

# **ANALIZA KUANTITATIVE E IMAZHEVE DHE BIOLOGJIA MOLEKULARE E KARCINOMËS ME QELIZA SKUAMOZE TË EZOFAGUT, ME REFERENCË PROGRESIONIN NEOPLAZIK DHE IMPLIKIMIN E VIRUSIT TË PAPILLOMËS HUMANE (HPV)**

**LUTFI ALIA\***

## **Summary**

### **QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS AND MOLECULAR BIOLOGY OF OESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA, WITH SPECIAL REFERENCE TO TUMOUR PROGRESSION AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) INVOLVEMENT**

Despite much research effort, the major prognostic factor of ESCC remains the pathological stage of the disease as defined by the TNM classification, whereas tumour grading is of limited value in this respect, mainly due to its low reproducibility. A better means for disease prognostication based on improved understanding of the pathogenetic mechanisms is urgently required.

*Materials and methods:* The material of the present study was derived from a series of 1876 oesophageal surgical specimens taken from a total of 700 patients, who underwent oesophageal resection for an invasive ESCC in Anyang Tumour Hospital, Henan Province of China. Among the cohort of 700 cases of ESCC, previously subjected to extensive testing for Human Papillomavirus (HPV) involvement and expression of p53 gene. All cases are analysed by histopathology and by in situ hybridisation (ISH) and PCR, immunohistochemistry, and a group of 272 patients was randomly selected for analysis of the primary tumour, adjacent mucosa and regional lymph nodes, in the quantitative image analysis. All these cases were subjected to extensive univariate and multivariate analysis to disclose independent predictors of progressive disease.

*Results:* For the analysis, the ESCCs were graded into three degrees: well, moderately and poorly differentiated. For morphological evidence of HPV – suggested lesions have been used the criteria described previously by Syrjänen. HPV-DNA was detected in 201 cases (33,5%) of the analysed cases, from which 133 cases by ISH and in 68 cases by PCR. Using the quantitative image analyses, the diploid ESCC was detected in 19,1% of ESCC, and aneuploid ESCC was detected in 80,9% of cases. In univariate analysis, lymph node status (considered as the surrogate marker of progressive disease) was significantly ( $p < 0.01$ ) predicted by the following nuclear parameters: nuclear area, Go-G1 ratio, HPV-DNA status, integrated optical density, mean optical density and cells S-phase. In multi-variate analysis, 6 variables remained as independent predictors of disease progression ( $p < 0.05$ ), the three most significant ones being nuclear perimeter, nuclear roundness and equivalent diameter ( $p < 0.01$ ).

*Conclusion:* A series of quantitatively measured nuclear parameters seem to bear a close correlation with ESCC differentiation and progression in univariate analysis and some of these variables proved to be significant independent predictors of disease progression in multivariate modelling as well. These data clearly advocate the use of quantitative image analysis in searching for additional prognostic factors of ESCC. Study in the immunohistochemistry, and in the molecular biology, have confirmed HPV involvement in the morphopathogenesis of KQSE.

---

\* Dërguar në redaksi në Janar 2007 miratuar në Shtator 2007.

Nga Instituti i Kirurgjisë, Universiteti i Sienës - Itali.  
Adresa për letërkëmbim: Alia L. Institui i Kirurgjisë,  
Universiteti i Sienës - Itali.

KQSE është ndër neoplazitë më të shpeshta, madje përfaqëson një primat aspak të dëshirueshëm, pasi përbën mbi 90% të të gjithë neoplazive të këtij organi dhe është një ndër neoplazitë me frekuencë të lartë në botë, me variacione në shpërndarje e në prevalencë në zona të ndryshme gjeografike (1,2,3). Incidenca dhe vdekshmëria nga KSE janë më të larta në Kinë, Iran, Afganistan, Afrika e Jugut, Kosta Rika etj, ndërsa në Europë rastiset rrallë (3). Në Provincën e Henan (Kina), rastisja e lartë e KQSE shoqërohet dhe me indeks të lartë vdekshmërie 22.34% të vdekjeve të përgjithëshme nga neoplazitë, e renditur në vendin e dytë pas karcinomës së stomakut (23.03%). Në kontean e Linxian, zona me rrezik të lartë për KQSE, kjo neoplazi rastiset 108,5 raste për 100.000 banorë, me vdekshmëri 99,7 raste për 100 000 banorë (2,3,4,5). Studimet epidemiologjike të kryera në popullatën e zonës së Linxian, kanë verifikuar ndërhyrjen e një mori faktorësh ambiental, që shoqërojnë malinjitetin e kësaj neoplazie, ndër të cilët rol të posaçëm ka HPV (3).

Në aspektin morfoklinik, KQSE nuk përfaqëson një entitet unik, por krijon forma neoplazie me agresivitet të ndryshëm, të cilat pavarësisht nga përkatësia e të njëjtit histotip, dallohen ndërmjet tyre nga diferencat në sjelljen kliniko-biologjike e në ndjeshmërinë ndaj mjekimit (1,2,5). Ky kompleksitet i KQSE ka nxitur studimin e një mori faktorësh, që bashkërendohen në ecurinë morfoklinike të kësaj sëmundjeje si ploïdia, marker-et e proliferimit qelizor, marker-et e ciklit qelizor (6), onkogenet, genet supresore të tumoreve (7), faktorët e rritjes, molekulat e adezionit (3), faktorët imunologjik (2), modeli i invazionit neoplazik (8), ndërveprimi tumor-matriks (9), metastazat limfonodale (10), tumor-stage (2), vlerësimi i parametrave histopatologjik (11), indeksi mitotik (6) dhe faktorët biologjik (12). Nga shumë studime rezulton se faktori prognostik më i rëndësishëm i KQSE mbetet stadi patologjik i përkufizuar sipas klasifikimit TNM (1,2), ndërsa grada histologjike ka vlera të kufizuara, për arsye se është metodë me riprodhueshmeri të dobët (2).

Studime të shumta sot kanë konfirmuar se, analiza kuantitative e imazheve (AKI) në citometrinë statike (CS) të neoplazive, ka kontribuar të shmangët subjektiviteti i histopatologjisë dhe i citologjisë tradicionale në përcaktimin e fenotipit neoplazik dhe të

kapërcehen kufizimet e morfologjisë klasike në vlerësimin e shkallës së agresivitetit të KQSE dhe të prognozës të sëmurëve (11). Me teknikën e AKI mund të identifikohen ato parametra morfometrik, që shprehin diversitetin që karakterizon KQSE (12). Me këtë teknikë morfometrike analizohen tre aspekte të popullatës qelizore neoplazike: aktiviteti proliferativ, sidomos alikuota e qelizave sipas fazave të ciklit qelizor; vlerat e DNA ploïdisë dhe parametrat morfo-nukleare të qelizave neoplazike (2,3,5,6,10). AKI-CS është bërë lehtësisht praktikë e me përdorim rutinë në studimin e karakteristikave biologjike të neoplazive, në veçanti të ploïdisë, duke u prezantuar një teknikë e standardizuar e potenciale, e besueshme e riprodhuese për diagnozën dhe përcaktimin e prognozës së KQSE (2,5).

Studimi i përmbytjes së DNA-s nukleare është bërë një ndër parametrat sinjifikativ për vlerësimin e karakteristikave të rritjes e të sjelljes biologjike të neoplazive, duke u bërë një "target" parësor i AKI dhe një ndër parametrat biologjik më të studiuar (2,6). Shumë studime kanë treguar se mbi 70% e KQSE janë aneuploide e poliploide. Aneuploidia është në korrelacione me stadin e avancuar të neoplazisë, me invazionin, me metastazat, me gradën e ulët të diferencimit histologjik dhe me potencial për recidiva pas rezeksionit të neoplazisë (5). Aktiviteti proliferativ është i lartë kur përmban numër të madh qelizash në fazën S, çka dëshmon natyrën agresive të neoplazisë (6). Për sa i përket parametrave morfonukleare, njihet fakti se ekziston një ndërvlerë reciproke ndërmjet modifikimeve morfologjike të bërthamës qelizore dhe agresivitetit biologjik të neoplazisë, kësaj studimi i tyre merr rëndësi praktike në vlerësimin e ecurisë dhe të prognozës (1,2,5). DNA aneuploidia, e shoqëruar me index DNA të lartë, shpreh agresivitetin e neoplazisë dhe prognozë të keqe të pacientit, në krahasim me KSE me DNA dipoidi (2,3). Këto të dhëna sugjerojnë se DNA aneuploidia është një marker i prognozës së keqe të sëmurit (5,9,10).

Një ndër problemet në studimet morfologjike të KQSE, mbetet njohja e mekanizmave të transformimit malinj të qelizave të epitelit ezofageal dhe progresimi i neoplazisë. Janë vrojtuar një mori fenomenesh molekulare që ndërhyjnë në proceset e kancerogjenezës siç janë mbishprehja ose shtypja e faktorëve të

rritjes, ndërhyrja e onkogeneve c-myc, ciklina D, PCNA, c-erb-B2, hist-1, int-2; inaktivizimi i geneve supresore p53, Rb, APC, MCC etj (2,3,4).

Ndër mekanizmat molekular të implikuar në kancerogenezën e epitelit të ezofagut, është dhe bashkëshoqërimi i infeksionit të HPV me mutacionet e genit p53 supresor.

Studime të shumta kanë konfirmuar se prania e një karcinogeni egzogen bëhet nxitësi "filleshtar" i transformimit neoplazik të epitelit ezofageal e më pas, gjendja e ndryshuar kompletohet nga ndërhyrja e një virusi onkogjen, si psh i HPV, që implikohet në mekanizmat etiopatogjenetike të KQSE. Roli i HPV në neoplazitë e ezofagut u vrojtua për herë të parë nga K. Syrjänen (1982) (4), i cili konstatoj në 40% të sëmurëve kishin dëmtime sugjestive për HPV, të njëjta me ato që shihen në condilomen gjenitale, e mirënjohur si patologji e shkaktuar nga HPV (4,7).

Studimet e KQSE me hibridacionin in situ (HIS) dhe me PCR, mundësuan të identifikohet pozitiviteti i lartë i DNA-HPV dhe i DNA-p53 në epitelin neoplazik, në epitelin joneoplazik fqinj (ENN) dhe në limfonodujt me metastaza, çka sugjerojnë se HPV dhe mbishprehja e p53 mutante janë ngjarje inkluzive në onkogenezën e KQSE, ku mendohet se vepron në mënyrë sinergjike me faktor të tjerë rrezikues (2,7,8,9). Në një studim të kombinuar të HIS me PCR të kryer në popullatën e Linxian-Kina, DNA-HPV ka rezultuar pozitive në 50% të rasteve me displazi të lehtë, në 80% të rasteve me displazi të moderuar, në 67,9% në ato me displazi të rëndë e në 66,7% në pacienta me KQSE (7). Rezultate të ngjashme komunikojnë dhe autorë të tjerë, që kanë studiuar KSE me të njëjtat teknika molekulare në popullatat e zonave me rrezik të lartë për këtë neoplazi si në Afrikën e Jugut, Alaska, Iran, Afganistan, Japoni, Tajlandë, Kili etj (7,9) si dhe në vendet perendimore, ku kjo neoplazi ka incidencë të ulët, si në Itali, Francë, Gjermani, USA (2).

Infeksioni me HPV i ezofagut bashkëshoqërohet dhe me veprimin sinergjik të faktorëve të tjerë rrezikues ambiental si nitrosaminat, mikotoksinat, aflatoksinat, lëndët kimike kancerogjene, deficietet nutricionale, përfshi konsumin abuziv të pijeve alkolike sidomos të atyre me ngjyra dhe të duhanit (4,7). Dihet se epiteli i ezofagut është tepër i ekspozuar nga ndikimi i faktorëve të jashtëm kancerogjen dhe muatgen, ndër të cilët përfshihet dhe HPV,

që shkakton mutacione të proteinës p53. Forma normale e p53 kontrollon ciklin qelizor, rregullon tranzicionin nga faza G1 në fazën S, ku funksionon si "checkpoint kontroll" për DNA e dëmtuar, kontrollon qelizën që ndodhet nën stress, riparon DNA, mban plasticitetin e genomës e kur dëmtimi është i rëndë, përcakton kalimin e qelizës në apoptozë, ndërsa kur apoptoza dështon, atëherë nxit proliferimin e shfrenuar neoplazik (7). Studime të shumta kanë provuar se p53 me mutacion missense grumbullohet në nukleusin qelizor ku vepron si onkogen dominant (9,11). Mendohet se onkoproteina E6 e HPV të tipeve 16 e 18,33 duke u lidhur me p53 shkakton mutacionin e saj. Me këtë mekanizëm shpjegohet fakti përse HPV16 e HPV 18 ndeshen shpesh në indet neoplazike për çka janë emërtuar dhe tipat me rrezik të lartë për KQSE, ndërsa HPV të tipeve 6 e 11 zakonisht shoqërojnë kondilomat benignje. Kjo diferencë në potencialin kancerogjen ndërmjet tipave të HPV me rrezik të vogël dhe HPV me rrezik të lartë për të kryer konversionin malinj final, mendohet se lidhet me grada të ndryshme ndërvarësie të HPV me faktorët sinergjik endogjen e ekzogjen (2,4,11). Progresimi malinj i lezioneve benignje të krijuara nga grupi i HPV me rrezik të vogël, mendohet se varet nga bashkëveprimi i tyre me kancerogenet ekzogjene, ndërsa lezionet e shkaktuara nga HPV me rrezik të lartë, progresojnë me ndërhyrjen e virusit, që zotëron aftësi të gjenerojë ngjarje endogjene siç është mutacioni i p53 (4,11).

#### Materiali dhe metodat

Materiali i studiuar përbëhet nga 1876 kampione biopsie të ezofagut, që i përkasin 700 të sëmurëve, të shtruar në Spitalin e Tumoreve në Anyang të provincës Henan në Kinë, ku i janë nënshtruar ezofagotomisë për KQSE invazive. Të gjithë të sëmurët janë banorë nga kontea Lixian, e evidencuar si zona me rrezik të lartë për KQSE.

**Histopatologjia:** 1876 kampionet indore të marra nga neoplazia, nga indi joneoplazik fqinj, nga limfonodujt rajonal me dhe pa metastaza, u fiksuan në formalinë 10%, u derdhën në parafinë, e për çdo rast u morën prerje të shumta me trashësi 3-5 im. Seksionet e ngjyrosura me haematoxylin-eosin, u ekzaminuan për diagnozën e histotipit të karcinomës, vlerësimin e gradës së neoplazisë (sipas kriterëve standarte) (4,12,13);

identifikimin e lezioneve sugjестive për HPV (sipas kritereve Syrjänen) (4); studimin e lezioneve në indin fqinj joneoplazik (ENN) dhe të limfonodujve rajonal me prani ose mungesë të metastazave.

**Analiza kuantitative e imazheve në citometrine statike:** Në 272 raste (38,9%) u realizua AKI-CS, për matjen e DNA ploidisë, të kuotës qelizore në fazën S të ciklit qelizor e të parametrave morfonukleare. Për çdo rast u seleksionua një kampion biptik që përmbante së paku 90% ind neoplazik dhe morfologjikisht të konservuar mirë, nga të cilët u prënë seksione indore, me trashësi 6  $\mu$ m, që u ngjyrosën me teknikën e Feulgen.

Për analizën morfometrike u përdor mikroskopi optik me inkorporim të telekameras me ngjyra CCD (JVC-Japan), e cila u lidh me sistemin e kompiuterit LEICA Q 500 - IMAGE ANALYSIS SYSTEM - England, i paisur me Qwin's software, specifik për analiza imazhesh, të cilat nga analoge shndërrohen në analizator në imazhe digjitale me rezolucion 512 x 512 pixel, në 256 nivele të ndryshme grije. AKI-CS u realizua sipas kritereve të rekomanduar nga "Consensus Report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on Standardization of Diagnosis DNA Cytometry" (13).

Për çdo fushë mikroskopike janë matur mesatarisht 450 bërthama, që u analizuan në mënyrë automatike nga sistemi i programuar, me përjashtim të fazave interaktive gjatë të cilave përjashtuam nga matjet bërthamat e papërshtatëshme (të deformuara, të ngjyrosura keq), bërthamat e mbivendosura dhe artefaktet. Kontrolli i linearitetit të densitetit optik integral (IOD) (2c, 4c, 8c) u krye duke shfrytëzuar limfocitet e seksionit indor. Koeficienti i variacionit (CV) për çdo matje është llogaritur në bazë të formulës:  $CV = SD / \text{mean} \times 100$  (SD-shmangia standarte). Vlera mesatare e kanalit të pikut G0-G1 për nukeuset neoplazike është vlerësuar 24, ndërsa i limfocitit 20.80, index i DNA = 1,14. Teknika e AKI në CS na ndihmoi të vlerësojmë këto parametra kuantitative:

A) *parametrat densitometrike*: janë matur densiteti optik mesatar (MOD), densiteti optik i integruar (IOD) dhe variacioni i grisë. Në bazë të vlerave të matjeve të IOD e me ndihmën e sistemit ModFit-Cell-Cycle Analysis, janë ndërtuar dhe analizuar kurbat polinomiale dhe histogramat për secilin seksion në veçanti dhe së fundi për çdo rast.

Janë konsideruar DNA diploide histogramat me një pikë me 10% qeliza në fazën G0-G1 në rajonin diploid 2c, që i përgjigjet bërthamave me index të DNA 1.00 - 1.15, me SD = 1.00 +/- 0.15. Janë konsideruar DNA aneuploide, histogramat me dy pikë anormale, me mbi 10% qeliza jashtë rajonit diploid (intervali 2c - 4c), ndërsa piku tetraploid u përkufizua me qelizat në G2-M (4N) > 15%, që korespondojnë me ID = 1.85 - 2.15, me SD = 1.85 +/- 0.30.

B) *Parametrat morfometrik*: tenika e AKI në CS na lejoj të maten këto parametra: area nukleare, aspect ratio, gjerësia, area konvekse, perimetri konveks, kurba gjatë, kurba e ngushtë, diametri ekuivalent, grey variancë, gjatësia, perimetri, rumbullaksia.

C) *Alikuota e fraksioneve qelizore*: u llogaritën në bazë të përqindjes të bërthamave në fazën G0-G1, në fazën G2-M dhe në fazën S, që përmban vlerat ndërmjetëse të dy fazave të tjera. Histograma e DNA u ndërtua nga tre komponentë që i korespondojnë fazave të ciklit qelizor, të cilat me ndihmën e sistemit software u diferencuan në vlera përqindjeje të ndryshme për çdo njërin nga grupet qelizore. Faza S është llogaritur si diferenca ndërmjet dy pikëve gaussiane që i përkojnë fazave G0-G1 e G2-M, e kësaj mbetja rezultante, që përfaqëson fraksionin e qelizave në fazën S, është shprehur në trajtën e kurbes polinomiale.

**Studimet kualitative të KQSE**: u bazuan në studimin me biologji molekulare të 600 raste biopsie me KQSE, që i përkasin të njëjtit numër pacientësh dhe me imunohistokimi të 36 raste biopsie me KQSE të derdhura në parafinë.

*Biologjia molekulare*. Prania e HPV-DNA u individualizua në dy grupe materiale:

- 117 raste kampione nga biopsi të freskëta të ruajtura me ngrirje -70°C dhe në

- 483 raste kampione biopsie endoskopike dhe prelieve të marra nga masa neoplazike pas ezofagotomisë dhe të derdhura në parafinë.

Kampionet e freskëta të KQSE përfaqësojnë tre grupe materiale:

- 70 raste janë biopsi endoskopike të ezofagut (ECA1-ECA70), që i përkasin pacientëve me moshë nga 22-72 vjeç, me mediana 53,9 vjeç, nga të cilët 45 janë meshkuj dhe 25 femra.

- 23 raste janë prelieve nga masa neoplazike pas ezofagektomisë (E1-E23), që i përkasin pacientëve me moshë 42-71 vjeç, me mediana 57,8 vjeç, nga të cilët 12 meshkuj dhe 11 femra.

- 24 raste janë materiale citologjike (C1-C24) të marra në pacienta të cilët më parë i janë nënshtruar biopsisë dhe janë diagnostikuar me prani të KSE invazive. Këta të sëmurë i përkasin moshave në kufijt 28-72 vjeç, me mediana 55,6 vjeç, nga të cilët 16 janë meshkuj e 8 raste femra.

Të dy grupet me KQSE, materialet e freskët dhe biopsitë e derdhura në parafinë u studiuan me teknikat e më poshtme të biologjisë molekulare:

\* *Skreening i HPV me hibridacionin in situ.* Për të zbuluar praninë e HPV-DNA në indin neoplazik, gjithë biopsitë iu nënshtruan kërkimeve me HIS - biotin - labelled HPV cocktails probes. Seksionet e derdhura në parafinë, pas çparafinimit me ksilol me dy kalime nga 5', në vazhdim iu nënshtruan procedurave standarde: seksionet u inkubuan në proteinaze K (0,5 mgr/ml) e PBS, në 37°C për 15'; u shpërlanë në PBS për 3'e u inkubuan në 37°C për tërë natën në përzierje hibridizimi që përmbante sondat e HPV dhe biotinë. Pas hibridizimit, seksionet u shpërlanë 2 herë me sodium chloride, sodium citrat-bufer, në 37°C e më tej u inkubuan për 29' (37°C) në streptavidin fosfatase alkaline (e holluar 1 : 300). Më pas u shpërlanë në salinë tris-bufer për 3 herë nga 3'. Sinjali i hibridizimit u zhvillua me tetrazolium nitroblu (NBT) e brom-klor-hidroksil fosfat në 37°C për 2h. Për të kontrolluar pozitivitetin u përdor linja qelizore e infiltuar me HPV (CaSKi).

\* *HIS për të specifikuar tipin e HPV.* Të gjitha kampionet që rezultuan HPV-DNA pozitive në HIS screeni ng, u analizuan në veçanti për të identifikuar tipin e virusit. Teknika e analizës është e njëjta: HIS me përdorim biotin - labelled HPV cocktails probes, por me veçori se u përdorën genomic HPV probes specifike për tipat e HPV 6,11,16,18,30,33, të cilat u biotinuan me nick-translation duke përdorur një kit komercial BRL (Geitensburg, USA) në koncentrim 1 mgr/ml të cocktails hibridizimit.

\* *Identifikimi i tipit të HPV-DNA me PCR.* DNA-ja genomike e purifikuar u amplifikua në PCR për HPV 16 dhe HPV 18.

Prania e DNA-HPV në biopsitë u analizua me PCR, duke përdorur MY09/ MY11 L1 me kompletin e oligodeoxynukleotide primers: 5'-CGTVCC(A/C)A(A/G)(A/G)GGA (A/T)ACTGATC-3' dhe 5'-GC(A/C)CAGGG(A/T)CATAA(CT)AATGG-3'(35,44).

Të gjitha rastet fillimisht u testuan me â-globin gene specifik primers 5'-

ACACMCTGTGTTCACTAGC-3' dhe 5'-CAACTTCATCCACGTTCAACC-3', të amplifikuar me 100bp të regjioneve të genit â-globin. Sekuencat specifike të HPV-DNA të amplifikuara në PCR më pas u konfirmuan në Southern Blot Hybridization me P-labelled me HPV 6,11,16 dhe 18 DNA probes.

\* *Identifikimi i sekuencave të DNA-p53 mutante.* Verifikimi i pranisë të DNA-p53 mutante në KQSE u realizua në teknikën e PCR-SCP (Single Strand Conformation Polimorphism), ku u analizuan 120 kampionet, të cilët gjatë screening rezultuan pozitive me p53 mutante. Kampionet e biopsive endoskopike dhe materialet citologjike të mbledhura me teknikën e ballonit nga masa neoplazike në ezofag, që përmbanin sasi të mjaftueshme DNA, iu nënshtruan analizës në PCR të amplifikuar. Njëkohësisht sekuencat e DNA-p53 u ekzaminuan për të verifikuar segmentin e eksonit ku ka ndodhur mutacioni dhe tipi i aminoacidit që është ndërruar.

*Imunohistokimia (IHK).* Mbishprehja e p53 mutante në KSE të derdhur në parafinë, u studiu në IHK me metodën Biotin-Streptavidina e Amplifikuar (BSA), duke përdorur antitrupe anti p53 (CM-1) (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK). Studimi imunohistokimik u realizua në 36 raste biopsie me KQSE të derdhura në parafinë. Fillimisht, seksionet u çparafinizuan me ksilol dhe u rihidratuan në kalime në seri zbritëse në alkool. Për bllokimin e peroksidazës endogjene, seksionet u zhytën në peroksid hidrogjeni 5% për 5', ndërsa lidhjet jospesifike u bllokuan duke i zhytur seksionet në serum normal 1,5% për 15'. Pas kësaj periudhe përgatitore, seksionet u inkubuan për tërë natën në 4°C me antitrupe anti p53 (CM-1) të holluar në raport 1:1000. Pasi u shpërlanë në PBS (pH 7,2), seksionet u kaluan në inkubacionin e dytë për biokonjugimin me antitrupe anti rabbit (Vector-Burlingham CA) të holluar në raport 1:200 e më pas seksionet u lanë në temperaturë mjedisi për 30' në. Së fundi, pas rishpëlarjes me PBS, seksionet indore u inkubuan në kompleksin peroksidaze-avidin-biotin (ABC, Vectastain Elite kit, Vector CA) për 40'. Prodhimet e imunoreaksionit u vizualizuan me zhytje të seksioneve në Diaminobenzidina Tetrakloride dhe u kundërngjyrosën lehtësisht me hematoksilinë.

*Analiza statistikore:* u realizua me SPSS - program kompiuter, version 6,1.

- Analiza univariate. Për interpretimin statistikor u përdorën testi Chi-kuadrat, testi ekzakt i Fisher, Pearson's R, Spearman korrelacion, që ndihmuan në vlerësimin e sinjifikancës në korrelimin midis variabileve individuale. Me që shpërndarja e disa variabileve nuk ishte normale (testi Kolmogorov-Smirnov dhe testi Lilliefors), përdorëm testet e përpunimit joparametrik të Kruskal-Wallis One-Way Anova-Analysis Variance (për diferencat e mesatareve të variabileve morfometrike në grupet me metastaza e pa metastaza në limfonoduj dhe me prani lezionesh sugjестive për HPV e pa lezione për HPV); Mann-Witney U test (korrelacioni ndërmjet vlerave kuantitative morfonukleare, statusi i limfonodujve, statusi i HPV dhe gradës së neoplazisë); Wilcoxon Rank-W test dhe Chi-quadrate (për sinjifikancën e korrelacionit ndërmjet variabileve individuale në analizën univariate).

- Analiza multivariate. U përdor për të analizuar vlerat prognostike të variabileve. Të gjitha variabilet me vlera sinjifikative në analizën univariate, janë përfshirë në analizën e regresionit multipel logjistik të modelit LR (Likelihood Ratio). Diferencat ndërmjet grupeve të analizuar e të ballafaquara janë konsideruar statistikisht sinjifikative në vlerat e koeficientit  $p = /< 0,05$ .

### Rezultatet

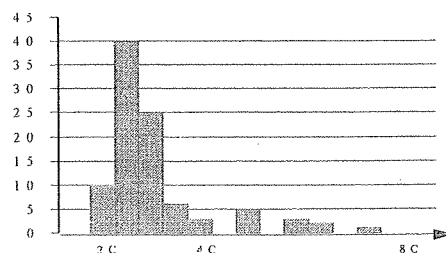
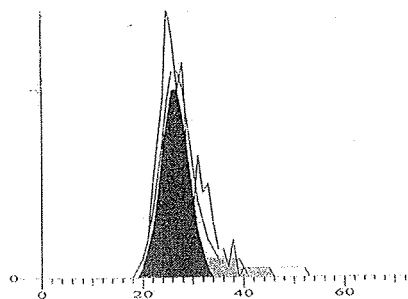
Rezultatet e materialit të studiuar, përfaqësojnë informacionin e përpunuar gjatë AKI-CS dhe në biologjinë molekulare, por për të kompletuar fizionominë komplekse të kësaj neoplazie, janë prezantuar e diskutuar dhe disa aspekte të përgjithëshme morfologjike e klinike të lidhura me problematikën e ndërlikuar që përmban KQSE, sidomos në aspektin e progresionit neoplazik.

Rezultatet e studimit histopatologjik: Sipas gradës së diferencimit histologjik rastet tona i kemi vlerësuar: KQSE të diferencuar mirë 198

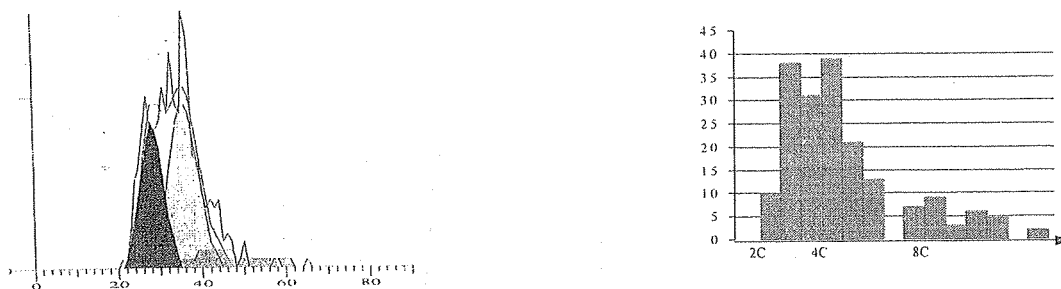
raste (28,3%), me diferencim të moderuar 355 raste (50,7%), të padiferencuara 147 raste (21%). Histotipat e diferencuar mirë dhe ato me diferencim të moderuar, për mungesë të diferencave sinjifikative janë analizuar si grup i përbashkët në ballafaqim me histotipat e padiferencuar. Nga ekzaminimi i limfonodujve rajonal rezultoj: me prani të metastazave 145 raste (46,5%), me mungesë të metastazave 157 raste (53,5%), ndër 312 raste që përmbanin limfonoduj. Në 183/700 raste (26,14%), në ekzaminimin histopatologjik të epitelit jo-neoplazik fqinj me masën parësore, u verifikua prania e lezioneve të displazisë, e vlerësuar e formës së lehtë në 21 raste (12,5%), e moderuar në 31 raste (18,5%) dhe e formës së rëndë në 69 raste (41%). Nga ekzaminimi histopatologjik i 500 biopsive, në 168 raste (33,6%) gjetëm lezione sugjестive për HPV në masën neoplazike, të shprehura: me lezione papillare 69 raste, me lezione të sheshta 16 raste, me lezione endofitike 83 raste. Njëkohësisht prania e lezioneve sugjестive për HPV u kërkuar dhe në ENN, nga rezultoj: me lezione papillare 5 raste dhe me lezione të sheshta 38 raste.

Rezultatet në analizën kuantitative të imazheve: AKI-CS u realizua në 272 raste biopsie (38,9%), që i përkasin të njëjtit numër pacientësh nga kontea Linxian e Kinës, nga të cilët 179 janë meshkuj (65,50%) dhe 93 femra (34,50%), me mosha në kufijt ndërmjet 36-72 vjeç, me mesatare 54,8 vjeç. Nga analiza e imazheve, në bazë të kurbave polinomiale, për çdo seksion u ndërtuan histogramat e KQSE, të cilat rezultuan në 52 raste DNA diploide (19,05%) (figura nr.1) dhe 221 raste me DNA aneuploide (80,95%) (figura nr.2), me koeficient variacioni 7,80 (SD  $\pm 3,30$ ), me index DNA=1,25 (SD  $\pm 0,80$ ). Fraksioni i qelizave në fazën S të ciklit qelizor, si në KQSE diploide dhe aneuploide rezultoj 32,4% (SD  $\pm 18,3$ ), fraksionet qelizore në fazën G2 - M janë 2,12%, ndërsa në fazën G0-G1 rezultuan 66,07% (shih tabela nr.1).

Figura nr.1 Kurba polinomiale dhe histograma e DNA diploide



**Figura nr.2 Kurba polinomiale dhe histograma e DNA aneuploide**



**Tabela nr.1 Vlerat e indeksit të DNA dhe të kuotave qelizore sipas fazave të ciklit qelizor**

Parametrat	Nr. rasteve	Mesatarja	Mediana	SD
Indeksi i DNA	272	1, 247	1, 210	0,8
G0-G1	272	66, 068	67, 010	20, 265
G2-M	272	2, 122	1, 370	2, 466
Qeliza Faza S	272	32, 386	31, 160	18, 237

**Tabela nr.2 Përshkrimi statistikor i vlerave të parametrave densitometrik në AKI-CS**

Parametrat	Nr. rasteve	Mesatarja	Mediana	SD
Ndryshueshmëria gri	272	0, 014	0, 014	0, 04
IOD	272	111718, 905	110365, 000	20292, 141
MOD	272	0, 615	0, 609	0, 088

**Tabela Nr.3 Përshkrimi statistikor i vlerave të parametrave morfonukleare në AKI-CS**

Parametrat	Nr. rasteve	Mesatarja	Mediana	SD
Area	272	48010, 000	47148, 000	6123, 433
Aspekti ratio	272	1468, 703	1454, 000	124, 508
Gjerësia	272	6618, 956	6571, 000	489, 101
Area konvekse	272	53150, 447	51908, 000	7244, 374
Perimetri konveks	272	25934, 817	25723, 000	1740, 177
Kurba e gjatë	272	26765, 000	26765, 000	681, 836
Kurba e ngushtë	272	6533, 721	6550, 000	673, 416
Diametri ekuivalent	272	7747, 381	7689, 000	470, 829
Ratio i plotë	132	0, 950	0, 952	0, 017
Gjatësia	272	9585, 756	9484, 000	743, 680
Perimetri	272	27401, 465	27164, 000	1787, 721
Rrumbullaksia	272	1191, 956	1189, 000	49, 704



Nga analiza univariate e vlerave që morëm nga matjet në AKI-CS rezulton se disa tregues si area nukleare, statusi DNA-HPV, ratio G0 - G1, IOD, MOD dhe fraksioni i qelizave në fazën S, janë parametra sinjifikative ( $p < 0,001$ ) të ballafaquar me limofondujt me metastaza dhe me gradën e tumorit, ndërsa janë në kufijt e sinjifikancës ( $p < 0,05$ ) parametrat e tjerë si DNA-index, G2-M, gjatësia nukleare, perimetri, rrumbullaksia e bërthamës. Në veçanti, grada e diferencimit histologjik e KQSE e analizuar në raport me ndryshimet sugjестive për HPV, paraqitet me sinjifikancë të lartë ( $p < 0,000001$ ) dhe në mënyrë sinjifikative me MOD ( $p < 0,01$ ), full ratio, me rrumbullaksin nukleare dhe statusin e limfonodujve me metastaza. Nga 27 parametra që analizuar me citometrinë statistike, 15 nga variabilet nukleare shprehin sinjifikancë të lartë e të moderuar me gradën histolo-gjike të KQSE.

**Rezultatet e studimit në biologjinë molekulare:** Nga analiza me teknikat HIS dhe me PCR të amplifikuar të materialeve të freskët të ngrira në mjedis  $-70^{\circ}\text{C}$ , kërkimet për HPV-DNA rezultuan pozitive në 20 raste (17,1%) ndër 117 kampione me KQSE. Analiza me HIS e 483 kampionëve biotipike me KQSE të derdhur në parafinë, HPV-DNA rezultoj pozitive në 113 raste (23,4%), ndërsa me PCR të amplifikuar, HPV-DNA rezultoj pozitive dhe në 68 raste të tjera (15,6%) ndërmjet 422 biopsi që iu nënshtruan analizës me këtë teknikë. Duke vlerësuar pozitivitetin e HPV-DNA në rastet me KQSE që kemi marrë në të dy grupet dhe me të dyja

teknikat së bashku (HIS dhe PCR), rezultojnë 201 raste (33,5%) pozitive me DNA-HPV. Të gjitha rastet e KQSE që në ekzaminimet në HIS e PCR rezultuan pozitive për HPV-DNA, i rianalizuar me HIS për të specifikuar tipin e HPV të pranishëm në indin neoplazik, nga u identifikuan tipa të ndryshëm HPV, ndër të cilët më të shpeshtit e sipas klasifikimit në grupe të viruseve janë tipat mukozal (HPV16, HPV18, HPV33, HPV6); tipi kutan HPV20 u identifikua në 6 raste të materialit citologjik, ndërsa HPV putative, që përbëjnë grupin me konsistent të viruseve të identifikuar në materialin tonë, janë tipat DL231, HPV 250, HPV DL332, HPV GA 1-3, HPV DL347, HPV 369.

Identifikimi i sekuencave të DNA-p53 mutante në KQSE u krye me teknikën e PCR-SSCP, në 120 kampione që gjatë screening rezultuan pozitive për p53 mutante. Materiali përbëhet nga 70 kampione (58,3%) të përfaqësuar nga 46 biopsi endoskopike dhe 24 materiale citologjike, të cilët përmbanin sasi të mjaftueshme DNA, për t'u analizuar në PCR të amplifikuar. Me teknikën e PCR-SSCP, prania e p53 mutante u identifikua në 19 raste (41,3%) ndër 46 biopsi me KQSE, ndërsa në 24 materialet citologjike (100%) të mbledhur nga pacienta me KQSE, rezultoj mbishprehje e p53 wild-typ. Nga analiza e sekuencave të DNA-p53 mutante që u ekzaminuan për të identifikuar eksonin ku ka ndodhur mutacioni dhe tipi i aminoacideve të këmbyer u morën këto rezultate:

Nr. i kampioneve	Eksoni i p53.	Lokaliz. Ac.Nukleik	Tipi i bazës së ndryshuar
9	7	1344	G ..... A
18	7	1320	T ..... A
18	5	1016	delecion
18	5	1072	delecion
44	7	1377	C ..... A
44	7	1383	A ..... G
44	7	1384	A ..... G
46	7	1357	delecion
69	7	1383	A ..... T
T1	5	1016	delecion
T1	5	1072	delecion



T6	7	1299	C ..... G
T6	7	1300	C ..... T
T10	7	1352	C ..... T
T20	7	1352	C ..... T

Siç shihet nga rezultatet e sistemuara në tabelën e mësipërme, spektri i mutacioneve të p53 në KQSE, është më shpesh i formës missense (pa kuptim) e më rrallë (vetëm 5 raste) i formës së delecionit të genit.

**Rezultatet e studimit imunohistokimik:** Shprehja e p53 mutante u analizuan me IHK në 36 raste biopsie KQSE të derdhura në parafinë, nga rezultatet se antitropat anti p53 janë imunoreaktivite në 20 raste (55,6%), që sipas gradës të diferencimit histologjik të neoplazisë paraqiten: në 15 raste me KQSE të diferencuara mirë, shprehja e p53 mutante ishte pozitive në 9 raste; në 16 raste me KQSE të diferencuara në mënyrë të moderuar rezultuan pozitive 7 raste dhe nga 5 raste me KQSE të padiferencuara, rezultoj pozitiv në 4 raste. Gjithashtu, u studiua shprehja e antitropave anti p53 në limfonodujt rajonal ku rezultoj pozitivitet në 4 kampione nga 9 raste me prani metastaze. Antitropat anti p53, në 5 raste shprehin imunongjyrim pozitiv dhe në ENN fqinj me masën parësore, ku konstatuam në 1 në 5 raste me hiperplazi të epitelit të ezofagut, në 2 raste ndër 10 me displazi dhe 2 raste nga 3 me karcinoma in situ që bashkëshoqërojnë KQSE.

### Diskutimi

Ky studim multiparametrik na ka ndihmuar të ndriçojmë disa aspekte thelbësore të lidhura me problematikën komplekse etiopatogjenetike, diagnostike dhe prognostike që përmban KQSE. Në aspektin morfoklinik, KQSE nuk përfaqëson një entitet unik, por krijon forma neoplazie me agresivitet të ndryshëm biologjik dhe pavarësisht se janë me përkatësi nga i njëjti histotip, dallohen ndërmjet tyre nga diferencat në sjelljen kliniko-biologjike e në ndjeshmërinë ndaj mjekimit (1,2,3, 4,14,15). Studimi i KQSE me AKI-CS, ka shmangur subjektivitetin e histopatologjisë e citologjisë tradicionale në përcaktimin e fenotipit neoplazik e ka ndihmuar të kapërcehen kufizimet e morfologjisë klasike në vlerësimin e shkallës së agresivitetit të neoplazisë dhe të prognozës të sëmurëve. Me AKI-CS arritëm të identifikojmë

ato parametra që shprehin këtë diversitet klinikobiologjik të KQSE. Vlen të theksohet se AKI-CS ka përparësit praktike sepse neoplazitë studiohen në materialet biotipe dhe autotipe të derdhura në parafinë.

Studimi në CS i 272 rasteve me KQSE, na lejoj të diskriminojmë anomalitë e DNA ploidisë nga rezultoni se në 221 raste, histogramat janë DNA aneuploide (80,95%) ( $p < 0,01$ ) dhe në 52 raste DNA diploide (19,05%) ( $p < 0,01$ ). Të dhënat tona përkohë plotësisht me ato të referuara nga autorë të tjerë që komunikojnë mbizotërim evident të rasteve të KQSE me DNA aneuploidi ndaj DNA diploide (5,6,12,14,16). Aneuploidia në KQSE shoqërohet dhe me indeks DNA të lartë ( $ID = 1,25$ ), madje të dy këto tregues janë parametra të ndërlidhur që shprehin agresivitetin e neoplazisë dhe prognozë të keqe të sëmurit dhe njëkohësisht shpjegojnë përse të sëmurët me KQSE kanë ecuri më të rëndë e prognozë më të keqe në krahasim me të sëmurët me të njëjtat karcinoma me qeliza skuamozë në inde e në organe të tjera.

Rastet e KQSE me DNA diploide, kanë prognozë më të mirë në krahasim me DNA aneuploidet. Konkluzione të njëjta kanë dhënë dhe autorë të tjerë (2,3,5,10). Shumica e studimeve ka treguar se aneuploidia është në korrelacione me statusin e limfonodujve me metastaza, me stadin e avancuar të neoplazisë, me invazionin në mukozën fqinje dhe në indet periezofageale, me gradën e ulët të diferencimit histologjik dhe me aftësitë për recidiva pas heqjes kirurgjikale të masës parësore (15,16).

Fraksioni i qelizave në fazën S të ciklit qelizor në KQSE, për rastet diploide dhe aneuploide së bashku, rezultoj 32,4%, ( $p < 0,001$ ). Kuota e lartë e qelizave në fazën S, konfirmon agresivitetin biologjik që shpreh KQSE, madje ky tregues mund të përdoret si kriter për të vlerësuar reduktimin e mbijetesës të sëmurit. Dhe autorë të tjerë referojnë se kuota e qelizave në fazën S  $> 10\%$  është marker prognostik, që sugjeron se KQSE ka ecuri agresive dhe se i sëmurit ka prognozë të keqe (6).

Analiza e vlerave të parametrave morfonuklear u realizua duke respektuar stratifikimin e KQSE sipas gradës së diferencimit histologjik, duke i grupuar rastet tona sipas këtij kriteri, në të diferencuara mirë 105 raste (38,6%), mesatarisht të diferencuara 89 raste (32,7%) dhe të pa diferencuara 78 raste (28,7%). Vlerat mesatare të variabileve kuantitative të parametrave morfonukleare të konfrontuara ndërmjet këtyre tre grupeve KSE, kanë prezantuar diferenca sinjifikative ( $p < 0,01$ ). Kështu, rezulton se variabilet morfonukleare si aspekti ratio, rrubullaksia, gria mesatare janë në vlera më të larta në KQSE të diferencuara në krahasim me karcinomat e pa diferencuara ( $p < 0,03$ ).

Në analizën krahasuese të këtyre variabileve kuantitative, duke përdorur test matching, kemi gjetur diferenca statistikisht sinjifikative ( $p < 0,01$ ) të vlerave mesatare ndërmjet KQSE të diferencuara me ato të padiferencuara, ndërsa nuk janë sinjifikative ndërmjet KQSE mesatarisht të diferencuara me ato të karcinomave të padiferencuar ( $p = 0,07$ ), rezultate këto që shprehin natyrën progresive të dëmtimeve neoplazike. Nga analiza krahasuese e të dhënave në 40 rastet (14,7%) që kanë të pranishme metastazat karcinomatose në limfonodujt regjional, rezulton se area nukleare, ratio G0-G1, IOD, MOD, fraksioni qelizor në fazën S, janë parametra sinjifikativ që mund të përdoren si marker për metastazat ( $p < 0,006$ ).

Një aspekt i veçantë i studimit të KQSE ishte verifikimi i HPV në lezionet e kësaj neoplazie. Lidhja ndërmjet KQSE dhe HPV, u komunikua për herë të parë nga Syrjänen me 1982 (4), i cili vrojtoj se 40% e të sëmurëve me KQSE në indin neoplazik dhe në epitelin fqinj joneoplazik, kishin dëmtime morfologjike të njëjta me ato që shihen në condilomën gjenitale, e mirënjohur si patologji e shkaktuar nga HPV (2,3,7,8,9,18,19,20).

Me studimet në biologjinë molekulare, u identifikua prania e DNA-HPV, si në indin neoplazik ashtu dhe në indin fqinj jo neoplazik, fakt që orientoj se infeksioni nga HPV implikohet në etiopatogjenezën e KQSE, ku ky virus mendohet se vepron në mënyrë sinergjike me faktorë të tjerë rrezikues (8,9). Njëkohësisht, DNA-HPV është identifikuar dhe në dëmtimet displazike të eptelit ezofageal (3,17). Në materialin tonë praninë e HPV e kemi identifikuar në 33,5% të rasteve.

Nga ekzaminimi i kujdesshëm në mikroskopinë optike të materialit tonë rezultoj se në 183 raste, kishin dëmtime morfologjike sugjestive për HPV në brendësi të indit neoplazik ndërsa në 317 raste nuk gjetëm dëmtime sugjestive për HPV. Nga konfrontimi i 6 parametrave morfonukleare (area nukleare, gjerësia, aspect ratio, equividia dhe area konvekse) të këtyre dy grupeve me KQSE, rezultuan diferenca statistikisht sinjifikative, të shprehura me vlera mesatare më të ulta në KQSE me dëmtime morfologjike sugjestive për HPV, në krahasim me ato të rasteve që nuk kanë dëmtime nga HPV ( $p < 0,001$ ). Ky konstatim dëshmon se HPV ndërhyrë në karcinogjenezën e ezofagut, duke krijuar kompleksin e modifikimeve të bërthamës së qelizave neoplazike, që shprehin vlera të ndryshuar në krahasim me ato pa dëmtime sugjestive për HPV. Këto të dhëna, dhe ato të marra në studimet me biologjinë molekulare, kanë ndikuar që shumë autorë ta konsiderojnë HPV faktor me rol në etiopatogjenezën e KQSE (3,8,9,20,22,23,24). Ky opinion përforcohet dhe nga fakti se në 43 raste (7,2%), gjetëm dëmtime sugjestive për HPV dhe në epitelin fqinj me neoplazinë parësore, sidomos në lezionet e displazisë, çka orienton për ndërhyrjen e këtij virusi në mekanizmat e transformimit neoplazik të qelizave. Në mbështetje të këtij opinioni janë dhe rezultatet që kemi marrë në studimet e materialit tonë me hibridacionin in situ dhe me PCR, ku në epitelin joneoplazik fqinj, kemi gjetur pozitivitet të HPV-DNA në 52 raste ( $p < 0,006$ ). Vlen të theksohet se nuk kemi gjetur korrelacion të parametrave morfometrik të pranisë së HPV-DNA me gradat e diferencimit histologjik të KQSE ( $p = 0,079$ ), në ndryshim nga dëmtimet që shkakton ky virus në karcinomat e organeve gjenitale (10,25,26). Këto të dhëna orientojnë se HPV implikohet në modifikimet qelizore të KQSE që prek popullatën e Linxian, të kësaj zone me incidencën më të lartë të KQSE në Kinë e në botë (7,9,28,29,30).

Kuadri morfologjik që karakterizon dëmtimet sugjestive nga HPV, si në epitelin neoplazik dhe në ENN fqinj, kanë sugjeruar se HPV, krahas rolit infektues implikohet dhe në proceset e kancerogenezës, madje e konsiderojnë një faktor potencial në morfopatogjenezën e KQSE (4,7,8,9). Nga komunikimi i parë i Syrjänen e deri më sot, një numër i madh studimesh kanë referuar prani konsistente të HPV-DNA në indin

neoplazik të KQSE, që referojnë rastisje nga 20% në 65 % të rasteve (2,9,12,14,20,29). Dihet se HPV, ashtu si viruset e tjerë me DNA, ka preferencë për epitelet skuamoze, kështu që identifikimi i tipave të ndryshëm të këtij virusi në KQSE orienton rolin e tyre në transformimin malinj të qelizës dhe në progresimin e neoplazisë (3,20). Rastisja e shpeshtë e HPV-DNA në KQSE dhe bashkëshoqërimi me gjen-proteinën p53 mutante, kanë sugjeruar rolin e tyre në karcinogenezën e epitelit të ezofagut, ku onkoproteina E6 e HPV dhe p53 mutante, janë ngjarje inkluzive në mekanizmat etiopatogjenetike të kësaj neoplazie. Është vërtetuar se p53 me mutacion missense ose me delezione të genit, grumbullohet në bërthamën qelizore ku vepron si onkogen dominant, duke e çuar qelizën në proliferim të pakontrolluar neoplazik (3,9,11,26,27). Karakteristikat e mbishprehjes e të ndërveprimit të HPV e të p53 mutante në mekanizmat etiopato-

gjenetike të KQSE, i analizuar në 600 raste biopsie me teknikat e HIS, me PCR dhe me IHK.

Në fazën e parë të studimit identifikuar praninë e HPV-DNA si në epitelin neoplazik ashtu dhe në ENN fqinj me masën parësore. Në analizën e 117 kampioneve të përgatitur nga materialet e freskët, me teknikat HIS dhe PCR, e identifikuar HPV-DNA në 20 raste (17,1%). Analiza me HIS e 483 kampioneve bioptike me KQSE të derdhur në parafinë, konfirmoj pozitivitet të HPV-DNA në 113 raste (23,4%), ndërsa me PCR e amplifikuar, HPV-DNA rezultoj pozitive në 68 raste (15,6%) ndër 422 biopsi që i'u nënshtruan analizës me këtë teknikë. Duke vlerësuar pozitivitetin e HPV-DNA në rastet me KQSE të marra me të dyja këto teknika së bashku (HIS+PCR), pozitiviteti u rrit në 201 raste (33,5%). Ky pozitiviteti i lartë i pranisë së HPV-DNA që kemi gjetur në materialet e studiuara në indin neoplazik, dëshmon për implikimin e HPV në zhvillimin e KQSE. Rezultatet tona përkohë me ato të komunikuar nga autorë të tjerë (12,14,16,17,30), madje referohet se në shpeshtësinë e rastisjes të HPV në KQSE nuk rezultojnë diferenca ndërmjet popullatës kineze me popullatën japoneze të prekur nga kjo neoplazi (28).

HPV-DNA e kemi identifikuar më shpesh në materialet citologjike (pozitiviteti 41,40%), në krahasim me biopsitë e marra me endoskopi dhe në prelievet neoplazike pas ezofagotomisë. Materiali citologjik është marrë me teknikën e

gërryerjes të masës neoplazike, kështu që mendojmë se mbetet e paqartë në se HPV-DNA është me origjinë nga vetë neoplazia, apo nga epiteli jo neoplazik fqinj me neoplazinë. Megjithatë vlen të theksohet se rezultate të ngjashme të arritura me të njëjtat teknika (HIS e PCR) referojnë dhe autorë të tjerë (16,17,20), madje ndonjë (23,26) sugjeron se materialet citologjike mund të jenë më të ndjeshme, në krahasim me indet neoplazike të derdhura në parafinë. Treguesi i ulët i pozitivitetit të HPV-DNA në biopsitë e KQSE të derdhura në parafinë, mund të jetë pasojë dhe e pranisë të një numri të vogël kopjesh DNA virale në qelizat neoplazike, fakt që ndoshta lidhet me mekanizmin "hit and run - godit dhe ik" i ngjashëm me atë që ndodh në infeksionet nga virusi Herpes Simplex (12,20,23). Kjo rrethanë justifikon dhe diferenat që ekzistojnë në rezultatet që komunikohen dhe nga i njëjti autor. Në një studim me HIS të kryer në pacientë nga kontea e Linxian (9), prania e HPV-DNA në KSE është identifikuar në 66,7% të rasteve, ndërsa në ENN në 50% me displazi të lehtë, në 80% me displazi të moderuar e në 67,9% në displazi të rëndë. I njëjti autorë, në një studim të kryer tre vjet më pas, po në pacienta nga Linxian, e identifikoj HPV-DNA në 23,4% të rasteve me KQSE dhe vetëm në 2,6% në ENN (8).

Në fazën e dytë të studimit, identifikuar tipat e viruseve të implikuara në KQSE. Për këtë qëllim rianalizuar 157 rastet me KQSE, që kishin rezultuar pozitive për HPV-DNA. Analiza u krye me teknikën e HIS, duke përdorur genomic probes specifike, që i përgjigjen tipave të HPV të rastisur më shpesh në infeksionet e ezofagut. Në materialin tonë u identifikuan tipat mukozotropike të HPV (16,18,33), që janë shkaktarë të shpeshtë infeksionesh të aparatit gjenital, ku shprehen me rrezik të lartë transformimi neoplazik, të pranishëm në të tre grupet e materialeve të analizuara (biopsi endoskopike, në prelievet pas ezofagektomisë dhe në materialin citologjik). Në bazë të studimeve epidemiologjike e eksperimentale të publikuara në monografinë IARC-1995, viruset e tipit 16 e 18 janë klasifikuar në grupin e parë si HPV me efekt kancerogen, ndërsa tipat 31,33,6 janë konsideruar "probabel" kancerogen (20,22,26,45). Fakti që në studimin tonë kemi identifikuar të pranishëm në indin neoplazik të KQSE edhe HPV33, madje në vlera më të larta se autorë të tjerë, na jep të drejtën ta

konsiderojmë dhe këtë virus me rrezik të lartë onkogen. Njëkohësisht, u identifikuan dhe tipat mukozal (HPV6, HPV11), që takohen shpesh në papillomat e gojës e të faringut, HPV13 që zakonisht shoqëron hiperplazinë epiteliale, si dhe tipat HPV53 e HPV54.

Në indin neoplazik të rasteve me KQSE, identifikuam dhe grupin e HPV të tipit kutan (HPV20 e HPV38), të njohur si shoqërues të karcinomës me qeliza skuamoze të lëkurës (3,7); tipin HPV27 që ndeshet në lezionet verrukoze të lëkurës e në karcinomat e intestinit (7,20), si dhe tipat HPV13 e HPV49. Në gamën e HPV të identifikuar në materialin tonë një vend të rëndësishëm kanë dhe tipat e viruseve putative që përbëjnë një grup konsistent që i kemi gjetur të pranishëm në indin neoplazik të KQSE siç janë HPV DL231, HPV DL250, HPV DL332, HPV GA 1-3, HPV DL347 e HPV 369, të cilët u identifikuan më shpesh në materialet citologjike. Me interes të veçantë rezulton bashkëshoqërimi i tipave të ndryshëm të HPV, sidomos të atyre të konsideruar me rrezik të lartë për mukozat dhe lëkurën siç ndodh me HPV13 që e gjetëm në indin neoplazik të shoqëruar me HPV38 dhe HPV53; po kështu HPV18 u zbulua në dopio infeksion me HPV54, ndërsa DL250 u gjet se bashku me HPV20.

Shumë autorë kanë referuar një përkatësi më të shpeshtë në KQSE të HPV të tipave 16 e 18, që janë konsideruar tipat me rrezik të lartë për ezofagun dhe më rrallë tipat HPV31, HPV33, HPV35 (7,9,11,17,22,28). Nga të dhënat e studimit tonë, identifikimi i tipave të HPV të implikuar në KQSE dhe në ENN, nuk konfirmon prevalencën e HPV16 e 18, përkundrazi kemi evidencuar variacion të gjerë tipa virusesh, që përforcojnë mendim se në mekanizmat etiopatogjenetik multifaktorial të KQSE implikohet një numër i madh tipash HPV.

Prania e infeksionit me HPV të epitelit ezofageal, shoqërohet dhe me degradimin e proteinës p53, që manifestohet me mbishprehjen intranukleare të formës së saj mutante, ku dhe vepron si onkogen dominant (21,22,23). Prania e HPV e mbishprehja e p53 mutante në KSE konsiderohen ngjarje inkluzive në karcinogjenezën e kësaj sëmundje. Onkoproteina E6 e HPV, pasi lidhet me proteinën p53 tumor-supresore, shkakton mutacion të p53, e cila në këtë gjendje humb funksionet normale dhe qeliza epiteliale në se nuk kalon në apoptozë, pëson transformimin

neoplazik, rrethana këto që përfaqësojnë një rrugë patogjenetike të zhvillimit të KQSE (22,24). Proteina p53 që pëson abrogim të funksioneve normale, grumbullohet e mbishprehet në formën e saj mutante në bërthamën qelizore, ku identifikohet lehtësisht me teknikat e IHK (27,28). Analiza direkte e p53 në kampionet e indit neoplazik ka sugjeruar se forma e saj mutante ka rastisje të shpeshtë në neoplazitë e ezofagut (9). Proteina p53 normale (wild-type) ka gjysëm jetë 6–20 minuta e normalisht nuk grumbullohet në nukleus e për rrjedhojë nuk evidencohet me teknikat konvencionale të imuno-precipitacionit e të IHK, ndërsa forma p53 mutante ka gjysëm jetë më të gjatë, mbi 6 orë, kështu që mbishprehja e saj intranukleare bëhet e dukëshme në studimet IHK, çka konfirmon implikimin në mekanizmat morfopatogjenetike të kësaj neoplazie (2,21,26).

Në studimin me IHK të 36 biopsive me KQSE të derdhura në parafinë, antitruapat anti p53, shprehin imunoreaktivitet pozitiv në 20 raste (55,6%). Rezultatet tona janë në vlera të njëjta me ato të referuar nga autorë të tjerë që e kanë gjetur p53 mutante në 50% të KQSE, në 67% të adenokarcinomave të ezofagut dhe në mbi 50% e neoplazive të tjera të ezofagut, ku manifestohet me një ose disa mutacione të sekuencave genike (24). Antitruapat anti p53 rezultuan pozitive 27,8% në ENN, ku shtrirja dhe intensiteti i pozitivitetit intensifikohen me rritjen e ashpërsisë së dëmtimeve nga 20% në epitelin hiperplazik e displazik (respektivisht), në 67% në karcinomat in situ. Kjo karakteristike e mbishprehjes së p53 mutante në dëmtimet prekancerogene, karakterizon implikimin e p53 në transformimin malinj të epitelit ezofageal dhe në progresimin e dëmtimeve proliferative. Në studimin tonë kemi konstatuar se në rastet me hiperplazi epiteliale, antitruapat anti p53 shprehin pozitivitet në qelizat e shtresës bazale të regjionit papillar, çka sugjeron se qelizat bazale janë selia fillestare ku nisin proceset e kancerogenezës të KQSE.

Një aspekt i rëndësishëm në studimin e KQSE me teknikat e biologjisë molekulare, ka qënë identifikimi me teknikën e PCR – SSCP, të sekuencave të DNA-p53 mutante në indin neoplazik. Ndër 120 raste të analizuara, 70 kampione (58,3%) të përbëra nga 46 biopsi endoskopike dhe 24 materiale citologjike, rezultuan me përmbajtje në sasi të mjaftueshme

DNA, për t'u ekzaminuar në PCR të amplifikuar nga rezultoj se p53 mutante u identifikua në 19 raste (41,3%) ndërmjet 46 biopsive me KSE, ndërsa në 24 materialet citologjike, rezultoj 100% pozitiviteti i mbishprehjes së p53 wild-typ. Nga analiza e p53 mutante të kompromentuar nga onkoproteina E6, në rastet tona rezultoj se mutacioni ka ndodhur në segmentin ndërmjet ekzoneve 5 e 7. Nga analiza e sekuecave të DNA-p53 mutante, rezultoj se spektri i mutacioneve të p53 në KQSE është më shpesh i formës missense, ku tipi i bazave të ndryshuara shprehet me zëvendësimin e aminocidit T me C (40%), i aminoacidit A me G (20%) dhe në format G me A, T me A, C me A. Delecionet e genit i gjetëm vetëm në 4 raste. Mbishprehja e p53 mutante në KQSE me HPV-DNA pozitive, konfirmon implikimin e këtyre dy faktorëve në mekanizmat e kësaj neoplazie. Konstatimi i pozitivitetit të p53 wild-type në 24 materialet citologjike (100%), konsiderohet si faza initiale e transformimit neoplazik të qelizës epiteliale, ku kjo mbishprehje, përfaqëson një

hiperreaktivitet të p53 para se të pësoj mutacionin. Në materialin tonë nuk kemi konstatuar prani të p53 mutante dhe as mbishprehje të p53 wild-type në qelizat e epitelit normal për rreth e në distancë me neoplazinë.

Rezultatet në studimin e karakteristikave molekulare të p53 në indet neoplazike të KQSE sugjerojnë se mbishprehja e p53 mutante është një event i hershëm i krijuar nga veprimi sinergjik e kompleks i faktorëve të ndryshëm kancerogen ambiental, ndër të cilët rol fundamental luan HPV, që ndërhyjnë në mekanizmat e kancerogenezës të epitelit ezofageal. Me rëndësi është dhe fakti i identifikimit të pozitivitetit të lartë të shprehjes së p53 mutante në epitelin jo neoplazik fqinj me masën e neoplazisë, çka orienton se mbishprehja e p53 mutante shërben si marker për diagnozën e lezioneve prekancerogjene, për të individualizuar transformimin malinj të epitelit të ezofagut dhe progresionin e neoplazisë.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Parkin D. M., Läärä E., Mur CS:** Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1985. Intern. Journ. Cancer. 41:184-197,1998.
2. **Tripodi S., Chang F., Syrjänen S., Shen Q., Cintorino M., Alia L., Santopietro R., Tosi P., Syrjänen K.:** Quantitative Image Analysis of Oesophageal Cell Carcinoma from the High-Incidence Area of China, with Special Reference of Tumor Progression and Papillomavirus (HPV) Involvement Anticancer Research. 20:3855-3862,2000.
3. **Chang F., Syrjänen S., Shen Q., Wang L., Syrjänen K.:** Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas from Cina. Cancer. 72: 2525-2530,1993.
4. **Syrjänen KJ.:** HPV infections and oesophageal cancer. Jour Clin Pathology 55:721-728, 2002.
5. **Böttger T., Storkel S., Stokle M., Wahl W., Jünger M., Effenberger-Kim O., Vinh T., Jünger T.:** DNA Image Citometry: A prognostic tool in squamous cell carcinoma of the oesophagus. Cancer; 67:2290-2294,1991.
6. **Chanvitan A., Nekarda H., Casson AG.:** Prognostic value of DNA index, S -phase fraction and p53 protein accumulation after surgical resection of esophageal squamous cell carcinoma in Thailand. Cancer 1995; 63:3: 381-386, 1995.
7. **Chang F., Syrjänen S., Shen Q., Wang L., Syrjänen K.:** Screening for human

- papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas from Cina. *Cancer*. 72: 2525-2530, 1993.
8. **Chang F., Syrjänen S., Shen Q., Cintonino M., Santopietro R., Tosi P., Syrjänen K.:** Detection of HPV-DNA in esophageal squamous cell carcinomas from the High-Incidence Area of Linxian. *Gastroenterology*. 35:123-130, 2000.
  9. **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.
  10. **Cintonino M., Tripodi S., Santopietro R., Perrone A., Alia L., Chang F., Syrjanen S., Shen Q., Tosi P., Syrjanen K.:** Cytokeratin Expression Patterns as an Indicator of Tumor Progression in Oesophageal Squamous Cell Carinoma. *Anticancer Research*. 21, 3100-3110, 2001.
  11. **He D., Zhang D. K., Lam K. Y., Ma L., Ngan H. Y., Liu S. S., Tsao S. W.:** Prevalence of HPV infection in oesophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the p53 gene mutation. *Int. J. Cancer*, 72:959-964, 1997.
  12. **Dormann AM, Walsh TN, Droogan O., Curran B., Hourihane B., Hennessy J., Leader M.:** DNA quantification of squamous cell carcinoma of the oesophagus by low cytometry and cytophotometric image analysis using formalin fixed paraffin embedded tissue. *Cytometry*. 13:886-892, 1992.
  13. **Bocking A., Giroud F., Reith A.:** Consensus Report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on Standardization of Diagnostic DNA Image Cytometry. *Anal. Quant. Cyt. Hist.*: 17, 1.1-5, 1995.
  14. **Herlin P., Duigou F., Masson E., Marnay J., Bloyet D., Michels JI., Jin Li Liu., Henry-Amar M., Mandard A., M., Mandard J-C.:** DNA Cytometric Abnormalities in Human Esophageal Squamous Intraepithelial and Invasive Carcinomas. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 17:1:8-14, 1995.
  15. **Alia L.:** Analisi morfologica, morfometrica, immunoistochimica e di biologia molecolare del carcinoma a cellule squamose dell'esofago. Dissertazione - Università di Siena (2000).
  16. **Minu A., Endo M., Sunagawa M.:** Role of DNA ploidy patterns in oesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 74:578-585, 1994.
  17. **Syrjänen S., Syrjänen K., Happonen R.:** Human Papilloma Virus DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by ISH. *Jour. Oral. Pathol.* 17, 273-278, 1988.
  18. **Togawa K., Jaskiewicz K., Takahashi H., Meltzer SJ, Rustgi AK.:** Human papillomavirus DNA sequences in esophagus squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 107:128-36, 1994.
  19. **Astori G., Lavergne D., Benton C., Hockmayer B., Egawa K., Gaerbe K., Michel M., de Villiers:** HPV are commonly found in normal skin of immuno competent hosts. *Jour. Invest. Derm* 110, 1998.
  20. **De Villers E-M., Lavergne D., Chang F., Syrjänen K., Tosi P., Cintonino M., Santopitero R., Syrjänen K.:** An interlaboratory Study to determine the presence of HPV-DNA in Oesophageal squamous cell carcinoma from China. *Intern. Journ Cancer*, 81, 225, 1999.
  21. **Chang F., Syrjänen S., Tervahauta A., Kurvinen K., Wang L., Syrjänen K.:** Frequent mutations of p53 gene in oesophageal squamous cell carcinomas with and without human papillomavirus (HPV) involvement suggest the dominant role of environmental carcinogens in oesophageal carcinogenesis. *Br J Cancer* 70:346-351, 1994.
  22. **Chang F., Syrjänen S., Syrjänen K.:** Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 13:1009-1022, 1995.
  23. **Chang F., Syrjänen S., Wang L., Shen Q., Syrjänen K.:** p53 expression and human papillomavirus (HPV) infection in esophageal squamous cell carcinomas derived from the high-incidence area of China. *Anticancer Res*. 16, 1-7, 1996.
  24. **Chang F., Wang L.:** p53 mutational spectrum in esophageal squamous cell carcinoma: clues to cancer etiology and pathogenesis. In Werner JA, Lippert BM, Rudert HH, edz. *Experta Medica. International. Congress. Series* 1114. Amsterdam; Experta Medica, 1996.

25. **Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL.**: Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int Journ Cancer*. Feb 10;103 (4):496-500, 2003.
26. **Chang F., Syrjänen S., Wang L., Shen Q., Syrjänen K.**: 1 p53 overexpression and human high-incidence area in China. *Anticancer Res* 17:709-715, 997.
27. **Li T., Lu ZM, Guo M., Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q., Ke Y.**: p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer*. 2002. 15;95 (12):2571-6.
28. **Kawaguchi H., Ohno Sh., Araki K., Miyazaki M., Saeki S., Watanabe M., Tanaka SH, Keizo Sugimachi.**: The p53 Polymorphism in HPV- associated Esophageal Cancer. *Cancer Research* June 1-60, 2753-2755, 2000.
29. **Cooper K.**: HPV and esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterol*. 108:1605, 1995.
30. **Delvenne Ph, Fontaine MA, Delvenne C., Nikkels A., Boniver J.**: Detection of Human Papillomaviruses in Paraffin-Embedded Biopsies of Cervical Intraepithelial Lesions: Analysis by Immunohistochemistry, in Situ Hybridization, and the Polymerase Chain Reaction. *Modern Pathol*. 7; 1:113-119, 1994.
31. **Xin Si H., Tsao SW, Suet Ping Poon C., Lai Man Cheung A.**: Human papillomavirus infection and loss of heterozygosity in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 30;213(2):231-9, 2004.