: cell-specific markers in normal differentiation and in the Pathology. *Cell* 31: 03-306.
  15. Tanabe T., Nishimaki T., Watanabe H., Ajioka Y., Akazawa K., Komukai S., Hatakeyama K.: Immunohistochemically detected micrometastasis in lymph nodes from superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Journ Surg Oncol*. 82(3):153-9, 2003.
  16. Syrjänen S., Cintorino M., Armellini D., Del Vecchio MT, Leoncini P., Bugnoli M., Pallini V., Silvestri S., Tosi P., Mantyjarvi R.: Expression of cytokeratin polypeptides in human papillomavirus (HPV) lesions of the uterine cervix: 1. Relationship to grade of CIN and HPV type. *Int Journ. Gynecol Pathol* 7: 23-38, 1998.
  17. Kuo T.: Cytokeratin profiles of the thymus and thymomas: Histiogenetic correlations and proposal for a hystiological classification of thymomas. *Hystopathol.* 36, 403-413 esophageal carcinoma and squamous epithelial dysplasia. *Hepatogastroent.* 40: 222-225, 2000.
  18. Alia L.: Analisi morfologica, morfometrica, immunohistochemica e di biologia molecolare del Carcinoma con le cellule squamose dell'esofago. Dissertazione corso XI - dottorato di ricerca - Università degli Studi di Siena, 2000.
  19. Lam KY, Loke L, Shen X, Ma LT: Cytokeratin expression in non-neoplastic esophag epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Virchows Arch* 426: 345-349, 1995.
  20. Qubain SW, Natsugoe S., Matsumoto M., Nakashima S., Baba M., Takao S., Aikou T.: Micrometastases in the cervical lymph nodes in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2001; 14 (2) : 143 - 148, 2001.
  21. Brattstrom D., Wagenius G., Dreilich M., Bergstrom S., Goike H., Hesselius P., Bergqvist M.: Newly developed assay measuring cytokeratins 8, 18 and 19 in serum is correlated to survival and tumour volume in patients with oesophageal carcinoma. *Journ Surg Oncology*. abstract No: 15. 120, 2004.
  22. Viaene AI, Baert JH: Expression of cytokeratin mRNAs in normal human esophageal epithelium. *Anat Rec* 241: 88-98, 1995.
  23. Huang Zh, Shen Y., Liang Y., Wu X.: Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: an immunohistochemical study of 8 cases. *Chin Med J*. 114:1084-1088, 2001.
  24. Kralovich KR, Li L., Hembrough TA, Webb DJ, Karns LR, Gonias SL.: Characterization of the binding sites for plasminogen and tissue-type plasminogen activator in CK8 and CK18. *Journ. Protein. Chemyst.* 17: 845 - 854, 1998.
  25. Yang K., Lipkin M.: AE-1 cytokeratin reaction patterns in different differentiation states of Squamous Cell Carcinoma of the esophagus. *Amer. Journ. Clin. Pathol.* 94, 261-269, 1990.
  26. Prasad S., Soldatenko VA, Srinivarsarao G., Dritschilo A.: Intermediat Filament Proteins during Carcinogenesis and apoptosi. *Intern. Journ. Oncol.* 14, 563 - 570, 1999.
  27. Takahashi H., Shikata N., Senzaki H., Shintaku M., Tsubura A.: Immuno-histochemical staining patterns of keratins in normal oesophageal epithelium and carcinoma of the oesophagus. *Histopathology* 26: 45-50, 1995 Jan.
  28. Jens G., Brockmann I, Hubertus St. Nottberg, Bernhard Glodny, Achim Heinecke and Norbert J. Senninger.: CYFRA 21-1 Serum Analysis in Patients with Esophageal Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 4249-4252, November 2000.
  29. Viaene AI, Baert JH: Expression of cytokeratin-mRNAs in squamous-cell carcinoma and balloon-cell formation of human oesophageal epithelium. *Histochem Jour.* 27: 69, 1995.
  30. Wild GA, Mischke D.: Variation and frequency of cytokeratin polypeptide patterns in human squamous non-keratinizing epithelium. *Exp Cell Res* 162: 114-126, 1986.
  31. Yamamoto K., Oka M., Hayashi H., Tangoku A., Gondo T., Suzuki T.: CYFRA 21-1 is a useful marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1; 79 (9): 1647 - 1655, 1997.

32. Komukai S., Nishimaki T., Suzuki T., Kanda T., Kuwabara S., Hatakeyama K.: Significance of immunohistochemical nodal micrometastasis as a prognostic indicator in potentially curable oesophageal carcinoma; British Journal of Surgery. Vol. 89, 2, 213 – 220, 2002.
33. Sato F., Shimada Y., Li Z, Watanabe G., Maeda M., Imamura M.: Lymph node micro-metastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Brit Jour. Surg.. 88(3): 426 – 432, 2001.