

CLAUDINEXPRESSZIÓ KÜLÖNBÖZŐ PANCREASDAGANATOKBAN ÉS JELENTŐSÉGE A DIFFERENCIÁLDIAGNÓZISBAN

Borka Katalin

Semmelweis Egyetem, Patológiai Doktori Iskola, Budapest

A claudinok (CLDN) a tight junction nélkülözhetetlen fehérjéi. Megváltozott expressziós mintázatokat már számos daganatban kimutatták. A CLDN-3 és -4 a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának receptora. A toxinak citolitikus hatása is ismert. Vizsgálataink célja volt a claudinexpresszió mintázatának összehasonlítása normális pancreassejtekben, pancreas-eredetű endocrín tumorokban, az adenocarcinómákban, mucinosus cysticus daganatokban és acinussejtes carcinómában. CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 expresszióját vizsgáltuk immunhisztokémiai és RT-PCR módszerrel. A vizsgálat eredményei a következők: 1.) A CLDN-1 és -4 már ismert expressziója mellett ductális sejtekben CLDN-2, -3 és -7, az acinussejtekben a CLDN-3 és -7 fehérje jelenlétét igazoltuk. Az endocrín sejtekben CLDN-3 és -7 fehérje expresszióját mutattuk ki. 2.) Az endocrín daganatokban a CLDN-3 és -7, az exocrín tumorokban a CLDN-1, -2 és -4 erős expresszióját figyeltük meg. Claudin fehérjék expresszióját elsőként írtuk le endocrín daganatokban. 3.) A CLDN-1, -4 és -7 fehérjék átmeneti expressziója a borderline cysticus mucinosus tumorok esetében alátámasztja a mucinosus cysticus daganatok szekvenciális kialakulásának elméletét. 4.) Elsőként ismertettük a pancreas gyerekkorban kialakuló acinussejtes carcinómáját, mely Cushing-szindrómát okozott. Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük: 1.) A CLDN-3 jelenléte endocrín differenciációra utal. Az exocrín eredetű adenocarcinómák és cysticus mucinosus tumorok CLDN-1, -2, -4 és -7 pozitívítást mutatnak, viszont az acinussejtes carcinómában csak CLDN-1 és -2 jelent meg. A normális pancreassejtek claudinexpresszióját is figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a CLDN-1, -2 és -4 fehérje a ductális, a CLDN-1 az acinaris, a CLDN-3 az endocrín differenciáció biztos markere. 2.) Az emelkedett CLDN-4-expresszió adenocarcinómákban és mucinosus cysticus tumorokban, valamint az endocrín tumorokban észlelt magas CLDN-3-expresszió e daganatok új, célzott terápiájának lehetőségét nyitja meg. 3.) A pancreastumorok claudinexpressziójának mintázata felhasználható a daganatok differenciáldiagnosztikájában és segítséget adhat a dignitás eldöntésében. Magyar Onkológia 53: 273–278, 2009

Kulcsszavak: tight junction, claudin, pancreasdaganatok, differenciáldiagnózis, terápia

Claudins (CLDNs) are essential proteins of tight junctions. Changes in their expression pattern have been demonstrated in a number of tumors. CLDNs-3 and -4 are receptors of the *Clostridium perfringens* enterotoxin, cytolytic effects of the toxin are well known. The aim of our studies was to compare the different CLDN expression patterns in normal pancreas cells, pancreatic endocrine tumors, adenocarcinomas, mucinous cystic tumors and acinar cell carcinomas. Expressions of CLDN-1, -2, -3, -4 and -7 proteins were examined using immunohistochemical as well as RT-PCR techniques and the following observations were made: 1.) In addition to the well-known CLDN-1 and -4 expression CLDN-2, -3 and -7 proteins were demonstrated in ductal cells, while CLDN-3 and -7 proteins showed expression in acinar cells. Expression of CLDNs-3 and -7 was manifest in endocrine cells. 2.) CLDN-3 and -7 proteins showed high expression in endocrine tumors, CLDN-1, -2, and -4 proteins in exocrine tumors. This is the first description of CLDN protein expression in endocrine tumors. 3.) The level of CLDN-1, -4 and -7 protein expression in borderline cystic tumors is in between that of benign and malignant tumors. This supports the sequential development theory regarding mucinous cystic tumors. 4.) This is a first review on childhood acinar cell carcinoma causing Cushing syndrome. According to our results the following conclusions are made. 1.) The presence of CLDN-3 refers to endocrine differentiation. The adenocarcinomas and cystic mucinous tumors of exocrine origin denoted CLDN-1, -2, -4 and -7 positivity, whereas acinar cell carcinomas expressed only CLDN-1 and -2. Considering the CLDN expression observed in normal pancreas cells, it can be established that CLDN-1, -2 and -4 proteins are definitely markers of ductal differentiation, CLDN-1 protein of acinar and CLDN-3 of endocrine differentiation. 2.) The increased CLDN-4 expression in adenocarcinomas and mucinous cystic tumors, as well as the

Levelezési cím:

Semmelweis Egyetem
II. sz. Patológiai Intézet
1091 Budapest
Üllői út 93.
Telefon: (06-1) 215-
7300/53445
Fax: (06-1) 215-6921
E-mail: borkakata@
hotmail.com

Témavezető:

Dr. Schaff Zsuzsa

high CLDN-3 expression in endocrine tumors may open up new prospects in the targeted therapy of these tumors. 3). The claudin expression pattern of pancreas tumors may be employed in the differential diagnosis of these tumors and may be of help in deciding dignity. Borka K. Claudin expression in different pancreatic cancers and its significance in differential diagnostics. *Hungarian Oncology* 53: 273–278, 2009

Keywords: tight junction, claudin, pancreatic cancers, differential diagnostics, therapy

BEVEZETÉS

A neuroendocrin (NE) daganatok a pancreasdaganatok 1–2%-át teszik ki, gyakran MEN 1- és von Hippel-Lindau-szindróma részeként jelentkeznek. A jól differenciált daganatok a méret és proliferációs aktivitás alapján benignus és bizonytalan viselkedésű csoportba oszthatók. A jól differenciált NE carcinomák ráterjednek a szomszédos szervekre és/vagy metasztázist adnak. A rosszul differenciált NE carcinomák magas proliferációs aktivitással rendelkeznek. A funkcionáló tumorok közül az insulinomák 90%-a benignusként viselkedik. Az egyéb hormont (gastrin, glucagon, VIP, somatostatin, serotonin, ACTH, GH, PTH) termelő daganatok és a nem-funkcionáló daganatok csaknem mindig malignus viselkedésűek.

A ductalis adenocarcinoma a leggyakoribb pancreas-eredetű malignus daganat. A dohányzás, diabetes, alkoholizmus mellett számos kromoszómaeltérés is szerepet játszik létrejöttében (K-ras, p16, p53, SMAD4/DPC4, cyclin D1, MUC1, MUC5, PSCA, mesothelin). A ductalis adenocarcinomák kifejezetten rossz prognózisú daganatok, a betegek 5 éves túlélése csupán 15–20%-os.

A mucinosus cysticus pancreasdaganatok a leggyakrabban előforduló cysticus pancreastumorok, csaknem mindig perimenopauzális korú nőkben fordulnak elő. A sejtek dysplasiája és az invázió jelenléte alapján mucinosus cystadenoma, bizonytalan természetű (borderline) mucinosus cysticus tumor és mucinosus cystadenocarcinoma csoportokba oszthatók.

Az acinussejtes carcinoma a pancreas exocrin daganatainak 1–2%-a és a pancreatoblastomához hasonlóan acinaris differenciációt mutat, tripszinogént és AFP-t termel. Az acinussejtes tumor főként felnőttkorban alakul ki, gyerekkori tumorról csupán néhány közlés áll rendelkezésre az irodalomban. A pancreatoblastoma diagnózisához az ún. squamoid sejtcsoportok hozzátartoznak, azonban ezek acinussejtes carcinomában hiányoznak.

A claudinok a tight junction (TJ) típusú sejtkapcsoló struktúrák felépítésében vesznek részt. A molekulacsatlád felfedezésére 1998-ban került sor és jelenleg az emberi szervezetben 24 tagja ismert. Minden claudin molekula 4 transzmembrán szegmentumból áll, valamint két extracelluláris hurokkal rendelkezik, az N és C terminális régió intracitoplazmatikusan helyezkedik el. A fehérjék elsődleges szerepet játszanak az intercelluláris rések lezárásában, a paracelluláris szelektív diffúzió irányításában, a szelektív ioncsatornák működésében, valamint fenntartják az apicalis és basolateralis membrán közötti fehérjék és lipidek eltérő összetételét.

A claudinoknak továbbá szerepük van a sejtek növekedésének és differenciációjának szabályozásában és a tumorigenezisben is. A claudinok hiánya vagy csökkent jelenléte, megváltozott expressziója a sejtheadhézió csökkenésével, a daganatos infiltráció fokozódásával, metasztázisképződéssel jár. Számos daganatban – ahol az invázióban feltehetően a TJ-k megváltozott struktúrája is szerepet játszik – bizonyos claudinok fokozott expresszióját írták le.

A claudinok szerv- és szövetspecifikus molekulák. A CLDN-2 fehérje például a gasztrointesztinális hámsejtekben és az azokból kiinduló daganatokban fokozottan expresszálódik. Az endothelsejtek és a belőlük kiinduló tumorok CLDN-5-pozitivitást mutatnak. Az epeúti daganatok fokozott CLDN-4-expressziója elkülöníti ezen tumorokat a hepatocellularis carcinomáktól. Pancreas-eredetű adenocarcinomában és intraductalis papillaris mucinosus neoplasiában (IPMN) szintén a CLDN-4 fokozott expressziója igazolódott. A CLDN-4 fokozott expresszióját még számos, különböző eredetű daganatban igazolták, így prostatadaganatokban, ovariumtumorokban, emlődaganatban, gyomorcarcinomában, endometrialis tumorokban, tüdő-, colon-, vese-, pajzsmirigy-carcinomában, oesophagus-adenocarcinomában, cervixtumorokban. A tüdőben a magas CLDN-3-expresszió kissejtes daganatra utal, elkülönítve azt az atípusos carcinoidtól, adenocarcinomától és laphámcarcinomától. Néhány daganatban az expresszió mértéke a prognózisra is utal. Például a CLDN-1, -3, -4 és -5 fehérje expressziója a kifejezetten rossz prognózisú, diffúz típusú gyomordaganatokban alacsonyabb a jobb prognózisú, intestinalis tumorokhoz viszonyítva. Invazív, metasztatikus emlődaganatokban a CLDN-1 és -7 fehérje csökkent expressziót mutat. Portióban kialakult invazív laphámcarcinomában az invázió kialakulásával a CLDN-1 és -2 csökkent expressziója figyelhető meg.

A fentiek alapján felmerül, hogy a TJ fehérjék jelentős változást mutatnak a pancreas különböző sejtípusaiból kialakuló tumorokban, valamint eltérés mutatkozik az endocrin és exocrin daganatok között a sejtkapcsoló fehérjék expressziójában is. A pancreas endocrin daganatainak claudinexpressziójára vonatkozóan nincs adat az irodalomban. Más szervek, például a tüdő-daganatok esetében viszont bebizonyosodott, hogy a szerv carcinoidjai lényegesen eltérnek a mirigyhám-eredetű daganatoktól a sejtkapcsolatok tekintetében. Másrészről a pancreas ductalis és acinaris sejteinek kapcsolódása és az ezekből kiinduló daganatokban a sejtkapcsolatok változása ugyancsak még nagy részben tisztázatlan. Mindezek megválaszolására célul tűztük

ki a sejtkapcsolatok változásának vizsgálatát normális hasnyálmirigyben és egyes pancreastumorokban. A TJ fehérjék változásainak detektálása során feltételezzük, hogy ezek megismerése adatokat szolgáltat az egyes tumorok patogenezisének megismerésére is. Ezen túlmenően az egyes pancreasdaganatokat jellemző TJ-mintázat („pattern”) ismerete diagnosztikus segítséget is nyújthat a pancreas endocrin és exocrin daganatainak elkülönítésében. A CLDN-3 és -4 a Clostridium perfringens enterotoxinjának (CPE) receptora és a közlemények alapján a fehérjéket expresszáló daganatsejtek (pancreas-adenocarcinoma, prostatacarcinoma) lízist okozza, mely új, célzott terápia bevezetését teszi lehetővé.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célkitűzésünk volt a claudin molekulasalád egyes tagjainak vizsgálata a pancreas különböző differenciáltságú sejteiben és daganatos elváltozásaiban. Feltételeztük, hogy a ductalis és acinaris sejtek, valamint az endocrin sejtek jelentősen különböznek egyes TJ fehérjék, elsősorban az azok gerincét képező claudinok összetételében, eloszlásában. Feltételeztük továbbá, hogy a jellegzetes „claudin-mintázat” az adott sejtekből kiinduló daganatok esetében is megmarad, azonban az expresszió mértéke változhat. A változás, esetlegesen új claudin fehérjék megjelenése, vagy eltűnése segíthet a pancreas egyes tumorai eredetének, a közös ősejtből való származásának megismerésében. A fenti feltételezések megválaszolására a következők vizsgálatát tűztük ki célul:

1. *Claudinexpresszió tanulmányozása normális, tumormentes pancreas különböző eredetű sejteiben.* Vizsgálni kívántuk a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje expresszióját a patológiás elváltozást nem mutató pancreas exocrin eredetű ductus- és acinussejtjeiben, valamint endocrin Langerhans-szigetsejtjeiben immunhisztokémiai módszerrel.
2. *Endocrin pancreastumorok vizsgálata claudinexpressziós mintázat megállapításával.* Célunk volt az endocrin daganattal rendelkező betegek klinikai adatainak (életkor, nem, hormontermelés) elemzése és a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje expressziójának analízise immunhisztokémiai módszerrel a pancreas endocrin daganataiban, valamint a kapott eredmények összehasonlítása benignus, bizonytalan természetű és malignus daganatokban.
3. *Exocrin eredetű ductalis adenocarcinomák claudinexpressziójának meghatározása.* A daganatok klinikopatológiai elemzése után vizsgálni kívántuk a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje jelenlétét fehérjeszinten, majd az expressziós mintázatot összehasonlítottuk a különböző differenciáltságú daganatok esetében.
4. *Endocrin és exocrin eredetű ductalis adenocarcinomák claudinexpressziós mintázatának összehasonlítása.* Célul tűztük ki az endocrin tumorok és ductalis adeno-

carcinomák CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 expressziós mintázatának összehasonlítását immunhisztokémiai reakciók és RT-PCR módszer során kapott eredmények alapján.

5. *Claudinexpresszió korrelációja a prognózissal mucinosus cysticus daganatokban* A pancreas mucinosus cysticus tumorainak klinikopatológiai sajátosságai mellett a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje jelenlétét és a prognózis korrelációját kívántuk vizsgálni immunhisztokémiai és RT-PCR módszerrel mucinosus cysticus adenomák, bizonytalan természetű mucinosus cysticus tumorok és mucinosus cysticus adenocarcinomák esetében.
6. *Acinussejtes tumor claudinexpressziós mintázata.* Célunk volt, hogy a ritka előfordulású acinussejtes tumor klinikai, patológiai és differenciáldiagnosztikai tulajdonságainak elemzése után a CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 fehérje jelenlétét feltérképezzük immunhisztokémiai módszerrel.
7. *Különböző eredetű pancreasdaganatok és a pancreas alkotó sejtek claudinexpressziós mintázatának összehasonlítása és annak szerepe a differenciáldiagnosztikában.* Össze kívántuk hasonlítani a pancreas alkotó eltérő differenciáltságú sejtek és a belőlük kialakuló endocrin daganatok, a ductalis adenocarcinomák, mucinosus cysticus tumorok és acinussejtes tumor CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 expressziós mintázatát immunhisztokémiai és RT-PCR módszerrel, és szerepét elemezni a differenciáldiagnosztikában.

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

Betegek és vizsgálati minták

A Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetének archívumából kiválasztott 74 szövetminta formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkjaiból készült metszeten végeztünk retrospektív vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével (#172/2003).

Öt, kóros eltérést nem mutató pancreasban vizsgáltuk a különböző claudinok expressziós mintázatát immunhisztokémiai módszerrel az acinusokban, ductusokban és az endocrin sejtekben. Húsz endocrin (4 benignus, 11 bizonytalan, 5 malignus) daganatot vizsgáltunk immunhisztokémiai módszerrel és közülük 8 esetben RT-PCR módszerrel végeztünk mRNA-szintű vizsgálatokat. Az adenocarcinomák (pT1:2, pT2:6, pT3:11, pT4:1; pN0:7, pN1:13; grade I:2, grade II:15, grade III:3) claudinexpresszióját 20 beteg mintáin vizsgáltuk, az RT-PCR vizsgálatokhoz ezekből 8 tumort választottunk ki. Tizenkettő mucinosus cystadenomát, 11 borderline kategóriába sorolt daganatot, valamint 5 mucinosus cystadenocarcinomát vizsgáltunk immunhisztokémiai módszerrel, melyek közül a molekula mRNA-szintű kimutatását 5 benignus, 5 borderline és 5 malignus tumor esetén végeztük el. Mindezek mellett egy 10 éves fiú pancreas-eredetű, ritka előfordulású, Cushing-

szindrómát okozó acinusos sejtes carcinomáját vizsgáltuk és immunhisztokémiai módszerrel meghatároztuk a daganat claudinexpressziós mintázatát.

Módszerek

Szöveti és hisztokémiai vizsgálatok

A formalinban fixált és paraffinba ágyazott normális, tumormentes pancreasból és a daganatokból származó szövetmintákat hematoxilín-eozinnal festettük. Az acinusos sejtes carcinoma esetében perjódsvá-Schiff (PAS), PAS-diasztáz és mucicarmin festést alkalmaztunk a mucin kimutatása céljából.

Immunhisztokémiai vizsgálatok CLDN-1, -2, -3, -4 és -7 elleni antitesttel

Paraffinba ágyazott, deparaffinált metszeteken az endogén peroxidáz blokkolása és antigénfeltárás után az elsődleges ellenanyagok kerültek alkalmazásra, melyek közül a CLDN-1, -3 és -7 elleni antitest poliklonális, a CLDN-2 és -4 elleni antitest monoklonális volt (Zymed Inc, San Francisco, CA, USA). A megfelelő biotinilált másodlagos ellenanyagot, avidin-streptavidin-enzim konjugátumot a Ventana immunautomata protokollja szerint alkalmaztuk. A reagensek és másodlagos ellenanyagok a Ventana cég (Tucson, AZ, USA) termékei. A reakciót diaminobenzidinnel (DAB: Ventana) vizualizáltuk, magfestésként hematoxilint alkalmaztunk. Negatív kontroll készítésénél az elsődleges antitest helyett nem-immun nyúl- és egérszérumot használtunk, illetve az elsődleges antitesttel való inkubálást elhagytuk. Pozitív kontrollként a következő szövetmintákat használtuk: CLDN-1 kimutatásához bőrből származó epitheliumot; CLDN-2, -3, -4-hez normális colon nyálkahártyát; a CLDN-7 detektálására emlőductushámsejteket.

A reakciót lineáris membránpozitivitás esetén pozitívként értékeltük, kivéve a CLDN-2 esetében, ahol granuláris citoplazmatikus reakció volt megfigyelhető. Az immunhisztokémiai reakciók eredményét a pozitívan festődő sejtek százaléka alapján kapott értékben fejeztük ki: 0 (0–5% pozitivitás), 1 (6–20% pozitivitás), 2 (21–40% pozitivitás), 3 (41–60% pozitivitás), 4 (61–80% pozitivitás), 5 (81–100% pozitivitás). Mucinosus cysticus daganatok esetében az immunhisztokémiai reakciókat értékeltük a festődés intenzitása alapján is: az enyhén 1, a közepesen 2, míg az erősen festődők 3 pontot kaptak. E két értéket mindegyik típusú claudinnal végzett reakcióban minden daganatos minta esetében összeszoroztuk, s a szorzatok átlagait alkalmaztuk a statisztikai vizsgálatok során.

Kiegészítő immunhisztokémiai vizsgálatok az acinusos sejtes tumor esetén

Az acinusos sejtes carcinoma immunhisztokémiai vizsgálatához egér monoklonális (β -catenin: BD Bioscience-610154, CEA: DAKO-M7072, chromogranin:

DAKO-M0869, CK 20: DAKO-M7019, CK 7: DAKO-M7018, CK AE1-AE3: DAKO-M3515, CK MNF116: DAKO-M0821, Ki-67: DAKO-M7240, NSE: DAKO-M873, p53: DAKO-M7001, serotonin: DAKO-N1530, synaptophysin: DAKO-M0776, vimentin: DAKO-M0725), nyúl poliklonális (ACTH: DAKO-N1531, AFP: DAKO-A0008, alfa-1-antitrypsin: DAKO-A012, lysosyme: DAKO-A0099, somatostatin: DAKO-N1551, gastrin: DAKO-N1540, glucagon: DAKO-N1542) és tengerimalac poliklonális (insulin: DAKO-N1542) antitesteket használtunk, a reakciókat a Ventana ES immunfestő automatával végeztük. Trypsinogen, CRF, ACTH vizsgálatokhoz jelölt avidin-streptavidin-biotin 2 (LSAB 2) rendszert (DAKO Cytomation, Glostrup, Dánia) használtunk. Kromogénként DAB-ot alkalmaztunk, melyet peroxidázzal tettünk láthatóvá. Magfestéshez hematoxilint használtunk. A daganat acinusos sejtes eredetét igazoló trypsinogen kimutatását poliklonális nyúl anti-patkány antitesttel végeztük. Ezt az antitestet a Budapesti Eötvös Lórárd Tudományegyetem Biokémiai Intézetében állították elő és Western blot vizsgálattal igazolták, hogy az antitest human trypsinogennel is reagál. Két corticotropin-releasing factor (CRF) elleni antitestet próbáltunk ki: 1: fagyasztott preparátumon alkalmazható (Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, CA, USA); 2: paraffinos anyagon is működő antitestet, amit Görcs TJ (SE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézet) szívességéből kaptunk.

A CRF és ACTH immunhisztokémiai reakciót fagyasztott készítményen is elvégeztük indirekt immunfluoreszcens módszerrel. A secretin (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY, USA) és vasoactive intestinalis polypeptid (VIP: Accurate Chemical and Scientific Corporation) kimutatását indirekt immunfluoreszcens módszerrel végeztük az irodalomban régebben közölték alapján dr. Köves Katalin segítségével a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetében. Az immunfluoreszcens vizsgálat során Triton X-100, majd 10%-os normál kecskeszérummal való előkezelés után a metszeteket a primer antiszérummal inkubáltuk 24 órán keresztül. A reakciót fluoreszcens isothiocyannal jelölt szekunder antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tettük láthatóvá. Kontrollként chronicus pancreatitisből és adenocarcinomából származó mintát használtunk. Az ACTH immunreakcióhoz boncolásból származó hypophysist, valamint egy 50 éves beteg ACTH-t szecernáló tüdődaganatából származó mintát alkalmaztunk pozitív kontrollként.

Szöveti multiblokk készítése

A mucinosus cysticus daganatok esetén az immunhisztokémiai reakciókat szöveti multiblokk / tissue microarray (TMA) segítségével végeztük, a mintát a TMA eszközével (Hisztopatológia Kft., Pécs) vettük.

Statisztikai elemzés

A különböző claudin molekulák kimutatásakor az immunhisztokémiai vizsgálatok során kapott eredmények statisztikai elemzését a Mann-Whitney U-teszt segítségével végeztük el. $P < 0,05$ valószínűségi értéket fogadtunk el szignifikánsnak.

Elektronmikroszkópia

Az acinussejtes tumorból történő elektronmikroszkópos vizsgálathoz a szövetrészletet 2,5%-os glutáraldehidben és ozmium-tetroxidban fixáltuk. Ultravékony metszeteket készítettünk, majd azt uranil-acetáttal és ólom-citráttal kettős-kontrasztoltuk.

Immunkemiluminometria

Az acinussejtes carcinoma ACTH-tartalmának direkt kimutatását immunkemiluminometriás vizsgálat során kit (Nichols Institute Ltd., San Juan, CA, USA) segítségével végeztük fagyasztott tumorból. Az eredményeket a chronicus pancreatitist és adenocarcinomat mutató mintával is összehasonlítottuk.

Real-time (RT-) PCR

A paraffinba ágyazott szövetblokkokból teljes RNS-t izoláltunk High Pure RNA Paraffin kit segítségével (Roche, Indianapolis, IN, USA), majd a teljes RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő MmulV reverz transzkriptázt (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és random hexamert (Applied Biosystems) alkalmazva Rnáz-inhibitor jelenlétében (Applied Biosystems).

A SYBR Green alapú RT-PCR-hez mintánként 12,5 μ l Sybr Green Master Mixet (BIO-RAD 1708882), illetve az általunk megtervezett primerekből (Primer Express program segítségével – Applied Biosystems) 300 nM koncentrációban 0,5–0,5 μ l-t, a korábban előállított cDNS-mintákból 2 μ l-t, valamint 9,5 μ l desztillált vizet használtunk fel. A reakciókat az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) készülékkel végeztük a következő paramétereket alkalmazva: 95 °C 2 perc, 95 °C 20 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 30 másodperc, ciklusszám: 40.

A kapott adatokat a REST (Relative Expression Software Tool) néven ismert relatív kvantifikálásra alkalmas számítógépes program segítségével értékeltük ki. A vizsgálatokhoz a GAPDH referenciagént alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK*Claudinexpresszió tanulmányozása normális, tumormentes pancreas különböző eredetű sejtjeiben*

Az irodalmi adatokkal egyezően CLDN-1 és -4 jelenlétét igazoltuk ductus- és acinussejtekben. Vizsgálataink során emellett CLDN-2, -3 és -7 expresszióját mutattuk

ki a ductalis sejtekben, acinussejtekben pedig CLDN-3 és -7 jelenlétét igazoltuk. Az endocrin sejtekben csupán a CLDN-3 és -7 fehérje volt detektálható.

Claudinexpressziós mintázat vizsgálata endocrin pancreastumorokban immunhisztokémiai módszerrel

A CLDN-3 és -7 közepesen erős expressziójának jelenlétét és a CLDN-1, valamint CLDN-4 fehérje expressziójának hiányát elsőként írtuk le e tumorokban. CLDN-2-t csak egy endocrin daganatban tudtunk kimutatni. A benignus, a bizonytalan természetű és a malignus daganatokban talált expresszió emelkedő, de nem szignifikáns tendenciát mutatott.

Ductalis adenocarcinomák claudinexpressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

A CLDN-4 és -7 irodalomban már ismert jelenléte mellett CLDN-1 fehérje expresszióját találtuk a vizsgált daganatok mindegyikében, míg a CLDN-2 csak a daganatok 45%-ában jelent meg. A CLDN-3 kimutatására szolgáló reakció negatív eredményt mutatott minden esetben. A különböző differenciálságú daganatok között nem találtunk szignifikáns különbséget a claudinexpresszióban.

Endocrin daganatok és ductalis adenocarcinomák claudinexpressziójának összehasonlítása immunhisztokémiai és RT-PCR vizsgálattal

Az mRNS-expressziós analízis az immunhisztokémiai reakciókhoz hasonló eredményeket adott. Az endocrin daganatokra magas CLDN-3 és -7 expresszió jellemző, míg az exocrin ductalis adenocarcinomák magasabb CLDN-1, -2 és -4 expressziót mutatnak. Az eltérés az immunhisztokémiai reakciók során minden claudin vizsgálatakor szignifikánsnak is bizonyult.

Claudinexpresszió korrelációja a prognózissal mucinosus cysticus daganatokban

A CLDN-3 fehérje hiánya a daganatok exocrin eredetét bizonyítja. CLDN-1, -2, -4 és -7 fehérje kimutatásakor immunhisztokémiai és RT-PCR vizsgálattal is magasabb expressziót találtunk az adenocarcinomákban az adenomákhoz képest, de szignifikáns eltérés immunhisztokémiai módszerrel csak CLDN-4, RT-PCR módszerrel CLDN-4 és -7 esetén mutatkozott.

Acinussejtes carcinoma claudinexpressziós mintázata

A daganat hisztológiai és immunhisztokémiai tulajdonságai alapján acinussejtes carcinomának felelt meg. Elsőként ismertettük a pancreas gyerekkorban kialakuló acinussejtes carcinomáját, mely Cushing-szindrómát

okozott. Az acinussejtes carcinomában a CLDN-1 és -2 jelenléte, valamint a CLDN-3 és -7 expressziójának hiánya a daganat exocrin eredetét támasztja alá.

Különböző eredetű pancreasdaganatok és a pancreast alkotó sejtek claudinexpressziós mintázatának összehasonlítása és annak szerepe a differenciáldiagnosztikában

Vizsgálataink alapján a pancreas endocrin daganataiban, exocrin eredetű adenocarcinomákban, mucinosus cysticus tumorokban és az acinussejtes tumorban a claudinok expressziós mintázata karakterisztikus eltéréseket mutat. A CLDN-3 jelenléte endocrin differenciációra utal. Az exocrin eredetű adenocarcinomák és cysticus mucinosus tumorok CLDN-1, -2, -4 és -7 pozitivitást mutatnak, viszont az acinussejtes tumor csak CLDN-1 és -2 pozitivitást mutatott.

KÖVETKEZTETÉSEK / ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A CLDN-1 és -4 már ismert expressziója mellett ductalis sejtekben CLDN-2, -3 és -7, az acinussejtekben a CLDN-3 és -7 fehérje jelenlétét igazoltuk. Az endocrin sejtekben CLDN-3 és -7 fehérje expresszióját mutattuk ki.
2. Az endocrin daganatokban magas CLDN-3 és -7 expressziót, míg az exocrin tumorokban magas CLDN-1, -2 és -4 expressziót találtunk. Claudin fehérjék expresszióját elsőként írtuk le endocrin daganatokban.
3. A CLDN-1, -4 és -7 fehérjék átmeneti expressziója a borderline mucinosus cysticus tumorok esetében alátámasztja a mucinosus cysticus daganatok szekenciális kialakulásának elméletét.
4. Elsőként ismertettük a pancreas gyerekkorban kialakuló, Cushing-szindrómát okozó acinussejtes carcinomáját.
5. A CLDN-3 jelenléte endocrin differenciációra utal. Az exocrin eredetű adenocarcinomák és cysticus mucinosus tumorok CLDN-1, -2, -4 és -7 pozitivitást mutatnak, viszont az acinussejtes carcinomában csak CLDN-1 és -2 jelent meg. A normális pancreassejtek claudinexpresszióját is figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a CLDN-1, -2 és -4 fehérje a ductalis, a CLDN-1 az acinaris, a CLDN-3 az endocrin differenciáció biztos markere.
6. Az emelkedett CLDN-4-expresszió adenocarcinomákban és mucinosus cysticus tumorokban, valamint az endocrin tumorokban észlelt magas CLDN-3-expresszió e daganatok új, célzott terápiájának lehetőségét nyitja meg.
7. A pancreastumorok claudinexpressziójának mintázata felhasználható a daganatok differenciáldiagnosztikájában és segítséget adhat a dignitás eldöntésében.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. Borka K, Kaliszky P, Szabó E, et al. Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch* 450:549–557, 2007
2. Illyés G, Luczay A, Benyó G, et al. Cushing's syndrome in a child with pancreatic acinar cell carcinoma. *Endocr Pathol* 18: 95–102, 2007

A doktori értekezéstől független közlemények

1. Borka K, Bánfi G, Kelemen Z, et al. Lichen sclerosis és hímvessző-rák összefüggése. *Magyar Urológia* 1:15-18, 2007
2. Borka K, Illyés G, Zsirka KA, et al. Acute pancreatitis with few symptoms and extensive necrosis. *Orvosi Hetilap* 26:1403–1404, 2001
3. Borka K, Patai K, Rendek A, et al. Pleomorphic rhabdomyosarcoma of the uterus in a postmenopausal patient. *Pathol Oncol Res* 12:102–104, 2006
4. Corradi G, Kiss F, Borka K, et al. Current viewpoints on the evaluation of testicular biopsy. *Orvosi Hetilap* 139:2243–2246, 1998
5. Kaliszky P, Jámbor G, Nagy Z, et al. Early results after aortoiliac reconstruction in our department in the past six years. *Magyar Sebészet* 56:103–107, 2003
6. Kelemen Z, Nyirády P, Bánfi G, et al. A hímvessző vastagítása vazelinnel – következmények és azok ellátása. *Magyar Urológia* 1:16–27, 2006
7. Nádas G, Bánfi G, Borka K, Romics I. A pénisz Kaposi-sarcomája. *Uroonkológia* 3:81-83, 2004
8. Nyirády P, Borka K, Bánfi G, Kelemen Z. Lichen sclerosis in urological practice. *Orvosi Hetilap* 44:2125–2129, 2006
9. Nyirády P, Kelemen Z, Kiss A, et al. Treatment and outcome of vaseline-induced sclerosing lipogranuloma of the penis. *Urology* 71:1132–1137, 2008
10. Sobel G, Halasz J, Bogdanyi K, et al. Prenatal diagnosis of a giant congenital primary cerebral hemangiopericytoma. *Pathol Oncol Res* 12:46–49, 2006
11. Vojnisek Z, Arató A, Bodánszky H, et al. Cholangitis sclerosans és haemobilia együttes előfordulása. *Gyermekgyógyászat* 3:275–283, 2005