

BEATA ROSTKOWSKA-NADOLSKA, MARZENA JAWORSKA, MARZENA KUBACKA,
MAREK BOCHNIA

Ekspresja cytokeratyny 4, 13 i 19 w nabłonku polipów nosa

Expression of Cytokeratin 4, 13, 19 in Nasal Polyps Epithelium

Klinika Otolaryngologii AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Cytokeratyny stanowią grupę nierozpuszczalnych w wodzie polipeptydów. Dotychczas wykryto 20 typów cytokeratyn. Ich ekspresja jest swoista i zależy od rodzaju nabłonka. Obecność cytokeratyn wskazuje na pochodzenie nabłonkowe tkanek. Badania dotyczące wyjaśnienia przyczyny powstawania polipów nosowych koncentrują się obecnie na analizie nieprawidłowości w budowie podścieliska polipów. Nieliczne są natomiast prace dotyczące nabłonka pokrywającego polipy nosowe.

Cel pracy. Oznaczenie i porównanie rozmieszczenia wybranych cytokeratyn o różnych masach cząsteczkowych CK-4, CK-13 i CK-19 w tkance nabłonkowej polipów nosowych oraz w prawidłowej błonie śluzowej nosa.

Materiał i metody. Materiałem do badań było 17 preparatów parafinowych tkanek polipów nosowych pobranych od pacjentów podczas polipektomii oraz 7 preparatów prawidłowej błony śluzowej nosa. Przy deparafinizacji i barwieniu immunohistochemicznym postępowano według procedur opisanych przez Pellegrino.

Wyniki. CK-19 była obecna w podstawnych i nadpodstawnych (*suprabasal*) komórkach wielorzędowego nabłonka oddechowego zarówno polipów nosowych, jak i prawidłowej błony śluzowej. CK-13 była silnie obecna w warstwie powierzchniowej wielorzędowego nabłonka oddechowego błony śluzowej oraz polipów nosowych, a nieco mniejsza w warstwie podstawnej. CK-4 wystąpiła w komórkach podstawnych i przyszczytowo w warstwie powierzchniowej komórek nabłonka wielorzędowego oddechowego, wykazywała natomiast słabą ekspresję w nabłonku ulegającym metaplastji płaskonabłonkowej.

Wnioski. Ekspresja cytokeratyn 19, 13 i 4 była podobna w nabłonku oddechowym prawidłowej błony śluzowej oraz w nabłonku oddechowym pokrywającym polipy nosowe. Różnice w ekspresji badanych cytokeratyn występowały między nabłonkiem oddechowym a nabłonkiem wielowarstwowym polipów nosowych (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 5, 891–895).

Słowa kluczowe: cytokeratyny, polipy nosa.

Abstract

Background. Cytokeratins are a complex family of 20 types of insoluble polypeptides of epithelial origin. They are expressed in different epithelia and each epithelium is characterized by specific pattern of cytokeratins components. Most of the researchers trying to explain nasal polyps' growth concentrate on the estimation of pathology in polyps' stroma. However the studies about the pathological changes in the epithelium of nasal polyps are rare.

Objectives. The estimation and comparison of disposition of cytokeratins CK-4, CK-13 and CK-19 in the epithelium of nasal polyps and normal nasal mucosa.

Material and Methods. Seventeen paraffinized tissue of nasal polyps taken during polypectomy and 7 nasal mucosa specimens taken during septoplasty were prepared and immunohistochemically stained with CK antibodies according to procedure described by Pellegrino.

Results. CK-19 was expressed in basal and suprabasal cells layer of respiratory epithelium of either nasal polyps or nasal mucosa. CK-13 was strongly expressed in intermediate and superficial layers of nasal polyps and normal mucosa, while its expression in basal cells of the both tissues was weaker. CK-4 was expressed in basal and superficial layers of respiratory mucosa whereas its expression in stratified squamous epithelium was weak.

Conclusions. CK-19, CK-13 and CK-4 expression was similar in respiratory epithelium of nasal polyps and normal nasal mucosa. The differences between the cytokeratins expression depended on the type of epithelium: respiratory or stratified squamous (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 5, 891–895).

Key words: nasal polyps, cytokeratin.

Cytokeratyny stanowią grupę nierozpuszczalnych w wodzie polipeptydów o masach cząsteczkowych 40–68 kD, tworzących filamenty (włókna) pośrednie w komórkach tkanki nabłonkowej [1]. Dotychczas wykryto 20 typów cytokeratyn. Ich ekspresja jest swoista i zależy od rodzaju nabłonka. Na podstawie występowania można je podzielić na CK charakterystyczne dla nabłonków jednowarstwowych (7, 8, 18–20), a także na występujące w nabłonkach wielowarstwowych (1–6, 9–17) [1–3]. Można je również podzielić na CK o masach cząsteczkowych 40–56,5 kD i kwasowym punkcie izoelektrycznym (CK kwaśne o numerach 10 i 12–20) oraz CK o masach cząsteczkowych 53–67 kD i zasadowym punkcie izoelektrycznym (CK zasadowe o numerach 1–9 i 11) [4]. Cytokeratyny po uwolnieniu z komórek proliferujących lub będących w stadium apoptozy są użytecznymi dobrze odzwierciedlającymi aktywność komórkową markerami nowotworów nabłonkowych. Wydaje się, że fragmenty niektórych cytokeratyn powodują, iż są one dobrymi substratami dla degradacji kapsaz, ich następne uwalnianie natomiast występuje podczas pośrednich stanów apoptozy. Kliniczna wartość oznaczania w płynach ustrojowych rozpuszczalnych, białkowych fragmentów cytokeratyn wyraża się możliwością wczesnej oraz szybkiej oceny nawrotów nowotworów nabłonkowych oraz oceny odpowiedzi na zastosowaną terapię [5].

Według Bernsteina polipy nosowe to choroba o wieloczynnikowej patogenezie, która nie jest do końca poznana. Badania dotyczące wyjaśnienia przyczyny powstawania polipów nosowych skupiają się obecnie na analizie nieprawidłowości w budowie podścieliska polipów [6]. Nieliczne natomiast są prace dotyczące nabłonka pokrywającego polipy nosowe [7]. Jest to nabłonek walcowaty migawkowy lub wielowarstwowy płaski, pod którym znajduje się tkanka łączna z naciekami zapalnymi.

Identyfikacja cytokeratyn z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych może pozwolić na ocenę komórek nabłonka oraz śledzenie nieprawidłowości w różnicowaniu komórek nabłonkowych.

Celem obecnej pracy było oznaczenie i porównanie rozmieszczenia wybranych cytokeratyn o różnych masach cząsteczkowych CK-4, CK-13, i CK-19 w tkance nabłonkowej polipów nosowych oraz w prawidłowej błonie śluzowej nosa.

Materiał i metody

Materiałem do badań było 17 preparatów parafinowych tkanek polipów nosowych pobranych od pacjentów podczas polipektomii oraz 7 preparatów prawidłowej błony śluzowej nosa. Skrawki po deparafinizacji inkubowano z przeciwciałami mono-

klonalnymi. Używano przeciwciał firmy SIGMA, swoistych dla CK-4 *clone* 6810, dla CK-13 *clone* KS-1A3, dla CK-19 – *clone* A53-B/A2. Zarówno przy deparafinizacji, jak i barwieniu immunohistochemicznym postępowano według procedur opisanych przez Pellegrino [8]. Preparaty oceniano, stosując następującą skalę: ekspresję poniżej 25% komórek oceniano jako słabą, 25–75% jako pośrednią, powyżej 75% jako silną.

Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Ekspresja CK-19, oceniana jako pośrednia, występowała w 76% badanych preparatów polipów nosowych w nabłonku oddechowym. W czterech preparatach była słaba, a w dwóch bardzo silna. CK-19 była obecna w podstawnych i przypodstawnych (*suprabasal*) komórkach nabłonka oddechowego zarówno polipów nosowych, jak i prawidłowej błony śluzowej (ryc. 1). W nabłonku metaplastycznym pokrywającym polipy nosowe ekspresja CK-19 była silna (>75% komórek).

CK-13 była silnie obecna w warstwie powierzchniowej nabłonka oddechowego błony śluzowej oraz polipów nosowych, a nieco mniejsza w warstwie podstawnej (ryc. 2). W metaplastycznym nabłonku wielowarstwowym płaskim jej ekspresja była słabsza. CK-4 była obecna w komórkach podstawnych i przyszczytowo w warstwie powierzchniowej komórek urzęsionych nabłonka wielorzędkowego oddechowego (ryc. 3 i 4), słabą ekspresję wykazywała natomiast w metaplastycznym nabłonku wielorzędkowym płaskim.

Tabela 1. Występowanie badanych cytokeratyn w zależności od rodzaju nabłonka

Table 1. Expression of cytokeratins depending on the kind of epithelium

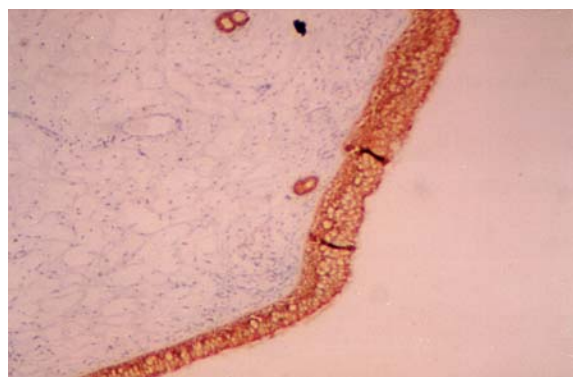
Cytokeratyny (Cytokeratins)	Nabłonek oddechowy (Respiratory epithelium)	Nabłonek wielowarstwowy (Stratified squamous epithelium)	Błona śluzowa nosa (Nasal mucosa)
CK-19	+	+++	+
CK-13	++	+	++
CK-4	++	+	++

+ – ekspresja słaba, ++ – ekspresja pośrednia,

+++ – ekspresja silna.

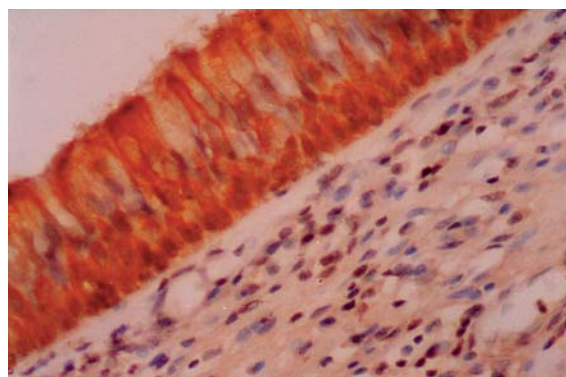
+ – weak expression, ++ – average expression,

+++ – strong expression.



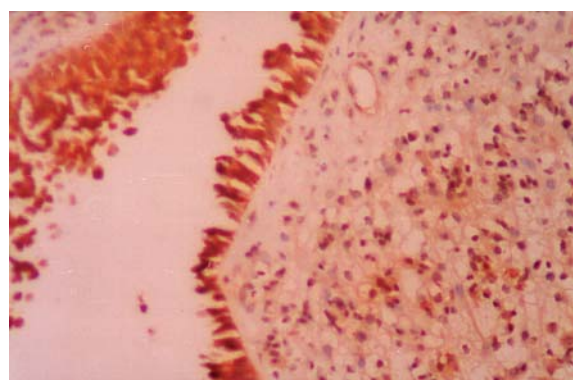
Ryc. 1. Ekspresja cytokeratyny 19 w nabłonku wielorzędowym oddechowym polipów nosa. Powiększenie 63×

Fig. 1. Expression of cytokeratin 19 in respiratory epithelium of nasal polyps. Magnification ×63



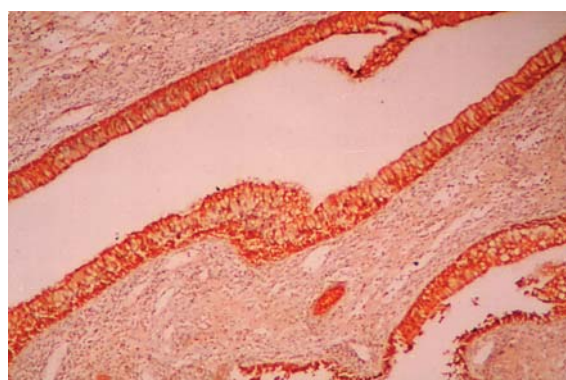
Ryc. 3. Ekspresja cytokeratyny 4 w nabłonku wielorzędowym oddechowym polipów nosa. Powiększenie 200×

Fig. 3. Expression of cytokeratin 4 in respiratory epithelium of nasal polyps. Magnification ×200



Ryc. 2 Ekspresja cytokeratyny 13 w nabłonku wielorzędowym oddechowym polipów nosa. Powiększenie 200×

Fig. 2. Expression of cytokeratin 13 in respiratory epithelium of nasal polyps. Magnification ×200



Ryc. 4 Ekspresja cytokeratyny 4 w nabłonku wielorzędowym oddechowym polipów nosa. Powiększenie 63×

Fig. 4. Expression of cytokeratin 4 in respiratory epithelium of nasal polyps. Magnification ×63

Omówienie

Polip nosowy jest pokryty nabłonkiem, pod którym znajduje się tkanka łączna z naciekami zapalnymi. Najczęściej spotykamy polipy pokryte nabłonkiem migawkowym oddechowym. Nabłonek ten pokrywa ponad 50% powierzchni w 71% polipów. Oprócz nabłonka oddechowego polipy nosowe są pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim [9]. Według Marchanda najbardziej zmieniają się, w porównaniu z prawidłową błoną śluzową, tylko zewnętrzne powierzchnie komórek nabłonka polipa i ich struktury powierzchniowe, okolice przypodstawne komórek natomiast nie odbiegają w sposób istotny od normy [10].

Stosiek uważa, że istnieje wiele form przejściowych między prawidłowym nabłonkiem oddechowym jamy nosowej a nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, będącym wynikiem metaplastji [11]. Jednak fakt, że nie znaleziono komórek atypowych o cechach dysplazji w badaniach histologicznych polipów nosowych może świadczyć

o tym, że proces prowadzący do zmian morfologicznych komórek ma charakter ograniczony. Barwienie skrawków tkanek polipów nosowych oraz prawidłowej błony śluzowej pozwala na porównanie rozmieszczenia swoistych dla komórek nabłonkowych cytokeratyn. Może mieć to znaczenie w śledzeniu ewentualnych zmian zachodzących w komórkach nabłonka prawidłowej błony śluzowej.

Wyniki naszych badań dotyczących ekspresji CK-19 są zgodne z doniesieniami innych autorów. W badaniach Evans et al. [12], DeLuca et al. [13], Jetten et al. [14] Purkis et al. [15], Shimizu et al. [16], CK-19 była obecna w podstawnych i przypodstawnych (*suprabasal*) komórkach nabłonka oddechowego. Zwiększenie ilości CK-19 było połączone z różnicowaniem nabłonka oddechowego do wielowarstwowego płaskiego [14]. Hicks stwierdził, iż cytokeratyna 19 była obecna we wszystkich komórkach nabłonka oddechowego polipów nosowych i małżowiny nosowej [7].

Doniesienia na temat ekspresji CK-13 w nabłonku oddechowym są sprzeczne. Analiza na-

szych badań wykazała jej ekspresję w wielorzędownym nabłonku oddechowym, w metaplastycznym nabłonku wielowarstwowym płaskim jej ekspresja była słabsza. Podobne wyniki otrzymali Huang [17] i Sajjan [18]. Hicks [7] nie stwierdził reakcji anty CK-13 z komórkami nabłonka polipów nosowych i małżowiny nosowej. W badaniach niektórych autorów była nieobecna w prawidłowym nabłonku oddechowym, była natomiast markerem zmian metaplastycznych nabłonka oddechowego w kierunku nabłonka wielowarstwowego [11, 14, 19]. Interesujące jest stwierdzenie ekspresji CK-13 na powierzchni nabłonka oddechowego u pacjentów z mukowiscydozą [18].

W dostępnej literaturze autorzy nie znaleźli doniesień na temat CK-4 w polipach nosa ani w prawidłowej śluzówce jamy nosowej. Wykazano jej obecność w prawidłowym nabłonku tchawicy [20] oraz w błonie śluzowej dziąseł u palaczy [22]. Nie stwierdzono natomiast jej ekspresji w nabłonku oddechowym jamy nosowej szczura [21]. W badaniach własnych po inkubacji ze swoistym

przeciwciałem dla CK-4 wybarwiały się komórki warstwy podstawnej nabłonka oddechowego zarówno w skrawkach polipów nosowych, jak i w prawidłowej błonie śluzowej.

Podsumowując, nabłonek oddechowy prawidłowej błony śluzowej nosa i pokrywający polipy nosa jest podobny nie tylko morfologicznie, ale również ze względu na ekspresję cytokeratyn 19, 13 i 4. Podobieństwo rozmieszczenia oraz intensywności występowania badanych cytokeratyn w nabłonku oddechowym nosa oraz polipów może sugerować, że procesy patologiczne prowadzące do powstania polipów dotyczą raczej podścieliska aniżeli nabłonka. Jednak rozmieszczenie cytokeratyn w polipach i błonie śluzowej nosa różni się ze względu na obecność metaplastycznego nabłonka wielowarstwowego występującego w polipach, a nieobecnego w prawidłowej błonie śluzowej nosa. Może to świadczyć o zmianie ekspresji badanych cytokeratyn podczas procesu powstawania polipów nosowych, co jest zależne od pojawienia się metaplastycznego nabłonka wielowarstwowego.

Piśmiennictwo

- [1] **Moll R:** Cytokeratine als Differenzierungsmarker. Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. (Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors). *Veroff Pathol* 1993, 142, 1–197.
- [2] **Maddox P, Szarewski A, Dyson J, Cuzick J:** Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. *J Clin Pathol* 1994, 47, 15–17.
- [3] **Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Muller A, Verse T, Pirsig W:** Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166, 501–509.
- [4] **Jenek R, Kruk-Zagajewska A, Szejma Z, Żeromski J:** Profil cytokeratyn (CK) w raku krtani. *Otolaryngol Pol* 2000, suppl. 31, 186–187.
- [5] **Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R:** Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004, 37, 529–540.
- [6] **Bernstein JM, Gorfien J, Noble B:** Role of allergy in nasal polyposis: a review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, 113, 724–731.
- [7] **Hicks WJr, Ward R, Edelstein D, Hall L, Albino A, Hard R, Asch B:** Cytokeratin expression in human respiratory epithelium of nasal polyps and turbinates. *Cell Biology International* 1995, 19, 301–306.
- [8] **Pellegrino MB, Asch BB, Connolly JL, Asch HL:** Differential expression of keratins 13 and 16 in normal epithelium, benign lesions and ductal carcinomas of the human breast determined by the monoclonal antibody Ks8.12. *Cancer Res* 1988, 48, 5831–5836.
- [9] **Składzień J:** Polipy nosowe, z zatoki szczękowej i choanalne. Badania kliniczne i morfologiczne. Rozprawa habilitacyjna. Kraków 1996, Drukarnia Narodowa.
- [10] **Marchand V, Tournier JM, Chevillard M, Polette M, Beorchia A, Klossek JM, Puchelle E:** Identification of antileucoprotease in remodeled human adult nasal surface epithelium. *Eur Respir J* 1995, 8, 15–21.
- [11] **Stosiek P, Kasper M, Moll R:** Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchov Arch A Anat Histopathol* 1992, 421, 133–141.
- [12] **Evans MJ, Cox RB, Zhu Q, Burke AS, Moller PC:** Organization of cytokeratin intermediate filaments in basal cells of growing rat trachea. *Tiss Cell* 1993, 25, 159–164.
- [13] **DeLuca LM, Huang FL, Roop DR:** Retinoids and control of epithelial differentiation and keratin biosynthesis in hamster trachea. *Meth Enzymol* 1990, 190, 91–100.
- [14] **Jetten AM, George MA, Smits HL, Vollberg TM:** Keratin 13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid. *Exp Cell Res* 1989, 182, 622–634.
- [15] **Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WBJ, Leigh IM, Lane EB:** Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *Cell Sci* 1990, 97, 39–50.
- [16] **Shimizu T, Nettesheim P, Ramaekers FCS, Randell SH:** Expression of “cell-type-specific” markers during rat tracheal epithelial regeneration. *AM J Respir Cell Mol Biol* 1992, 7, 30–41.
- [17] **Huang TH, St. George JA, Plopper CG, Wu R:** Keratin protein expression during the development of conducting airway epithelium in nonhuman primates. *Differentiation* 1989, 41, 78–86.

- [18] **Sajjan US, Sylvester FA, Forstner JF:** Cable-piliated Burkholderia cepacia binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. *Infect Immun* 2000, 68, 1787–1795.
- [19] **Lancillotti F, Darwische N, Celli G, DeLuca LM:** Retinoid status and the control of keratin expression and adhesion during the histogenesis of squamous metaplasia of tracheal epithelium. *Cancer Res* 1992, 52, 6144–6152.
- [20] **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R:** The catalog of human keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982, 31, 11–24.
- [21] **Pritlove-Carson S, Charlesworth S, Morgan PR, Palmer RM:** Cytokeratin phenotypes at the dento-gingival junction in inflammation in smokers and nonsmokers. *Oral Dis* 1997, 3, 19–24.
- [22] **Schlage WK, Bulles H, Friedrichs D, Kuhn M, Teredesai A:** Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. I. Determination of normal cytokeratin expression patterns in nose, larynx, trachea and lung. *Toxicol Pathol* 1998, 26, 324–343.

Adres do korespondencji:

Beata Rostkowska-Nadolska
Katedra i Klinika Otolaryngologii AM
ul. T. Chałubińskiego 2
50-368 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.11.2004 r.

Po recenzji: 20.01.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 4.03.2005 r.

Received: 19.11.2004

Revised: 20.01.2005

Accepted: 4.03.2005