

CLAUDINOK ÉS PROGNOSZTIKAI FAKTOROK VIZSGÁLATA EGYES GASTROINTESTINALIS BETEGSÉGEKBE

Gyórfy Hajnalka

Semmelweis Egyetem, Patológiai Doktori Iskola, Budapest

A gastrointestinalis daganatok a daganatos halálozások között az első tíz helyen állnak a világon. Az emésztőrendszer daganatos és egyéb betegségeinek kialakulása együtt jár a sejtkapcsolatok, így a tight junction (TJ) megváltozásával. A TJ gerincét alkotó claudin fehérjék (CLDN) a különféle szövetekben eltérő összetételben és eloszlásban helyezkednek el, de jellemzőek az egyes szövetekre. I. Vizsgáltuk a CLDN-összetétel változásait a nyelőső Barrett-metaplasziájában és a talaján kialakult adenocarcinómában. Kimutattuk, hogy a normális foveolaris hámhoz képest a CLDN2 és -3 fokozott expressziót mutat Barrett-metaplasziában. Az adenocarcinoma CLDN2- és CLDN3-expressziója fokozott a foveolaris hámhoz és a Barrett-metaplasziához képest. A Barrett-metaplasia és adenocarcinoma hasonló claudinmintázata támogatja a kettő összefüggéséről szóló elméletet. II. A CLDN2, -3 és -4 fokozott expressziót mutatott a gyomor intestinalis metaplasziájában, összehasonlítva az antrum normális foveolaris hámjával. A vékony- és vastagbél adenocarcinómája fokozott CLDN2-expressziót mutatott a normális hámhoz képest. A vastagbél-adenoma és -adenocarcinoma nem különíthető el CLDN-mintázat alapján. A Barrett-metaplasziának és a gyomor intestinalis metaplasziájának ill. a vékonybél normális hámjának a CLDN-rajzolata igen hasonló egymáshoz. III. Gyermek coeliakiás vékonybélmintáit vizsgálva bizonyítottuk, hogy a CLDN2 és -3 expressziója a coeliakiában fokozott a normális kontrollhoz képest. A CLDN2- és -3 szignifikánsan fokozott expressziója és a súlyosabb hisztológiai kép miatt a distalis duodenum alkalmasabbnak tűnik a diagnosztikus biopsziás mintavételre. IV. A hámsejtek mellett lágyszövetdaganatok is tartalmaznak sejtkapcsolatokra jellemző fehérjéket. Gastrointestinalis stromalis tumorokban (GIST) és más mesenchymalis daganatokban, így angiosarcomában, haemangiómában, leiomyosarcomában és leiomyómában különböző claudin fehérjék expresszáálódtak. CLDN2 minden daganatban kimutatható. A CLDN1 csak leiomyosarcomában volt pozitív. A leiomyoma csak CLDN2-t expresszált. A GIST és leiomyosarcoma CLDN2-, 3-, 4-, 5- és -7-expressziót is mutatott. Az angiogén tumorok CLDN2- és -5-pozitívak voltak. A CLDN-expressziós mintázat jellemzőnek bizonyult az egyes daganatokra. A GIST és leiomyosarcoma között a hasonló CLDN-mintázat felveti a hisztogénetikai kapcsolatot. Az eltérő dignitású leiomyogén és angiogén daganatok között különbség tehető a CLDN-rajzolat alapján is. Magyar Onkológia 53:377–383, 2009

Kulcsszavak: claudin, Barrett-metaplasia, coeliakia, GIST, immunhisztokémia

Gastrointestinal tumors are highly ranked regarding tumoral mortality worldwide. The development and progression of gastrointestinal (GI) diseases go hand in hand with the changes of tight junctions (TJ). Claudins (CLDN) are the main TJ proteins, showing different expression by the different tissues, with the expressed CLDN profile being representative. I. We explored the changes of CLDN expression in Barrett's esophagus and related adenocarcinoma. CLDN2 and -3 expression in Barrett's esophagus was higher than in normal foveolar epithelium. Adenocarcinoma showed higher CLDN2 and -3 expression compared with normal and Barrett's epithelia. The similar CLDN expression profile of Barrett's esophagus and adenocarcinoma supports their sequential development. II. Gastric intestinal metaplasia showed higher expression of CLDN2, -3 and -4 as compared with normal antral foveolar mucosa. Tumors of small and large bowels exhibited higher CLDN2 expression when compared with normal epithelia. Colorectal adenoma and adenocarcinoma could not be differentiated according to their CLDN profile. Intestinal metaplasias of Barrett's esophagus and stomach show similar CLDN profile to small bowel epithelium. III. Studies on duodenal mucosa in celiac disease in childhood demonstrated CLDN2 and -3 expression to be higher than in normal mucosa. The expression was significantly higher in the distal part of the duodenum samples. This and the serious histological findings suggest that the distal duodenum is more adequate for biopsy testing. IV. Beside the epithelial cells, mesenchymal tumors

Közlésre érkezett:
2009. augusztus 26.

Elfogadva:
2009. szeptember 20.

Levelezési cím:
Dr. Gyórfy Hajnalka
Semmelweis Egyetem
II. sz. Patológiai Intézet
1091 Budapest
Üllői út 93.
Telefon/Fax:
(06-1) 215-6921
E-mail:
hajni@korb2.sote.hu

Témavezető:
Dr. Kiss András

express intercellular junctional proteins. Expression of claudins in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and other mesenchymal neoplasia was also studied. The CLDN profile was found to be representative to the individual tumor. GIST, angiosarcoma, hemangioma, leiomyosarcoma and leiomyoma showed expression of various CLDNs. CLDN2 was detected in all entities. CLDN1, however, was found positive in leiomyosarcoma only. Leiomyoma, on the other hand, expressed only CLDN2. GISTs and leiomyosarcomas showed CLDN2, -3, -4, -5 and -7-expression. The angiogenic tumors revealed CLDN2 and -5 expression. The similar CLDN profile observable in GIST and leiomyosarcoma is suggestive of a histogenetic relationship. Smooth muscle and vessel tumors of different dignity could also be separated from each other based on CLDN profile. Györffy H. Studies on claudins and prognostic factors in gastrointestinal diseases. Hungarian Oncology 53:377–383, 2009

Keywords: claudin, Barrett's esophagus, celiac disease, GIST, immunohistochemistry

BEVEZETÉS

A daganatos halálozások között, sajnálatosan, előkelő helyet foglalnak el a gastrointestinum daganatai a világon, így az első tíz hely között – a vezető tüdő-, ill. emlőrák után – az emésztőrendszeri tumorok állnak. Magyarországon a daganatok incidenciája és mortalitása különösen magas. Évente kb. 75 ezer rosszindulatú daganatot fedeznek fel, amely lényegesen több a nyugat-európai, de a környező országok eseteinél is. 1999 és 2003 között hazánkban évente több mint 33 ezer férfi és nő halálát okozta valamilyen daganatos betegség.

A nyelőcső-adenocarcinoma praemalignus elváltozása a Barrett-metaplasia (BE), morbiditása 18 megbetegedés 100 ezer lakosra vetítve. A nyelőcsőrákok elsősorban férfiakat betegítenek meg, a nemzetközi halálozási statisztikák 11. helyén állnak. A nyelőcső daganatainak mintegy 26%-a adenocarcinoma (ACC), amely a fejlett országokban az utóbbi évtizedekben növekvő incidenciát mutat. A gyomor intestinalis metaplasziája ugyancsak rákelőtti elváltozás. A vékonybelek hámtumorai igen ritkák, csakúgy, mint a gastrointestinum falából kiinduló stromadaganatok (GIST). A coeliakia előfordulása világszinten 1/200–300 fő, hazánkban 1%-ra tehető, mely betegség sok éves fennállása során a béldaganatok, köztük lymphomák előfordulási valószínűségét növelheti.

Az emésztőrendszer betegségeinek kialakulásával, progressziójával a hámsejtek morfológiája mellett a funkció is megváltozik. A kóros folyamatok során a sejtkapcsolatok is megváltoznak, így a tight junction (TJ), ill. az azt felépítő struktúrfehérjék eltérései mutatathatók ki. A TJ gerincét alkotó claudin fehérjék (CLDN) a különféle szövetekben, elsősorban a hámsejtekben, eltérő összetételben és eloszlásban helyezkednek el, ahogy azt az adott sejt elektromos rezisztenciában és paracelluláris transzportban felvállalt szerepe igényli. Jelenleg 24 CLDN-típust különítenek el emberben, de bizonyos élőlényekben akár 50 eltérő CLDN is előfordulhat. A különféle funkciót ellátó hámokban eltérő a TJ CLDN-összetétele. A sejtkapcsoló fehérjéknek igen fontos szerepük van a gyomor-bélrendszer hámsejtjeinek alapvető működésében. Több kutatási eredmény utal arra – más szervrendszerekben is –, hogy bizonyos betegségekben, így daganatokban is különböző típusú CLDN-ok eltérései láthatóak. A CLDN3 és -4 a receptora a *Clostridium perfringens* enterotoxinjának (CPE),

mely a sejtek lízisét okozhatja. Kísérletes eredmények arra engednek következtetni, hogy a CPE a daganatok célzott terápiájában is szerephez juthat, sőt már biztató klinikai kutatások is folynak ez irányban.

Bizonyos betegségek, különösen a daganatok képződésének patomechanizmusa – az intenzív kutatások ellenére – sajnálatos módon számos részletében nem tisztázott. A karcinogenezisben a sejtkapcsolatoknak jelentős szerepe van, melyre számos adat utal. Különösen jelentős lehet a sejtkapcsolatok megváltozása a gastrointestinalis rendszerben, ahol mind a barrierképzésben, mind a permeabilitásban szerephez jutnak.

A lágyrészek szöveteiben, daganataiban a sejtkapcsoló fehérjék kevésbé vizsgáltak. Ereken és érederetű tumorokban kimutatták a CLDN5 jelenlétét. Alacsonyan differenciált sarcomákban a claudin fehérjék jelenlétét az epithelialis irányú differenciációval magyarázták.

Míndezek alapján kezdtük vizsgálni az egyes TJ-fehérjéket, elsősorban a gerincet alkotó claudinok expressziójának változását a gastrointestinalis traktus hám- és mesenchymalis lézióiban.

CÉLKITŰZÉSEK

A gastrintestinalis rendszer sejtkapcsolatainak változása döntő az egyes megbetegedések kialakulásában és progressziójában.

Feltételeztük, hogy a sejtkapcsolatok, kiemelten a tight junction gerincét képező claudinok egyes típusai változó mértékben expresszálódnak az egyes nem daganatos és daganatos gastrointestinalis megbetegedésekben. Hipotézisünk szerint a claudinexpresszió változása összefügg a megbetegedés előrehaladott voltával, így prognosztikus értékű.

A fentiek igazolására a következő kérdésekre kerestük a válaszokat, ill. a következőket terveztük vizsgálni.

Barrett-metaplasia (BE) és adenocarcinoma (ACC)

- A különböző claudinok expressziós mintázatát kívántuk meghatározni és ezek változásait BE-ben és ACC-ben, összehasonlítva azokat a normális foveolaris mirigyhámmal.
- Claudinok expressziójának vizsgálata laphámcarcinomában (SQCC) és normális laphámban (SQ).

*Intestinalis metaplasia (IM),
vékony- és vastagbél-tumorkok*

- Vizsgálni kívántuk, hogy az intestinalis irányú differenciálódásra (kehelysejtek megjelenése: intestinalis metaplasia, bélhám) milyen claudin fehérjék jellegzetesek, ezek milyen változásait találjuk a daganatokban a normális szövetekhez képest.
- A dignitás terén eltérő tumorkok összehasonlítása a vastagbélben.

Coeliakia

- Claudinok expressziójának változása coeliakiában, normális vékonybélhámmal összehasonlítva.
- A vékonybél biopsziás mintavétele helyének optimális meghatározása, a vizsgálati idő és a pszichés terhelés csökkentésére.
- A claudinexpresszió jellegzetességeinek összehasonlítása a duodenum bulbusából és distalis területéről származó minták esetén.
- CD3-pozitív intraepithelialis lymphocyták számának meghatározása.

Gastrointestinalis stromalis tumorkok

- Meg kívántuk határozni, hogy kimutathatóak-e claudinok a GIST-ben. Összehasonlításként bizonyos szövettani, ill. immunhisztokémiai jellemzőkben hasonlító angiosarcomát és leiomyosarcomát, valamint ezek jóindulatú formáit vizsgáltuk.
- Vizsgálni kívántuk, hogy a különböző dignitású daganatok különböznek-e egymástól claudinexpresszió alapján.
- Az Amerikai Hadsereg Patológiai Intézetével (AFIP) kooperációban a duodenalis elhelyezkedésű lágyszövetdaganatokat vizsgáltuk. A korábbi műtéti preparátumoknál nem volt mindig egyértelműen eldönthető, hogy leiomiogén daganatokról vagy valódi GIST-ekről van-e szó. Amióta a tirozinkináz-inhibitor gyógyszer, az Imatinib (Gleevec, Glivec, Novartis, Basel, Svájc) elérhető a terápia részére, fontosnak tartották újraértékelni a már egyszer diagnosztizált gastrointestinalis „stromalis” daganatokat. Az anyaggyűjtésben, -feldolgozásban és az adatok kiértékelésében vettünk részt.
- GIST-ek előfordulási arányának, prognózisának meghatározása.
- c-Kit-mutáció kimutatása.

ANYAG ÉS MÓDSZER*Vizsgálati anyag*

A felhasznált vizsgálati anyagokat az 1. táblázatban összesítettük.

1. táblázat. A felhasznált vizsgálati anyagok

Tanulmány	Minta	Eset-szám	Élet-évek	Átlag-életkor (év)
BE – ACC – SQCC (n=125)	SQCC ^{3,4,6}	25	48–75	60,6
	ACC ^{3,4,6}	25	46–63	52
	BE ^{3,4,6}	25	58–67	63,2
	Kontroll ^{3,4,6}	25+25	15–75	55,4
IM – vékony- és vastagbél-daganatok (n=45)	IM ^{3,4,6}	5	61–84	70,6
	Vékonybél-ACC ^{3,4,6}	5	48–78	60,8
	Vastagbél-ACC ^{3,4,6}	15	51–80	65,3
	Vastagbél-adenoma ^{3,4,6}	20	49–84	66,7
Coeliakia (n=47)	Coeliakia ⁵	33	2–17	6,4
	Kontroll	14	17–29	22,6
GIST, AS, LS (n=35)	GIST ^{1,2}	13	46–80	67,6
	LS ¹	12	27–49	48,2
	AS ¹	10	27–95	65,8
GIST (AFIP) (n=156)	GIST ⁷	156	10–88	56

SQCC=laphámcarcinoma, ACC=adenocarcinoma, BE=Barrett-metaplasia, IM=intestinalis metaplasia, GIST=gastrointestinalis stromalis tumor, LS=leiomyosarcoma, AS= angiosarcoma. Mintáinkat a SE II. Patológiai Intézetének archívuma, a Országos Onkológiai Intézet¹ és az Állami Egészségügyi Központ Patológiai Osztálya² szolgáltatta. Együttműködő partnereink a SE I. Belgyógyászati Klinika³, I. Sebészeti Klinika⁴, I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika⁵, Ferencvárosi Egészségügyi Központ⁶ és az AFIP Lágyszövetpatológiai Osztálya⁷ voltak.

*Módszerek**Hisztológia, hisztokémia*

Az eltávolított szövetmintákat 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk 24 órán át, majd paraffinba ágyasztuk. A 3–4 µm vastagságú metszeteken haematoxylin-eosin (HE) festést, és bizonyos esetekben (BE és IM) alciankek-perjódsv-Schiff (PAS) reakciót végeztünk. GIST-eknél az AFIP szövettani laboratóriumában elkészült HE metszeteken a morfológia, kiterjedés, metasztatizáció mellett 50 nagy nagyítású látótérben (HPF) a mitózisok számát értékelték. A tumorméret és a mitózisok száma alapján 6 prognosztikai csoportba kerültek a GIST-ek.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra paraffinos mintákat használtunk. Az CLDN2, -4 és -5 elleni antitestek monoklonálisak, a CLDN1, -3 és -7 elleniek poliklonálisak, nyúlserumból kerültek izolálásra. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat 3–5 µm vas-

tagságú metszeteken végeztük. Antigénfeltárás után a metszeteket különböző hígítású elsődleges antitesttel inkubáltuk. A reakció láthatóvá tétele standard avidin-biotin peroxidáz technikán alapult (ABC rendszer), kromogénként diaminobenzidint (DAB) használtunk. Valamennyi immunhisztokémiai vizsgálatot a Ventana ES immunfestő automatájával végeztük (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA). A pozitív sejteket 10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben számoltuk, 100–100 sejtet vizsgáltunk 20x-os nagyítású objektívvel. A standard értékeléshez pontrendszert készítettünk: 5=80–100%, 4=60–80%, 3=40–60%, 2=20–40%, 1=5–20%, 0=<5%-nyi sejtet találtunk pozitívnak.

A CD3 elleni antitestreakció esetén az antigénfeltárás megegyezik a fentebb leírtakkal. A pozitív sejtek százalékos arányát határoztuk meg három látótérben, ezeknek számtani átlagát vettük számításba. Az értékelés a bolyhok felszínén látható sejtek között történt, olyan módon, hogy a bolyhokat fordított „U”-ként felfogva, a számolást csupán az összekötő száron végeztük.

Statisztikai értékelés: Shapiro-Wilk W-teszt, Mann-Whitney féle U-teszt, Kruskal-Wallis teszt.

A CD117 (c-Kit) kimutatásánál a feltárás után az elsődleges antitest hígítása 1:600 volt. A láthatóvá tétel a claudinoknál részletezettekkel egyezik. Csak olyan GIST-eket vettünk figyelembe, ahol a c-Kit-reakció pozitív volt. A jelen vizsgálatban a leiomyosarcoma és angiosarcoma c-Kit immunhisztokémiai vizsgálata történt meg.

GIST-eknél az AFIP laboratóriumában az immunhisztokémiai vizsgálat 113 GIST-ből és 10 simaizom-daganatból készült. c-Kit (CD117), CD34, α -simaizomaktin, desmin, CK7, CK18, CK19, neurofilament 68 (NF68), gliális fibrillaris savanyú protein (GFAP) és S100 reakciók kerültek elvégzésre. A statisztikai analízis a Statview statistical software (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) segítségével készült.

Immunfluoreszcens vizsgálat

GIST, AS, LS esetén a reakció helyének pontos megjelenítésére CLDN2 és CLDN5 immunfluoreszcens vizsgálatot végeztünk paraffinos blokkokból származó 10 μ m vastag metszeteken. Az antigénfeltárás a fentebb leírtakkal egyezik meg. A metszeteket az elsődleges monoklonális antitesttel inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként IgG-konjugált, anti-egér Alexafluor 488-at használtunk. A magok háttérfestését és fedését DAPI-t tartalmazó fedő médiummal végeztük. Az így elkészített lemezeket lézercanoning konfokális mikroszkóppal értékeltük (Nikon Eclipse E800 mikroszkóp; BioRad Radiance 100 Laser scanning System és BioRad Lasersharp 2000 szoftver).

mRNS-expresszió vizsgálata

BE, ACC és FOV esetén CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN5 és GAPDH mRNS kimutatása valós idejű RT-PCR vizsgálattal: 10–10 paraffinba ágyazott ACC-, BE- és FOV-mintát választottunk ki. A formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákból a teljes RNS izolálása a High Pure RNA Paraffin Kit-tel (Roche, Indianapolis, IN, USA) történt. A kivágott minták méretétől függően 2–5 darab 5 μ m vastag metszeteket tettünk Eppendorf-csőbe minden egyes blokkból. BE és FOV esetében mikrodisszekció is történt a specializált intestinalis metaplasia ill. a hengerhámsejtek pontosabb kimutatására. 16 órán át Proteinase K-val emésztettük a mintákat. Valamennyi tisztítás a gyártói protokoll szerint zajlott. Felhasználásig az RNS-t mínusz 80°C-on tároltuk. Ahhoz, hogy a paraffinos mintákon megbízhatóan PCR-vizsgálatokat végezzünk, egy korábbi vizsgálat során 6 különböző hosszúságú amplikont elemeztünk 6 primerpár segítségével. Az optimális méret 100–200 bázispár között mozgott.

A teljes RNS-mennyiséget (500 ng) 42°C-on 50 perc alatt irtuk át cDNS-sé random hexamereket felhasználva a MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével, RNase-inhibitor (Applied Biosystems) jelenlétében. A kvantitatív valós idejű RT-PCR reakciót 2 μ l cDNS-templáttal (teljes volumen 25 μ l) végeztük ABI Prism 7000 szekvenciadetektáló rendszerrel (Applied Biosystems). Az összes PCR SYBRGreen alapú Mastermix-ben (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) zajlott. A primerszekvenciákat a 2. táblázatban részleteztük.

A munkamenet a következő volt: Kezdeti denaturálás 95 °C – 2'; denaturálás 95 °C – 20"; primerkötődés 63 °C – 30"; szintézis 72 °C – 60". Az utóbbi három folyamatot 40-szer ismételtük. A termék homogenitásának ellenőrzésére olvadáspont-analízist végeztünk 55–95 °C-on, mely a termékek homogenitását és a primer specifikus kötődését is alátámasztotta. A mérések 96-os plate-ekben, duplikátumokban történtek a kontroll génekkel párhuzamosan futtatott reakcióban. A PCR-termékek méretének ellenőrzésére a reakciótermékek-ből 10 μ l-t futtattunk 2%-os agaróz gélen, majd etidiumbromidos festéssel tettük láthatóvá az amplikonokat. A valós idejű PCR-adatok értékelése és statisztikai elemzése REST expressziós szoftverrel készült (www.wzwtum.de/gene-quantification), a GAPDH és β -actin volt a referenciagén.

A GIST-angiosarcoma-leiomyosarcoma mintáinkon az RT-PCR hasonlóan zajlott; CLDN2 és a CLDN5 mRNS-expresszióját vizsgáltuk. Referenciagénként GAPDH-t (amplikonhossz 97) használtunk. A primer-szekvenciák a 2. táblázatban láthatóak.

GIST (AFIP): Molekuláris genetikai vizsgálat történt az AFIP laboratóriumában 30 olyan esetből, ahol a c-Kit

2. táblázat. Primerfrekvenciák

	Forward	Reverse
CLDN2 GI:9966780	5'-CTCCCTGGCCTGCATTATCTC-3' (273-293)	5'-ACCTGCTACCGCCACTCTGT-3' (344-363)
CLDN3 GI:21536298	5'-CTGCTCTGCTGCTCGTGTC-3' (732-751)	5'-TTAGACGTAGTCCTGCGTCGTAG-3' (836-860)
CLDN4 GI:14790131	5'-GGCTGCTTTGCTGCAACTGTC-3' (741-761)	5'-GAGCCGTGGCACCTTACACG-3' (829-848)
CLDN5 GI: 38570041	5'-TTCCTGAAGTGGTGTCACCTGAAC-3' (93-116)	5'-TGGCAGCTCTCAATCTTACAG-3' (169-190)
GAPDH GI:7669491	5' -CATTGACCTCAACTACATGG-3' (186-205)	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' (287-306)
β -actin GI:15928802	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3' (1031-1048)	5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3' (1157-1174)

CLDN=claudin, GAPDH= glicerilaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

(CD117) reakció pozitív volt. A c-Kit exon 9, 11, 13 és 17 mutációk kimutatása történt PCR-reakcióval és direkt szekvenálással.

EREDMÉNYEK

Barrett-metaplasia

A BE claudinexpressziós mintázata a kontrollként alkalmazott foveolaris hámtól (FOV) eltér, mivel a FOV sejtei nem adtak CLDN2 és -3 immunhisztokémiai reakciót. A BE mRNS-szinten tartalmazott CLDN2-t, mely fehérjeszinten nem volt kimutatható. A CLDN3 már fehérjeszinten is detektálható volt. A nyelőcső ACC-ja viszont mind CLDN2-t, mind CLDN3-at expresszált fehérjeszinten is. A CLDN1 és -7 immunhisztokémiai reakció pozitív volt, de nem mutatott szignifikáns különbséget a FOV, BE és ACC között.

A laphámszöveteket összehasonlítva a laphámcarcinoma szignifikánsan magasabb CLDN1-expressziót mutatott. CLDN2- és -3-expresszió alig, ill. nem mutatható ki; a CLDN4 és -7 azonban kifejezetten expresszáldott, de nem volt statisztikai különbség a normális laphám és a carcinoma között.

Intestinalis metaplasia (IM), vékony- és vastagbél-tumороk

A CLDN2 mutatta a legmarkánsabb eredményeket. Az IM, a vékonybél kontroll-szövetek – a korábban vizsgált BE-hez hasonlóan – alacsony mértékben expresszáltak CLDN2-t, míg a vékonybél-ACC-k, ill. a vastagbél daganatai esetén kifejezett CLDN2-expressziót találtunk. A vastagbél normális háma nagyobb mennyiségű CLDN2-t és 3-at expresszál, mint az IM, ill. a vékonybél normális háma, de nem olyan mértékben, mint a bél-tumороk. A CLDN3-eredmények követik a CLDN2-vel találtakat. CLDN4, -7 esetén nem volt szignifikáns különbség a vizsgált minták közt. Az antrum FOV

pedig – a már korábban értékelt – cardialis foveolaris hámmal megegyező claudinmintázatot mutatott.

A normális vékonybélhámmal összehasonlítva a vékonybél-adenocarcinómát, fokozott CLDN2- és -3-expressziót kaptunk. A vastagbél-adenoma és -adenocarcinoma csak CLDN2-expresszióban mutatott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest. A vastagbél-adenoma és az ACC-k között nem tehető különbség a claudinexpressziójuk alapján.

Coeliakia

A claudinok expressziós mintázata eltérő volt a coeliakiában a kontroll szövetekhez képest. Szignifikánsan emelkedett CLDN2- és CLDN3-expressziót találtunk coeliakiában, míg a CLDN4 nem változott érdemben.

Eredményeinket a lokalizáció szempontjából kiértékelve azt találtuk, hogy a distalis duodenum a megfelelő hely a biopsziás mintavételre.

A CLDN2 és -3 valamennyi coeliakiás esetben a distalis duodenumban mutatott szignifikánsan fokozott expressziót a kontroll esetekhez hasonlóan.

A CD3-pozitív intraepithelialis lymphocyták (IEL) számának szignifikáns emelkedését találtuk coeliakiás betegekben. Az intraepithelialis lymphocyták számát tekintve szignifikáns eltérést nem találtunk a két mintvételi hely között, de a lymphocyták számának emelkedő tendenciáját észleltük a distalis duodenumban.

Gastrointestinalis stromalis tumorok

Az összehasonlított lágyszövetdaganatok többféle claudint expresszáltak. CLDN1 kizárólag leiomyosarcomában volt kimutatható. CLDN2 valamennyi tumorban megjelent. A leiomyomák csupán CLDN2-t expresszálnak.

CLDN5-expresszió legkifejezettebben az érdaganatokban jelent meg, szignifikáns különbséget találtunk az angiosarcoma és leiomyosarcoma, ill. GIST között. A leiomyosarcomában és GIST-ben CLDN2, -3, -4, -5 és -7 is előfordult. CLDN2 immunfluoreszcens reakcióval intracelluláris elhelyezkedést mutattunk ki a GIST-ben és leiomyosarcomában, de angiosarcomában a granuláris jelleg mellett a plazmamembrán közelébe lokalizálódó reakciót kaptunk. CLDN5-reakció minden tumorban a sejmembránhoz kötött, lineáris volt. CLDN2 és -5 esetében mRNS-expressziót is kimutattunk.

A különböző dignitású daganatoknál a leiomiogén tumorok mutattak eltérést, mely szerint a jóindulatú formában csupán CLDN2-t tudtunk kimutatni, míg a sarcoma CLDN1, -2, -3, -4, -5 és -7 expressziót is mutat.

Az angiogén daganatok dignitástól függetlenül CLDN2-t és -5-öt expresszáltak. Az angiosarcomában a CLDN5 erőteljes expressziót mutatott, a haemangiómában alacsonyabbat, de nem szignifikánsan különbözött. A CLDN2-expresszió viszont az angiosarcomában volt gyengébb, mint a haemangiómában.

GIST (AFIP)

A vizsgált 167 tumor közül 156 GIST-nek bizonyult a c-Kit-reakció pozitívítására alapozva. A méreteket és az osztódási potenciált figyelembe véve rosszabb prognózisúak, így kedvezőtlen túlélési adatokat mutatnak azok a stromatumorok, ahol a méretek nagyobbak és 5/50 hpf (=nagy nagyítású látótér) feletti osztódó alakot találtunk. Szignifikáns rizikófaktor a fentiek mellett a koagulációs nekrozis, az epitheloid sejtalakok, a hyalinus ér-occlusio és a mucosa infiltrációja is.

Az értékelt GIST-ek 43%-ában c-Kit – exon 9 és 11 – mutációt igazoltak az AFIP laboratóriumában.

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Barrett-metaplasia – adenocarcinoma

- A normális foveolaris hámmhoz képest a Barrett-metaplasia fokozott CLDN2- és CLDN3-expressziót mutatott. A Barrett-metaplasziában a CLDN2 csupán mRNS-szinten expresszáldott.
- A nyelőcső adenocarcinómája mind a foveolaris hámmhoz, mind a Barrett-metaplasziához képest emelkedett CLDN2-t és CLDN3-at expresszált fehérje- és mRNS-szinten.

Coeliakia

- Coeliakiás betegek vékonybélhámjában, melyben gyulladáshoz és regenerációs kórfolyamatok is jelen vannak, a kontroll szövetekhez képest szignifikánsan emelkedett CLDN2-expressziót detektáltunk.
- Immunhisztokémiai eredményeink alapján meghatároztuk, hogy a distalis duodenumban szignifi-

kánsan magasabb a CLDN2 és -3 expressziója, mint a bulbusban. Ez arra enged következtetni, hogy a vékonybél-boholyatrophikiában a distalis duodenum a megfelelőbb célpont a mintavételezésre, a biztos diagnózis és súlyosság meghatározására.

Gastrointestinalis stromalis tumorok

- A vizsgált lágyrészdaganatok több claudint változó erősséggel expresszálnak.
- CLDN2 a jó- és rosszindulatú ér- és simaizom-tumorokban és a GIST-ben is jelen van.
- A GIST-ekben CLDN2, -3, -4, -5 és -7 is előfordult.
- Az angiogén tumorok dignitástól függetlenül CLDN2-t és -5-öt expresszálnak.
- Leiomyómában csupán CLDN2-t tudtunk kimutatni, a leiomyosarcoma ellenben CLDN1, -2, -3, -4, -5 és -7-et is expresszált, ha kis mennyiségben is.
- Immunfluoreszcens reakcióval a CLDN2 intracelluláris elhelyezkedését mutattuk ki a GIST-ben és leiomyosarcomában, de angiosarcomában a granuláris jelleg mellett a plazmamembrán közelébe lokalizálódó reakciót kaptunk. A CLDN5-reakció minden tumorban a sejmembránhoz kötött, lineáris volt.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A Barrett-metaplasziában és nyelőcső-adenocarcinómában – elsőként – kimutatott fokozott CLDN2 mRNS- és CLDN3 fehérje- és mRNS-expresszió a két elváltozás közötti összefüggésről szóló elméletet támasztja alá. Az eredmények demonstrálják, hogy a Barrett-metaplasia és a foveolaris hám eltérései a TJ molekuláris megváltozásával járnak és feltételezhetően a hám dysplasiás, daganatos elváltozásaiban szerepük van.
- Elsőként igazoltuk, hogy coeliakiában a CLDN2 expressziója fokozott a normális hámmhoz képest. A distalis duodenumban szignifikánsan fokozottabbak a CLDN2 és -3 expressziójának eltérései a bulbushoz és a normális kontrollhoz képest. Ennek és a distalis duodenumban a hámon belüli lymphocyták számának emelkedő tendenciája alapján biopszia vételének optimális helye is a mély duodenumban jelölhető ki.
- Az antrum és a korábban vizsgált cardia foveolaris hámmjának CLDN-mintázata hasonló, nem expresszált CLDN2-t. A gyomor intestinalis metaplasziája és a vékonybél hámja hasonlóan viselkedik a Barrett-oesophagus intestinalis metaplasziájához, miszerint a foveolaris hámmhoz képest fokozottan expresszált CLDN2-t és -3-at. Az intestinalis metaplasziákban és a vékonybél normális hámmjában észlelt claudin-expressziós jellegzetességek felvetik a CLDN2 és -3 szerepét az intestinalis irányú differenciálódásban.
- A lágyrésztumorok és GIST többféle claudin fehérjét tartalmaznak, és e claudinrajzolat jellemző a vizsgált lágyrésztumorokra. A GIST és LS CLDN-expressziós

mintázatának hasonlósága a két daganat közötti hisztogenetikai kapcsolatot veti fel. A különböző dignitású angiogén és leiomiogén daganatok között különbség tehető a claudinexpressziós mintázatuk alapján is.

IRODALOM

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. Gyórfy H, Holczbauer Á, Nagy P, et al. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch* 447:961–968, 2005
2. Miettinen M, Kopczynski J, Markhlouf HR, et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 27:625–641, 2003
3. Hritz I, Gyórfy H, Molnar B, et al. Increased p53 expression in the malignant transformation of Barrett's esophagus is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment. *Pathol Oncol Res* 15:183–192, 2007
4. Nagy Szakal D, Gyórfy H, Tokes AM, et al. Claudin 2, 3 és 4 expressziója coeliakiás gyermekek proximális és disztális duodenumában. *Gyermekgyógyászat* 59:272–276, 2008
5. Buzás Gy, Gyórfy H, Csörget T. Barrett-nyelőcső és colonadenoma kapcsolata. *Orvosi Hetilap* 143:1423–1425, 2002

Doktori értekezéstől független közlemények

1. Buzás GyM, Illyés Gy, Gyórfy H, et al. A Controloc gyorsesztt és a polimeráz láncreakció értékelése a *Helicobacter pylori* fertőzés eradikáció előtti diagnózisában. *Magyar Belorvosi Archivum* 53:156–160, 2000
2. Buzas GM, Gyórfy H, Szeles I, Szentmihályi A. Second-line and third-line trial for *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcers: a prospective, crossover, controlled study. *Curr Ther Res* 65:13–25, 2004
3. Gyórfy H, Zsirka-Klein A, Gyökeres T, et al. Pancreas pseudocyst vagy metasztázis? *Orvosi Hetilap* 146:2223–2226, 2005
4. Lukovich P, Papp A, Fuszek P, et al. A duodenum Crohn-betegsége, klinikai jelek, diagnosztika, gyógyszeres és sebészi kezelés. *Orvosi Hetilap* 149:505–508, 2008
5. Pintér VP, Gyórfy H, Arató A, et al. Eosinophil és allergiás colitises csecsemők laboratóriumi és kolonoszkópiás jellemzői. *Gyermekgyógyászat* 59:291–295, 2008
6. Németh Z, Szász AM, Tátrai P, et al. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J Histochem Cytochem* 57:113–121, 2009
7. Németh Z, Szász AM, Somorác A, et al. Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers. *Pathol Oncol Res* 2009 Feb 2 [Epub ahead of print]