

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós immunhisztokémiai
vizsgálatok kutyák daganatos szöveteiben
PhD-értekezés**

Készítette:

Dr. Jakab Csaba

Budapest

2011.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
1. Összefoglalás.....	6
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	8
4. Célkitűzések.....	16
5. Anyag és módszer.....	17
5.1. Pozitív kontrollok	17
5.1.1. Külső human pozitív kontrollok.....	17
5.1.2. Belső pozitív kontrollok	18
5.2. Tumordiagnosztika	19
5.2.1. Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában	19
5.2.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	21
5.2.3. Lép minták vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel	22
5.2.4. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban	22
5.2.5. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban	23
5.3. Tumorprogressio.....	25
5.3.1 Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban	25
5.3.2. Szöveti multiblokk technika / Tissue Micro-Array	27
5.3.3. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	29
5.3.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban.....	30
5.3.5. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganataiban.....	30
5.3.6. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban.....	31
5.4. Angiogenesis vizsgálatok.....	31
5.4.1. Claudin-5 alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban.....	31
5.4.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban	32
5.4.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában	32
6. Eredmények	34
6.1. Pozitív kontrollok.....	34
6.1.1. Külső human pozitív kontrollok.....	34
6.1.2. Belső pozitív kontrollok	35

6.2. Tumordiagnosztika.....	37
6.2.1. Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában.....	37
6.2.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	41
6.2.3. Lépminták vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel	42
6.2.4. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban	46
6.2.5. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban	49
6.3. Tumorprogressio.....	55
6.3.1. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban	55
6.3.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	58
6.3.3. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban.....	59
6.3.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganataiban	63
6.3.5. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban.....	67
6.4. Angiogenesis vizsgálatok.....	72
6.4.1. Claudin-5 alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban	72
6.4.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban	75
6.4.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában	76
7. Következtetések	79
7.1. Tumordiagnosztika.....	79
7.1.1. Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában.....	79
7.1.2. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban	83
7.1.3. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban	84
7.2. Tumorprogressio.....	89
7.2.1. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban	90
7.2.2. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban	94
7.2.3. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganataiban.....	96
7.2.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban.....	98

7.3. Angiogenesis vizsgálatok.....	100
7.3.1. Claudin-5 alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban.....	102
7.3.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban	104
7.3.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában	106
8. Új tudományos eredmények.....	109
9. Irodalom	110
10. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	123
10.1. A témában megjelent tudományos publikációk.....	123
10.2. A témában tartott előadások	126
10.3. A témában tartott posztterek nemzetközi konferenciákon	126
11. Egyéb közlemények referált lapokban	127
12. Köszönetnyilvánítás.....	131

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Rusvai Miklós témavezető
egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi
Állatorvostani Tanszék

Prof. Dr. Vetési Ferenc
nyugalmazott egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi
Állatorvostani Tanszék

Dr. Vajdovich Péter
egyetemi docens, PhD
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Készült 8 példányban. Ez az 1. számú példány.

.....
dr. Jakab Csaba

Rövidítések

AFP	Alpha-foetoprotein
AGF	Angiofibroma
cAGF	Kutyák angiofibromája
ALM	Angioleiomyoma
cALM	Kutyák angioleiomyomája
ALMS	Angioleiomyosarcoma
cALMS	Kutyák angioleiomyosarcomája
BPNST	Benign peripheral nerve sheath tumor; Jóindulatú perifériás ideghüvely daganat
cBPNST	Canine benign peripheral nerve sheath tumor; Kutyák jóindulatú perifériás ideghüvely daganata
CAD	Cholangiocellularis adenoma
CEA	Carcinoembrionalis antigén
CCH	Cholangiocellularis hyperplasia
CK 7	Cytokeratin 7
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
dCCC	Differenciált cholangiocellularis carcinoma
dHCC	Differenciált hepatocellularis carcinoma
ECM	Extracellularis matrix
EMA	Epithelialis membrán antigén
EMT	Epithelialis mesenchymalis transitio
FA	Fibroadenoma
FS	Fibrosarcoma
HA	Haemangioma
HAD	Hepatocellularis adenoma
hCCC	Human cholangiocellularis carcinoma
HE	Haematoxylin és eosin
Hep Par 1	Hepatocyte paraffin 1
hHCC	Human hepatocellularis carcinoma
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HNH	Hepatocellularis nodularis hyperplasia
HP	Haemangiopericytoma (Pericytoma)
cHP	Kutyák haemangiopericytomája
HSA	Haemangiosarcoma
Ig	Immunglobulin
IH	Immunhisztokémia

LH	Lymphoid hyperplasia
cLGCC	Canine low grade colorectal adenocarcinoma
MPC	Myopericytoma
cMPC	Kutyák myopericytomája
MPNST	Malignat peripheral nerve sheath tumor; Rosszindulatú perifériás ideghüvely daganat
cMPNST	Canine malignant peripheral nerve sheath tumor; Kutyák rosszindulatú perifériás ideghüvely daganata
MVD	Microvessel density; Mikroérsűrűség
nCCC	Differenciálatlan cholangiocellularis carcinoma
nHCC	Differenciálatlan hepatocellularis carcinoma
NSE	Neuron specifikus enoláz
PBS	Foszfáttal pufferolt sóoldat
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule; CD31
cPNST	Canine peripheral nerve sheath tumor
PWT	Perivascular wall tumor; Perivascularis érfal tumor
α-SMA	α -Smooth muscle actin
SCC	Squamous cell carcinoma; Laphámrák
cSCC	Canine squamous cell carcinoma; Kutyák laphámrákja
TDLU	Terminal ductulo-lobular unit
TIA	Tumor-induced angiogenesis; Daganat-indukálta érújdonképződés
TJ	Tight junction
TMA	Tissue Micro-Array; Szöveti mikrosorozat
T/NK	T-lymphocyta/natural killer sejt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand faktor

1. Összefoglalás

A *claudinok* 17-27 kDa molekulatömegű, tight junction (TJ) membránproteinek, amelyeknek szerepük van a hámsejtek, az endothelsejtek és a perineurialis epitheloid sejtek fiziológiás, ill. patológiás paracellularis transzport folyamatainak szabályozásában, a luminalis barrier és a sejten belüli jelátviteli folyamatok fenntartásában. A claudinok és az egyéb TJ strukturális elemek szabályozzák a makromolekulák, fehérjék, lipidek, ionok, víz, növekedési faktorok ún. paracellularis transzportját, ill. permeabilitását. A humanizált anti-claudin-1, -3, -4, -5 és -7 ellenanyagokra alapozott, daganatpatológiai, indirekt immunhisztokémiai vizsgálataink három irányba bontakoztak ki, 1. *Tumordiagnosztikai*-; 2. *Tumorprogressiós*-; és 3. *Neovascularisatiós* vizsgálatok. Munkánk során, a SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék konvencionális (hagyományos) paraffinos blokkokba ágyazott, archivált, kutyákból származó daganatos szövetmintáit használtuk fel. Az immunhisztokémiai módszer kivitelezése a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar II. számú Pathológiai Intézetének Immunhisztokémiai Laboratóriumában történt.

A tumordiagnosztikai vizsgálataink során, a daganatpatológiában jól hasznosítható, immunhisztokémiai paneleket dolgoztunk ki, a kutyák haemangiosarcomájának, az orsósejtes- és a cholangiocellularis daganatainak eredményes, megbízható differenciál diagnosztikájához. Tumorprogressiós tanulmányaink során megvizsgáltuk a claudin-1, -3, -4, -5 és -7 integráns membránfehérjék szerepét a kutyák emlőmirigy daganatainak, low grade colorectalis carcinomájának, a hepatoid-sejtes neoplasiáinak és a pancreas exocrin acinaris sejtes carcinomáinak kialakulásában. A neovascularisatiós vizsgálatainkat egy új endothel markerre, a claudin-5 kimutatására alapoztuk. Segítségével tanulmányoztuk a kutyák különböző emlőmirigy daganatainak mikroérsűrűségét, a kutyák bőrében kialakult idült gyulladások indukálta érújdonképződést és a *v. portae* keringési rendellenességeihez társult májbeli, portalis arteriola hyperplasiákat. Eredményeinket lektorált, impakt faktorral rendelkező, hazai és külföldi tudományos folyóiratokban publikáltuk.

2. Bevezetés

Az állatorvosi daganatpatológia, illetve diagnosztika makroszkópos és mikroszkópos metodikai skáláját, az utóbbi évtizedekben, egy új molekuláris patológiai módszer, az immunhisztokémia egészítette ki. Az eljárás az immunológiából jól ismert antigén-antitest reakción alapszik. Az immunhisztokémia során a különböző megbetegedések kórisméjének pontos meghatározása céljából strukturális, vagy funkcionális fehérjéket, glikoproteineket, vagy összetett szénhidrátokat, lipideket mutatunk ki a sejtekben, vagy az extracelluláris térben. E molekuláris patológiai eljárás mindemellett alkalmas a kórfolyamat kiterjedtségének a meghatározására, továbbá a kóros sejtek olyan biológiai paramétereinek megítélésére, amelyek a várható kórlefolyással, a megbetegedés kimenetelével állnak szoros kapcsolatban és vizsgálatukkal következtetések vonhatók le a prognózis, a sejtek és szövetek jellemzése céljából.

A többsejtű élő szervezetek összehangolt, differenciált működésű sejtársadalomnak tekinthetők, amelyben a sejteknek, a különböző felépítésű és funkciójú szövetek, szervek felépítéséhez össze kell kapcsolódnuk közvetlenül (sejt-sejt kapcsolat) vagy közvetve [sejt-extracelluláris matrix (ECM) kapcsolat]. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során az ép - elsősorban a hám - szövetekben észlelt, sejt-sejt, illetve sejt-ECM kapcsolatok kialakítására specializálódott struktúrákat, funkcionálisan három csoportra osztjuk fel: 1. **elzáró kapcsolatok** (tight junction, zonula occludens), 2. **lehorgonyzó kapcsolatok** (zonula adherens, focalis adhesio, desmosoma, hemidesmosoma), 3. **kommunikációs kapcsolatok** (gap junction, kémiai synapsis).

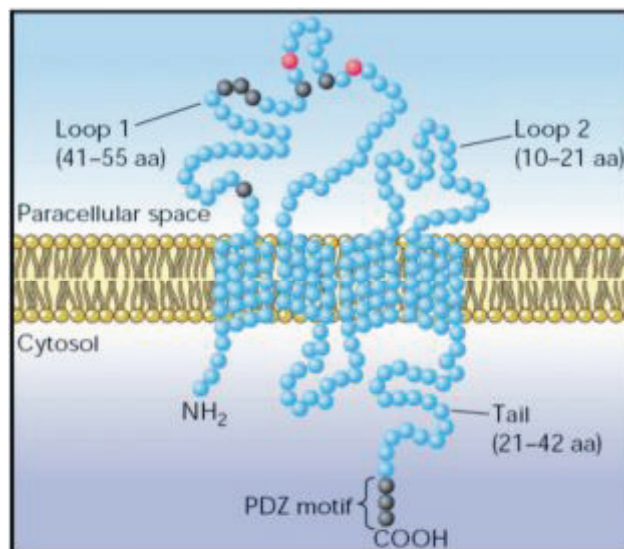
A hámszövetekre jellemző, hogy a hámsejtek által alkotott összefüggő sejtpopuláció, mint biológiai barrier megakadályozza az epithelsejtek két oldalán (apicalis, basolateralis oldalakon) helyeződő molekulák szabad diffúzióját. A gerincesekben erre a sejtfunkcióra az intercelluláris szoros illeszkedések, az ún. **tight junction (TJ)** struktúrák specializálódtak, amelyek a lumen felé tekintő, apicalis felszín közelében teljesen körülölelik a sejtet. A TJ proteineket két nagy csoportra osztjuk fel, amelyek közül az egyik csoportot az **integráns membránfehérjék** képezik. Ide soroljuk a **claudinokat**, az **occludinokat** és a **junctionalis adhesiós molekulákat**. A másik csoportot a **perifériás membránfehérjék** képezik, amelyek az integráns membránfehérjéket kapcsolják a sejtvázkötő elemekhez. Ebbe a csoportba tartoznak a **zonula occludens fehérjék** és az **AF-6** (afadin).

A **claudinok** 17-27 kDa molekulatömegű TJ membránfehérjék, amelyeknek fontos szerepük van a hámsejtek és endothelsejtek, a perineurialis epitheloid sejtek, élettani, illetve kóros paracelluláris transzport folyamataiban, továbbá a luminalis barrier és a sejten belüli jelátviteli folyamatok fenntartásában. A claudinok és az egyéb TJ strukturális elemek szabályozzák a makromolekulák, fehérjék, lipidek, ionok, víz, növekedési faktorok ún. paracelluláris transzportját, illetve permeabilitását. Alapvető feladatuk, hogy megőrizzék az

apicalis és a basolateralis membrán molekuláris összetételének különbségeit, a membránban a transzportfehérjék aszimmetrikus eloszlását, amely alapvető a hámsejtek funkciójához. Tehát ezek a molekulák biztosítják az epithelialis sejtek fiziológias polaritását. Jelenleg a human vizsgálatok 24 claudin típust különítenek el. A claudin molekuláknak szignifikáns szerepük van a TJ struktúrák kialakításában, illetve TJ funkciók biztosításában. A claudinok konzervatív fehérjék, amelyek négy transzmembrán (a sejtmembránon áthatoló) doménből épülnek fel, cytoplasmaticus amino- (N-terminalis) és karboxil- (C-terminalis) végekkel, illetve két hidrofób extracellularis hurokkal. A claudinok alkothatnak homopolimert, vagy heteropolimert, és ezeken belül lehetséges homofil és heterofil kapcsolódás.

3. Irodalmi áttekintés

A claudin elnevezést először japán kutatók, *Mikio Furuse* és *Shoichiro Tsukita* (1998, *Kyoto University*) használták. A claudin szó a latin „claudere” szóból származik, amelynek jelentése „zárni”, ezzel is utalva az intercellularis barrier funkcióra (Furuse et al., 1998) (**1. ábra**). *Saitou* és *mtsai* vizsgálataik során 1998-ban figyelték meg, hogy az occludin-deficiens egér embrionalis őssejtek képesek egészséges egérembriót formálni, az embionalis sejtek közötti, jól fejlett TJ-struktúrákkal. Ekkor merült fel a gondolat, hogy az occludinon kívül léteznek egyéb TJ integráns membrán fehérjék is, amelyek képesek az occludin nélkül TJ kialakítására (Saitou et al., 1998).



1. **ábra.** A claudin molekula szerkezete (http://fmp-berlin.info/schmieder/research/tight_junctions.htm).

A molekuláris felfedezést követő human kutatások a claudin fehérjék számos szerepét bizonyították a különböző élettani és patológiai folyamatokban. Az 1998-as évtől

napjainkig, az impakt faktorra rendelkező szaklapokban publikált, claudinokkal kapcsolatos új eredményeket bemutató cikkek száma valamivel több, mint kétezer. A szakcikkek kb. 90 %-a human vizsgálati eredményeket közöl, csak kisebb része érinti az állatorvosi kutatásokat. Ez utóbbi komoly, motiváló tényező, kihívás, hiszen számos új eredmény lehetősége rejlik a különböző állatfajokban tapasztalható, az azonos biológiai folyamatok claudinok által szabályozott lezajlásának összehasonlításában, illetve a human megfigyelésekkel való összevetésükben. A comparativ jellegű, claudin alapú vizsgálatokra, az emberrel azonos környezetben élő állatok, a kutya, a macska szervezetében lezajló kóros folyamatok, pl. carcinogenesis, gyulladás, kifejezetten alkalmasnak bizonyulhatnak a hasonló carcinogen hatásokkal terhelt közös környezet miatt (Karen et al., 2005; Mullin, 1997).

A claudinmolekulák kulcsfontosságú komponensei az epithelialis, a mesothelialis, az endothelialis és a perineuralis sejtek TJ sejtkapcsoló struktúráinak. A víz, a benne oldott anyagok, az ionok, a sejtnövekedést és sejtsztódást befolyásoló növekedési faktorok paracellularis áramlásának szabályozásában játszanak szerepet (Tsukita és Furuse, 2002). A TJ sejtkapcsoló szerkezetekben ezek a claudin fehérjék homofil és heterofil kapcsolatokat képesek kialakítani egymással (homo- és heterodimerizáció) (Furuse et al. 1999; 2002). Ezeknek a szoros sejtkapcsolódást biztosító fehérjéknek további fontos szerepük van a különböző biológiai folyamatokban, így az embryogenesisben, a szöveti remodelling folyamatokban és a daganatképződésben (tumorigenesisben). A sejtpolaritás és a paracellularis transzport folyamatok megóvása, illetve megőrzése miatt feltételezik, hogy ezek a claudinmolekulák tumorsuppressiv feladatot látnak el a daganatok kialakulásának megelőzésében (Karen et al., 2005). Egyes feltételezések szerint a carcinogenesis során a sejtpolaritás elvesztését a különböző növekedési faktorok kóros paracellularis transzportja, illetve kóros beáramlása követi, amely auto- és paracrin serkentés révén idéz elő daganatképződést (Mullin, 1997). A claudinok és más tight junction fehérjék elvesztése a sejtheadhesiók (sejtkapcsolatok) fellazulásához, megszűnéséhez vezet, amely fontos lépés a daganatinvázcióban és áttétképzésben (Karen et al., 2005; Mullin, 1997).

Az eddig felfedezett 24 claudinmolekula közül (Tsukita és Furuse, 1999; Tsukita et al., 2001) a 23 kDa molekulatömegű claudin-1 számos human immunhisztokémiai (IH) tanulmányban került feldolgozásra. A tumordiagnosztikai vizsgálatokban a **claudin-1** mint újonnan felfedezett perineurialis marker kimutatása segíti a human perifériás ideghüvely daganat (PNST) különböző altípusainak pontos kórisméjét. Az idegrostok S-100 protein negatív és epithelialis membran antigén (EMA) pozitív perineurialis epitheloid sejteinek claudin-1 pozitívását Folpe és mtsai (2002) írták le először. Vizsgálataikba számos, a perineuriomához hasonló kórszövettani megjelenésű, mesenchymalis daganatot: 7 dermatofibrosarcoma protuberans, 8 low-grade fibromyxoid sarcomát, 3 desmoplasticus fibroblastomát, 7 fibromatosist, 9 neurofibromát és 5 schwannomát vontak be. A megvizsgált perineuriomák, az esetek 92 %-ában claudin-1 pozitívást is adtak, az egyéb daganatok

claudin-1 negatívnak bizonyultak (Folpe et al., 2002). Ezek után a claudin-1 perineurialis markert, az S-100 protein, az EMA és egyéb markerekkel együtt a human orsósejtes daganatok differenciál diagnosztikai IH-i paneljébe beépítették. A claudin-1 perineurialis marker felhasználása számos újkeletű diagnosztikai leírásban szerepel. Ezek a következők: claudin-1 pozitív human orbitalis (Chen et al., 2011), parotidealis (Agaimy et al., 2011), oralis (buccalis, intramandibularis) (Koutlas et al., 2010), endobronchialis (Duncan et al., 2010), lingualis (Adachi et al., 2010), ilealis (Wludarski et al., 2011), colorectalis intramucosalis perineurioma (Agaimy et al., 2010), továbbá hybrid schwannoma/perineurioma (Hornick et al., 2009), reticularis és plexiform (Mentzel és Kutzner, 2005), epitheloid (Haider et al., 2008) dermalis/subcutan granularis (Al-Daraji, 2008), illetve malignus perineurioma. Valamennyi esetben az új marker segítette a diagnosztikai patológiai munkát (Sato et al., 2008).

Az anti-claudin-1 ellenanyag segít elkülöníteni a human anaplasticus meningeomát a meningealis haemangiopericytomától (Rajaram et al., 2004), továbbá a human schwannomát a fibroblasticus meningeomától (Singh et al., 2011). Hahn és mtsai (2006) 10 human anaplasticus meningeomából 6-ban (60%), 20 human fibrosus meningeomából 8-ban (40%) és 10 human meningothelialis meningeomából 7-ben (70%) tapasztaltak claudin-1 immunreaktivitást (Hahn et al., 2006). Ezen kívül diagnosztikai markerként használható a human vesecarcinómák közül a claudin-1 pozitív papillaris renocellularis carcinoma detektálására (Fritzsche et al., 2008).

A human IH-i tumorprogressió vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a claudin-1 molekula expressziójának elvesztése kedvezőtlen prognosztikai jel, a fokozottabb kiújulási hajlam, a korai metastasis és a rövidebb túlélési idő miatt a II. és III. stádiumú colorectalis carcinoma (Yoshida et al., 2011), valamint a human oesophagealis carcinoma esetén (Miyamoto et al., 2008). Human melanocytás elváltozásokban végzett IH-i vizsgálatok során leírták, hogy a claudin-1 molekula csökkent expressziója, illetve elvesztése tumorprogressiót fokozó, a metastaticus fenotípust segítő tényező a melanomagenesis során (Cohn et al., 2008). Hasonló eredményekre vezettek a human prosztatata (Sheehan et al., 2007) és emlőmirigy carcinómákban végzett claudin-1 alapú IH-i vizsgálatok is (Tőkés et al., 2005; Morohashi et al., 2007). A human tüdőadenocarcinómákban tapasztalt claudin-1 overexpresszió, tumorsuppressor hatásának bizonyult. A claudin-1 fehérjét fokozottan expresszáló tüdőadenocarcinomás betegekben hosszabb túlélési időt figyeltek meg az alacsony claudin-1 mintázatú daganatos betegekkel szemben (Chao et al., 2009).

Az anti-claudin-1 ellenanyagra alapozott, IH-i állatorvosi kutatások és esetleírások száma, a human megfigyelésekhez képes jóval kisebb. Az állatorvosi claudin alapú vizsgálatok bár nagyobb részt nem onkológiai jellegűek, de fellelhetők onkológiai munkák. Ramos-Vara és mtsai (2010) 28 *kutyából* és 8 *macskából* származó, különböző szövettani típusú, lágyagyburki daganat, meningeoma immunfenotípusát vizsgálták anti-claudin-1, anti-CD34, anti-E-cadherin, anti-glucose Transporter 1, anti-laminin és anti-protein gene product

9.5 ellenanyagok segítségével. Vizsgálataik során cytoplasmaticus, illetve cytoplasmaticus-membrán claudin-1 pozitívítást észleltek a meningeomák egy részében (21/36; 58,3%). A kutyákból származó, 13 transitionális meningeomából 8-ban (61,5%), 4 fibroblasztos meningeomából 2-ben (50%) és valamennyi anaplasticus meningeomában claudin-1 pozitívítást észleltek. A microcystás és a myxoid meningeomák claudin-1 negatívnak bizonyultak (Ramos-Vara et al., 2010).

Az állatorvosi szakirodalomban Cornelis és mtsai (2009) írtak le egy 4 éves Leonbergi szuka *kutyában* claudin-1 pozitív perineuriomát (Cornelis et al., 2009).

Bizikova és mtsai (2011) *kutyák* bőrének, pofai nyálkahártyájának intact hámsejtjeiben, továbbá pemphigus foliaceus elváltozásokban vizsgálták a claudin-1 és egyéb sejtkapcsoló molekulák (desmoglein-1, desmoglein-3, desmocollin-1, desmocollin-3, desmoplakin-1/2, plakoglobin, plakophilin-1, E-cadherin, zonula occludens-1, occludin) expresszióját indirekt immunfluoreszcensz vizsgálatokkal (Bizikova et al., 2011).

Ohta és mtsai (2011) 4 egészséges beagle *kutya* vékonybeléből és vastagbeléből vett endoscopos biopátumokon végzett claudin-expressziós vizsgálataik során claudin-1 negativitást tapasztaltak (Ohta et al., 2011).

Furuse és mtsai (2001) MDCK (Madine Darby Canine Kidney) sejteken vizsgálták a claudin-1, -2 és -4 molekulák expresszióját. Megállapították, hogy a claudin-1 és -4 molekulák mindkét sejtvonalon (MDCK I és II) coexpresszálódnak, viszont a claudin-2 protein csak az MDCK II sejtvonalon jelenik meg (Furuse et al., 2001).

Malaeb és mtsai (2007), továbbá Duncan és mtsai (2009) Western-blot technika segítségével tanulmányozták *juh* magzat, újszülött és felnőtt állat agyvelő szürkeállományában lévő haemo-encephalicus barrier claudin-1, claudin-5, zonula occludens-1 és -2 expresszióját. Munkájuk során magasabb claudin-1 expressziós szintet tapasztaltak a juh magzatban az újszülöthöz, illetve a felnőtt állatokhoz viszonyítva. Vizsgálataik során a szteroid kezelés, sejtkapcsoló struktúrákra kifejtett hatását is vizsgálták (Malaeb et al., 2007; Duncan et al., 2009). Satterfield és mtsai (2007) claudin-1, -2, -3, -4, occludin expressziós vizsgálatokat végeztek ciklusban és korai vemhes állapotban lévő *jerkék* méhének endometrialis rétegében. Megállapították, hogy a progesteron hormon csökkenti a sejtkapcsoló proteinek expresszióját az endometrialis hámsejtekben (Satterfield et al., 2007). További vizsgálatok során megállapították, hogy a *szarvasmarha* bendő intact hámrétegében, a claudin-1 expresszió, csökkenő mértékben észlelhető a stratum granulosum – stratum spinosum – stratum basale irányban, a stratum corneum claudin-1 negatív (Graham és Simmons, 2005).

Saitoh és mtsai (2009) *sertés* elváltozásmentes gingivalis hámrétegében végzett IH-i vizsgálataik során claudin-1, -5 és occludin negativitást, illetve claudin-4 és -7 pozitívítást figyeltek meg (Saitoh et al., 2009). Sertés (LLC-PK1) vesehámsejtvonalon végzett vizsgálatok során claudin-1 immunpozitivitást észleltek (Van Itallie et al., 2003).

Karim és mtsai (2011) *macska, nyúl, egér* és human eredetű ophtalmologiai minták vizsgálatai során tanulmányozták a claudin-1, occludin, zonula occludens fehérjék expresszióját a nem pigmentált ciliaris epithelben. Azt tapasztalták, hogy a claudin-1 molekula a nem pigmentált és a pigmentált epithelium határán expresszáldott (Karim et al., 2011).

Az **anti-claudin-3 és -4** ellenanyagokkal végzett állatorvosi kutatásokból származó, tudományos publikációk kis számban születtek. Ezek jelentős része szintén nem onkológiai jellegű témákat dolgoz fel és a legtöbbjük MDCK sejtvonalakon végzett kutatás. Weng és mtsai (2005) *kutyák* jejunumában írtak le intenzív basolateralis claudin-3 és -4 expressziót, bizonyítva, hogy ezek a claudinok konstitutív komponensei a vékonybél epithelialis sejtjei között kialakult TJ struktúráknak (Weng et al., 2005). Ohta és mtsai (2011) egészséges *kutyák* vékonybeléből és vastagbeléből vett endoscopos bioptátumokon végzett claudin-expressziós vizsgálataik során a duodenumban claudin-3 pozitivitást és claudin-4 negativitást, továbbá a colonban claudin-3 expressziót tapasztaltak (Ohta et al., 2011).

Furuse és mtsai (2001) MDCK sejteken végzett tanulmányaik során írták le a claudin-4 molekula expresszióját (Furuse et al., 2001). Ohta és mtsai (2006) *szarvasmarhából* származó vesében vizsgálták a claudin-1, -2, -3, -4 és -10 expressziót. A Henle-kacs ascendáló szárában tapasztaltak claudin-3 és -4 coexpressziót, továbbá a distalis tubulusokban claudin-4 expressziót (Ohta et al., 2006). Diesing és mtsai (2011) *sertés* eredetű vékonybélsejtvonal izolátumon *in vitro* végzett kísérleteik során megállapították, hogy a deoxynivalenol kezelés hatására csökken a claudin-3 expresszió mértéke a bélhámsejtek membránjában (Diesing et al., 2011). Bailey és mtsai (2010) Western-blot eljárást alkalmazva megfigyelték, hogy a progesteronnal kezelt, ivartalanított *emsékben*, a progesteron hatására csökkent a luminalis endometrialis és glandularis epithelialis sejtek basolateralis claudin-4 expressziója, viszont a claudin-3 expresszió változatlan maradt (Bailey et al., 2010). Saitoh és mtsai (2009) *sertés* elváltozásmentes, gingivalis hámrétegében vizsgálták a claudin-1, -4, -5, -7 és occludin expressziót. Azt tapasztalták, hogy a claudin-4 molekula az elszarusodó, többrétegű hám, valamennyi rétegének epithelsejtjeiben, a TJ-struktúrákban expresszáldott (Saitoh et al., 2009). Sertés (LLC-PK1) vesehámsejtvonalon végzett vizsgálatok során claudin-3 és -4 immunpozitivitást észleltek (Van Itallie et al., 2003).

A *Clostridium perfringens* enterotoxinjáról (CPE), amely 35 kDa molekulatömegű polipeptid, már több mint 15 éve ismert, hogy az emlős sejteken, gyors, direkt cytolysist okoz (McClane et al., 1988). A közelmúltban vált ismertté, hogy a claudin-3 és -4 molekulák a CPE receptorai (Katahira et al., 1997). A CPE protein C-terminalisa kötődhet a claudin-3 és -4 proteinekhez, míg az N-terminalis pórusokat formál a plazmamembránban. Amikor a CPE kötődik a claudin-3 és/vagy a claudin-4 molekulákhoz, akkor az ezeket a TJ proteineket

expresszáló emlős sejtekben gyors, cytolysist okoz (McClane et al., 1988). Ez az ismert folyamat veti fel a toxin terápiás alkalmazhatóságát olyan daganatokban, amelyek magas claudin-3 és/vagy claudin-4 expressziót mutatnak, pl. human pancreas- (Michl et al., 2001), ovarium- (Hough et al., 2000) és prostatacarcinomában (Long et al., 2001). Kominsky és mtsai vizsgálataik során claudin-3 és -4 fehérjéket overexpresszáló human in vitro emlőráksejtvonalakban CPE-indukált, dózis dependens, rapid cytolysist (tumorslyst) figyeltek meg (Kominsky et al., 2004).

A **claudin-5** az elsőként identifikált endothel-specifikus claudin fehérje. Hiánya, deléciója okozza a human ún. velo-cardio-facialis syndromát, amely veleszületett szívfejlődési rendellenességgel, száypad-anomáliákkal és arcdysmorphiával járó tünetcsoport (Morita et al., 1999). Morita és mtsai (2003) kutatásaik során leírták human és egér bőr irha rétegének ér-endothelsejtjeiben (Morita et al., 2003). Soini (2005) 116 epithelialis és 92 nem epithelialis eredetű human daganatban végzett claudin expressziós vizsgálatot. Az endothelialis daganatokban, az angiosarcomákban és a benignus vascularis elváltozásokban észlelt claudin-5 immunreaktivitást (Soini, 2005). Vizsgálatok szerint a 12-40 hetes human magzati tüdő vérereinek endothelsejtjei intenzíven expresszálják a claudin-5 TJ molekulát (Kaarteenaho et al. 2010). Turunen és mtsai (2009) megfigyelték, hogy a high grade, előreheladott állapotú, biológiaiag agresszívebb viselkedésű, human serosus petefészek carcinomák fokozottan expresszálják (overexpresszálják) a claudin-5 molekulát. Munkájuk során 85 serosus ovarium carcinomán végeztek IH-i vizsgálatot. Eredményeik azt bizonyították, hogy a human petefészek carcinomákban tapasztalt fokozott claudin-5 expresszió, rossz prognosztikai indikátor (Turunen et al., 2009). Soini (2004) 13 emlőmirigy eredetű és 7 nem emlőmirigy eredetű Paget kóros mintán végzett vizsgálatai során az esetek 50 %-ában figyelt meg claudin-5 membrán pozitivitást a hámban (Soini, 2004). Soini és mtsai (2006) human gyomorcarcinomákban végzett vizsgálataik során megállapították, hogy a claudin-5 fokozottabban expresszálódott az intestinalis típusú malignomákban és a claudin-4, illetve a claudin-5 expressziója asszociálódott az E-cadherin megjelenésével. Az intenzív claudin-5 pozitivitást mutató gyomorcarcinomákban nagyobb proliferációs és apoptoticus aktivitást észleltek (Soini et al., 2006). Nem onkológiai jellegű vizsgálatok során megállapították, hogy a human tüdőszövetben, interstitialis pneumonia esetén a claudin-5 molekulák fokozottabban expresszálódnak, intenzívebb immunreaktivitást adnak a vascularis endotheliumban (Kaarteenaho-Wiik és Soini, 2009). Miettinen és mtsai (2011) 280 benignus és malignus human vascularis daganatban, továbbá 448 epithelialis, mesenchymalis és neuroectodermalis tumorban vizsgálták a claudin-5 expressziót. Tumordiagnosztikai munkájuk során azt tapasztalták, hogy a capillaris, illetve cavernosus haemangiomák, a lymphangiomák intenzív claudin-5 immunreaktivitást mutattak, viszont a juvenilis capillaris haemangiomákban a kevésbé differenciált neoplasticus érképződményekben claudin-5

negatív daganat területeket is megfigyeltek. A retriform, a kaposiform, az epitheloid és az epitheloid-sarcoma-like haemangi endotheliomák diffúz cytoplasmaticus reaktivitást mutattak. A legtöbb angiosarcoma (115/119; 96,63 %) és Kaposi-sarcoma (28/29; 96,55 %) claudin-5 pozitívnak bizonyult. A carcinomák [a ductalis emlőcarcinoma (3/5), a colorectalis adenocarcinoma (12/21), az endometrialis adenocarcinoma (13/13), a nem kis-sejtes differenciálatlan tüdő carcinoma (5/18), a pulmonalis adenocarcinoma (7/8), a kissejtes tüdőcarcinoma (7/9), a serosus petefészkek carcinoma (7/8), a pancreas ductalis carcinoma (3/4), a prostatacarcinoma (3/6), a laphámrák (3/9), a nyelőcsőrák (4/7), a gyomor adenocarcinoma (8/9), az embryonalis here carcinoma (1/1)] gyakorta mutattak a sarcomatoid carcinomával ellentétben, az angiosarcomához képest gyengébb, heterogen, nem diffúz claudin-5 pozitivitást. A seminomák, a renocellularis, a hepatocellularis és a pecsétgyűrűsejtes carcinomák claudin-5 negatívak. A nem vascularis eredetű daganatok közül a bifázisos synovialis sarcomában (5/6) észleltek immunreaktivitást. Az extrasceletalis myxoid chondrosarcomák kis részében (3/10) gyenge cytoplasmaticus claudin-5 reakciót figyeltek meg. A claudin-5 negatív haemangioperictoma, glomus tumor és melanoma intratumoralis mikroerei claudin-5 pozitivitást, míg a carcinomák mikroerei claudin-5 negativitást mutattak. A vizsgálatok alapján az anti-claudin-5-öt, az anti-pancytokeratinnal asszociált immunpanel használatban a human angiosarcoma és a haemangi endothelioma diagnosztikai markerének nyilvánították (Miettinen et al., 2011).

Az állatorvosi szakirodalomban kisszámú claudin-5 alapú vizsgálatról közölt adat található. Ohta és mtsai (2011) egészséges beagle *kutyák* vékonybeléből és vastagbeléből vett endoscopos biopátumokon végzett claudin-expressziós vizsgálataik során a vékonybélben intenzív, míg a vastagbélben gyenge claudin-5 expressziót, intenzivitást tapasztaltak (Ohta et al., 2011). Lyons és mtsai (2011) mucopolysaccharidososisban szenvedő *kutyák* hasi aortájának végágaiban végzett IH-i vizsgálat során a claudin-5 expresszió elvesztését tapasztalták az intima rétegben (Lyons et al., 2011). Csébi és mtsai (2011) *kutyákban*, autolog transplantatio során külső rectus hüvelyt felhasználva, vénás graftokon, anti-claudin-5 ellenanyag segítségével vizsgálták a mesothel sejtek endothelialis transdifferentiációját (Csébi et al., 2011). Duncan és mtsai (2009) nem onkológiai jellegű, Western-blott vizsgálataik során, *juh* agyvelejének kéregállományában azt tapasztalták, hogy az exogen glükokortikoid bevitel nem fokozta az agy-vér gát endotheliumának claudin-5 expresszióját (Duncan et al., 2009).

A **claudin-7** egy 24 kDa molekulatömegű TJ protein. Az anti-claudin-7-el végzett human kutatások számos új eredményt mutattak fel az utóbbi 10 évben. Bernardi és mtsai (2011) tumorprognosztikai vizsgálataik során, human invasív ductalis emlőmirigycarcinomák közül a luminalis A alcsoportban [HER2 (Human epidermalis növekedési receptor-2) negatív / ER (oestrogen receptor) pozitív - PR (progesteron receptor) pozitív] 45,8 %-ban (11/24), a

luminalis B alcsoportban (HER2 pozitív / ER pozitív – PR pozitív) 60,9 %-ban (14/23), a HER2 pozitív / ER negatív – PR negatív alcsoportban 55,6 %-ban (5/9), és a tripla-negatív alcsoportban 30 %-ban (6/20) tapasztaltak claudin-7 pozitivitást. Munkájuk során azt tapasztalták, hogy a claudin-7 pozitív esetek között gyakrabban észlelhető relapsus a claudin-7 negatív esetekhez képest. Eredményeik ellentmondanak a korábbi kutatási megfigyeléseknek (Bernardi et al., 2011). Szász és mtsai (2011) a human invasív ductalis emlőcarcinomákban tapasztalt csökkent claudin-7 expresszió esetén fokozottabb malignitást, magasabb gradust, illetve fokozottabb metastaticus készséget figyeltek meg (Szász et al., 2011). A *claudin-7* protein expressziójának elvesztését figyelték meg human fej- és nyaki laphámrákban (Al Moustafa et al., 2002), továbbá invasív emlőrákban (Kominsky et al., 2003). Lioni és mtsai (2007) megfigyelték, hogy a human intact nyelőcső hámsejtek malignus transformatiója során a claudin-7 membrán expressziója mislocalisálódik a cytoplasmába, vagy elvesztik a tumorsejtek a claudin-7 expressziójukat. Vizsgálataik szerint, a claudin-7 elvesztése csökkentette az E-cadherin expresszió mértékét, gyengítve a homotipias sejt-sejt kapcsolatokat és fokozva a sejtinvasio mértékét. A claudin-7 reexpresszió indukciója a claudin-7 deficiens oesophagealis nyelőcsőcarcinoma sejtvonalon viszont fokozta az E-cadherin kifejeződését és csökkentette az invasivitást. Véleményük szerint a nyelőcsőrákokban tapasztalt, E-cadherin valamint claudin-1, -4 és -7 expresszió elvesztése molekuláris háttere lehet az epithelialis-mesenchymalis transiciónak (átmenetnek) (Lioni et al., 2007). Dahiya és mtsai (2011) human epithelialis petefészek malignomákban (serosus-, világossejtes-, endometroid- és mucinosus carcinomákban) a claudin-7 fokozott expresszióját tapasztalták. Eredményeik alapján a claudin-7 molekulát diagnosztikai markernek és potenciális molekuláris targetnek nyilvánították (Dahiya et al., 2011). Li és mtsai (2011) a normál tüdőszövethez viszonyítva, a claudin-7 csökkent kifejeződését figyelték meg human primer tüdő laphámrákokban és adenocarcinomákban. Feltételezik, hogy ez a molekuláris esemény e tüdődaganattípusok progressziójának egyik esszenciális lépése (Li et al., 2011). Bornholdt és mtsai (2011) enyhefokú, mérsékelt és súlyosfokú colorectalis dysplasiákban, továbbá colorectalis carcinomákban tapasztaltak claudin-7 expresszió redukciót, amit a colorectalis carcinogenesis korai eseményének tartanak (Bornholdt et al., 2011). Human tumordiagnosztikai vizsgálatok során a claudin-7 molekulát a vese nephronok distalis részéből kiinduló daganatok, a chromophob renocellularis carcinoma és az oncocytoma markerének nyilvánították (Truong és Shen, 2011).

Az állatorvosi szakirodalomban publikált, claudin-7 alapú vizsgálatok száma alacsony. Ohta és mtsai (2011) egészséges *kutyák* duodenumából és colonjából vett endoscopos bioptátumokon végzett claudin-expressziós vizsgálataik során gyenge claudin-7 expressziót tapasztaltak mind a vékonybél, mind a vastagbél hámsejtjeiben (Ohta et al., 2011). Saitoh és mtsai (2009) *sertés* intact, gingivalis hámrétegében claudin-7 expressziót figyeltek meg. A felszíni hámréteg epithelsejtjei intenzív, míg a basalis hámsejtek gyenge

claudin-7 immunpozitivitást mutattak (Saitoh et al., 2009). Sertés (LLC-PK1) vesehámsejtvonalon végzett vizsgálatok során claudin-7 immunreaktivitást figyeltek meg (Van Itallie et al., 2003).

4. Célkitűzések

Immunhisztokémiai vizsgálataink során célul tűztük ki, hogy a kutyák ép és egyes daganatos szöveteiben a humanizált anti-**claudin-1**, anti-**claudin-3**, anti-**claudin-4**, anti-**claudin-5** és anti-**claudin-7** ellenanyagok keresztreakcióit teszteljük, illetve tanulmányozzuk kezdetben human külső pozitív kontrollok, majd általunk kiválasztott, kutyákból származó szövetekre alapozott, **külső** és **belső pozitív kontrollok** segítségével. Az immunhisztokémiai reakciók megfelelő kiértékeléséhez standard pozitív és negatív kontrollra van szükség. A pozitív kontroll a specifikus antitestkötődés megtörténtét hivatott bizonyítani, lehet a vizsgált metszeten belüli várhatóan pozitív struktúra (*belső kontroll*), vagy egy másik, párhuzamosan festett metszetben lévő ismert pozitívitás (*külső kontroll*). Enzimmel jelzett reagensek használatakor a mikroszkópban az enzim szubsztrátjának és az alkalmazott kromogénnek egymással való hatásából keletkező reakcióterméket látjuk. A pozitív kontroll készítésénél ellenőrizhetjük a laboratóriumban használt módszerünket, a reagenseket és önmagunkat. A gyakorlatban, ha ismeretlen daganatszövetet vizsgálunk, minden esetben olyan pozitív kontrollt kell mellékelnünk, amely biztosan tartalmazza a kimutatni kívánt antigént, vagy olyan normál szövetet, amely biztosan pozitív reakciót ad.

A humanizált anti-claudin antitestek megbízható immunreaktivitása esetén (a) **Tumordiagnosztikai vizsgálatokat** (az anti-claudin ellenanyagok kutyákból származó daganatok patológiai diagnosztikáját segítő, immunhisztokémiai markerként történő felhasználását); (b) **Tumorprogressziós vizsgálatokat** (kutya daganatokban bekövetkező, claudin expressziós mintázat változásának tanulmányozását); és (c) **Neovascularisatiós, vasoproliferációs vizsgálatokat** (patológiás, tumor-indukálta neoangiogeneticus és nem daganatos jellegű vasoproliferatív folyamatok tanulmányozását) kívántunk végezni az ellenanyagokkal.

Tumordiagnosztika.

Az első kutatási részben, az endothel-specifikus anti-**claudin-5** ellenanyag kutyák vérérképző daganatainak azonosítására való alkalmasságát kívántuk vizsgálni, a korábban bevált endothel markerekkel, az anti-CD31-el és a von Willebrand faktorról összehasonlítva. A második kutatási részben, az anti-**claudin-7** antitest, kutyák epeúti daganataira való specifitását kívántuk tesztelni. A harmadik kutatási részben, az anti-**claudin-1** ellenanyag differenciál diagnosztikai marker szerepét kívántuk bizonyítani, a kutyák fusocellularis

daganataiban, különösen a perifériás ideghüvely daganatokra és a perivascularis érfal tumorokra koncentrálnak. Az eredményeinkre alapozva kialakított, új immunhisztokémiai panelek segítségével, a megbízható állatorvosi daganat diagnosztikai- és prognosztikus patológiát szándékoztunk fejleszteni.

Tumorprogressio.

A kutatás második részében a kutyák jóindulatú és rosszindulatú simplex emlőmirigy daganataiban, a low grade colorectalis adenocarcinomáiban, a hasnyálmirigy exocrin acinaris sejtes carcinomáiban és a perianalis (hepatoid-sejtes, circumanalis) mirigyeinek tumoraiban kívántuk tanulmányozni a **claudin-1, -3, -4, -5** és **-7** expressziós mintázatban bekövetkező változásokat, részben a tumorprogressió folyamatok, a carcinogenesis molekuláris hátterének vizsgálata és részben a human tumor modellek, molekuláris targetek esetleges felfedezése végett.

Angiogenesis vizsgálatok.

A kutatás harmadik részében az endothel specifikus anti-**claudin-5** antitest segítségével, kutyák emlőmirigy daganataiban kívántuk tanulmányozni a tumor-indukálta neoangiogenesis, illetve a mikroérsűrűséget, továbbá a peritumoralis (pericarcinomatous) nyirokerek tumoros invasióját (tumorembolisatio), a nem daganatos jellegű vasoproliferációkban, a kutyák májában kialakult portalis arteriolaris hyperplasiákban és idült gyulladásszerű neoangiogenesisben.

5. Anyag és módszer

5.1. Pozitív kontrollok

5.1.1. Külső human pozitív kontrollok

A kutyák különböző ép és daganatos átalakult szövetein végzett claudin-expressziós immunhisztokémiai vizsgálataink során, claudin-1, -3, -4, -5 és -7, tight junction fehérjék immuneaktivitását tanulmányoztuk standard human eredetű külső pozitív kontroll szöveteken. A **claudin-1** esetén human elváltozásmentes bőrmintát használtunk kontrollként, azon belül a *stratum spinosum* rétegében és a folliculusok külső gyökérhámhüvelyében lévő hámsejteket, illetve a faggyúmirigyeket felépítő sebocytákat. A **claudin-3 és -4** esetén human intact colon nyálkahártyát használtunk külső pozitív kontrollként, amelyben a colonocytákban (bélhámsejtekből) vizsgáltuk az immunreaktivitást. A **claudin-5** esetén human intact bőrt használtunk külső pozitív kontrollként, amelyben a dermalis vérerek endothelsejtjeinek immunreaktivitását tanulmányoztuk. A **claudin-7** esetén human emlőmirigyből kiinduló fibroadenomát használtunk kontrollként, amelynek benignus hámsejtjeinek reakcióját vizsgáltuk (**Táblázat 1.**). (**Eredmények: 6.1.1. fejezet, 34. oldal.**)

Antitest	Human külső pozitív kontrollok
Claudin-1	Intact bőr: epidermis stratum spinosumának és a folliculusok külső gyökérhámhüvelyének sejtjei; sebocyták.
Claudin-3	Intact colon nyálkahártya: colonocyták(felszíni és crypta hámsejtek).
Claudin-4	Intact colon nyálkahártya: colonocyták (felszíni és crypta hámsejtek).
Claudin-5	Intact bőr: dermalis vérerek endothelsejtjei.
Claudin-7	Emlőmirigy fibroadenoma: benignus hámsejtjei.

Táblázat 1. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt human külső pozitív kontroll szövetek.

5.1.2. Belső pozitív kontrollok

Immunhisztokémiai vizsgálataink során a megbízható belső pozitív kontrollokat szelektáltuk. A **claudin-1** protein esetében a kutyák intact epidermisének és folliculusainak hámsejtjeiben, a verejtékmirigy-, illetve a faggyúmirigy-hámsejtekben vizsgáltuk a keresztreaktivitást. A **claudin-3 és -4** molekulák esetén kutya elváltozásmentes bőrének apocrin-mirigyhámsejtjeiben (verejtékmirigy-hámsejtekben) vizsgáltuk az immunreaktivitást. A **claudin-5** fehérje esetén kutya elváltozásmentes bőrében a vér- és nyirokerek endothel sejtjeiben tanulmányoztuk az immunreaktivitást. A **claudin-7** molekulák esetén kutya elváltozásmentes bőrének verejtékmirigy-hámsejtjeiben vizsgáltuk a reakciót (**Táblázat 2.**). (Eredmények: 6.1.2. fejezet, 35. oldal.)

Antitest	Belső pozitív kontrollok
Claudin-1	Intact bőr: epidermis stratum spinosumának és a folliculusok külső gyökérhámhüvelyének sejtjei; sebocyták és apocrin hámsejtek.
Claudin-3	Intact bőr: faggyúmirigy- és verejtékmirigy-hámsejtek.
Claudin-4	Intact bőr: faggyúmirigy- és verejtékmirigy-hámsejtek.
Claudin-5	Intact bőr: dermalis vér- és nyirokerek endothelsejtjei.
Claudin-7	Intact bőr: verejtékmirigy-hámsejtek.

Táblázat 2. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt kutyákból származó, belső pozitív kontroll szövetek.

A továbbiakban az anyag és módszer következő fejezeteit, az anti-claudin-1, -3, -4, -5 és -7 antitestekre alapozott, három különböző irányú vizsgálatnak megfelelően taglalom, a jobb áttekinthetőség és a követhetőség érdekében.

5.2. Tumordiagnosztika

5.2.1. Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában

A vizsgálatainkhoz a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2004. január 1. és 2011. december 31-e között, diagnosztikai célból beküldött, kutyákból származó, műtétileg eltávolított, biopsiás (67 minta) és necropsiás (28 minta) daganatos vizsgálati anyagokat használtunk fel. Az megvizsgált, összesen 95 tumor minta kórszövettanilag neoplasticus orsósejtes komponenseket tartalmazó daganatszövet volt (Táblázat 3.).

Szövetminta (tumor)	Esetszám	Szövetminta (tumor)	Esetszám
1. HSA capillaris differenciált	4	10. Cardialis rhabdomyosarcoma	3
2. HSA cavernous differenciált	11	11. MPNSTs	3
3. HSA solid típusú differenciálatlan	11	12. Orsósejtes melanoma	4
4. Haemangioma	9	13. Synovialis sarcoma	4
5. Lymphangioma	3	14. Osteosarcoma	5
6. Haemangiopericytoma	7	15. Chondrosarcoma	4
7. Fibrosarcoma	11	16. Benignus fibroblast proliferatio	5
8. Myxosarcoma	3	17. Vaginalis leiomyoma	5
9. Leiomyosarcoma	3	Összesen:	95

Táblázat 3. A vizsgálatba bevont orsósejtes daganatok összesítése.

A mintákat szobahőmérsékleten, 24 órán át, 8 %-os pufferolt (PBS, pH 7.0) formaldehydoldatban konzerváltuk. Az így nyert szövetmintákat *Shandon excesor szövetelőkészítő automatával* tettük alkalmassá a további feldolgozásra. Az automata szövetelőkészítőgép a 14 órás programja alatt 6 lépcsős felszálló alkohol-sorozat (4 x 1 óra, majd 2 x 1,5 óra) és 3 lépcsős felszálló xylol-sorozat (3 x 1 óra) után 3 lépésben (3 x 80 perc) 60 °C-os paraffinnal (*Shandon Histoplast Pelletised Paraffin Wax*) kontaminálta a szövetmintákat. A szövetelőkészítést a paraffinos beágyazás követte. A paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket haematoxylinnal és eosinnal festettünk meg, *Shandon Varistain 24-4 automata festőgép* segítségével. A metszeteket Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp segítségével analizáltuk. Az optimális, standard körülmények között konzervált mintákon kívül, 10, nem pufferolt, nem neutralis, 15 %-os formalinban 2 hétig fixált, haemangiosarcoma mintát (5 cavernosus, 1 capillaris, 4 solid típust) is beválogattunk a vizsgálatainkba.

A továbbiakban az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket kétszer váltott xylolban (2x10 percen keresztül), majd háromszor váltott alkoholban (3x5 percen át 100%-os, 70%-os és 50%-os alkohol) deparaffináltuk, majd 1x-es PBS-sel való mosás után antigénfeltárást végeztünk. Az antigének feltárása magas hőmérsékleten, mikrohullámmal

(30 perc, 800 W) történt, kiegészítve Target Retrieval Solution feltáró oldattal (DAKO, Glostrup, Dánia, pH 6). Az endogen-peroxidáz aktivitását 0,3%-os H₂O₂-dal, metanolban blokkoltuk 5 percen keresztül. A vizsgálatainkhoz felhasznált antitesteket táblázatban foglaltuk össze (**Táblázat 4.**). Az immunhisztokémiai reakciókat avidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (DAKO LSAB2 Kit) és DAB (diamino-benzidin) kromogénnel tettük láthatóvá. A kontrasztfestés Mayer-féle haemalaunnal történt. A negatív kontroll metszeteket az elsődleges antitestek kihagyásával készítettük. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során külső pozitív kontrollként, kutya intact dermalis kis artériáit használtuk.

- | |
|---|
| 1. anti- claudin-5 (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100, Zymed Inc.) |
| 2. anti- CD31 (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:80, DAKO) |
| 3. anti- von-Willebrand faktor (vWF) (monoclonalis egér ellenanyag, 1:50, DAKO) |
| 4. anti- vimentin (monoclonalis egér ellenanyag, 1:200, DAKO) |
| 5. anti- α-smooth muscle actin (α-SMA) (monoclonalis egér ellenanyag, 1:8000, Sigma) |
| 6. anti- S-100 protein (polyclonalis nyúl ellenanyag, 1:50, DAKO) |
| 7. anti- neuron specific enolase (NSE) (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100, DAKO) |
| 8. anti- Melan-A (monoclonalis egér ellenanyag, 1:50, DAKO) |

Táblázat 4a. Az immunhisztokémiai vizsgálat során felhasznált ellenanyagok összesítése.

1. anti- claudin-5	endothel specifikus TJ protein (membrán)
2. anti- CD31	endothelialis marker (membrán)
3. anti- von-Willebrand faktor	endothelialis marker (membrán)
4. anti- vimentin	mesenchymalis marker (cytoplasma)
5. anti- α-smooth muscle actin	izommarker (cytoplasma)
6. anti- S-100 protein	neurogen, melanocyta marker (cytoplasma, nucleus)
7. anti- neuron specific enolase	neurogen marker (cytoplasma)
8. anti- Melan-A	melanocyta marker (nucleus)

Táblázat 4b. Az immunhisztokémiai vizsgálat során felhasznált ellenanyagok specifitása.

Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp segítségével, 10 nagy nagyítású, random szelektált látómezőben történt. A pozitív immunreakciót mutató daganatsejtek aránya alapján a következő scoring-rendszert alkalmaztuk: 0 (negatív) = 0 - 5%; 1 = 5 - 20%; 2 = 20 - 40%; 3 = 40 - 60%; 4 = 60 - 80%; 5 = 80 - 100% tumorsejt pozitivitás (**Táblázat 5.**).

Tumorsejt pozitivitás	Score
0 – 5 %	0
5 – 20 %	1
20 – 40 %	2
40 – 60 %	3
60 – 80 %	4
80 – 100 %	5

Táblázat 5. Az immunhisztokémai reakciók kiértékelése során használt scoring-rendszer.

A megvizsgált mintákban tapasztalt claudin-5 reaktivásokat, a korábbi fejezetben leírt, megbízható, külső pozitív kontrollhoz viszonyítottuk. Ha a mintákban megfigyelt claudin-5 immunreaktivitás megegyező volt a külső pozitív kontroll mintában észleltekkel, akkor az „intenzív” jelzőt használtuk a reakció leírására, ha kevésbé volt erős, akkor a „gyenge” jelzőt alkalmaztuk.

Az eredmények kiértékelésénél kutyákból származó, külső pozitív kontrollokat használtunk: haemangiosarcoma CD 31 és vWf, fibroma vimentin, leiomyoma α -SMA, schwannoma S-100 protein, illetve NSE, és melanoma Melan-A esetén. **(Eredmények: 6.2.1. fejezet, 37. oldal.)**

5.2.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A necropsiás vizsgálataink során, 10 HSA szövetmintát izoláltunk, amelyeket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltuk. A következő lépésben $10\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar II. számú Patológiai Intézetében. A metszeteket 2x5 perces foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS-ben) történő mosás után 30 percig BSA-val (Bovine serum albumin) szobahőmérsékleten kezeltük a nem specifikus kötődések kizárása végett. Ezek után a metszeteket **anti-claudin-5**-tel kezeltük éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A továbbiakban a fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel (AlexaFluor TM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubáltuk a metszeteket szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. A fedés FluoroMount fluoreszcens fedőanyaggal (Dako, Glostrup, Dánia) történt, amelyhez előzőleg $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 4,6-diamidino-fenilindol kék fluoreszcens magfestéket kevertünk. Konfokális lézer mikroszkópos vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetében végeztük, Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Bio-Rad Radiance 2100 típusú konfokális lézer scanning berendezéssel, illetve a Bio-Rad LaserSharp 2000 szoftverrel. **(Eredmények: 6.2.2. fejezet, 41. oldal.)**

5.2.3. Lép minták vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel

A daganat minták mellett megvizsgáltunk 14 nem daganatos lép mintát: 4 intact lépszövetet, 5 lymphoid hyperplasia indukálta acut intrapulparis haematomát és 5 szervülő, idült intrapulparis haematomát. A megvizsgált 26 haemangiosarcoma minta közül 16 volt lép eredetű, amelyek közül 12 indukált lép haematomát. A 6 haemangioma minta közül 2, míg a 11 fibrosarcoma közül 3 származott haematomás lépből. Ezeket a mintákat anti-claudin-5 és anti-CD31 markerekkel vizsgáltuk (Táblázat 6.). (Eredmények: 6.2.3. fejezet, 42. oldal.)

Léphaematoma típusa	Mintaszám (db)
1. Lymphoid hyperplasia (acut haematoma)	5 (5/14)
2. Szervülő idült haematoma	5 (5/14)
3. Lép HSA (acut haematoma)	12 (12/16/26)
4. Lép HA (acut haematoma)	2 (2/6)
5. Lép fibrosarcoma (acut haematoma)	3 (3/11)

Táblázat 6. A megvizsgálat léphaematomák megoszlása.

5.2.4. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban

A vizsgálataink során a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2004. január 1. és 2009. december 31-e között, diagnosztikai célból beküldött, kutyákból származó necropsias vizsgálati anyagokat (n =108) használtunk fel (Táblázat 7.).

Minta	Minta szám (db)
1. Cholangiocellularis hyperplasia (CCH)	6
2. Cholangiocellularis adenoma (CAD)	10
3. Differenciált cholangiocellularis carcinoma (dCCC)	15
4. Differenciálatlan cholangiocellularis carcinoma (nCCC)	6
5. Intact extrahepaticus epeút	6
6. Intact epehólyag	8
7. Cyticus mucinosus hyperplasiás epehólyag	5

Táblázat 7.a. Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont epeúti minták (n=56).

Minta	Minta szám (db)
1. Intact májszövet	15
2. Hepatocellularis nodularis hyperplasia (HNH)	10
3. Hepatocellularis adenoma (HAD)	6
4. Differenciált hepatocellularis carcinoma (dHCC)	15
5. Differenciálatlan hepatocellularis carcinoma (nHCC)	6

Táblázat 7.b. Az immunhisztokémiai vizsgálatba bevont májszöveti minták (n=52).

A minták konzerválásánál, kórszövettani és immunhisztokémiai feldolgozásánál utalnék az előző fejezetre. A vizsgálatok során **anti-claudin-7** (polyoclonalis nyúl ellenanyag, 1:80 hígítás, Zymed Inc.) ellenanyagot használtunk fel. A reakciók kiértékelésénél a következő scoring rendszert használtuk, (-) negatív; (+) < 25% sejtpozitivitás; (++) 25-50% sejtpozitivitás; (+++) 50-75% sejtpozitivitás; 75-100% sejtpozitivitás 10, nagy nagyítású (200x), random szelektált látómezőben detektált tumorsejtre vonatkoztatva (**Táblázat 8.**). A megvizsgált mintákban tapasztalt claudin-7 immunreaktivitásokat, a korábbi alfejezetben leírt (**Lásd. 5.1.2. alfejezet**), megbízható, pozitív kontrollhoz viszonyítottuk. Ha a mintákban megfigyelt claudin-7 reakció megegyező volt a külső pozitív kontroll mintában észleltekkkel, akkor az „intenzív” jelzőt használtuk a reakció leírására, ha kevésbé volt erős, akkor a „gyenge” jelzőt alkalmaztuk. (**Eredmények: 6.2.4. fejezet, 46. oldal.**)

Tumorsejtpozitivitás:	0	< 25%	25-50%	50-75%	75-100%
Scoring:	-	++	++	+++	+++

Táblázat 8. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelésénél alkalmazott scoring-rendszer.

5.2.5. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban

A vizsgálatainkhoz a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2004. január 1. és 2011. május 31-e között, diagnosztikai célból beküldött, kutyákból származó, műtétilag eltávolított, biopsiás (n = 155) és necropsiás (n = 58) mintákat használtunk fel. Az megvizsgált, összesen 213 minta közül, 10 intact perifériás ideg volt, amelyeket pozitív kontrollként használtunk, a többi 199 minta különböző típusú, kórszövettanilag neoplastikus orsósejtes komponenseket tartalmazó tumorszövet volt, illetve 4 liposarcomát vizsgáltunk (**Táblázat 9.**).

Tumor	Mintaszám (db)	Tumor	Mintaszám (db)
1.a. Schwannoma	4	14. Anaplasticus sarcoma	8
1.b. Neurofibroma	8	15. Amelanoticus orsósejtes melanoma	8
1.c. Perineurioma	8	16. Histiocytás sarcoma	8
2. MPNST	16	17. Orsósejtes carcinoma	8
3. Meningeoma	6	18. Myoepithelioma	8
4. Fibroma	6	19. Complex carcinoma	8
5. Leiomyoma	6	20. Cardialis rhabdomyosarcoma	5
6. Myxoma	6	21. Synovialis sarcoma	4
7. Orsósejtes haemangioma	4	22. Osteosarcoma	5
8. Orsósejtes lipoma	2	23. Chondrosarcoma	4
9. Fibrohistiocytás nodulus	4	24.a. Haemangiopericytoma	10
10. Fibrosarcoma	8	24.b. Myopericytoma	8
11. Leiomyosarcoma	8	24.c. Angioleiomyoma	6
12. Myxosarcoma	6	24.d. Angioleiomyosarcoma	4
13. Solid haemangiosarcoma	8	24.e. Angiofibroma	3

Táblázat 9. Kutyákból származó, anti-claudin-1 antitesttel megvizsgált, orsósejtes daganat minták (n=199).

A immunhisztokémiai vizsgálatok során a következő antitesteket alkalmaztuk: anti-**claudin-1** (polyclonalis nyúl ellenanyag, hígítás 1:100, Zymed Inc.), anti-**S-100 protein** (polyclonalis nyúl ellenanyag, hígítás 1:50, DAKO), anti-**neuron specific enolase** (NSE) (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:100, DAKO), anti- **α -smooth muscle actin** (α -SMA) (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:8000, Sigma), anti-**vimentin** (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:200, DAKO), anti-**cytokeratin AE1-AE3** (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100 hígítás, DAKO), anti-**claudin-5** (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100 hígítás, Zymed Inc.), anti-**Melan-A** (monoclonalis egér ellenanyag, 1:50 hígítás, DAKO), anti-**heavy caldesmon** (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:50, DAKO), anti-**calponin** (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:30,000, Sigma) és anti-**desmin** (monoclonalis egér ellenanyag, hígítás 1:400, Novocastra).

A minták konzerválásánál, kórszövettani és immunhisztokémiai feldolgozásánál utalnék a korábbi alfejezetre (**Lásd. 5.2.1. alfejezet**). A claudin-1 és S-100 protein esetén a reakciók kiértékelésénél használt scoring rendszer esetén utalunk a korábbi alfejezetre (**Lásd. 5.2.4. alfejezet**).

A megvizsgált mintákban tapasztalt claudin-1 reaktivásokat, a korábbi alfejezetben leírt (**Lásd. 5.1.2. alfejezet**), megbízható, kontrollhoz viszonyítottuk. Ha a mintákban megfigyelt claudin-1 immunreaktivitás megegyező volt a külső pozitív kontroll mintában észleltekkkel, akkor az „intenzív” jelzőt használtuk a reakció leírására, ha kevésbé volt erős, akkor a „gyenge” jelzőt alkalmaztuk. Az egyéb antitestek esetén (chondroma S-100 protein,

schwannoma NSE, pericyta α -SMA és calponin, mastocytoma vimentin, emlőmirigy pancytokeratin, HSA claudin-5, melanoma Melan-A, *m. arrector pili* heavy caldesmon és desmin) a reakciók kiértékelésénél kutyákból származó, külső pozitív kontrollokat használtunk. **(Eredmények: 6.2.5. fejezet, 49. oldal.)**

5.3. Tumorprogressio

5.3.1. Claudin-1,-3,-4,-5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban

A vizsgálatainkhoz a SZIE-ÁOTK Kóronctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2008. január 1. és 2010. december 31-e között, diagnosztikai célból beküldött, kutyákból származó, műtétilag eltávolított, biopsiás és postmortalis vizsgálatra küldött tetemekből izolált, necropsiás emlőmirigymintákat használtunk fel. A megvizsgált, összesen 145 minta közül, 20 intact emlőmirigy volt, amelyeket a továbbiakban pozitív kontrollként használtunk, a többi 125 minta részben jóindulatú simplex proliferatív elváltozás, részben primer és secunder, különböző malignitási fokozatú simplex carcinoma volt **(Táblázat 10.)**

A kutyák rosszindulatú elsődleges emlőmirigydaganatai alapvetően három nagy csoportba sorolhatók: 1. Simplex carcinomák; 2. Complex carcinomák; 3. Egyéb szöveti eredetű malignomák. Az első csoportra jellemző, hogy a malignus daganat tisztán, az emlőmirigy epithelialis sejtjeiből (az alveolaris és/vagy a ductalis hámsejtekből) indul ki. A második daganatcsoportot az emlőmirigy hámsejtjeiből és az alveolusokat, valamint a tejelvezető csatornácskákat körülölelő myoepithelsejtekből kiinduló, neoplasticus sejtek egymással keveredő, malignus burjánzása jellemzi. Az állatorvosi emlődaganatpatológia, a prognosztikai információkat nyújtó, human diagnosztikai patológiában kidolgozott grading-rendszert átvette, specializálta a kutyák simplex infiltráló emlőmirigycarcinomáira. A gradinggel a kutyák simplex emlőrákjának a differenciáltságát, azaz a malignitási fokát határozhatjuk meg. A numericus grading során figyelembe vesszük a simplex emlőrák állományában (1) a tubulus formálódás mértékét, (2) az osztódó daganatsejtek számát (mitoticus indexet) és (3) a sejtmagok alakjának, nagyságának, chromatin állományának variabilitását. Mindhárom paraméter 1-3 pontig osztályozható, így a kapott pontok összege 3-9 között változhat. Az első paraméter esetén az 1 pont azt jelenti, hogy a simplex emlőrák állományában nagy arányban (>50%), míg 3 pont esetén nem, vagy csak kis arányban (<10 %) tapasztalható tubulusképzés. A második paraméter pontozása a következőképpen alakul: 1 pont ha tíz nagy nagyítású (400x) látóterenkét egy osztódó daganatsejt figyelhető meg, illetve 2 pont ha 2-3, 3 pont ha ennél nagyobb a mitoticus sejtszám. A harmadik paraméter esetén 1 pont ha enyhe nuclearis pleomorphismust érzékelünk, 2 pont a közepes és 3 pont a kifejezett sejtmag polymorphismus. A pontozásos rendszerből kitűnik, hogy minél magasabb a három paraméter pontjainak összege, annál differenciálatlanabb a simplex

emlőrák. Ennek figyelembevételével három grade-szintet különítünk el: grade I (jól differenciált, 3-5 pont), grade II (közepesen differenciált, 6-7 pont) és grade III (rosszul differenciált, 8-9 pont) (Goldschmidt et al., 2011).

Emlőmirigy szövetminta	Mintaszám (db)
1. Intact emlőmirigy	20
2. Lobularis hyperplasia	15
3. Simplex adenoma	20
4. <i>In situ</i> carcinoma	20
5. Grade I-es infiltráló simplex carcinoma	20
6. Grade II-es infiltráló simplex carcinoma	20
7. Grade III-es infiltráló simplex carcinoma	20
8. Secunder grade III-as simplex carcinoma (pulmonalis metastasis)	10

Táblázat 10. Claudin-expressziós vizsgálatokba beválogatott, kutyákból származó emlőmirigyminták összefoglaló táblázata.

A minták konzerválásánál, kórszövetteni és immunhisztokémiai feldolgozásánál utalnék a korábbi alfejezetre (**Lásd. 5.2.1. alfejezet**). A vizsgálatok során felhasznált antitesteket táblázatban foglaltam össze (**Táblázat 11.**).

Antitest	Hígítás	Antitest típusa	Antitestet előállító vállalat
<i>Claudin-1</i>	1:100	Polyclonalis nyúl	Zymed (Francisco, CA, USA)
<i>Claudin-3</i>	1:80	Polyclonalis nyúl	Zymed (Francisco, CA, USA)
<i>Claudin-4</i>	1:100	Monoclonalis egér	Zymed (Francisco, CA, USA)
<i>Claudin-5</i>	1:100	Monoclonalis egér	Zymed (Francisco, CA, USA)
<i>Claudin-7</i>	1:80	Polyclonalis nyúl	Zymed (Francisco, CA, USA)

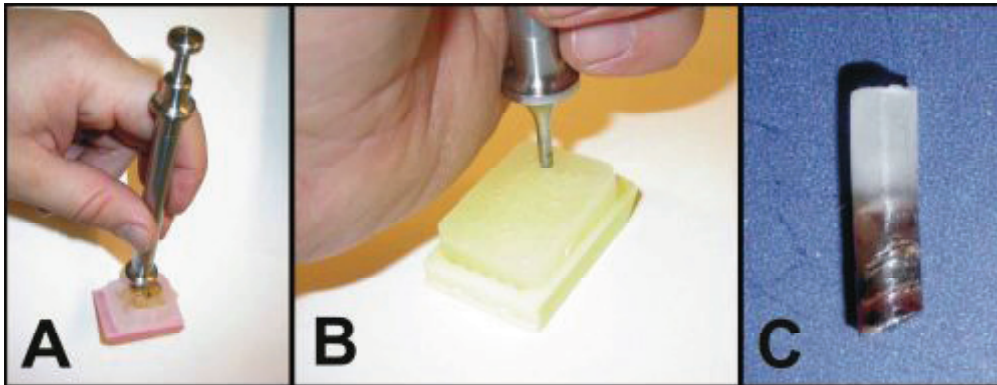
Táblázat 11. A claudin-expressziós vizsgálatok során felhasznált antitestek.

A reakciók kiértékelésénél használt scoring rendszer esetén utalunk a korábbi alfejezetre (**Lásd. 5.2.4. alfejezet**).

Az intact emlőmirigyekben, illetve proliferatív elváltozásaiban tapasztalt claudin reaktivitásokat, a korábbi fejezetben leírt, megbízható, külső pozitív kontrollokhoz viszonyítottuk. Ha az emlőmirigyekben, valamint proliferatív elváltozásaiban megfigyelt claudin immunreaktivitás megegyező volt a külső pozitív kontroll mintákban észleltekkkel, akkor az „intenzív” jelzőt használtuk a reakció leírására, ha kevésbé volt erős, akkor a „gyenge” jelzőt alkalmaztuk.

5.3.2. Szöveti multiblokk technika / Tissue Micro-Array

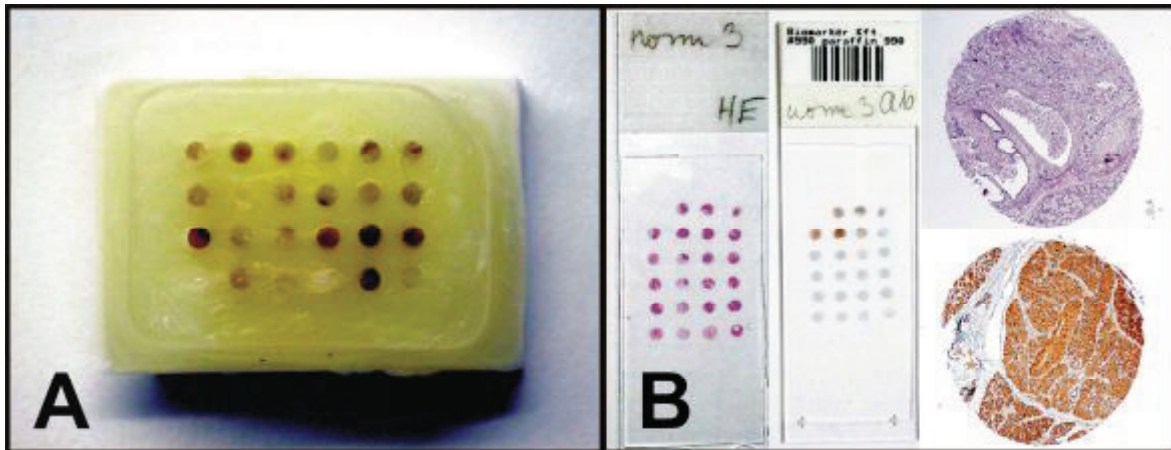
A vizsgálataink során 18 intact emlőmirigyet tartalmazó konvencionális (hagyományos), donor, paraffinos blokkokból verticalis pozíciójú, 2 mm átmérőjű szövetmintákat (hengereket) vettünk ki, manualis extractor segítségével és helyeztünk bele három 24 hengereminta befogadására alkalmas ún. recipiens, szöveti multiblokkba (8. ábra).



8. ábra A. A 2 mm-átmérőjű hengereminta eltávolítása a hagyományos paraffinos donor blokkból, manualis extractor segítségével. B. Az eltávolított hengereminta behelyezése a recipiens TMA-multiblokkba. C. A hengereminta, beágyazott emlőmirigy-részletet tartalmazó, distalis pólusa és a proximális információmentes paraffinos rész.

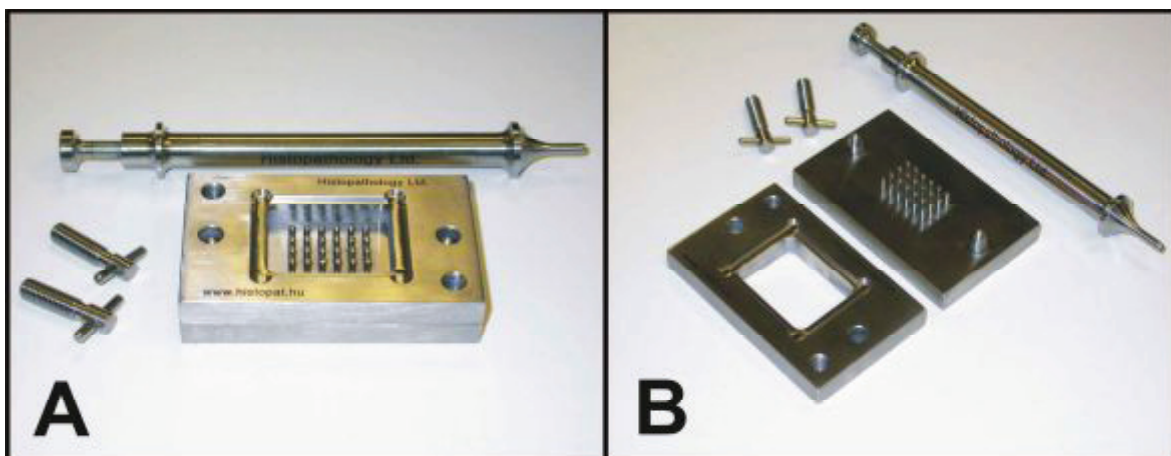
Ennek segítségével egyetlen tárgylemezen egyszerre 24 szövetmintát tesztelhetünk standard körülmények között, egyetlen szövetfestési, ill. immunhisztokémiai reakcióhoz szükséges reagens-mennyiséggel, ami jelentős anyagi megtakarítást biztosított. A vizsgálataink során egyetlen emlőmintából négy szöveti hengert távolítottunk el és helyeztünk a szöveti multiblokk egy sorába, így lehetővé vált 18 eset feldolgozása 3 szöveti multiblokk segítségével.

A szöveti multiblokk technika, vagy Tissue Micro-Array (TMA) során a konvencionális kórszöveti paraffinos blokkokból, megfelelő technikai kivitelezéssel kisméretű szövethengereket távolítunk el, amelyeket az ún. recipiens, vagy paraffinos multiblokkba (9. ábra) helyezve és azokból metszeteket készítve lehetővé válik egyetlen tárgylemezen nagyszámú eset (akár több mint 1000) azonos körülmények között megfestett mintáinak vizsgálata. Az elkészült szöveti multiblokkokat 15-20 percre termosztátba (56-58°C) helyeztük a szöveti hengerek és a recipiens paraffin blokk közötti szoros kapcsolódás kialakítása végett, amely elengedhetetlen a későbbi 3-4 µm-es metszetek, mikrotómmal történő készítéséhez



9. ábra A. Huszonnégy (6x4) minta befogására alkalmas recipiens, paraffinos, szöveti TMA-multiblokk. B. A TMA-multiblokkból készített HE- és immunhisztokémiai metszetek.

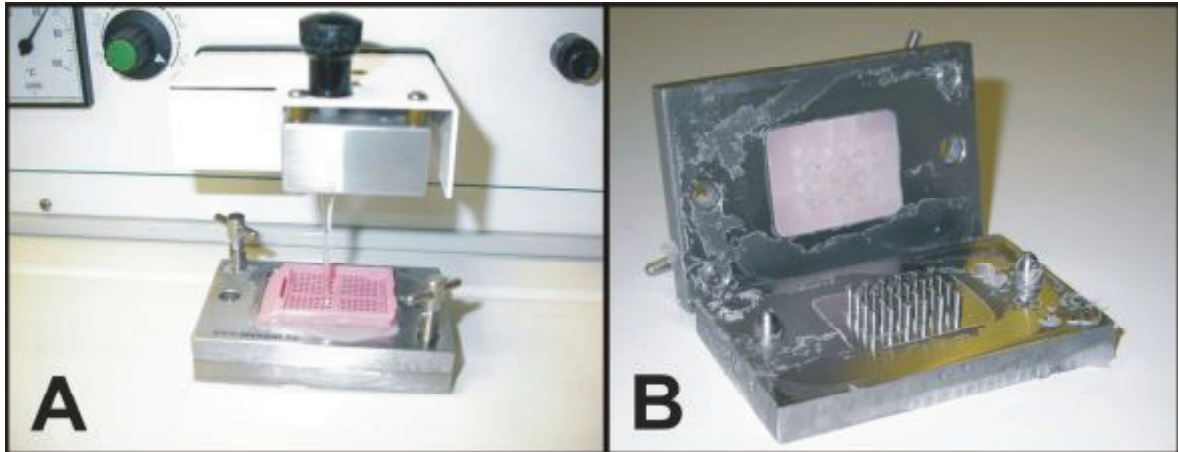
A munkánk során alkalmazott, magyar feltalálók által 2002-ben kifejlesztett szöveti multiblokk előállító kézi készülék (Tissue MicroArray Builder Manual Set) egy, az ún. donor paraffin blokkokból a 2 mm átmérőjű szöveti hengert eltávolító lyukasztó extraktorból és a TMA blokk öntőmintájából áll. Az utóbbi öntőforma két, egy felső és alsó részből áll, amelyek közül az utóbbi két szélén középen egy-egy, a felső részen ezeknek megfelelő, szimmetrikus helyen található furatokba illeszkedő, fémtövis található, amelyek a felső-alsó részek horizontális, egymáshoz való rögzítését segítik. Az alsó rész közepén 6 sorba és 4 oszlopba rendezve, 2 mm átmérőjű és 6 mm magas fémtüskék helyeződnek, amelyek az ún. recipiens paraffinos multiblokk befogadó furatainak kialakítására szolgálnak. A felső rész centralisan a 24 alsó tüskének megfelelő helyen kimart és felső felszínén a szövettani kazettát befogadó peremmel rendelkezik (10. ábra).



10. ábra A -B. A TMA-multiblokk készítéséhez szükséges Tissue MicroArray Builder Manual Set.

A szöveti multiblokk készítése során az összeillesztett felső, alsó részek közül a felső kimart részébe helyezük a blokk tartó kazettát, majd abba és az alatta lévő fémtüskékbe töltjük

a folyékony paraffint, hogy egységes recipiens blokkhoz jussunk. A paraffin megfelelő mértékű dermedése után óvatosan, a felső rész diagonális pólusain található csavarmentes furatokba helyezett csavarok segítségével eltávolítjuk a két részt egymástól, majd a felső részből kiemeljük a benne maradt, kész szöveti multiblokkot, vagy recipiens blokkot (11. ábra). (Eredmények: 6.3.1. fejezet, 55. oldal.)



11. ábra A -B. A TMA-multiblokk készítésének műveleti fázisai.

5.3.3. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszéken végzett necropsiás vizsgálataink során, kiirtott vagy elhullott, 6 - 8 éves, 6 szuka kutya intakt inguinalis emlőmirigyéből vettünk szövetszövetmintákat, amelyeket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltuk. A következő lépésben $10\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk a Semmelweis Egyetem II. számú Pathológiai Intézetében. A metszeteket 2×5 perces foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS-ben) történő mosás után 30 percig BSA-val (Bovine serum albumin) szobahőmérsékleten kezeltük a nem specifikus kötődések kizárása végett. Ezek után a metszeteket a 10. Táblázatban felsorolt antitestekkel kezeltük egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A továbbiakban a fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel (AlexaFluor TM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubáltuk a metszeteket szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. A fedés FluoroMount fluoreszcens fedőanyaggal (Dako, Glostrup, Dánia) történt, amelyhez előzőleg $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 4,6-diamidino-fenilindol kék fluoreszcens magfestéket kevertünk.

Konfokális lézer mikroszkópos vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetében végeztük Nikon Eclipse E800 mikroszkópra szerelt Bio-Rad Radiance 2100 típusú konfokális lézer scanning berendezéssel, illetve a Bio-Rad LaserSharp 2000 szoftverrel. (Eredmények: 6.3.2. fejezet, 58. oldal.)

5.3.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban

A vizsgálatainkhoz a SZIE-ÁOTK Kóronctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2005. január 1. és 2008. december 31-e között, diagnosztikai célból beküldött, kutyákból származó, műtétilag eltávolított, biopsiás (n = 20) és postmortalis vizsgálatra küldött tetemekből izolált, necropsiás intact colorectalis szövetmintákat (n = 10) használtunk fel. A megvizsgált, összesen 30 minta közül, tehát 10 intact colorectum volt, amelyeket a továbbiakban pozitív kontrollként használtunk.

A kutyák colorectalis carcinomáit, a differenciáltság szempontjából két csoportra osztjuk: (1) differenciált/low grade és (2) differenciálatlan (rosszul differenciált)/high grade csoportokra. A low grade típusra jellemző, hogy a propria mirigyekből kiinduló, elsődleges mirigyhámrák tubulusokat, papillaris projectumokat képezve burjánzik, állományában nem figyelhetők meg solid atypicus sejtfészek, viszonyla alacsony mitoticus indexsel rendelkezik és ritkán képez áttéteket. Ezzel szemben a high grade típusú vastagbélrákok, kisebb mértékben képeznek tubulopapillaris kórszövettani struktúrákat (>50%), nagyobb számban figyelhető meg állományukban solid sejtfészek, nagyobb a mitoticus- és az apoptoticus index, agresszívebb-gyorsabb növekedési tendencia, valamint nagyobb fokú metastasiskészség jellemzi. Mindkét csoport esetében a malignitási fok meghatározása mellett, a human daganatpatológiából átvett stádiumbeosztást használjuk a prognosztikai információ nyerése céljából (Head et al., 2002).

Az immunhisztokémiai reakciók kivitelezésénél és kiértékelésénél a korábbi alfejezetben leírt módszert (Lásd. 5.2.1. alfejezet), külső pozitív kontrollokat, illetve pontozásos (scoring) rendszert alkalmaztuk. (Eredmények: 6.3.3. fejezet, 59. oldal.)

5.3.5. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganataiban

A vizsgálataink során felhasznált, kutyák intact hepatoid-sejtes mirigyeinek (n = 10) és azok proliferatív elváltozásainak (n = 67) biopsiás mintáját, kórszövettani diagnózis végett küldték a SZIE-ÁOTK Kóronctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére 2008. január 1. és 2010. december 31-e között. A vizsgálataink során perianalis, egészséges hepatoid-sejtes mirigymintát [n = 10; 3 szuka és 7 kan; átlagéletkor: 7,3 év (5-10 év)], továbbá hepatoid-sejtes nodularis (göbös) hyperplasiát [n = 10; 6 szuka és 4 kan; átlagéletkor: 9,2 év (8-12 év)], adenomát [n = 12; 6 szuka és 6 kan; átlagéletkor: 8,6 év (7-10 év)], epitheliomát [n = 15; 8 szuka és 7 kan; átlagéletkor: 9,9 év (7-13 év)], differenciált carcinomát [n = 15; 9

szuka és 6 kan; átlagéletkor: 10,7 év (8-15 év)] és *differenciálatlan carcinomát* [n = 15; 11 szuka és 4 kan; átlagéletkor: 12,4 év (9-16 év)] tanulmányoztunk.

A minták feldolgozásánál, az immunhisztokémiai reakciók kivitelezésénél és kiértékelésénél a korábbi alfejezetekben leírt módszert, pozitív kontrollokat (**Lásd. 5.1.2. alfejezet**), illetve pontozásos (scoring) rendszert alkalmaztuk (**Lásd. 5.2.4. alfejezet**). (**Eredmények: 6.3.4. fejezet, 63. oldal.**)

5.3.6. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban

Vizsgálataink során 2002. január 1. és 2010. december 31-e között, a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékén 40 kutya tetemből izoláltunk pancreas mintákat. A vizsgálatra bevont szövetek a következők voltak: *elváltozásmentes pancreas* [n = 10; 6 szuka és 6 kan; átlagéletkor: 6,4 év (4-10 év)], *differenciált acinaris sejtes exocrin pancreas carcinoma* [n = 10; 2 szuka és 8 kan; átlagéletkor: 11 év (8-14 év)], *differenciálatlan acinaris sejtes exocrin pancreas carcinoma* [n = 10; 5 szuka és 5 kan; átlagéletkor: 10,1 év (8-16 év)], *differenciált acinaris sejtes exocrin pancreas carcinoma intrahepaticus metastasisa* (n = 5) és *differenciálatlan acinaris sejtes exocrin pancreas carcinoma intrahepaticus metastasisa* (n = 5).

A minták feldolgozásánál, az immunhisztokémiai reakciók kivitelezésénél és kiértékelésénél a korábbi fejezetben leírt módszert, külső pozitív kontrollokat, illetve a korábbi alfejezetben leírt (**Lásd. 5.2.4. alfejezet**) pontozásos (scoring) rendszert alkalmaztuk. (**Eredmények: 6.3.5. fejezet, 67. oldal.**)

5.4. Angiogenesis vizsgálatok

5.4.1. Claudin-5 alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban

Vizsgálataink során 2006. január 1. és 2008. december 31-e között, a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére diagnosztikai célból beérkezett, kutyákból származó, 8 %-os pufferolt formaldehid-oldatban, szobahőmérsékleten, 24 órán át konzervált, emlőmirigy biopátumokat használtunk fel. A paraffinos blokkba ágyazott minták között: *normális emlőmirigy* (n = 5), *simplex adenoma* (n = 12), *complex carcinoma* (n = 18), *differenciált grade I-es infiltráló simplex carcinoma* (n = 20), *differenciálatlan grade III-as infiltráló simplex carcinoma* (n = 20) és *pulmonalis secunder grade III-as infiltráló simplex carcinoma* (n = 10) volt. A daganatok érképző (angiogen) tulajdonságának jellemzése végett,

morphometriai módszerrel, mikroérsűrűség vizsgálatokat végeztünk, a kutyák elsődleges és áttéti daganataiban lévő vérereket jól feltüntető, endothel-specifikus **claudin-5** ellenanyag segítségével. Az immunhisztokémiai módszer kivitelezésénél utalunk a korábbi afejezetre (**Lásd. 5.2.1. alfejezet**).

Az emlődaganatok érdenzitásának, mikroérsűrűségének (MVD, Microvessel density), vagy microvascularisitásának meghatározásánál a daganatok állományában, az endothel-specifikus anti-claudin-5 ellenanyaggal jelölt metszetekben, a leginkább vascularisáltnak tűnő, négy különböző területet (hot spots) megkerestük és 200x-os nagyítás mellett digitalizált felvételt készítettünk. A fotodokumentumokat a továbbiakban, a claudin-5 immunreaktivitásra alapozva, Leica QWin V3.3.0 software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) segítségével kvantifikáltuk. A claudin-5 pozitív területeket pixel %-ban fejeztük ki. (**Eredmények: 6.4.1. fejezet, 72. oldal.**)

5.4.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban

A munkánk során a SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani tanszékére 2008. január 1. és december 31-e között beérkezett, 15 kutya bőrből sebészileg eltávolított, 8 %-os pufferolt formaldehid-oldatban konzervált bioptátumokat elemeztük. A fixálás után elkészült paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket haematoxilinnal és eosinnal festettük meg. Az immunhisztokémiai módszer kivitelezésénél a korábbi leírásunkra utalunk (**Lásd. 5.2.1. alfejezet**). Az immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz anti-**claudin-5** ellenanyagot (1:100 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Zymed Inc.) használtunk. (**Eredmények: 6.4.2. fejezet, 75. oldal.**)

5.4.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában

A munkánk során a SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani tanszékére 2002. január 1. és 2010. december 31-e között beérkezett, 25 meg nem határozott oktanú májbeteg kutya [9 szuka és 16 kan; átlagéletkor: 2,7 év (1-6 év)] májából sebészileg, illetve endoscopos mintavételezés által eltávolított, 8 %-os pufferolt formaldehid-oldatban konzervált bioptátumokat elemeztük. A standardizáló vizsgálatainkhoz 5 kutya tetemből [3 szuka és 2 kan; átlagéletkor: 8,4 év (6-10 év)] származó, elváltozásmentes májmintát vontunk be. A fixálás után elkészült paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket haematoxilinnal és eosinnal festettük meg. A májelváltozások patológiai diagnosztikáját a *WSAVA Standards for clinical and histological*

diagnosis of canine and feline liver disease című klinikopatológiai könyvre alapoztuk (Rothuizen et al., 2006). Az immunhisztokémiai módszer kivitelezésénél a korábbi leírásunkra utalunk (**Lásd. 5.2.1. alfejezet**). Az immunhisztokémiai vizsgálataink során anti-**claudin-5** ellenanyagot (1:100 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Zymed Inc.) használtuk fel.

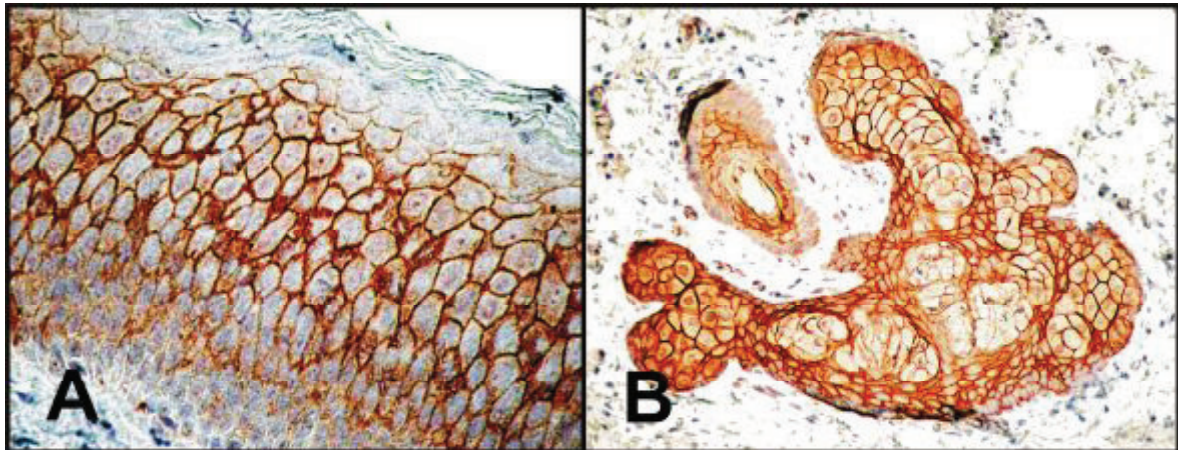
A kutyákból származó, intact necropsiás májmintákban végzett kórszövettani vizsgálataink során a Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp, illetve ahhoz adaptált oculometer segítségével, kétdimenziós kvantitativ histomorphometriai vizsgálatokat végeztünk. Ennek során megmértük az általunk kis- (90 – 300 μm), középnagy- (300 – 800 μm) és nagy csoportba (> 800 μm) sorolt portalis terület legnagyobb hosszanti átmérőjét, továbbá megszámloltuk ezen szöveti területekben észlelhető portalis hepaticus arteriolák, portalis venulák és portalis nyirokerek számát. A következő lépésben a májbiopsiás mintákban végeztük el az előbbi három histomorphometriai paraméter vizsgálatát, tanulmányozva a portalis arteriolák, venulák és nyirokerek számbeli változását. (**Eredmények: 6.4.3. fejezet, 76. oldal.**)

6. Eredmények

6.1. Pozitív kontrollok

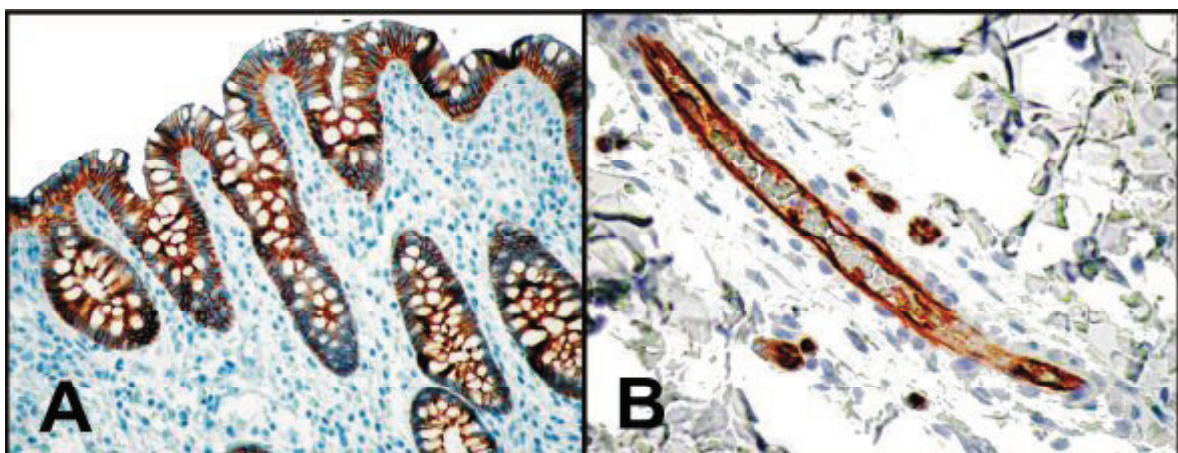
6.1.1. Külső human pozitív kontrollok

Az anti-*claudin-1*-el végzett vizsgálataink során human normál bőrmintát használtunk külső pozitív kontrollként, amelyben a stratum spinosum rétegében lévő hámsejtekben (**2.A. ábra**), illetve a faggyúmirigyeket felépítő sebocytákban tapasztaltunk intenzív lateralis membrán pozitivitást (**2.B. ábra**).



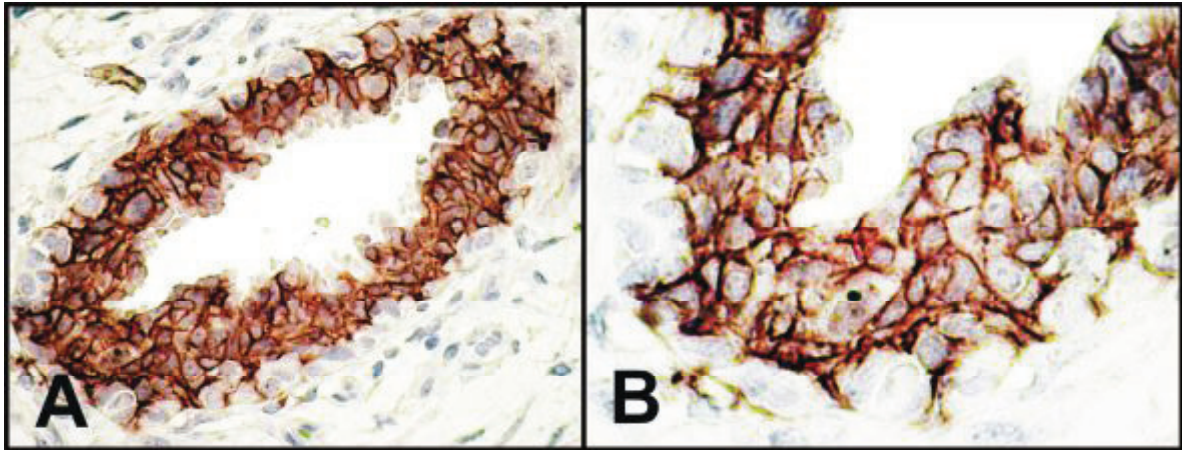
2. ábra Human normál bőrminta. Claudin-1 külső pozitív kontrollok. **A.** Jól látható az intact bőr keratinocytáinak linearis membrán pozitivitása (barna színreakció) (IH, 400x). **B.** Claudin-1 membrán pozitivitást mutató sebocyták intact faggyúmirigyben (IH, 200x).

Az anti-*claudin-3*-mal és az anti-*claudin-4*-el végzett vizsgálataink során human intact colon nyálkahártyát használtunk kontrollként, amelyben az enterocytákban intenzív basolateralis membrán pozitivitást tapasztaltunk (**3.A. ábra**). Az anti-*claudin-5*-tel végzett vizsgálataink során human intact bőrt használtunk külső pozitív kontrollként, amelyben a dermalis vérerek endothelsejtjei mutattak intenzív membrán immunreaktivitást (**3.B. ábra**).



3. ábra Human, külső pozitív kontrollok. **A.** Jól látható az intact remesebél colonocytáinak claudin-3 membrán pozitivitása (IH, 200x). **B.** Claudin-5 membrán pozitívás jeleit mutató endotheliocyták intact dermalis kis artériákban (IH, 200x).

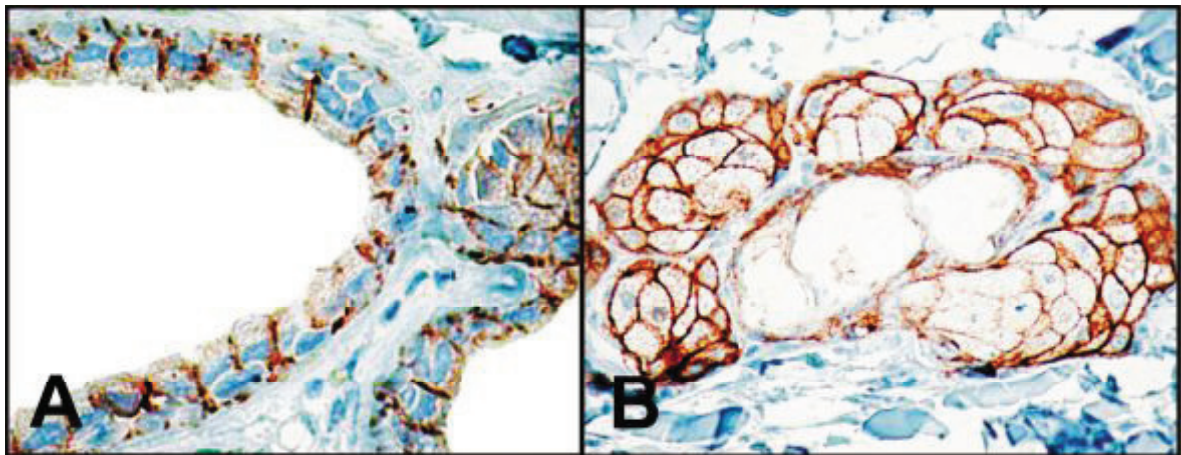
Az anti-*claudin-7*-tel végzett vizsgálataink során human emlőmirigyből kiinduló fibroadenomát (FA) használtunk kontrollként, amelynek benignus hámsejtjei laterális membrán pozitivitást mutattak (**4. ábra**). A vizsgálataink során részben az elsődleges antitestek kihagyásával végzett reakciókat, illetve részben a mirigylebenyék közötti és körüli fibroblast sejteket használtuk negatív kontrollként.



4. ábra Claudin-7 külső pozitív human kontroll. **A.** Human emlőmirigy FA. Jól érzékelhető a benignus luminalis epithel sejtek linearis claudin-7 membrán pozitivitása, a claudin-7 negatív, jóindulatúan burjánzó fibroblastokkal (negatív kontrollokkal) körülölelve (IH, 200x). **B.** Nagyobb nagyítású felvétel a FA-ról (IH, 400x).

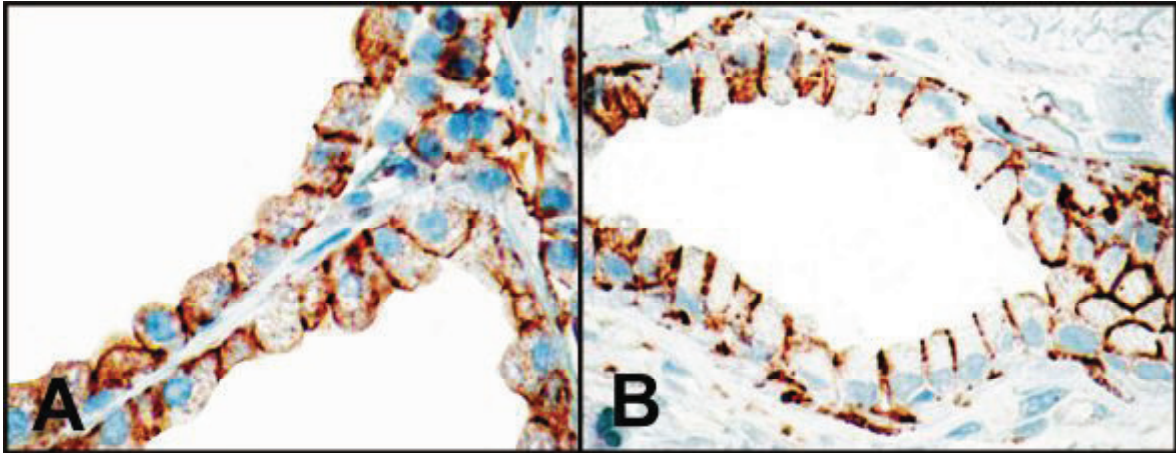
6.1.2. Belső pozitív kontrollok

Immunhisztokémiai vizsgálataink során a következő megbízható belső pozitív kontrollokat szelektáltuk. A claudin-1 protein esetében a kutyák intact epidermisének és folliculusainak hámsejtjeiben, a verejtékmirigy- (**5.A. ábra**), illetve a faggyúmirigy-hámsejtjeiben (**5.B. ábra**) intenzív membrán pozitivitást tapasztaltunk.



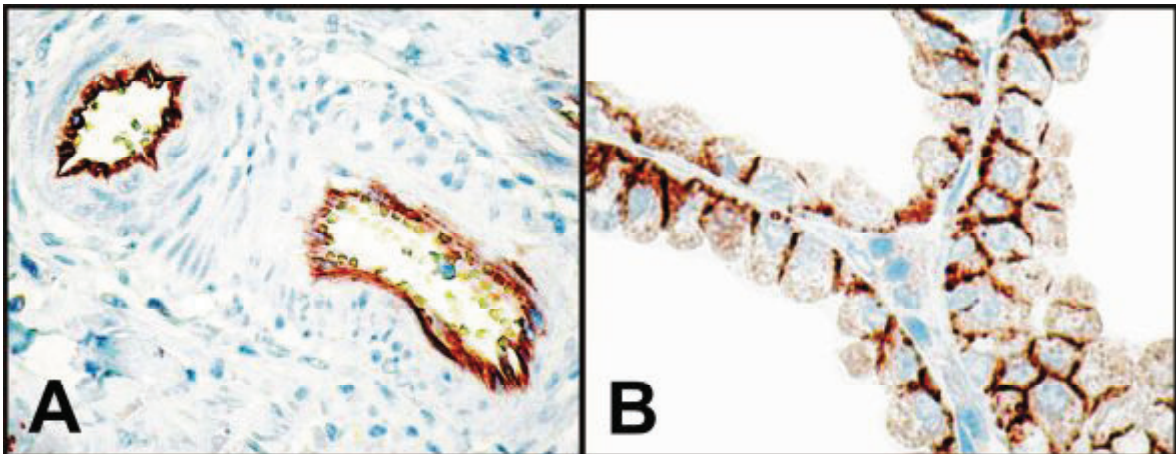
5. ábra Belső pozitív kontrollok. **A.** Kutya intact apocrin mirigyhámsejtjeiben észlelhető lineáris claudin-1 membrán pozitívitás (IH, 400x). **B.** Claudin-1 lineáris immunreaktivitás kutya intact faggyúmirigyének sebocytáiban (IH, 400x).

A claudin-3 (**6.A. ábra**) és -4 molekulák (**6.B. ábra**) esetén intenzív membrán pozitivitást tapasztaltunk az apocrin-mirigyhámsejtekben (verejékmirigy-hámsejtekben).



6. ábra Belső pozitív kontrollok. **A.** Claudin-3 lineáris, pozitív membrán reakció, kutya intact verejékmirigyében (IH, 400x). **B.** Claudin-4 lineáris membrán immunreaktivitás, kutya egészséges apocrin mirigyében (IH, 400x).

A claudin-5 integráns fehérje vizsgálata során a vér- és nyirokerek endothel sejtjeiben figyeltünk meg erős, membrán immunreaktivitást (**7. A. ábra**). A claudin-7 molekulák esetén intenzív membrán pozitivitást tapasztaltunk az apocrin-mirigyhámsejtekben (**7.B. ábra**) (Jakab et al., 2008e).



7. ábra Belső pozitív kontrollok. **A.** Intenzív claudin-5 membrán pozitív endothelsejtek kutya elváltozásmentes dermalis kis artériáiban (IH, 400x). **B.** Intenzív, lineáris claudin-7 membrán immunreaktivitás, kutya intact apocrin mirigyhámsejtjeiben (IH, 400x).

A dolgozat következő fejezeteit a továbbiakban az anti-claudin-1, -3, -4, -5 és -7 antitestekre alapozott, három különböző irányú vizsgálatnak megfelelően taglalom, a jobb áttekinthetőség és a követhetőség érdekében.

6.2. Tumordiagnosztika

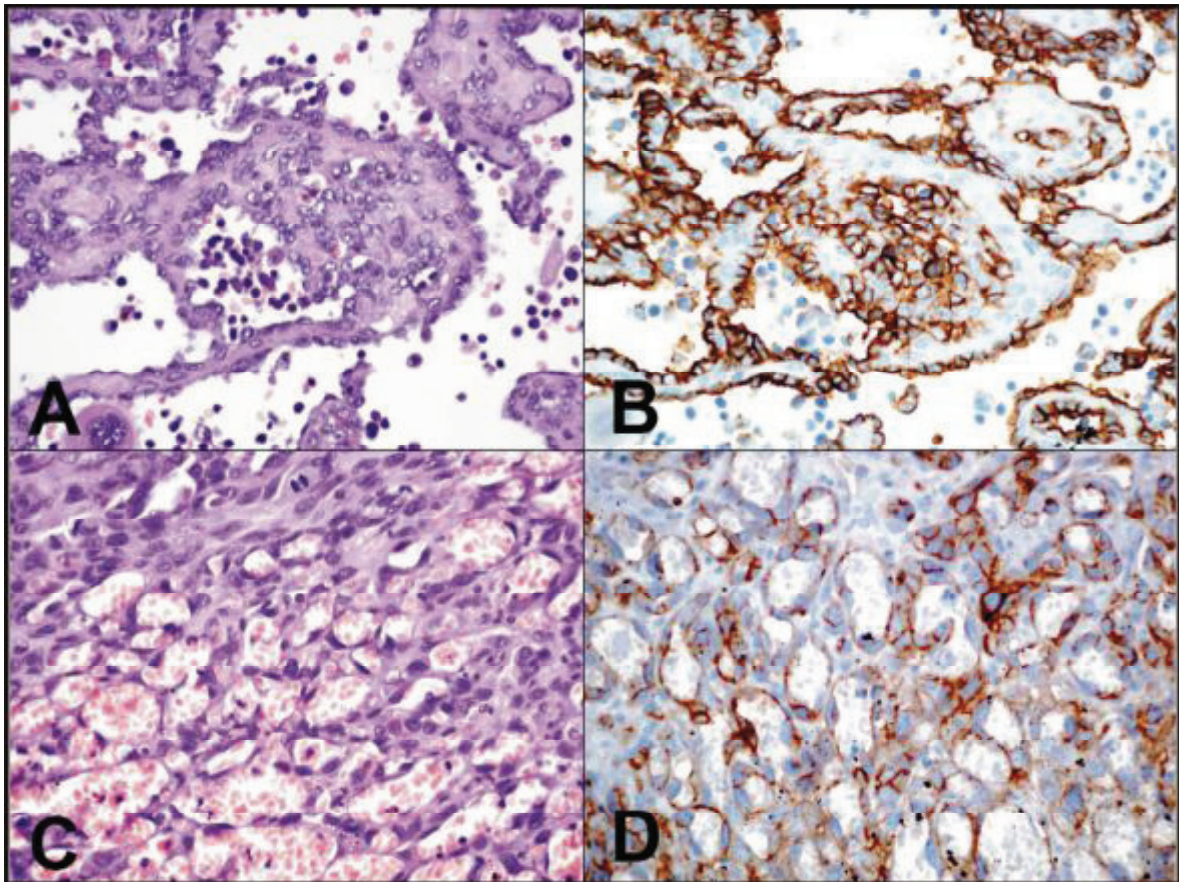
6.2.1. Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában

Az endothel markerekkel (vWf, CD31, claudin-5) végzett immunhisztokémiai vizsgálataink során az endothelialis daganatokban eltérő pozitívítást észleltünk. A nem endothelialis tumorok parenchyma sejtjei az endothel markerekre negativitást mutattak. A jóindulatú haemangioma és lymphangioma esetén mindhárom antitesttel 100%-os pozitívítást tapasztaltunk. A 26 HSA közül 8-ban (30,77%), 3 cavernosusban, 5 solidban vWf negativitást észleltünk. Ezzel szemben valamennyi HSA minta (100%) intenzív diffúz CD31 és claudin-5 membrán pozitívítást mutatott (Táblázat 12.).

Szövetminta (tumor)	Esetszám	B	N	vWf	CD31	Claudin-5
1. HSA capillaris típusú differenciált	4	2	2	P = 4	P = 4	P = 4
2. HSA cavernous típusú differenciált	11	9	2	P = 8 N = 3	P = 11	P = 11
3. HSA solid típusú differenciálatlan	11	5	6	P = 6 N = 5	P = 11	P = 11
4. Haemangioma (5 cavernosus, 1 capillaris, 1 orsósejtes, 1 arteriovenosus 1 angioliipoma)	9	9	-	P = 8	P = 8	P = 8
5. Lymphangioma	3	3	-	P = 3	P = 3	P = 3
6. Haemangiopericytoma	7	7	-	N	N	N
7. Fibrosarcoma	11	11	-	N	N	N
8. Myxosarcoma	3	3	-	N	N	N
9. Leiomyosarcoma	3	-	3	N	N	N
10. Cardialis rhabdomyosarcoma	3	-	3	N	N	N
11. MPNSTs	3	2	1	N	N	N
12. Orsósejtes melanoma	4	4	-	N	N	N
13. Synovialis sarcoma	4	2	2	N	N	N
14. Osteosarcoma	5	-	5	N	N	N
15. Chondrosarcoma	4	4	-	N	N	N
16. Benignus fibroblast proliferatio	5	5	-	N	N	N
17. Vaginalis leiomyoma	5	1	4	N	N	N
Összesen:	95	67	28			

Táblázat 12. A megvizsgált, kutyákból származó orsósejtes komponensű, a HSA-tól differenciál diagnosztizálendő daganatok vWf, CD31 és claudin-5 immunreaktivitása. Jelölések: B = Biopsia; N = Necropsia; P = Pozitív, N = Negatív.

Az általunk használt semiquantitativ pontozási rendszerben a differenciált (capillaris, cavernosus típusú) HSA daganatsejtek 70-100%-a mutatott CD31 pozitivitást (átlagpont: 4,88), míg a differenciált HSA neoplasticus sejtek 90-100%-a claudin-5 pozitív volt (átlagpont: 4,96) (12. ábra). Ugyanez az arány a differenciálatlan (solid típusú) HSA-ban a következő volt: 40-100% CD31 pozitívitas (átlagpont: 4,44), illetve 90-100% claudin-5 pozitívitas (átlagpont: 4,84) (13.A-B. ábra) (Táblázat 13.).

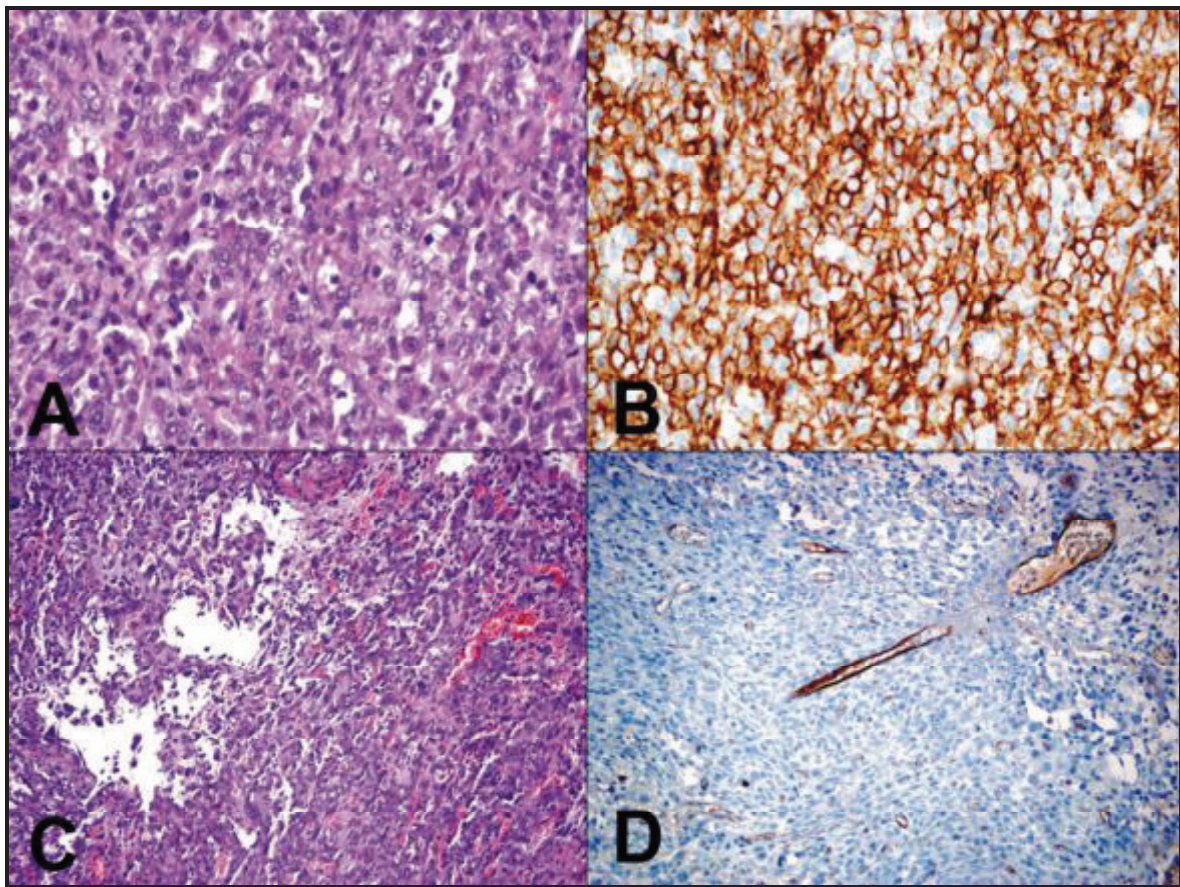


12. ábra Kutyából származó HSA. A. Cavernosus típusú HSA (HE, 200x). B. Intenzív diffúz claudin-5 membrán pozitívitas a malignus endothelioblastokban a cavernosus típusú HSA-ban (IH, 200x). C. Capillaris típusú HSA (HE, 200x). D. Intenzív diffúz claudin-5 membrán pozitívitas a malignus endothelioblastokban a capillaris típusú HSA-ban (IH, 200x)

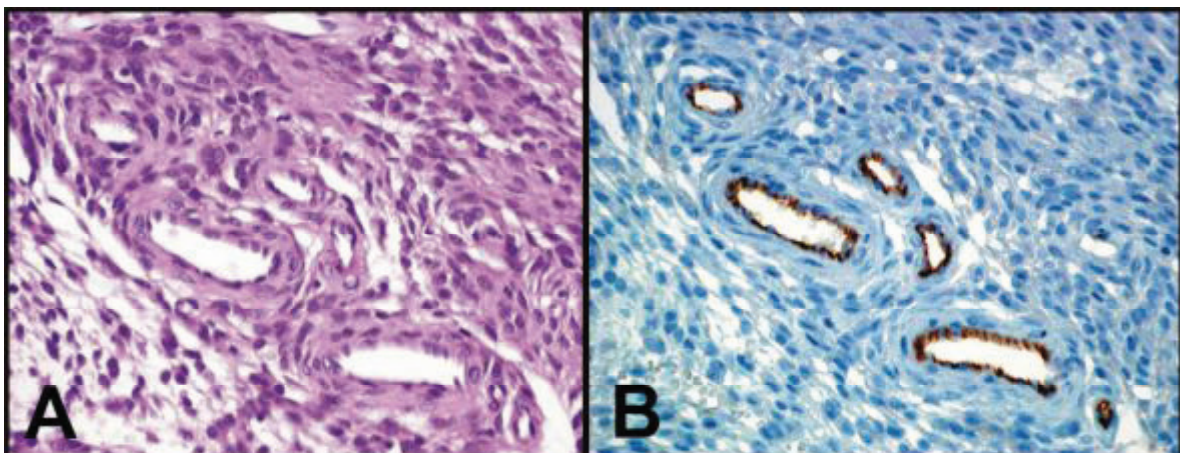
Endothel marker	Capillaris és cavernosus típusú differenciált HSA	Solid típusú differenciálatlan HSA
CD31	4,88 (4,7 – 5)	4,44 (4,1-4,7)
Claudin-5	4,96 (4,9 – 5)	4,84 (4,7 – 5)

Táblázat 13. A CD31 és claudin-5 endothel markerekkel végzett immunhisztokémiai reakciók pontozásos rendszerben megadott eredményének összehasonlító táblázata.

A megvizsgált, nem endothelialis eredetű daganatokban a tumor-indukált mikroerek endothel sejtjei intenzív CD31 és claudin-5 pozitivitást adtak (13.C-D. és 14. ábra).

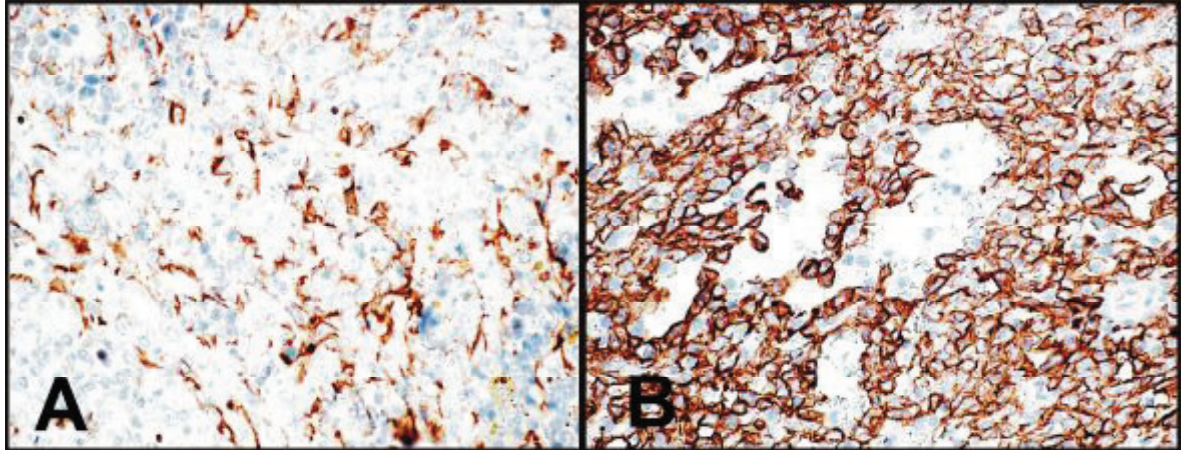


13. ábra A. Solid, differenciálatlan HSA (HE, 200x). **B.** Diffúz, intenzív, egyértelmű claudin-5 membrán pozitívítás a solid HSA-ban (IH, 200x). **C.** Solid HSA-szerű kórszövettani megjelenésű fibrosarcoma állománya tumor-indukált mikroerekkel és multiplex vérzéssel (HE, 100x). **D.** A fibrosarcoma sejtek claudin-5 negatívítást, míg az intratumoralis mikroerek endothelsejtjei intenzív claudin-5 pozitívítást mutatnak (belső pozitív kontroll) (IH, 100x).



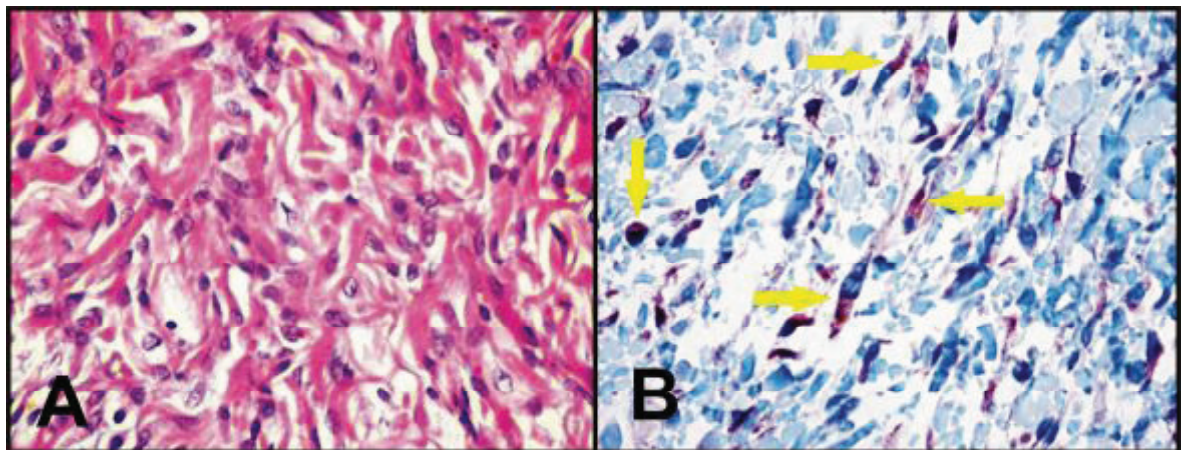
14. ábra A. Jól vascularisált haemangiopericytoma (HE, 400x). **B.** A claudin-5 negatív haemangiopericytoma állományában claudin-5 pozitív mikroerek (IH, 400x).

Valamennyi, nem pufferolt, nem semlegesített 15 %-os formaldehid-oldatban 2-4 hétig túlfixált HSA minta esetében intenzív claudin-5 membrán pozitivitást tapasztaltunk. Ezzel szemben a tízből nyolc minta CD31 negatívnak bizonyult, illetve a két CD31 pozitív túlkonzervált minta egyikében volt csak gyenge, nem diffúz, multifocalis CD31 immunreaktivitás (15. ábra).

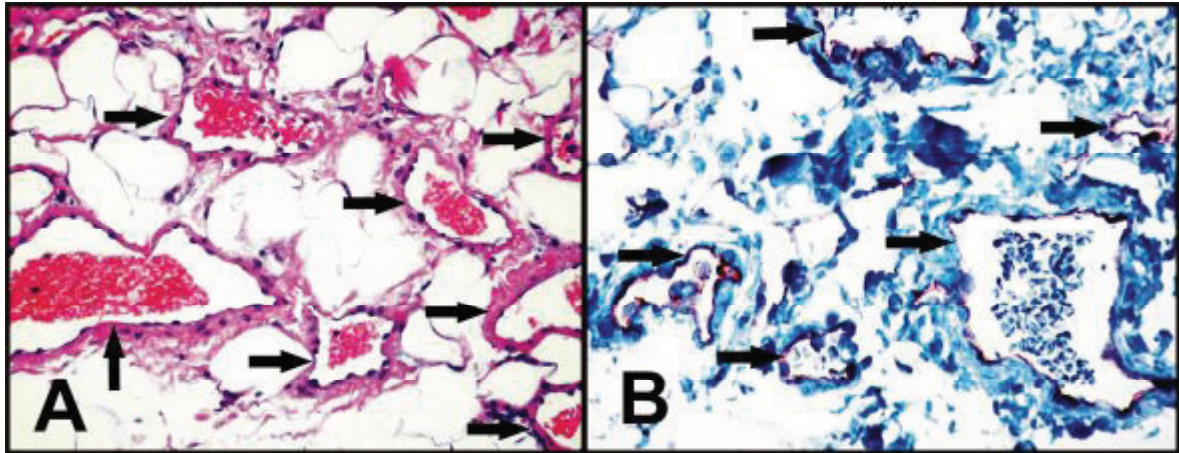


15. ábra **A.** Gyenge, multifocalis (nem diffúz) CD31 membránpozitivitás nem standard körülmények között, túlkonzervált HSA-ban (IH, 200x). **B.** Intenzív, diffúz, claudin-5 membránpozitivitás a túlfixált HSA-ban (IH, 200x).

A jóindulatú haemangiómák és lymphangiómák esetén mindhárom endothelspecifikus antitesttel (anti-vWf, anti-CD31, anti-claudin-5) 100%-os pozitivitást tapasztaltunk. Egy esetben, rutin kórszövettani vizsgálattal benignus fusocellularis mesenchymalis tumornak tűnő, orsósejtes haemangioma excisional biopátum (16. ábra), illetve egy esetben egy benignus mesenchymoma, Tru-cut biopsiás tűvel vett core biopátumának, úgynevezett angioliptomának korrekt definitív diagnózisát segítette a claudin-5 marker (17. ábra).



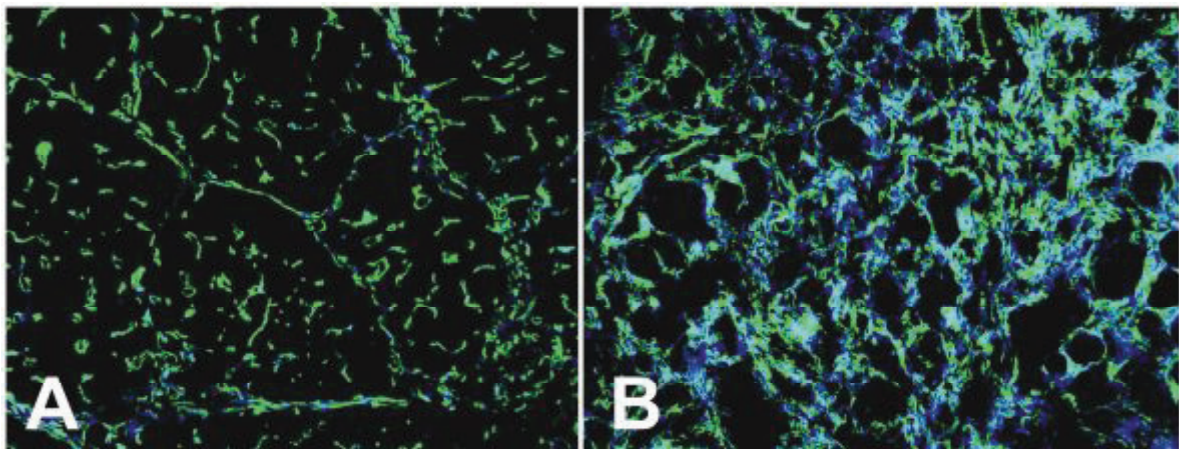
16. ábra **A.** Benignus fusocellularis haemangioma fénymikroszkópos felvétele (HE, 200x). **B.** Intenzív claudin-5 pozitivitást mutató benignus endothel sejtek (nyilak), claudin-5 negatív fibroblastok és collagen rostok együttes burjánzása az orsósejtes haemangiómában (IH, 200x).



17. ábra **A.** A core-bioptátum kórszöveti felvételén nyilakkal jelölve látható az angiolipoma haemangioma komponense (HE, 200x). **B.** Intenzív claudin-5 membrán pozitivitás (nyilak) az angiolipoma benignus endothel sejteiben (IH, 200x).

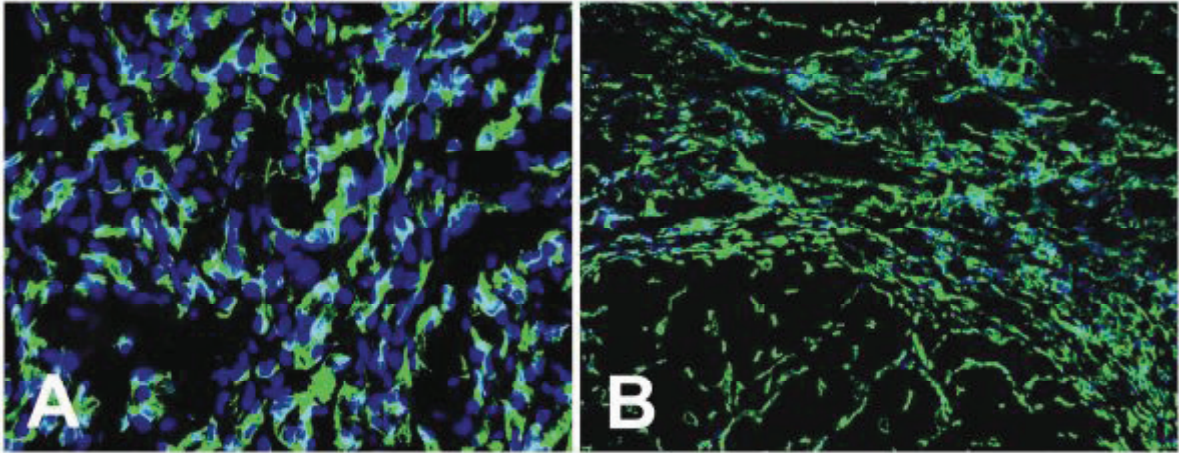
6.2.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A konfokális mikroszkópos vizsgálataink során intenzív claudin-5 membránreakciót (jelet) észleltük a tumoros endothelioblastok membránjában, mind az egysoros daganatos endothelbéléssel rendelkező (**18.A. ábra**), mind a többsoros neoplasticus endothelsejt réteggel rendelkező (**18.B. ábra**) cavernosus HSA-ák esetében. Az alapvető morfológiai eltérés a paraffinos blokkokra alapozott immunhisztokémiai vizsgálataink és a konfokális mikroszkópos vizsgálataink esetén az volt, hogy az első esetben a claudin-5 membrán pozitivitás barna színreakció formájában (DAB-chromogen) volt észlelhető világos háttérben, az utóbbi esetben viszont zöld, intenzívebb (fluoreszcensen jelölt második antitestek), térben jobban definiálható membránreaktivitást észlelehattünk sötét háttérben. Mindkét esetben kék sejtmagelszíneződést tapasztalhattunk (hemalaun háttérfestés; 4,6-diamidino-fenilindol kék fluoreszcens magfesték).



18. ábra **A.** Az egyrétegű endothelbéléssel rendelkező, cavernosus HSA claudin-5 expressziós mintázata (zöld színreakció) konfokális mikroszkópos felvételen. A sejtmagok a sötét háttérben kék színben láthatók (100x). **B.** Claudin-5 expressziós mintázat a többrétegű daganatos endothelsejt béléssel rendelkező, cavernosus HSA-ban (Konfokális mikroszkópos felvétel, 100x).

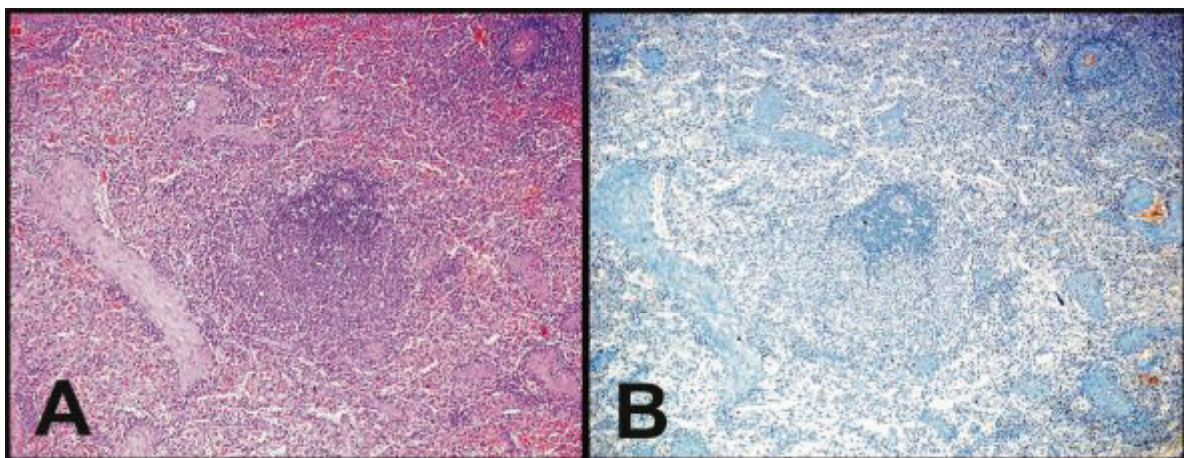
A solid HSA mintákban szintén intenzív claudin-5 membránpozitivitást tapasztaltunk (**19.A. ábra**). Egy esetben vegyes kórszövettani megjelenésű, cavernosus-solid típusú HSA-t vizsgáltunk (**19.B. ábra**).



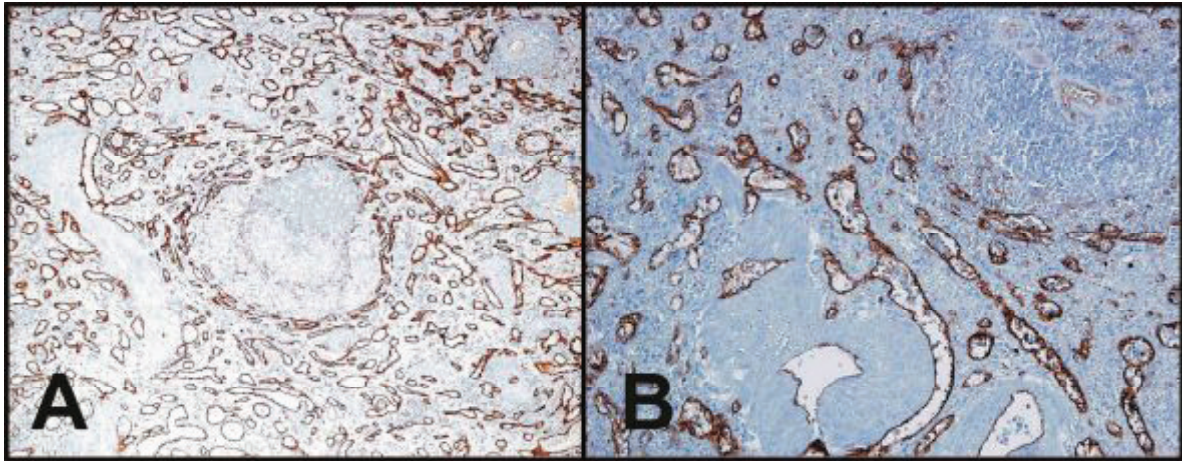
19. ábra A. Claudin-5 expressziós mintázat a solid HSA-ban (Konfokális mikroszkópos felvétel, 200x)
B. A felvételen a vegyes típusú, cavernosus-solid HSA claudin-5 expressziós mintázata látható (Konfokális mikroszkópos felvétel, 100x) (Jakab et al., 2009h).

6.2.3. Lépminták vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel

A megvizsgált intact lépmintákban (**20.A. ábra**) a CD31 a continuális endotheliumban, így a trabecularis artériák és vénák, továbbá a centralis artériákban pozitív reakciót adott, viszont a discontinuális endothelben, így a vörös pulpa sinusaiban, továbbá a capillariskban CD31 negativitást tapasztaltunk (**20.B. ábra**). Az anti-claudin-5-tel végzett vizsgálatok során azt találtuk, hogy mind a continuális, mind a discontinuális endothelium intenzív, diffúz, jól értékelhető membránpozitivitást mutatott (**21. ábra**).

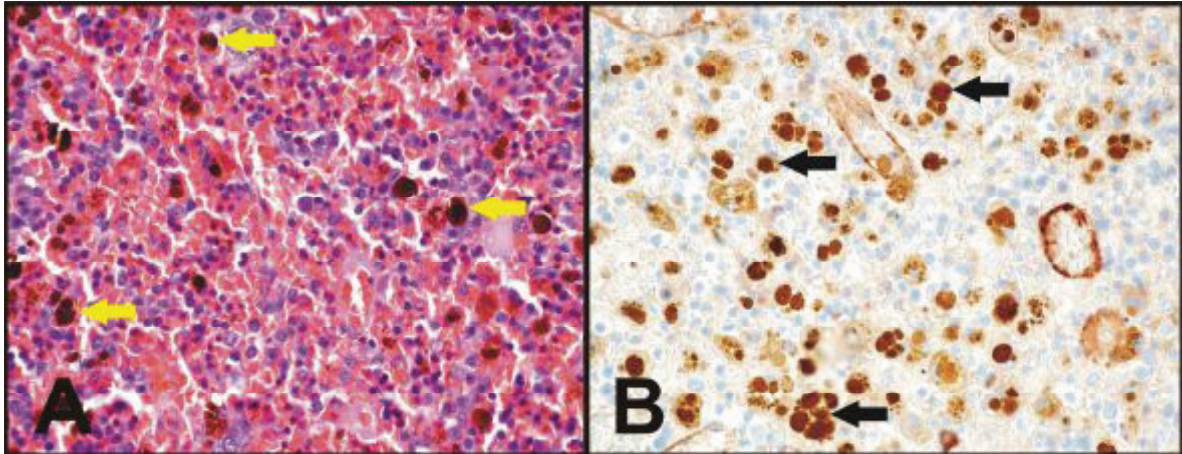


20. ábra A. Elváltozásmentes lépszövet kutyából. A kép középső részén és a jobb felső sarokban a fehér pulpát képviselő, periarterialis lymphaticus hüvely látható a centralis kis artériák körül, illetve környezetükben a vérrel telt vörös pulpa sinusok és simaizomszövetben gazdag trabeculák (HE, 40x).
B. CD31 immunhisztokémiai reakció kutyából származó intact lépszövetben. CD31 negatív discontinuális endothelium látható a vörös pulpában (IH, 40x).



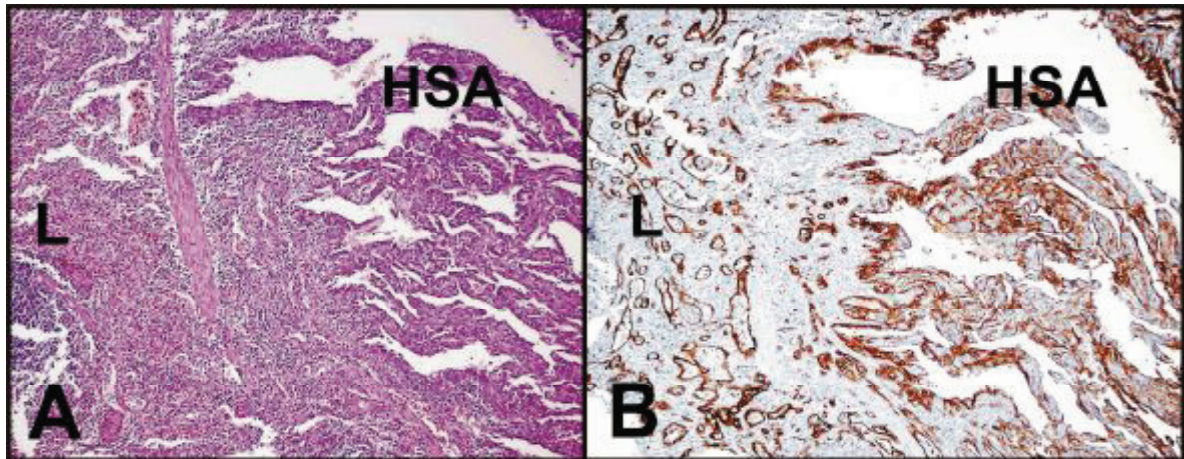
21. ábra A-B. Claudin-5 immunhisztokémiai reakció kutyából származó intact lépszövetben. Jól látható barna színreakció formájában a discontinualis claudin-5 pozitív endothellel bélelt sinus rendszer (IH, A: 40x, B: 100x).

A lymphocyták, a macrophagok, a stromalis sejtek, az extramedullaris haemopoeticus őssejtek, továbbá a trabecularis és capsularis simaizomsejtek, a visceralis peritoneum mesothelsejtjei nem expresszálták a claudin-5 molekulát. Fals pozitív reakciót adtak a metszetekben a siderocyták (haemosiderint termelő falósejtek), illetve a cytoplasmájukban felhalmozódott haemosiderin pigment (**22. ábra**).



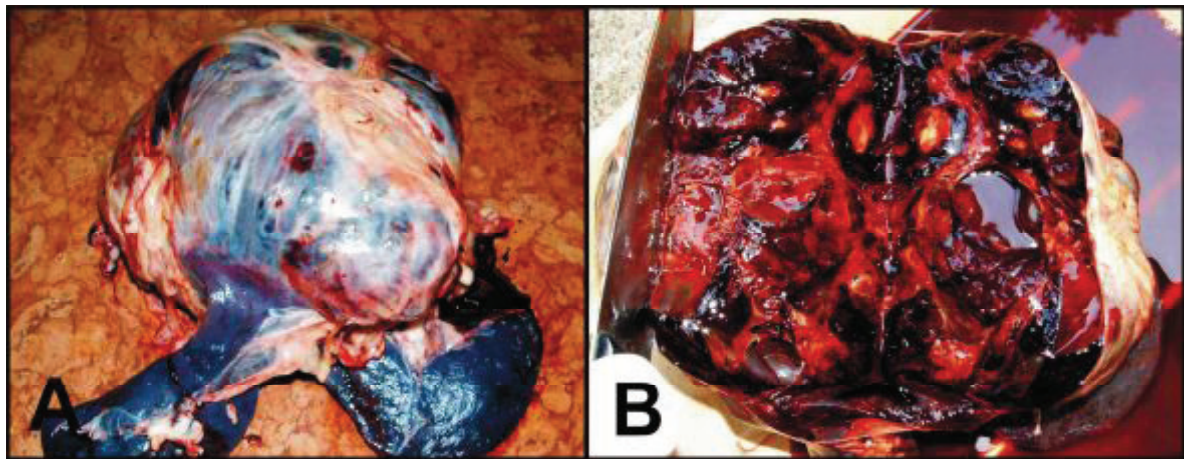
22. ábra A. Léphaematoma környezetében kialakult siderocytá proliferatio (nyilak) (HE, 200x). **B.** Fals claudin-5 pozitív siderocyták a lépben (nyilak) (IH, 200x).

Az intrapulparis acut léphaematómák vizsgálata során a CD31-el szemben, a vörös pulpa sinusait bélelő endothelium kitűnő claudin-5 pozitív belső kontrollként működött. Ennek megfelelően egyértelmű claudin-5 pozitivitást találtunk mind a peritumoralis pozitív kontrollban, mind a primer lép HA-ákban és HSA-ákban (**23. ábra**).

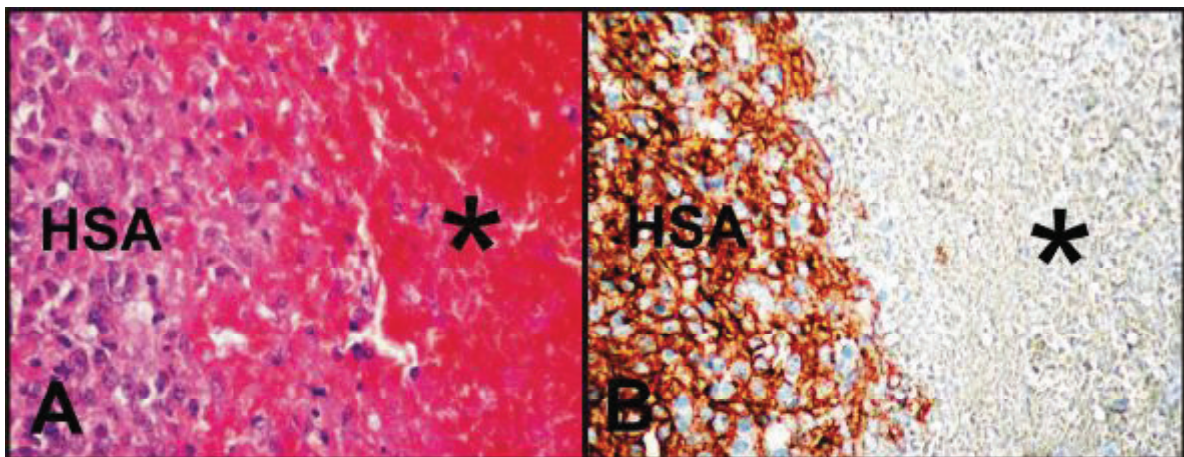


23. ábra A. Lép eredetű, differenciált, primer HSA környezetében a vörös pulpa szövet (L) (HE, 40x). **B.** Megbízható belső pozitív kontrollként szolgáló sinus endothelium (L) a claudin-5 pozitív HSA környezetében (IH, 40x).

A claudin-5 jól értékelhető pozitivitást adott az endothelialis daganatok (HA, HSA) indukálta léphaematómákban (**24- 25. ábra**), míg claudin-5 negativitást tapasztaltunk a solid HSA-szerű megjelenésű léptumорок (fibrosarcomák) intrapulparis vérömlenyeiben (**26.A. ábra**).

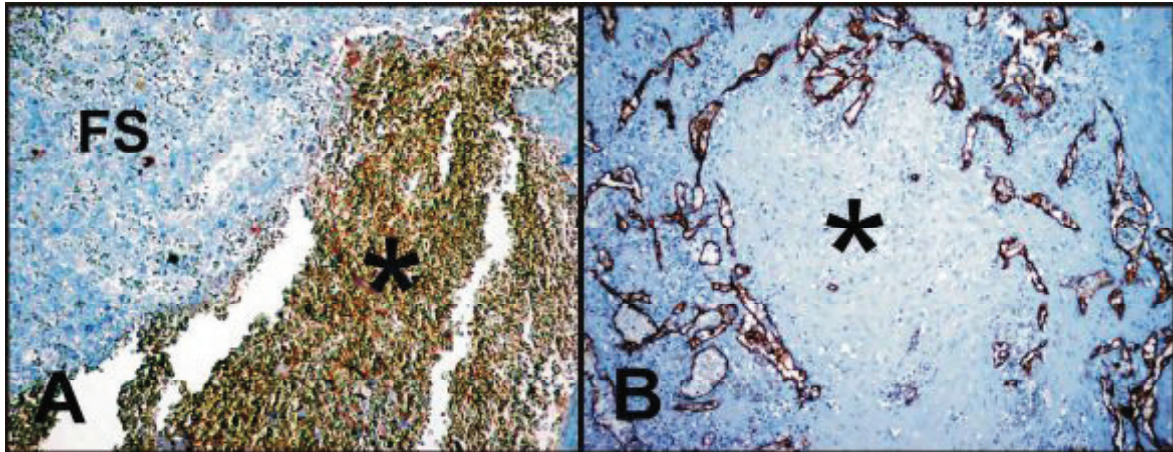


24. ábra A. Lép eredetű, differenciálatlan, primer HSA esetén kialakult acut léphaematoma makroszkópos felvétele. **B.** Az intrapulparis haematoma metszészlapja.



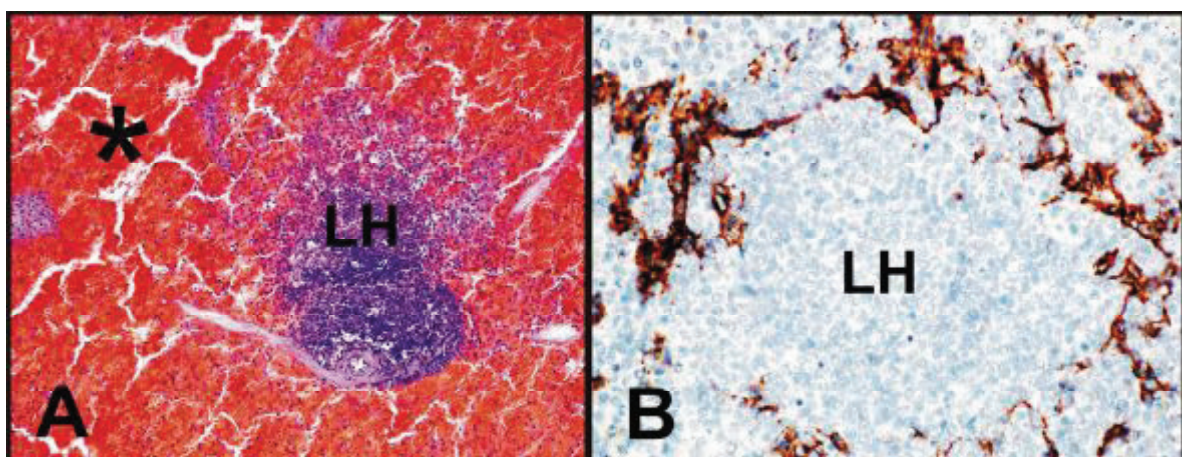
25. ábra A. Lép eredetű solid, differenciálatlan primer HSA esetén kialakult heveny léphaematoma (csillag) (HE, 200x). **B.** Claudin-5 pozitívitas a solid HSA-ban, a környezetben kiterjedt claudin-5 negatív extravasalódott vörösvérsejttömeg (csillag) (IH, 200x).

A fibrotisálódó, szervülő, idült léphaematómák vizsgálata során CD31 negatív, claudin-5 pozitív endothellel bélelt, torzult szerkezetű sinusrendszert és claudin-5 negatív proliferáló fibroblastokat figyeltünk meg (26.B. ábra).



26. ábra A. Lép eredetű solid, differenciálatlan primer HSA-szerű kórszövettani megjelenésű, claudin-5 negatív fibrosarcoma (FS) indukálta heveny léphaematoma (csillag) (IH, 200x). **B.** Claudin-5 pozitív, deformálódott szövettani szerkezetű sinusok a lépfibrosis környezetében (csillag) (IH, 100x).

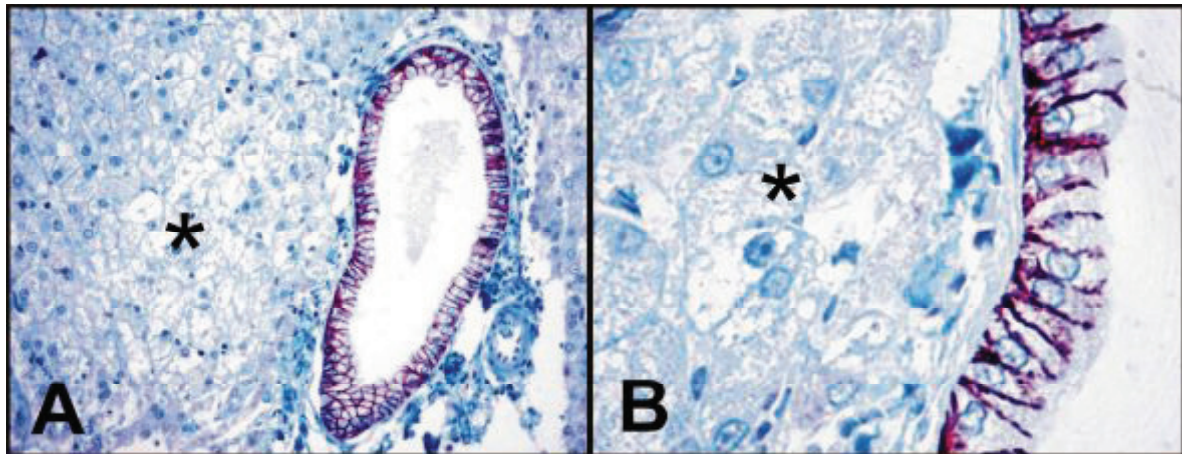
A lymphoid hyperplasiák esetén kialakuló léphaematómákban jól értékelhető claudin-5 pozitivitást tapasztaltunk a perifollicularis lymphoid tüszők nyitott capillárisaiban, claudin-5 negatív nyiroksejt állománnyal (27. ábra). (Következtetések: 7.1.1. fejezet, 79. oldal.)



27. ábra A. Lymphoid hyperplasia (LH) indukálta heveny léphaematoma (csillag) (HE, 100x). **B.** Claudin-5 pozitív nyitott, deszorganizált capillarisok a claudin-5 negatív proliferáló lymphoid sejtek (LH) periferiáján (IH, 200x).

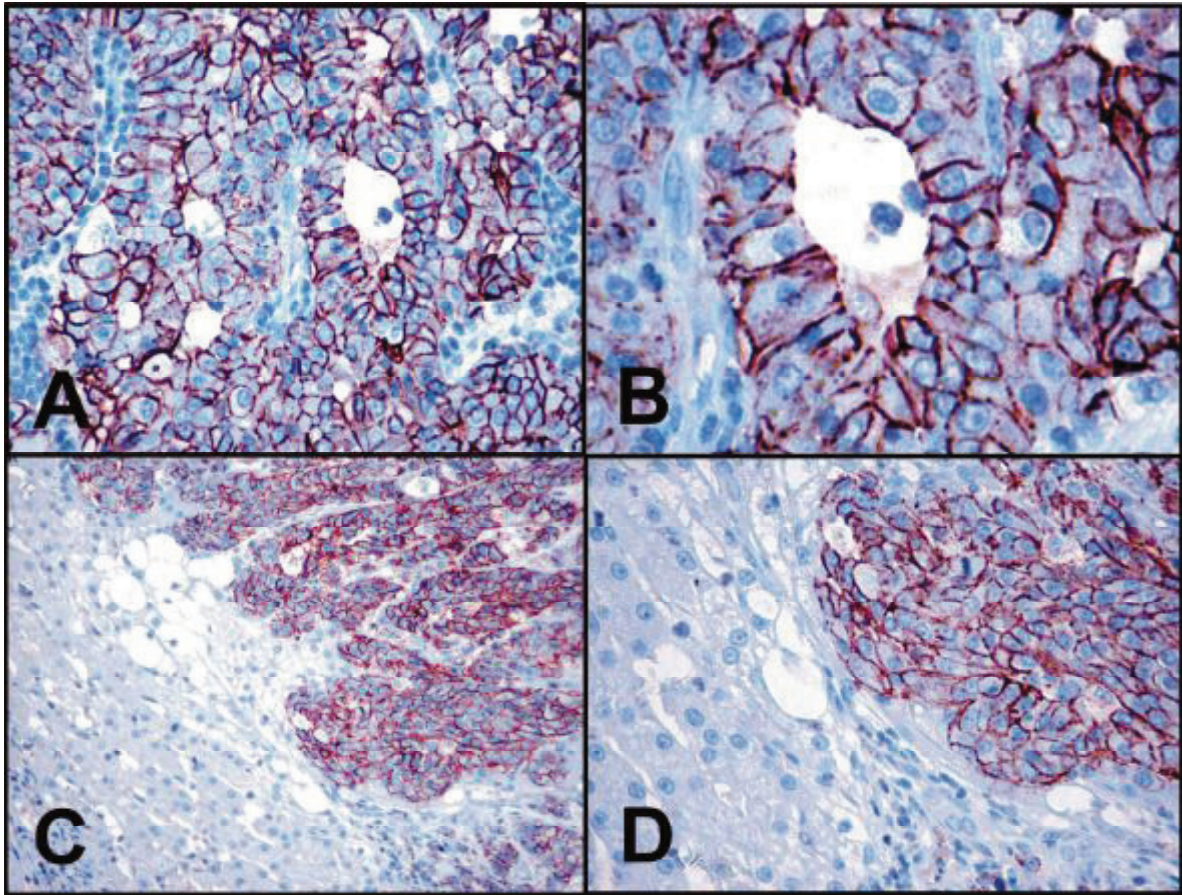
6.2.4. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban

A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy valamennyi intact májszövetben a hepatocyták, a sinusokat és a portalis ereket bélelő endothel sejtek, a portalis fibroblastok, a Kupffer-sejtek, a nagyobb intrahepaticus erek tunica mediájának és tunica adventitiájának sejtjei és a mesothelialis sejtek claudin-7 negatívak voltak. Ezzel szemben valamennyi intact máj mintában (15/15; 100%) az epeutakban, átmérőtől függetlenül, a cholangiocyták (biliaris epithelsejtek) intenzív (++++) basolateralis claudin-7 membránpozitivitást mutattak (28. ábra).



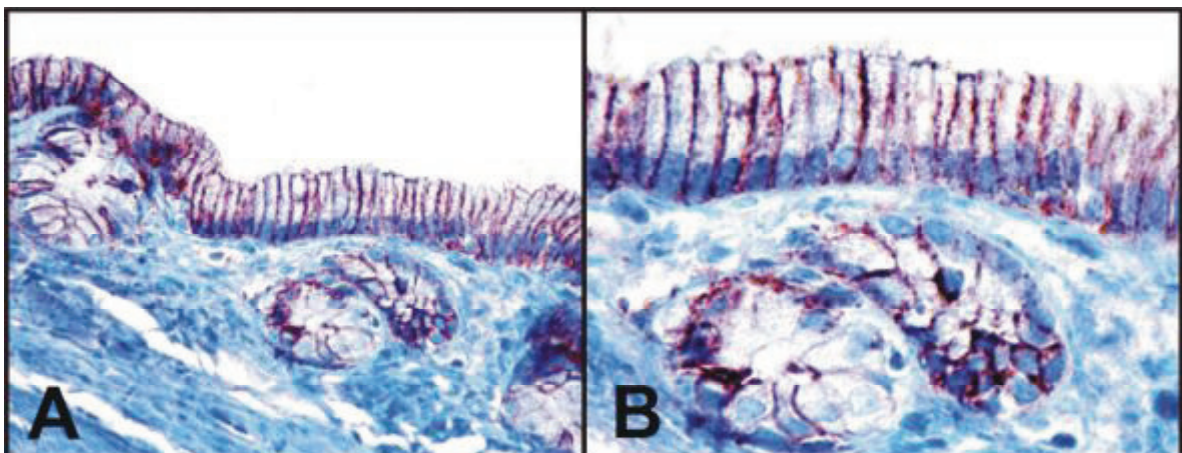
28. ábra A. Intenzív, claudin-7 membránpozitivitást mutató intact cholangiocyták, claudin-7 negatív májsejtek környezetében (csillag) (IH, 100x). B. Nagyobb nagyítású felvétel a claudin-7 pozitív epeúti hámsejtekről és a claudin-7 negatív májsejtekről (csillag) (IH, 400x).

Valamennyi benignus és malignus proliferatív biliaris epithel elváltozásban, így a CCH (6/6; 100%), CAD (10/10; 100%), dCCC (15/15; 100%) és nCCC mintákban (6/6; 100%) diffúz, intenzív (++++) basolateralis claudin-7 membránpozitivitást észleltünk (29. ábra).



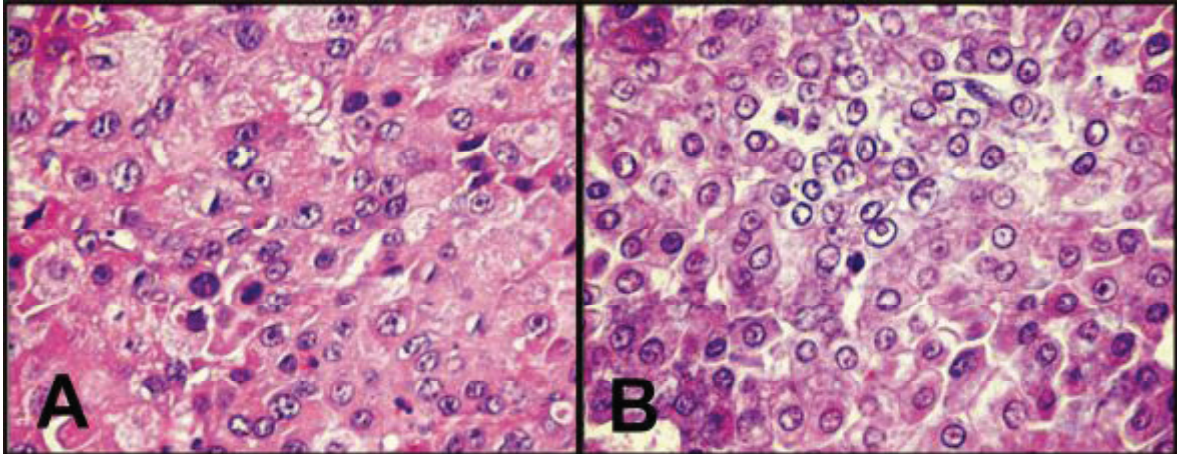
29. ábra **A.** Intenzív, claudin-7 membrán pozitivitás dCCC-ban (IH, 200x). **B.** Nagyobb nagyítású felvétel a claudin-7 pozitív dCCC-ről (IH, 400x). **C.** A dCCC-hoz hasonló, intenzív claudin-7 pozitivitás nCCC-ban, claudin-7 negatív peritumoralis májsejtekkel (IH, 100x). **D.** Nagyobb nagyítású felvétel a claudin-7 pozitív nCCC-ről és a negatív belső kontrollról (IH, 200x).

Valamennyi intact extrahepaticus epeúti (6/6; 100%), epehólyag (8/8; 100%) (**30. ábra**) és cysticus mucinosus epehólyag hyperplasiás minta (5/5; 100%) diffúz, intenzív (++++) claudin-7 membránpozitivitást adott.

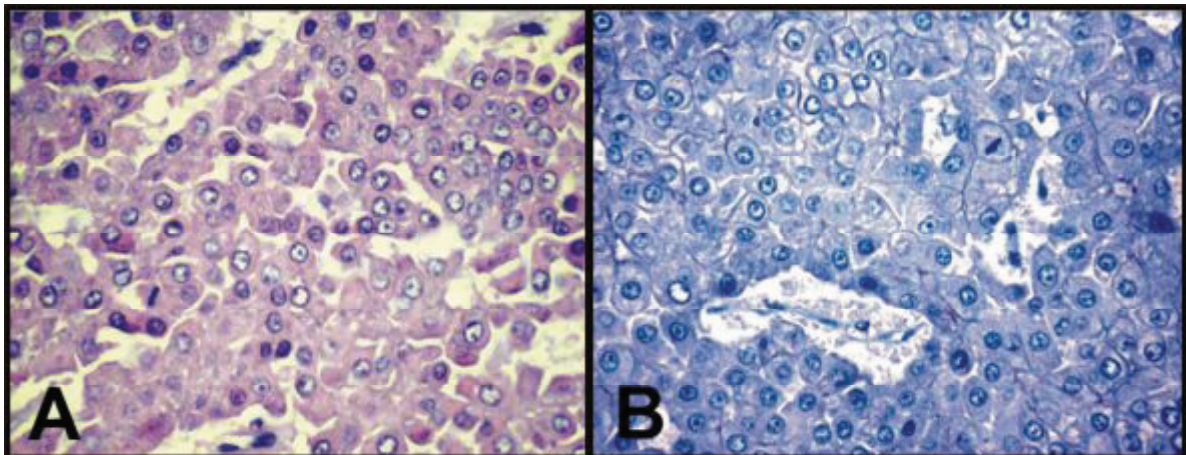


30. ábra **A.** Intenzív claudin-7 membránpozitivitás intact epehólyaghámban és mirigyeiben (IH, 200x). **B.** Nagyobb nagyítású felvétel (IH, 400x).

A vizsgálataink során valamennyi intact májszöveti mintában a májsejtek, továbbá a benignus májsejtburjánzások: HNH (10/10; 100%), HAD (6/6; 100%) claudin-7 negatívnak bizonyultak. A dCCC-val és a nCCC-val (**31.A. ábra**) szemben mind a dHCC (15/15; 100%) (**31.B. ábra**), mind a nHCC (6/6; 100%) minták szintén claudin-7 negatívnak bizonyultak (**32. ábra**). (Következtetések: 7.1.2. fejezet, 83. oldal.)



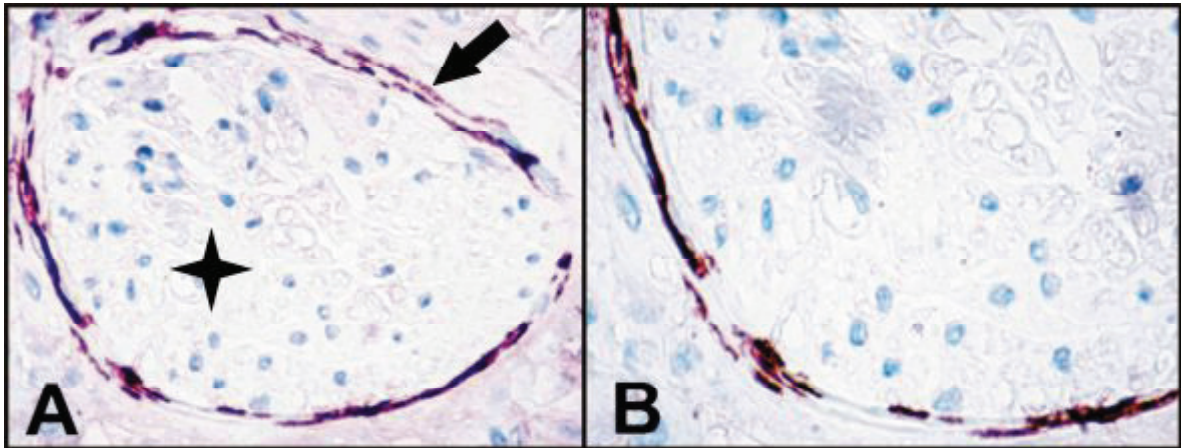
31. ábra A. A nCCC solid, a dHCC-hoz és a nHCC-hoz hasonló kórszövettani megjelenése (HE, 200x). **B.** A dHCC kórszövettani fenotípusa (HE, 200x).



32. ábra Claudin-7 negatív dHCC. **A.** (HE, 200x). **B.** (IH, 200x).

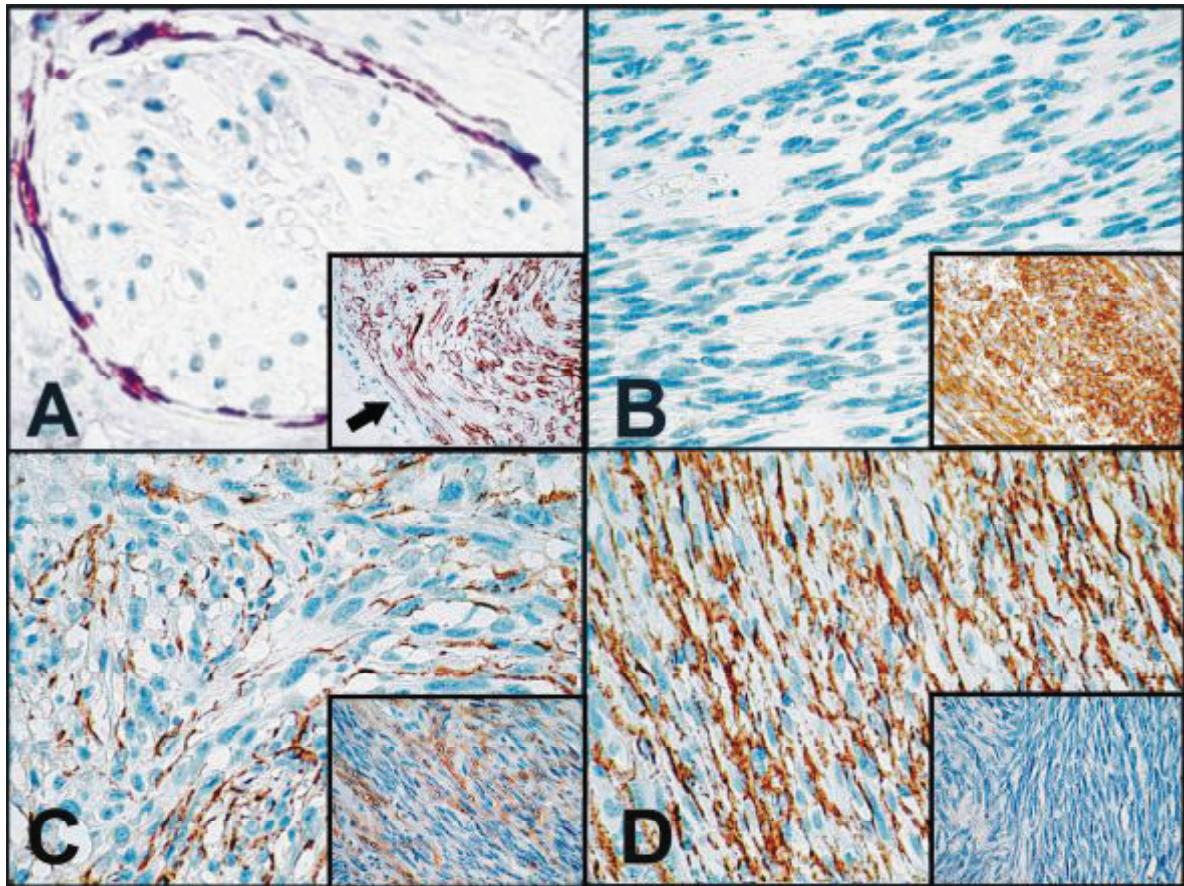
6.2.5. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban

A vizsgálatok során az intact perifériás idegek perineurialis epitheloid sejtjeiben intenzív (++++) **claudin-1** membránpozitivitást és S-100 protein negativitást tapasztaltunk (**33-34.A. ábra**). A Schwann sejtek és a perineurialis fibroblastok claudin-1 negatívnak bizonyultak.



33. A. ábra Claudin-1 pozitív perineurialis epitheloid sejtek (nyíl) a claudin-1 negatív Schwann sejtek (csillag) körül, kutya intact perifériás idegében (HE, 200x). **B.** (IH, 400x).

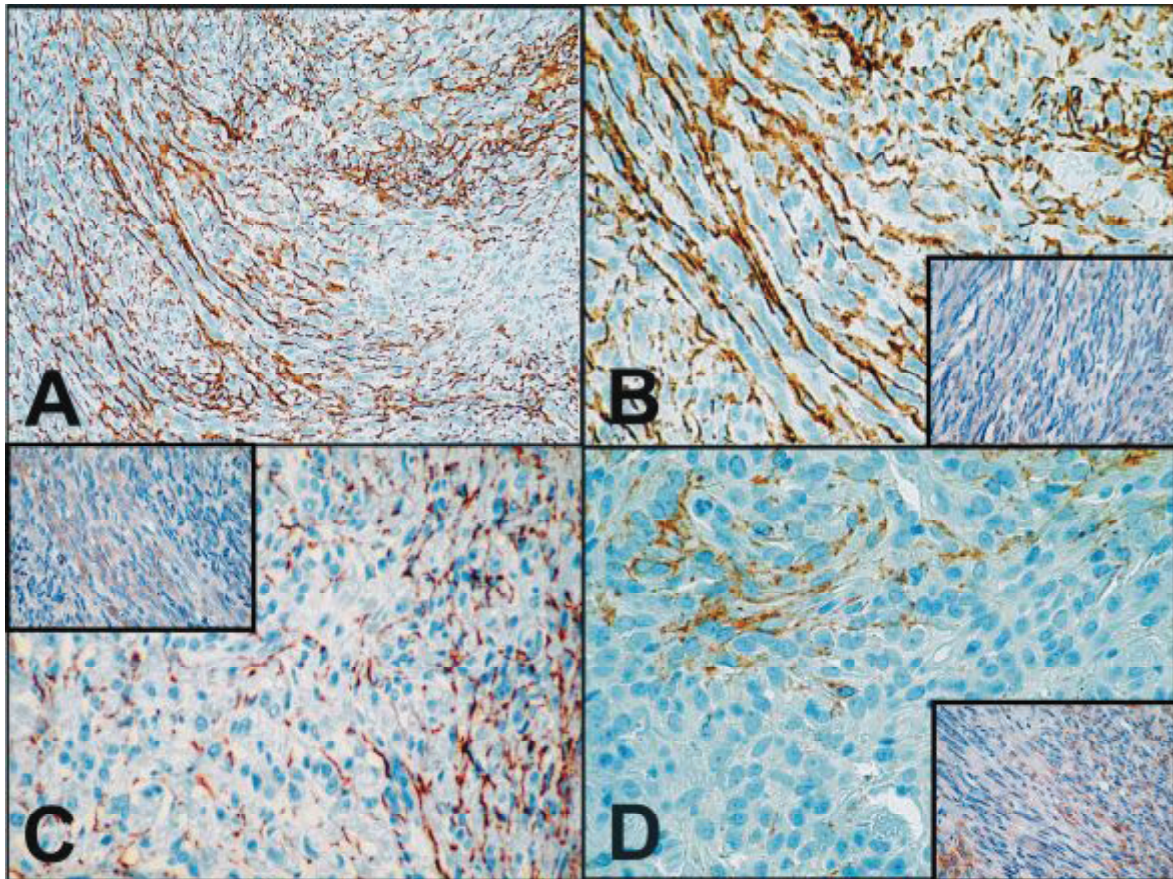
A cBPNST minták: (1) a *schwannomák* (4/4; 100%) claudin-1 negatívnak bizonyultak (**34.B. ábra**), (2) a *neurofibromák* (8/8; 100%) nem diffúz, intenzív (+ - +++) claudin-1 pozitivitást mutattak (**34.C. ábra**), (3) a *perineuriomák* (8/8; 100%) pedig diffúz, intenzív (++++) claudin-1 membrán immunreaktívak voltak (**34.D. ábra**). Valamennyi cMPNST minta (16/16; 100%) claudin-1 pozitív volt. Hét cMPNST (7/16; 43,75%) mutatott diffúz, intenzív (++++) membrán pozitivitást (**35.A-B. ábra**), hat (6/16; 37,5%) mintában tapasztaltunk diffúz, intenzív (++++) pozitivitást (**35.C. ábra**), és három tumor (3/16; 18,75%) mutatott diffúz, intenzív (++) immunreaktivitást (**35.D. ábra**). A cMPNST mintákban a daganatos Schwann sejtek és a perineurialis fibroblastok claudin-1 negatívnak bizonyultak.



34. A. ábra Claudin-1 pozitív perineurialis epitheloid sejtek és claudin-1 negatív Schwann sejtek az intact perifériás idegben (IH, 400x). Inzert: S-100 protein negatív perineurialis sejtek (nyíl) és S-100 protein pozitív Schwann sejtek (kontrollok, IH, 400x). **B.** Claudin-1 negatív schwannoma (IH, 400x). Inzert: S-100 protein (++++) pozitívitás a schwannomában (IH, 400x). **C.** Claudin-1 (++) pozitív neurofibroma (IH, 400x). Inzert: S-100 protein (++) pozitívitás a neurofibromában (IH, 400x). **D.** Claudin-1 (++++), pozitív plexiform perineurioma (IH, 400x). Inzert: S-100 protein negatívitás a plexiform perineuriomában (IH, 400x).

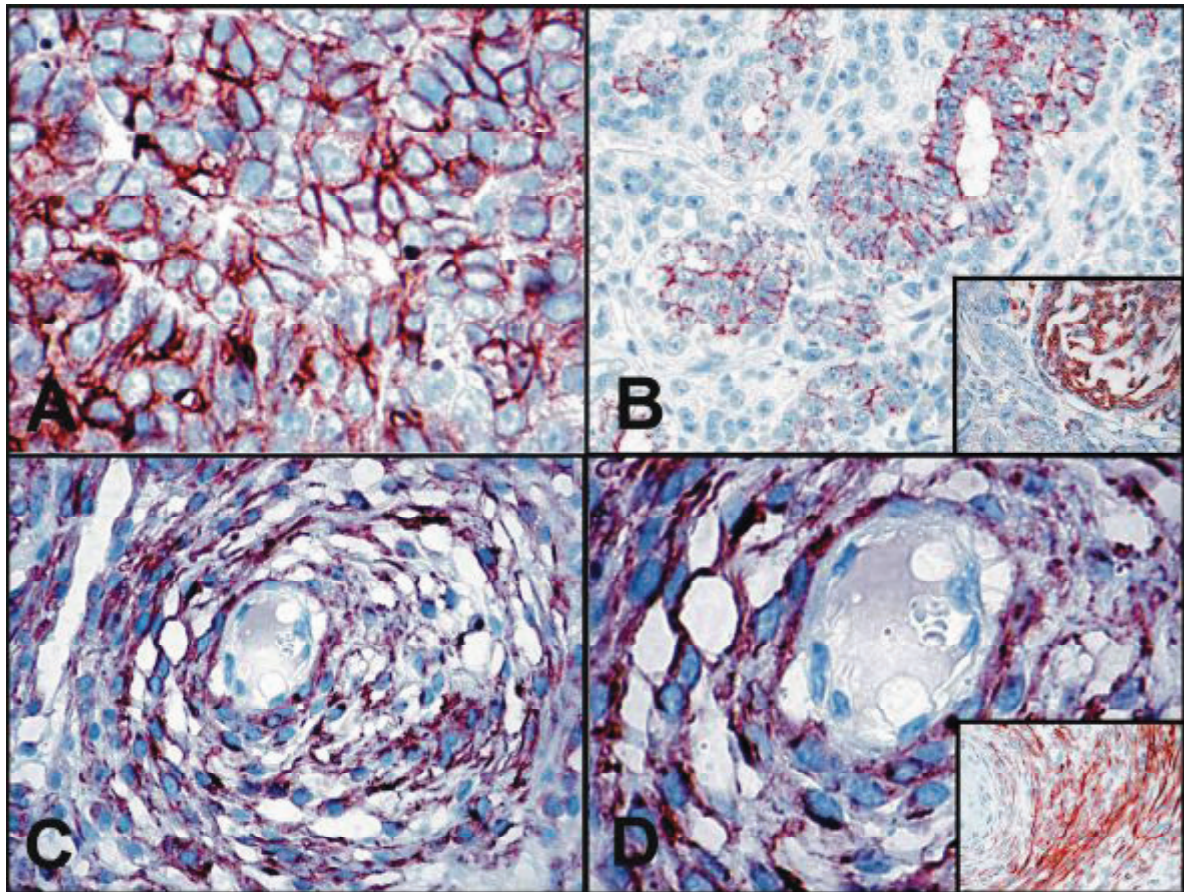
r

Valamennyi psammomatous meningeoma, illetve a peritumoralis nem daganatos meningotheocytták claudin-1 immunonegativitást mutattak. A fibroma, leiomyoma, myxoma, orsósejtes haemangioma, az orsósejtes lipoma, a fibrohistiocytás nodulus, a fibrosarcoma, a leiomyosarcoma, a myxosarcoma, a solid haemangiosarcoma, a liposarcoma, az orsósejtes amelanotikus melanoma, a histiocytás sarcoma, a myoepithelioma, a complex emlőmirigy carcinomák daganatos myoepithelial komponense, a cardiacalis rhabdomyosarcoma, a monofázisos synovialis sarcoma, az osteosarcoma és a chondrosarcoma claudin-1 negatívnak bizonyultak.

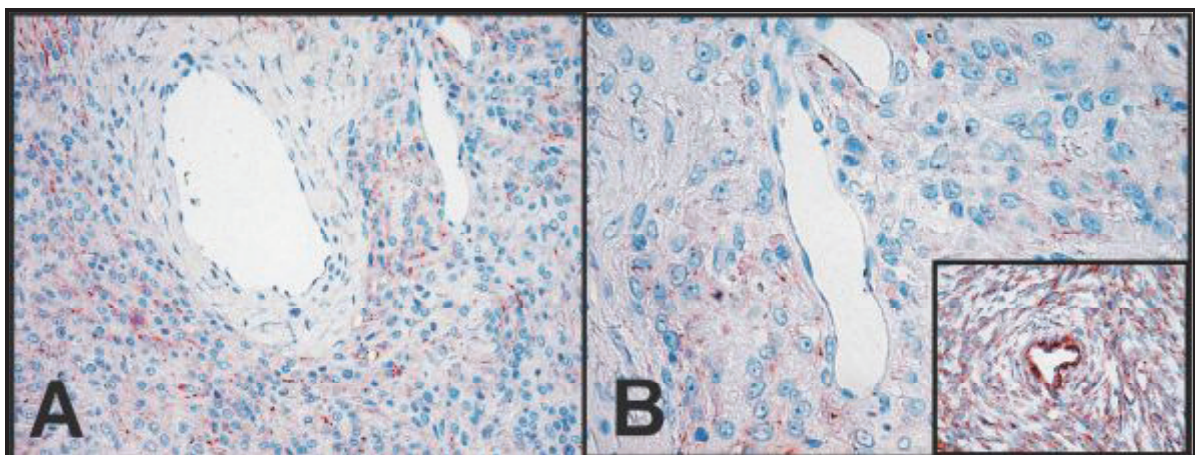


35. A-B. ábra Diffúz, intenzív (++++), claudin-1 pozitívitás cMPNST-ban (IH, 200x, 400x). Inzert: S-100 protein (+) pozitívitás a cMPNST-ban (IH, 400x). **C.** Diffúz, intenzív (+++) claudin-1 pozitívitás cMPNST-ban (IH, 400x). Inzert: S-100 protein (++) pozitívitás a cMPNST-ban (IH, 400x). **D** Diffúz, intenzív (++) claudin-1 pozitívitás cMPNST-ban (IH, 400x). Inzert: S-100 protein (+++) pozitívitás a cMPNST-ban (IH, 400x).

Az *orsósejtes laphámrák* minták (8/8; 100%) intenzív, diffúz (+++ - +++) claudin-1 membránpozitivitást mutattak (**36.A. ábra**). A *complex emlőmirigy carcinomák*ban a neoplasticus luminalis epithel sejtek membránjában tapasztaltunk intenzív claudin-1 immunreaktivitást (**36.B. ábra**). A cPWT csoportban a *haemangiopericytomák* (cHP) (10/10; 100%) intenzív, diffúz, (+++ - +++) (**36.C-D. ábra**), illetve a *myopericytomák* (cMPC) gyenge, elszórt (+) claudin-1 membránpozitivitást mutattak (**37.A-B. ábra**).



36. **A. ábra** Diffúz, intenzív (++++), claudin-1 pozitívitas az orsósejtes laphámrákban (IH, 400x). **B.** Claudin-1 pozitív daganatos emlőmirigy luminalis epithel sejtek, claudin-1 negatív tumoros myoepithelsejtek környezetében complex emlőmirigy carcinomában (IH, 200x). Inzert: S-100 protein pozitívitas a complex emlőmirigy carcinoma myoepithel komponensében (IH, 400x). **C-D.** Diffúz, intenzív (++++), claudin-1 pozitívitas haemangiopericytomában (IH, 200x, 400x). Inzert: α -SMA pozitívitas a HP-ban (IH, 400x).



37. **A-B. ábra** Gyenge, elszórt (+) claudin-1 pozitívitas a MPC-ban (IH, 200x, 400x). Inzert: α -SMA pozitívitas a MPC-ban (IH, 400x).

Az egyéb eredetű benignus és malignus tumorok, illetve a cFHN minták claudin-1 negatívnak bizonyultak.

Az intact perifériás idegekben a Schwann sejtek diffúz, intenzív (++++), **S-100 protein** cytoplasmaticus pozitívítást, míg a perineurialis fibroblastok S-100 protein negatívítást mutattak. A cBPNST minták: (1) a *schwannomák* diffúz, intenzív (+++ - +++) S-100 protein

pozitivitást; (2) a *neurofibromák* nem-diffúz, intenzív (++) S-100 protein pozitivitást, (3) a *perineuriomák* pedig S-100 protein negativitást mutattak. A claudin-1 (++++) pozitivitást mutató hét cMPNST minta (+) S-100 protein pozitivitást, a claudin-1 (++) pozitivitást mutató hat cMPNST mintából: négy tumor (++) S-100 protein pozitivitást és két daganat (+) S-100 protein pozitivitást, továbbá a claudin-1 (++) pozitív cMPNST mintákból: kettő (++) S-100 protein pozitivitást és egy minta (+) S-100 protein pozitivitást mutatott. A complex emlőmirigy cacinomák a daganatos myoepithelsejtjeik révén, nem diffúz, intenzív, cytoplasmaticus S-100 protein pozitivitást mutattak. A psammomatosus meningeomák, az orsósejtes amelanoticus melanomák, a myoepitheliomák és a chondrosarcomák intenzív, diffúz (+++ - +++) S-100 protein pozitivitást mutattak. Az egyéb eredetű minták S-100 protein negatívak voltak.

A cBPNST minták közül: (1) három *schwannoma* (3/4) mutatott **NSE** negativitást, egy elszórt, cytoplasmaticus NSE pozitivitást; (2) hat *neurofibroma* (6/8) mutatott NSE negativitást, illetve kettő (2/8) elszórt, cytoplasmaticus NSE pozitivitást; (3) a *perineuriomák* NSE negatívnak bizonyultak. Tizenegy cMPNST (11/16) volt NSE negatív, öt (5/16) mutatott elszórt NSE immunreaktivitást. Az egyéb eredetű beválogatott minták NSE negatívak voltak.

A leiomyomák, a leiomyosarcomák, a myoepitheliomák, a cardialis rhabdomyosarcomák, a cHP-ák, cMPC-ák, cALM-ák és a cALMS-ák diffúz, intenzív (+++ - +++++), illetve a complex carcinomák nem diffúz, intenzív (++) **α -SMA** pozitivitást mutattak. Az egyéb eredetű minták α -SMA negatívnak bizonyultak. Valamennyi cPWT minta vimentin pozitív volt. A cHP, a cMPC, a cAGF heavy caldesmon negatívnak, a cALM és a cALMS heavy caldesmon pozitívnak bizonyult. A cAGF-en kívül, valamennyi cPWT minta calponin pozitivitást mutatott. Desmin pozitív a cMPC, a cALM és a cALMS volt (**Tábl. 14.**).

Perivascularis érfal tumor/ Ellenanyag	Claudin-1	α -SMA	Heavy caldesmon	Calponin	Desmin	Vimentin
1. Hemangiopericytoma (n=10)	P (intenzív, +++- ++++)	P (+++-++++)	N	P (+++-++++)	N	P (++++)
2. Myopericytoma (n=8)	P (gyenge, +)	P (+++-++++)	N	P (+++-++++)	P (++-+++)	P (++++)
3. Angioleiomyoma (n=6)	N	P (++++)	P (++++)	P (++++)	P (+++-++++)	P (++++)
4. Angioleiomyosarcoma (n=4)	N	P (++++)	P (++++)	P (++++)	P (+++-++++)	P (++++)
5. Angiofibroma (n=3)	N	N	N	N	N	P (++++)
Összesen: 31						

Táblázat 14. A perivascularis érfal eredetű tumorok immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei (P = pozitív, N = negatív).

Az immunhisztokémiai vizsgálati eredményeinket a nem perivascularis eredtű daganatok esetén is táblázatba foglaltuk össze (Táblázat 15.). (Következtetések: 7.1.3. fejezet, 84. oldal.)

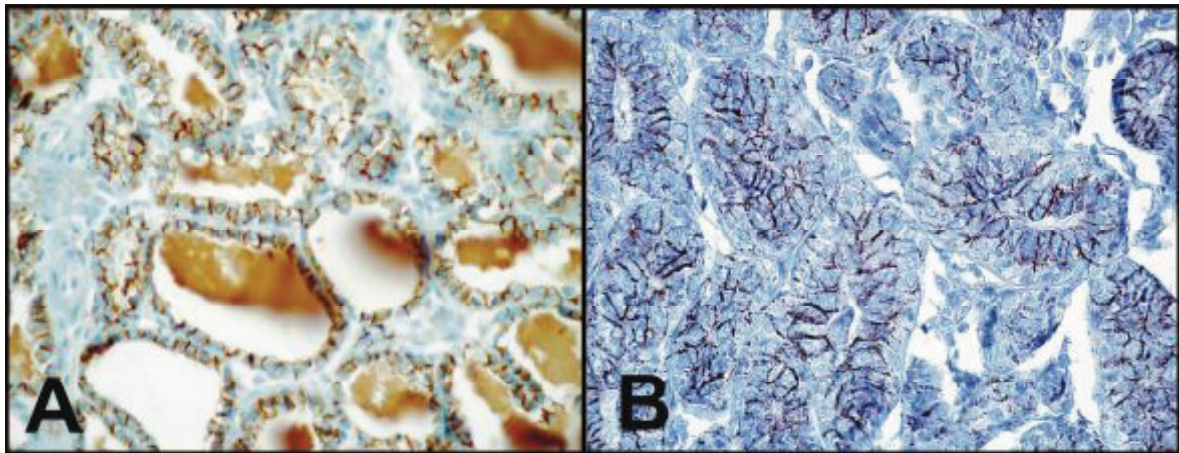
Tumor/Előanyag	Claudin-1	S-100 protein	NSE	α-SMA	Vim	panCK	Claudin-5	Melan-A
1. a. Schwannoma (n=4)	N	P (++++-++++)	N (3/4) P(1/4)(+)	N	P (++++)	N	N	N
1. b. Neurofibroma (n=8)	P (+-+++)	P (+-+++)	N (6/8) P (2/8)(+)	N	P (++++)	N	N	N
1. c. Perineurioma (n=8)	P (++++)	N	N	N	P (++++)	N	N	N
2. cMPNST (n=16)	P (+-+++)	P (+-+++)	N (11/16) P(6/16)(+)	N	P (++++-++++)	N	N	N
3. Psammomatous meningioma (n=6)	N	P (++++-++++)	N	N	P (++++)	N	N	N
4. Fibroma (n=6)	N	N	N	Ne	P (++++)	N	N	N
5. Leiomyoma (n=6)	N	N	N	P (++++)	P (++++)	N	N	N
6. Myxoma (n=6)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
7. Orsósejtes haemangioma (n=4)	N	N	N	N	P (++++)	N	P (++++)	N
8. Orsósejtes lipoma (n=2)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
9. Fibrohistiocytás nodule (n=6)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
10. Fibrosarcoma (n=8)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
11. Leiomyosarcoma (n=8)	N	N	N	P (+++-++++)	P (++++)	N	N	N
12. Myxosarcoma (n=6)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
13. Solid haemangiosarcoma (n=8)	N	N	N	N	P (++++)	N	P (++++)	N
14. Anaplastic sarcoma (n=8)	N	N	N	N	P (++++)	P (+)	N	N
15. Amelanoticus orsósejtes melanoma (n=8)	N	P (+++-++++)	N	N	P (+++-++++)	N	N	P (++++)
16. Histiocytás sarcoma (n=8)	N	N	N	N	P (++++)	N	N	N
17. Orsósejtes carcinoma (n=8)	P (++++)	N	N	N	N	P (++++)	N	N
18. Myoepithelioma (n=8)	N	P (++++)	N	P (++++)	P (++++)	N	N	N
19. Complex carcinoma (n=8)	P (+---)	P (+-+++)	N	P (+-+++)	P (+-+++)	P (+-+++)	N	N
20. Cardialis rhabdomyosarcoma (n=5)	N	N	N	P (+++-++++)	P (++++)	N	N	N
21. Synovialis sarcoma (n=4)	N	N	N	N	P (+-+++)	N	N	N
22. Osteosarcoma (n=5)	N	N	N	N	P (+++-++++)	N	N	N
23. Chondrosarcoma (n=4)	N	P (+++-++++)	N	N	P (+++-++++)	N	N	N
Összesen: 168								

Táblázat 15. A nem perivascularis érfal eredetű orsósejtes tumorok IH vizsgálati eredményei (P=pozitív, N=negatív).

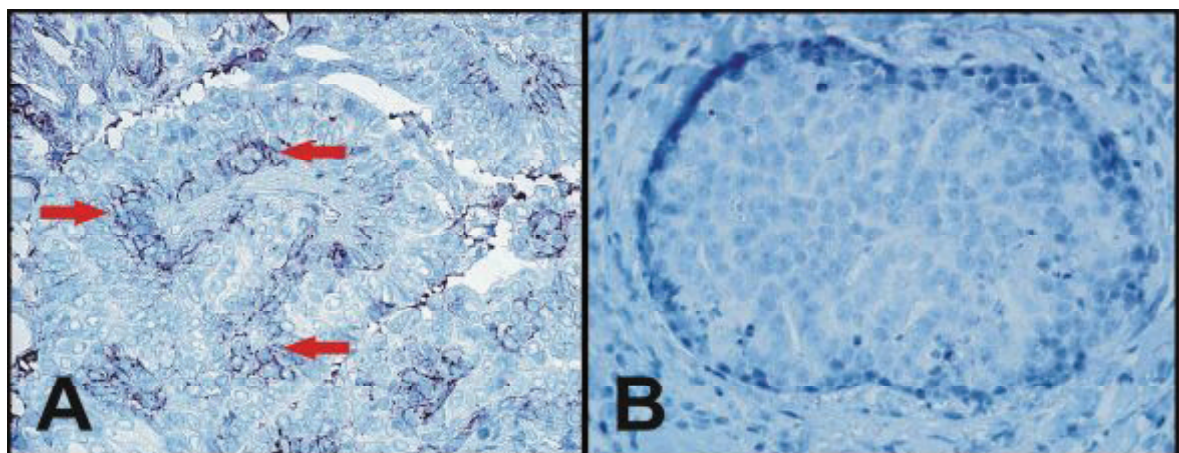
6.3. Tumorprogressio

6.3.1. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban

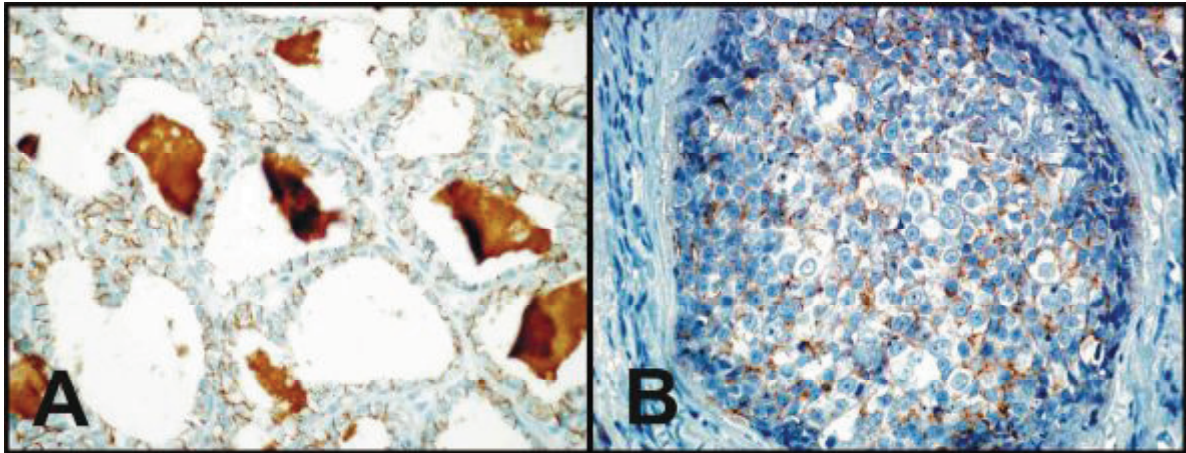
Immunhisztokémiai vizsgálataink során, a kutyák intact emlőmirigyeiben, a lebénykéket felépítő alveolusokat bélelő, luminalis mirigyhámsejtek, továbbá a tejelvezető csatornácskákat bélelő epithelsejtek membránjában észleltük a claudin molekulák expresszióját. Az alveolusokat és a tejelvezető csatornácskákat körülölelő myoepithelsejtek, a stromát felépítő fibroblastok, az adipocyták, a reaktív lymphocyták, a histiocyták claudin-1, -3, -4, -5 és -7 negativitást mutattak (belső negatív kontroll). A stromalis nyirokerek és vérerek endothel sejtjei claudin-5 pozitivitást adtak (belső pozitív kontroll). A proliferatív, nem neoplasticus és a primer, illetve a secunder (áttéti) emlődaganatokban tapasztalt claudin-1, -3, -4, -5 és -7 immunreaktivások (38 - 43. ábra) eredményeit táblázatban foglaltuk össze (Táblázat 16.).



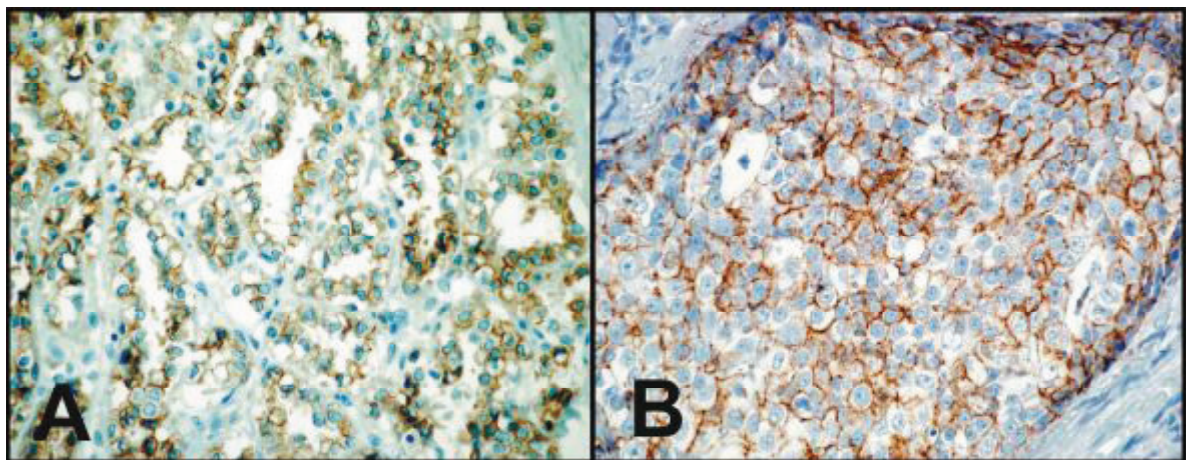
38. **A. ábra** Diffúz, linearis, intenzív (++++), claudin-1 membránreaktivitás kutyá intact emlőmirigyének alveolaris luminalis hámsejtjeiben. A képen fals pozitívitás észlelhető az alveolusok üregében felhalmozódott secretumban (IH, 200x). **B.** Diffúz, linearis, intenzív (++++), claudin-1 membránpozitivitás simplex adenomában (IH, 400x).



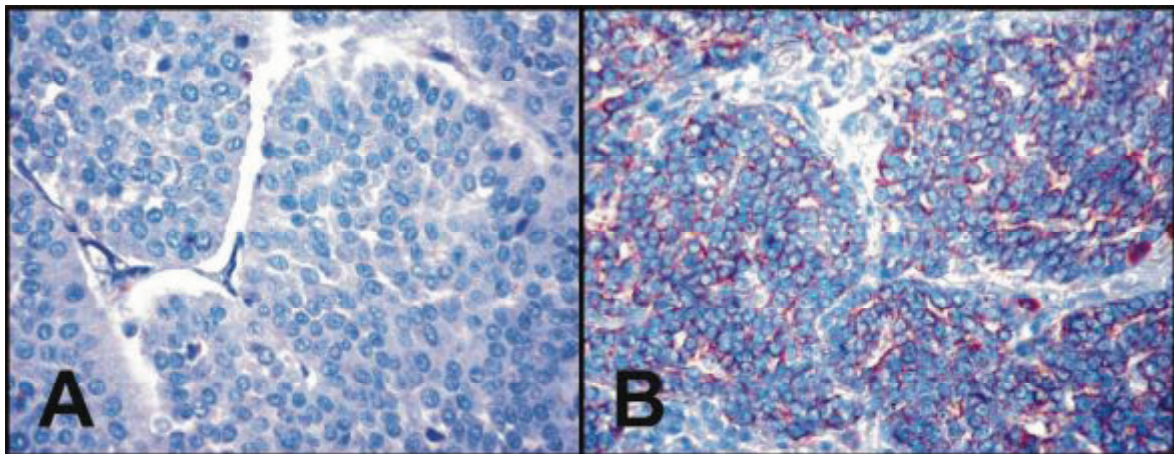
39. **A. ábra** Nem diffúz (multifocalis), intenzív (+) claudin-1 membránreaktivitás (nyilak) kutyá *in situ* simplex emlőmirigy carcinomájában (IH, 400x). **B.** A claudin-1 molekula expressziójának elvesztése grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinomában (IH, 400x).



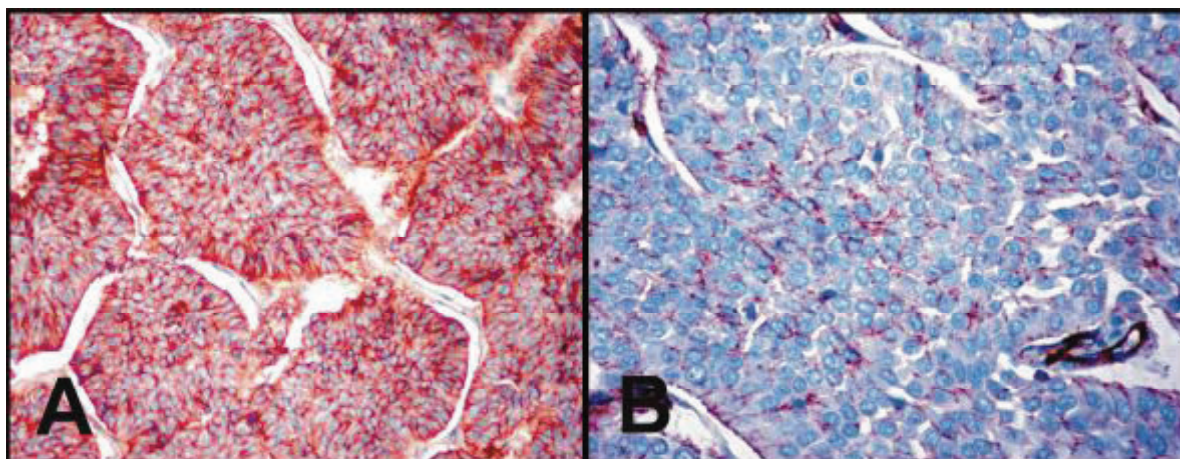
40. A. ábra Diffúz, intenzív (++++) claudin-3 membrán immunreaktivitás kutya intact emlőmirigyének alveolaris luminalis hámseljteiben (IH, 200x). **B.** Diffúz, intenzív (+++) claudin-3 membránpozitivitás grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinomában (IH, 400x).



41. A. ábra Diffúz, intenzív (++++) claudin-4 membrán immunreaktivitás kutya intact emlőmirigyének alveolaris luminalis hámseljteiben (IH, 200x). **B.** Diffúz, intenzív (++++) claudin-4 membránpozitivitás grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinomában (IH, 400x).



42. A. ábra A claudin-1 molekula expressziójának elvesztése kutya grade III-as carcinomájának pulmonalis áttétében (IH, 400x). **B.** Diffúz, intenzív (+++) claudin-3 membránpozitivitás grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinoma tüdőmetastasisában (IH, 400x).



43. **A. ábra** Diffúz, intenzív (++++), claudin-4 membránpozitivitás grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinoma tüdőáttétében (IH, 200x). **B.** Intenzív (+ - ++), claudin-5 membránpozitivitás secunder grade III-as simplex infiltráló emlőcarcinomában (IH, 400x).

Minta / Antitest	Cldn-1	Cldn-3	Cldn-4	Cldn-5	Cldn-7
1. Intact emlőmirigy	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, gyenge (++++)	Diffúz, intenzív (++++)
2. Lobularis hyperplasia	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, gyenge (++++)	Diffúz, intenzív (++++)
3. Simplex adenoma	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, intenzív (++++)	Diffúz, gyenge (++++)	Diffúz, intenzív (++++)
4. <i>In situ</i> carcinoma	Nem diffúz, intenzív (+)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Nem diffúz, gyenge (++)	Diffúz, intenzív (++ - +++)
5. Grade I-es infiltráló simplex carcinoma	Negatív	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Nem diffúz, gyenge (++)	Diffúz, intenzív (++ - +++)
6. Grade II-es infiltráló simplex carcinoma	Negatív	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Nem diffúz, gyenge (+)	Diffúz, intenzív (++ - +++)
7. Grade III-as infiltráló simplex carcinoma	Negatív	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Negatív	Diffúz, intenzív (++ - +++)
8. Secunder grade III-as simplex carcinoma (pulmonalis metastasis)	Negatív	Diffúz, intenzív (+++ - +++)	Diffúz, intenzív (++++)	Nem diffúz, intenzív (+ - ++)	Diffúz, intenzív (+++ - +++)

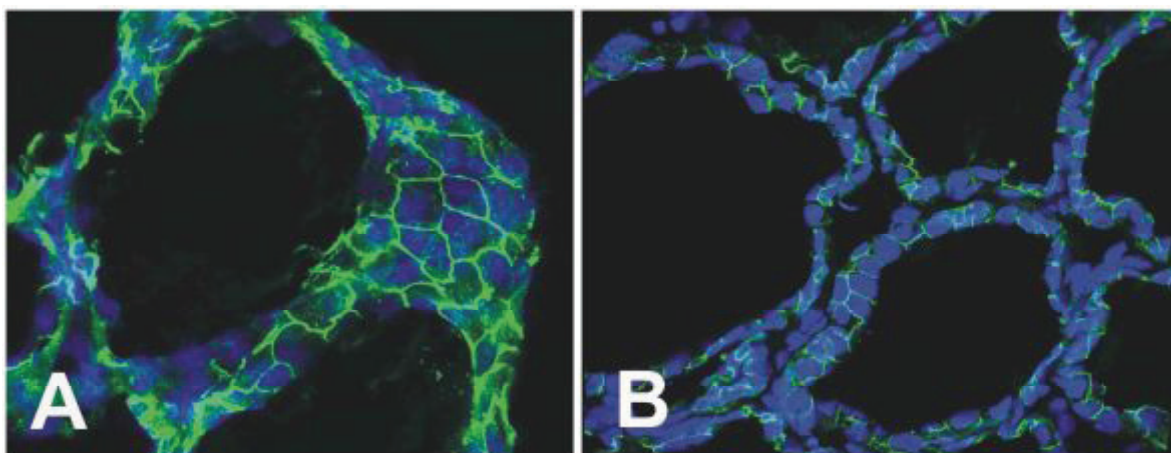
Táblázat 16. Claudinexpressziós vizsgálati eredmények kutyák emlőmirigyeiben és annak proliferatív elváltozásában (Cldn=claudin).

A daganatok stromájában lévő, ún. tumor-indukált neoangiogenesis révén kialakult új, illetve az eredeti alapszövet incorporált ereiből felépülő intratumoralis mikroerek endothel sejtei, intenzív claudin-5 pozitívítást mutattak. A daganatos emlőmirigyekben végzett

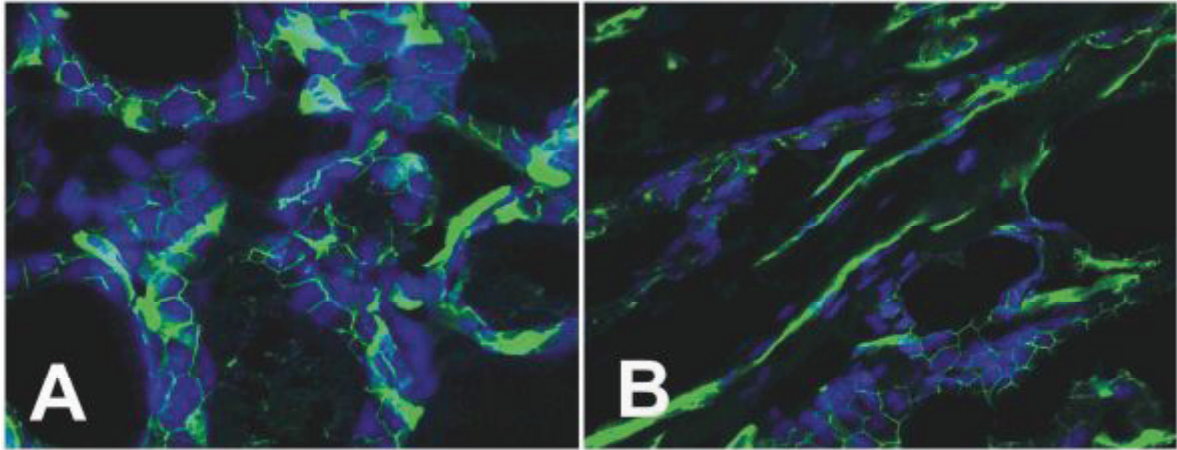
vizsgálatok során, valamennyi claudin molekula esetén fals pozitív reakciót tapasztaltunk a neoplasticus tubulusok (neoductusok) üregét kitöltő, ún. áltejben, az apoptotizáló tumorsejtekben, a necrotizált szöveti területeken, a vérereket kitöltő szérumban, a nyirokereket kitöltő lymphában, a daganatos stromát infiltráló, illetve intravascularisan megjelenő plasmasejtekben. A tüdőáttétekben a peritumoralis, környező ép bronchus-, bronchiolus- és alveolaris hámszövetek lineáris, intenzív claudin-1, -3, -4 és -7 membránpozitivitást mutattak (belső pozitív kontrollok). A pleura mesothel sejtszövetjei claudin-1, -3, -4 és -7 negatívnak bizonyultak. Az intrapulmonalis vér- és nyirokereket, illetve az alveolocapillarisok endothel sejtszövetjei claudin-5 pozitivitást mutattak (belső pozitív kontrollok), ugyanakkor a környező ép epithelialis sejtszövetek claudin-5 fehérje negatívak voltak.

6.3.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink során tapasztalt eredmények megegyeztek, illetve megerősítették a korábbi megfigyeléseinket. A claudin-1, -3, -4 és 7 molekulák intenzív membránpozitivitást adtak az intact emlőmirigyekben (**44. ábra**). A claudin-5 esetében a membránpozitivitás mellett erős jelet kaptunk az endothelsejtszövetek közötti TJ struktúráról, mind a vérerek, mind a nyirokereket esetében (**45. ábra**). (**Következtetések: 7.2.1. fejezet, 90. oldal.**)



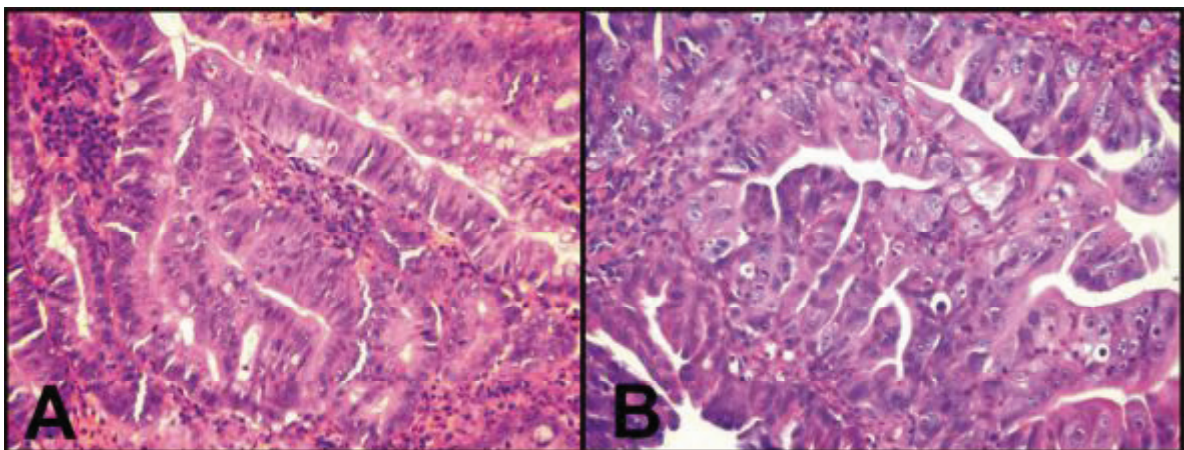
44. A. ábra Intenzív, lineáris, diffúz claudin-3 membránpozitivitás (zöld lineáris jel) a kutya emlőmirigylebenykeinek alveolusait bélelő hámszövetekben. A sejtmagok és a cytoplasma kék színben tűnnek fel (Konfokális mikroszkópos felvétel, 400x). **B.** Jól érzékelhető a claudin-4 membrán jel (pozitivitás) az emlőmirigylebenyke epithel sejtszövetjeiben (Konfokális mikroszkópos felvétel, 200x).



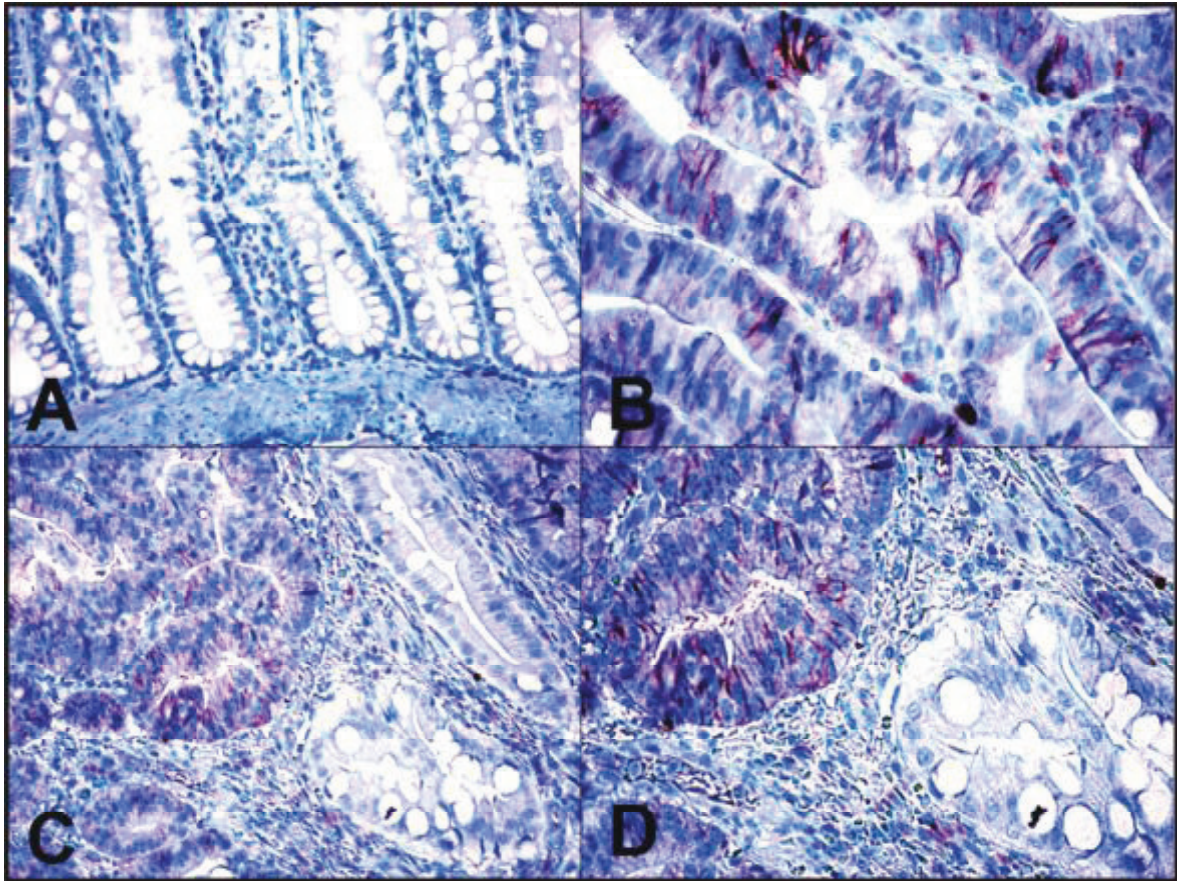
45. A. ábra A felvételen a claudin-5 membránpozitivitást mutató mirigyhámsejtek és az acinusok körüli, intenzív claudin-5 expressziót mutató vérerek endothelsejtjei láthatók (Konfokális mikroszkópos felvétel, 400x). **B.** A felvételen a perilobularis stromában lévő, intakt nyirokereket bélelő endothelsejtek intenzív claudin-5 expressziója (zöld lineáris jel) mutatható ki (Konfokális mikroszkópos felvétel, 200x).

6.3.3. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban

Az intact colorectum epithelialis sejtjei (a felszíni colonocyták, a mirigyhámsejtek), továbbá mesenchymalis sejtjei claudin-1 negativitást mutattak. A vizsgálatainkba bevont, low grade malignitású colorectalis adenocarcinoma (cLGCC) minták (**46. ábra**) 45 %-ában (9/20) nem diffúz (multifocalis), intenzív (++) claudin-1 membránpozitivitást tapasztaltunk (**47. ábra**). A cLGCC minták más részében (11/20; 55 %) a carcinoma sejtek cytoplasmaticus claudin-1 pozitivitást mutattak.

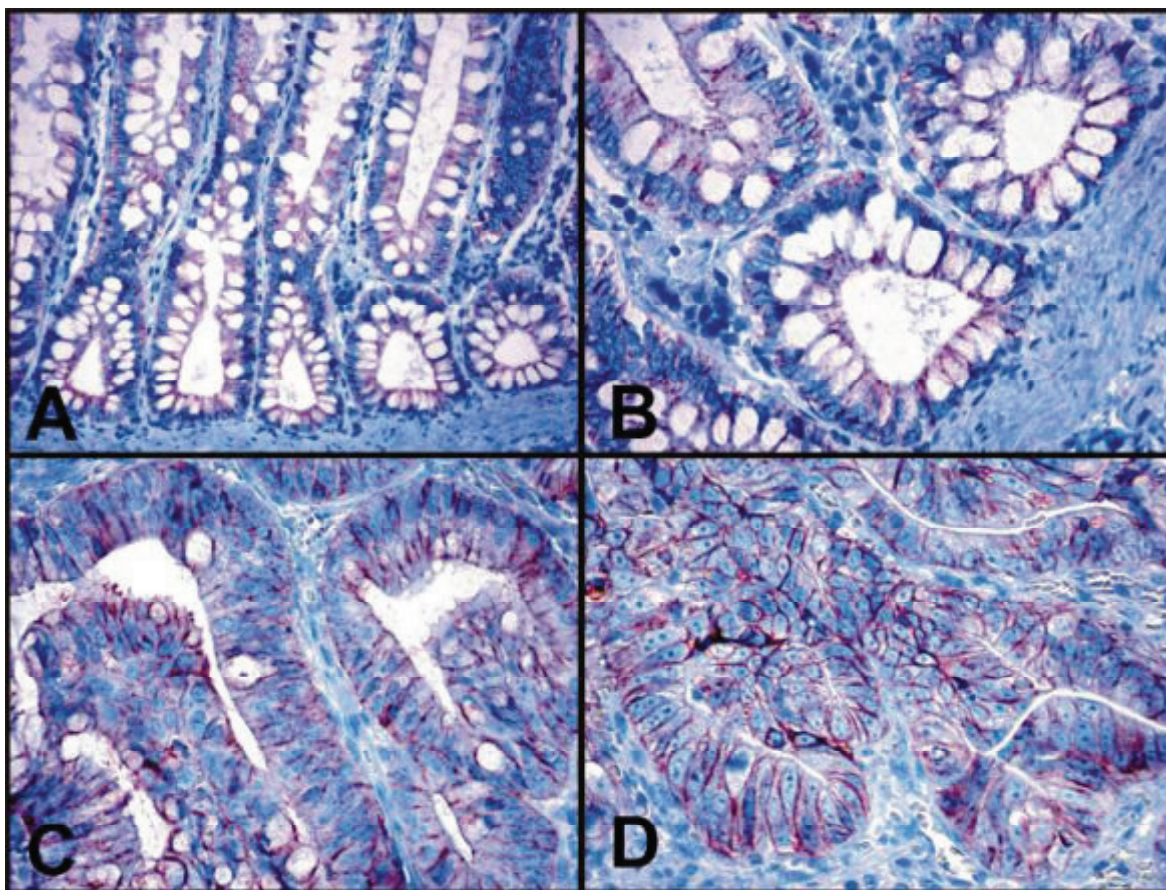


46. ábra A kórszövetteni felvételeken a tubulusokat, papillaris projectumokat képező, gyulladásos sejtekkel infiltrált, daganatos stromával rendelkező, mérsékelt számban apoptoticus és osztódó tumorsejteket tartalmazó cLGCC látható. **A-B.** (HE, A: 200x, B: 400x).



47. ábra **A.** A kutyákból származó, elváltozásmentes colorectalis mucosa claudin-1 negativitást mutatott (IH, 200x). **B.** Patológiás claudin-1 expresszió megjelenése a cLGCC-ben (IH, 400x). **C-D.** A felvétel bal oldalán a claudin-1 pozitivitást mutató cLGCC invazív frontja, míg a jobb oldalon az intact, peritumoralis vastagbélmirigyek (belső negatív kontrollok) láthatók (IH, C: 200x, D: 400x).

Az elváltozásmentes colorectum epithelialis alkotóelemei, tipikusan a TJ struktúrák területén, lateralis, apicalis, pontszerű (nem linearis) intenzív, diffúz claudin-3 membránpozitivitást mutattak (**48. A-B. ábra**). Az intact felszíni hámsejtek, illetve a kehelysejtek és a crypta mirigyhámsejtek nem mutattak cytoplasmaticus claudin-3 immunreaktivitást. A cLGCC mintákban diffúz, intenzív (++++) claudin-3 linearis membránpozitivitást (az intact colorectumhoz képest overexpressziót) tapasztaltunk (**48. C-D. ábra**). A mirigyhámrák daganatsejtjeiben nem tapasztaltunk extramembranosus, cytoplasmaticus immunreaktivitást.

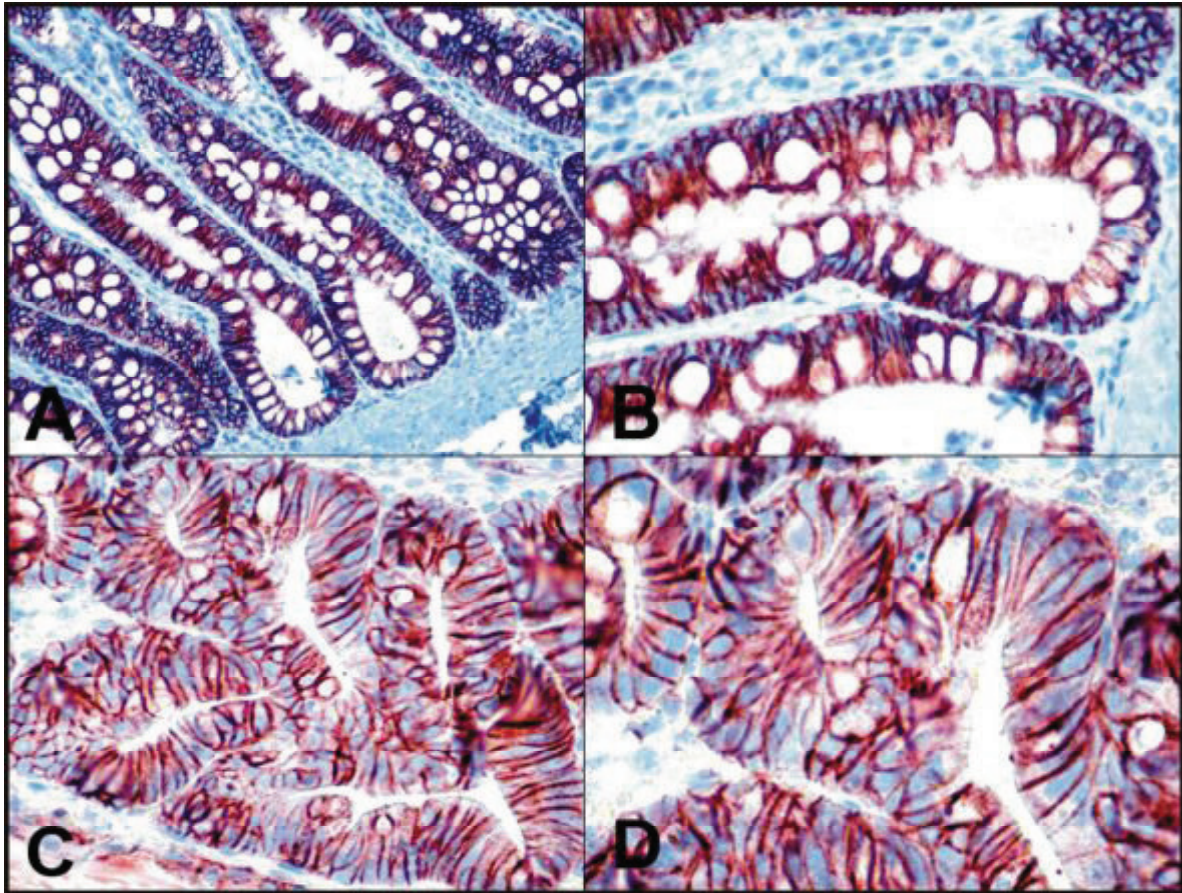


48. ábra A-B. A kutyából származó, elváltozásmentes colorectalis mucosában az epithelialis sejtek pontszerű, intenzív, apicalis, lateralis claudin-3 membránpozitivitást mutattak (IH, A: 200x, B: 400x). **C-D.** A cLGCC mintákban, az intact mintákhoz viszonyítva, a claudin-3 molekula fokozott, diffúz, lateralis, nem pontszerű, hanem linearis intenzív (++++) reakcióját tapasztaltuk (IH, C: 200x, D: 400x).

A claudin-4 molekula expressziója mind az elváltozásmentes mintákban, mind a tumorokban hasonló volt a claudin-3 molekula expressziójához, azzal a különbséggel, hogy a cLGCC-ákban (+++) pozitivitást mutatott.

Az intact colorectalis szövetek, illetve a cLGCC-ák epithelialis alkotóelemei claudin-5 negativitást mutattak. Az alapszövet kötőszöveti vázának vér- és nyirokereinek, továbbá a daganat-indukált újonképzett mikroereinek endothelsejtjei intenzív claudin-5 immunreaktivitást mutattak (belső pozitív kontrollok).

Az elváltozásmentes minták felszíni hámsejtjei és mirigyhámsejtjei diffúz, intenzív, linearis claudin-7 pozitivitást mutattak, cytoplasmaticus reakció jelei nélkül (**49. A-B. ábra**). A cLGCC minták 30 %-a (6/20) diffúz, intenzív, linearis (++++) claudin-7 pozitivitást (**49. C-D. ábra**), 70 %-a (14/20) pedig gyenge cytoplasmaticus claudin-7 immunreaktivitást mutatott. (Következtetések: 7.2.2. fejezet, 94. oldal.)



49. ábra A-B. A kutyából származó, elváltozásmentes colorectalis mucosában az epithelialis sejtek lineáris, intenzív, lateralis claudin-7 membránpozitivitást mutattak (IH, A: 200x, B: 400x). **C-D.** A cLGCC mintákban, az intact mintákhoz hasonló, diffúz, lateralis, nem pontszerű, hanem lineáris intenzív (++++) claudin-7 reakciót tapasztaltunk (IH, C: 200x, D: 400x).

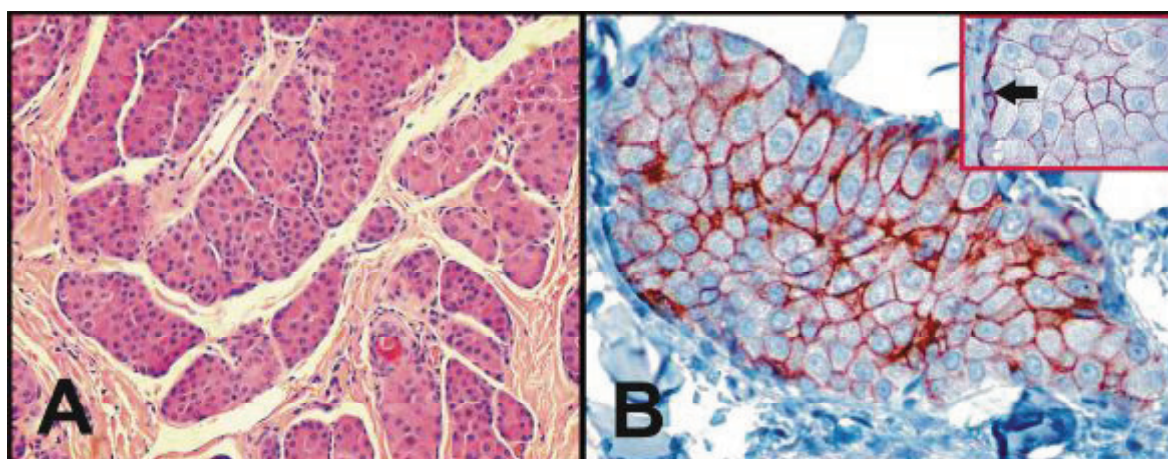
6.3.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganaiban

Az intact hepatoid-sejtes és a proliferatív mirigyelváltozások claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós mintázatának scoring eredményeit táblázatban összesítettük (Táblázat 17.).

Minta/Antitest	Claudin-1	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7
<i>Intact mirigy</i>	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
<i>Nodularis hyperplasia</i>	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
<i>Adenoma</i>	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
<i>Epithelioma</i>	Gyenge, multifocalis, linearis membrán (+ - +++) Elszórt cytoplasmaticus	Gyenge, multifocalis, linearis membrán (+ - ++)	Gyenge, multifocalis, linearis membrán (+ - ++)	Gyenge, multifocalis, linearis membrán (+)	Negatív
<i>Differenciált carcinoma</i>	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++ - +++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++ - +++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++ - +++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (+ - ++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++ - +++)
<i>Differenciálatlan carcinoma</i>	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)

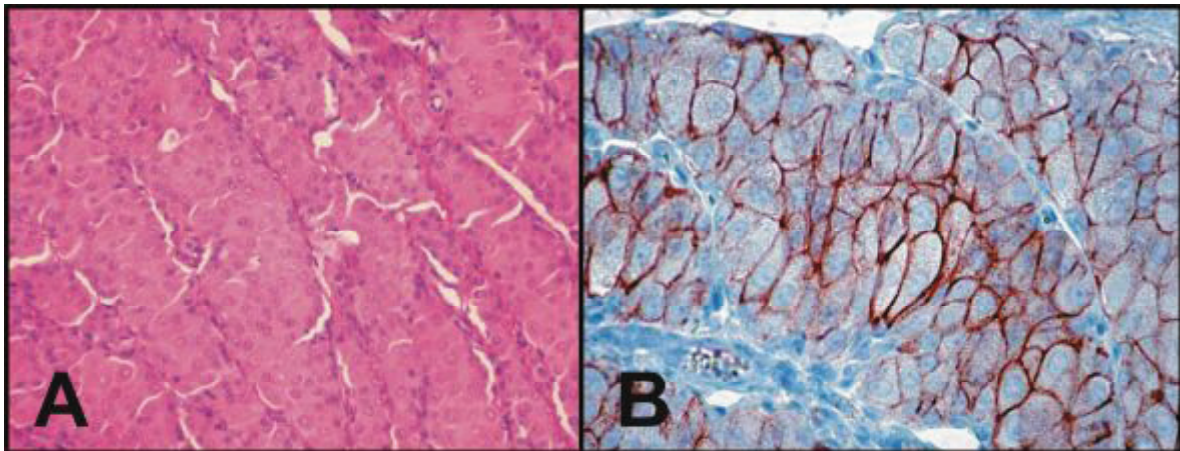
17. Táblázat. A kutyák hepatoid-sejtes mirigyében és proliferatív elváltozásaiban tapasztalt claudin expressziós vizsgálatok eredményei.

Az anti-claudin-1 antitesttel végzett vizsgálataink során diffúz, intenzív, linearis membránpozitivitást tapasztaltunk az elváltozásmentes hepatoid-sejtes mirigyek hámsejtjeiben (a differenciált, érett mirigyhámsejtekben valamint a basalis helyeződésű, pótló-, vagy őssejtjeiben egyaránt) (50. ábra).



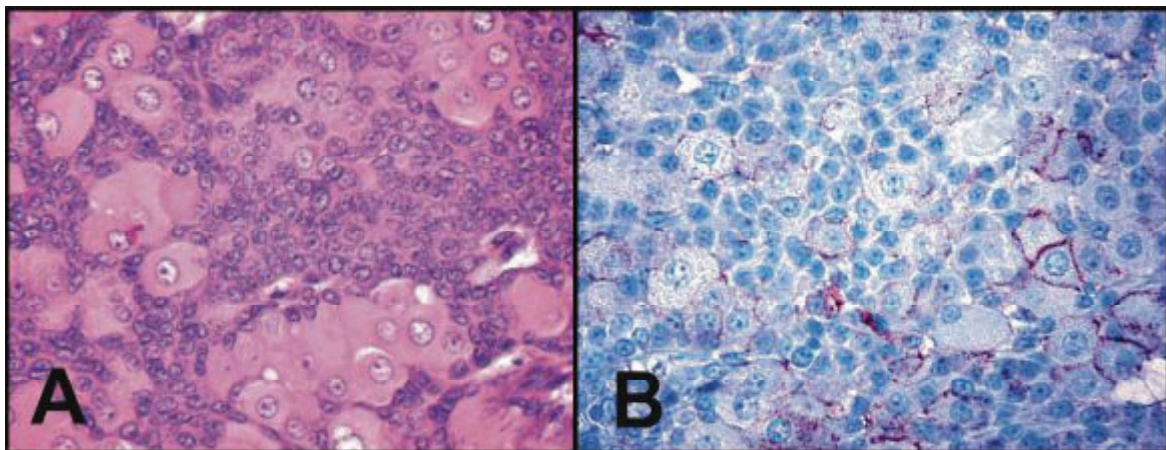
50. ábra A. Kutyából származó, elváltozásmentes hepatoid-sejtes, perianalis mirigy kórszöveti felvétele (HE, 100x). B. Diffúz, intenzív, claudin-1 linearis membránreakció az intact mirigyben (IH, 200x). Inzert: Jól érzékelhető a claudin-1 immunreaktivitás a pótlósejtjeik membránjában is (nyíl) (IH, 400x).

Hasonló claudin-1 expressziós mintázatot figyeltünk meg a nodularis hyperplasiákban és az adenomákban (**51. ábra**).



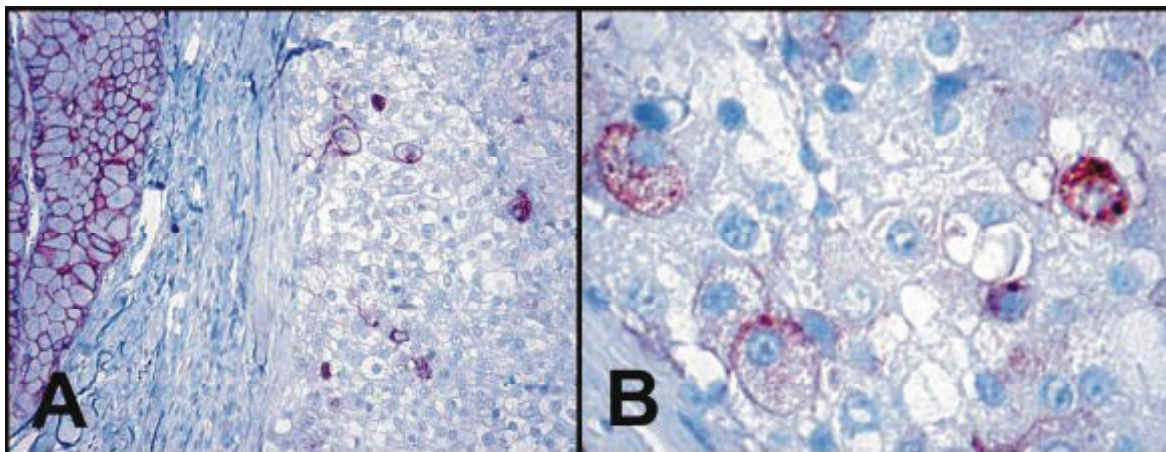
51. ábra A. Hepatoidsejtes adenoma (HE, 100x). **B.** Claudin-1 expresszió hepatoid-sejtes adenomában (IH, 200x).

Csökkent (nem diffúz, multifocalis) claudin-1 expressziót tapasztaltunk a hepatoidsejtes epitheliomákban. Ezekben a daganatokban a neoplasticusan burjánzó basalis, pótlósejtek nem expresszálták a claudin-1 molekulát, viszont a multiplex gócbokban felimerhető, tipikus hepatoid-sejtmorfológiájú (bőséges, eosinophil cytoplasma, nagy vesicularis sejtmag) daganatsejtek, intenzív lateralis claudin-1 membránpozitivitást mutattak (**52. ábra**).



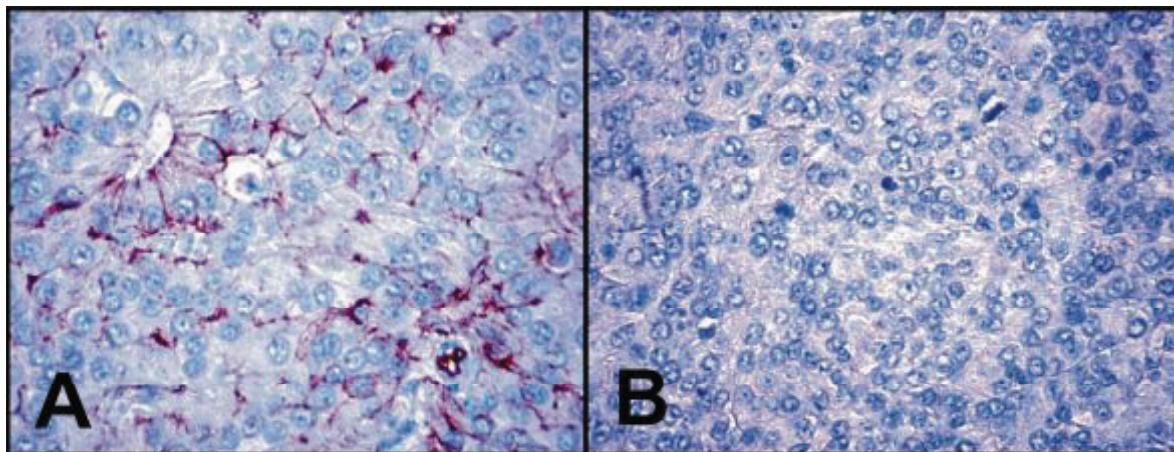
52. ábra A. Hepatoidsejtes epithelioma (HE, 200x). **B.** Claudin-1 expresszió hepatoid-sejtes epitheliomában (IH, 200x).

Mindezek mellett, elszórtan, néhány perifériás helyeződésű (az invazív front részét képező) epitheliomasejt (kb. 1-5 %-a a tumorsejteknek) finom, vagy durva granularis cytoplasmaticus claudin-1 pozitivitást mutatott (**53. ábra**). A hepatoid-sejtes epitheliomák központi területein nem tapasztaltunk ún. non-junctionalis claudin-1 expressziót a daganatsejtekben.



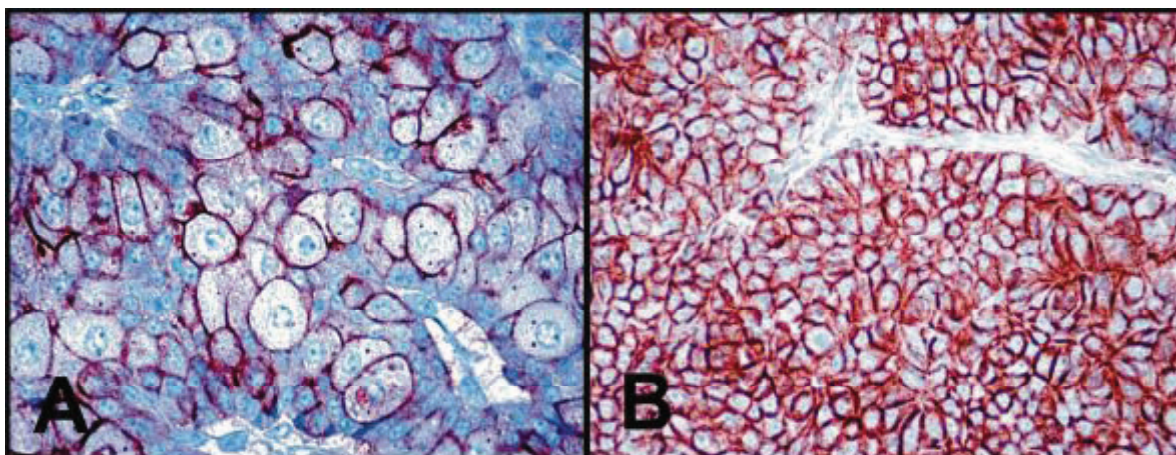
53. ábra A. Nem-junctionalis, cytoplasmaticus claudin-1 pozitivitás néhány perifériás helyeződésű hepatoid-sejtes epitheliomasejtben. A kép bal oldalán a peritumoralis, összenyomott, claudin-1 pozitív normális hepatoid-sejtes mirigylebenyke látható (IH, 100x). **B.** Nagyobb nagyítású felvétel a non-junctionalis claudin-1 expresszióról a hepatoid-sejtes epitheliomában (IH, 200x).

A differenciált hepatoid-sejtes carcinomákban a semiquantitatív scoring (pontozásos) rendszerben meghatározott claudin-1 expressziós érték magasabb volt, mint az epitheliomákban, viszont mérsékelten kisebb, mint az adenomákban (**54. A. ábra**). A differenciálatlan hepatoid-sejtes carcinomák nem expresszálták a claudin-1 molekulát (**54. B. ábra**). A periepitheliomatousus és pericarcinomatousus normális és hyperplasticus perianalis mirigyek hámsejtjei megbízható belső pozitív kontrollként voltak használhatók.



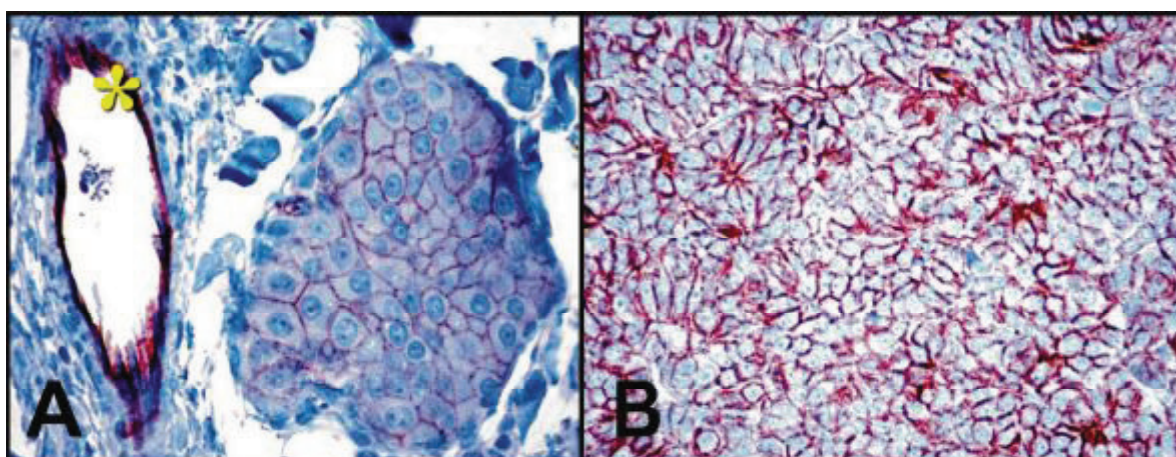
54. ábra A. Claudin-1 expresszió a differenciált hepatoid-sejtes mirigyhámrákban (IH, 200x). **B.** A claudin-1 expresszió diffúz elvesztése a differenciálatlan hepatoid-sejtes mirigyhámrákban (IH, 200x).

Az intact mirigyekben, a göbös hyperplasiákban, az adenomákban a claudin-1-hez hasonlóan, intenzív, diffúz (++++), lineáris membrán claudin-3 és -4 immunreaktivitást észleltünk. Ellentétben a claudin-1 expressziós mintázattal, a gyenge, multifocalis (+ - ++), lineáris membrán claudin-3 és -4 reaktivitású epitheliomákban nem tapasztaltunk cytoplasmaticus pozitivitást. A differenciált carcinomákban diffúz, intenzív (++ - +++) lineáris claudin-3 és -4 membránexpressziót figyeltünk meg (**55. A. ábra**). A differenciálatlan carcinomákban, szemben a claudin-1-el, intenzív, diffúz (++++), lineáris membrán claudin-3 és -4 pozitivitást észleltünk (**55. B. ábra**).



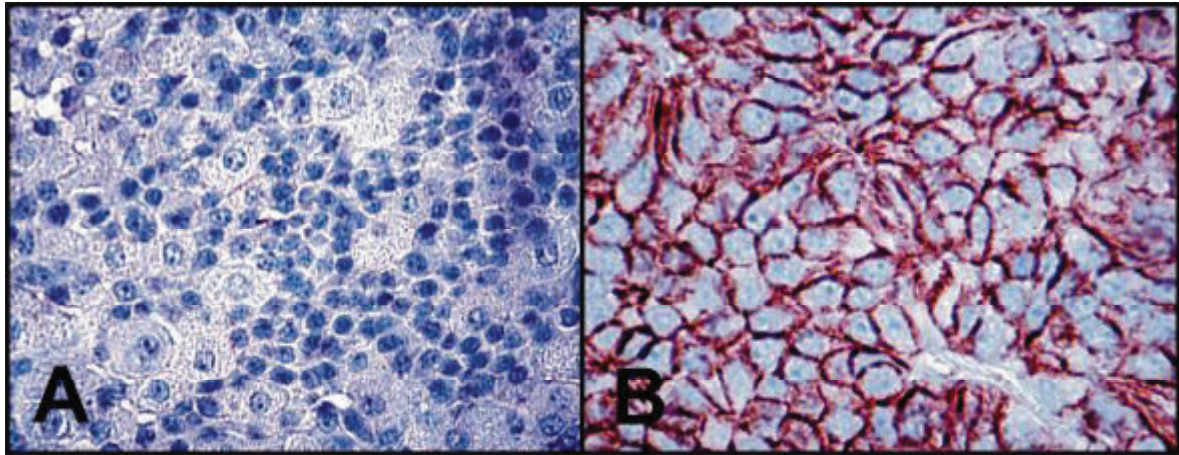
55. ábra A. Claudin-4 expresszió differenciált hepatoid-sejtes carcinomában (IH, 200x). **B.** Fokozott claudin-4 expresszió differenciálatlan hepatoid-sejtes carcinomában (IH, 100x).

A claudin-5 expressziós mintázat a különböző mintákban a claudin-3 és -4 immunreaktivitáshoz volt hasonló, azzal a különbséggel, hogy az epitheliomákban kisebb tumorsejtpozitivitási arányt, továbbá az intratumoralis mikroerek, illetve a környező intact vérerek endothelsejtjeiben intenzív claudin-5 pozitivitás volt észlelhető (**56. ábra**).



56. ábra A. Claudin-5 expresszió intact hepatoid-sejtes mirigyben és a perilobularis artéria endothelsejtjeiben (csillag) (IH, 200x). **B.** Fokozott claudin-5 expresszió differenciálatlan hepatoid-sejtes carcinomában (IH, 100x).

Az intact hepatoid-sejtes mirigyekben, hyperplasiákban és adenomákban, továbbá a differenciált és a differenciálatlan carcinomákban a claudin-3 és -4 expresszióval megegyező claudin-7 immunreaktivitást tapasztaltunk. A hepatoid-sejtes epitheliomák claudin-7 negatívnak bizonyultak (**57. ábra**). (Következtetések: 7.2.3. fejezet, 96. oldal.)



57. ábra A. Claudin-7 expresszió elvesztése hepatoid-sejtes epitheliomában (IH, 200x). B. Fokozott claudin-7 expresszió differenciálatlan hepatoid-sejtes carcinomában (IH, 200x).

6.3.5. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban

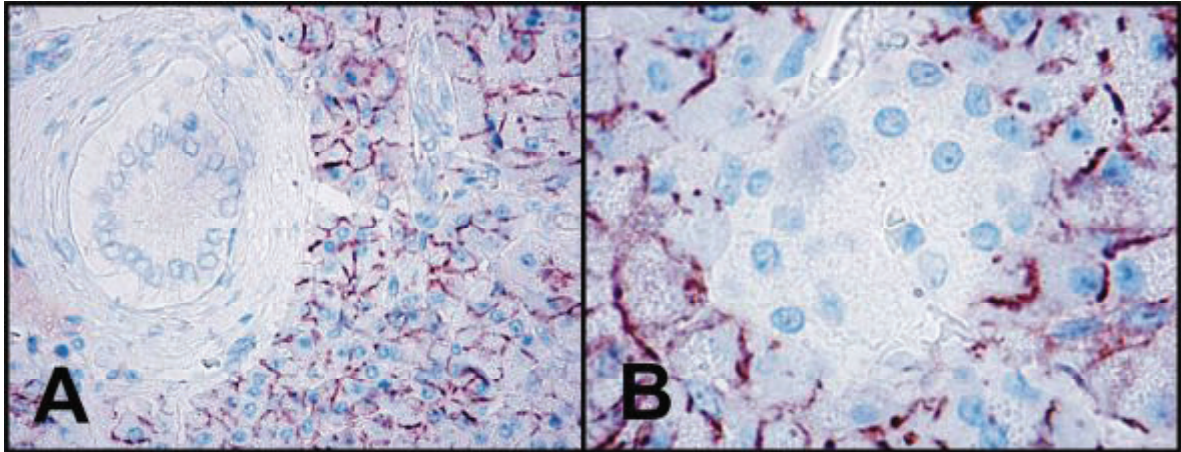
Az intact hasnyálmirigy sejtek és az acinaris sejtes carcinomák claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós mintázatának scoring eredményeit táblázatban összesítettük (Táblázat 18.).

Szövet-sejt/Antitest	Claudin-1	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7
Intact pancreas: Acinaris sejt	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
Intact pancreas: Ductalis hámsejt	Negatív	Negatív	Negatív	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
Intact pancreas: Endocrin sejtek	Negatív	Negatív	Negatív	Negatív	Negatív
Primer differenciált acinaris sejtes cc.	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
Primer differenciálatlan acinaris sejtes cc.	Negatív	Negatív	Negatív	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
Secunder differenciált acinaris sejtes cc.	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Intenzív, diffúz, apicalis membrán (++++)	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)
Secunder differenciálatlan acinaris sejtes cc.	Negatív	Negatív	Negatív	Negatív	Intenzív, diffúz, linearis membrán (++++)

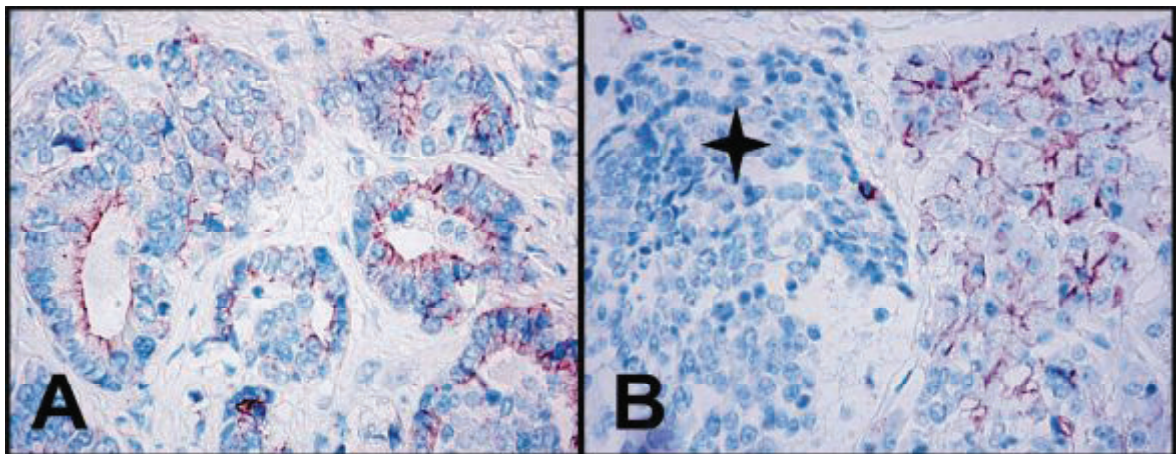
18. Táblázat. A kutyák hasnyálmirigy sejteinek, valamint primer és secunder acinaris sejtes carcinomáinak (cc.) claudinexpressziós vizsgálati eredményei.

Az anti-claudin-1 antitesttel végzett indirekt IH-i vizsgálataink során diffúz, intenzív, linearis (++++), membránpozitivitást tapasztaltunk az elváltozásmentes acinaris sejtekben (58. A. ábra). A ductalis hámsejtek, illetve a Langerhans-szigetek endocrin sejtjei claudin-1 negatívnak bizonyultak (58. B. ábra). Az elsődleges és az áttéti differenciált acinaris sejtes

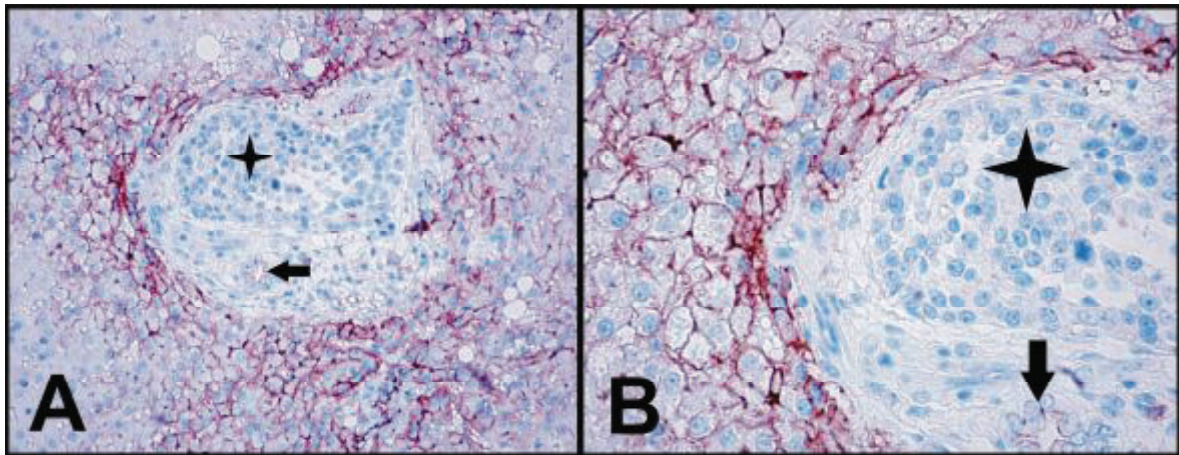
carcinomák diffúz, intenzív, apicalis (++++) claudin-1 immunreaktivitást mutattak, szemben a claudin-1 negatív differenciálatlan exocrin carcinomával (59. ábra). A periportalis intact májsejtek diffúz, intenzív linearis (++++), a biliaris hámsejtek pedig diffúz, gyenge linearis (++++) claudin-1 membránpozitivitást mutattak (60. ábra).



58. ábra A. Bal oldalon claudin-1 negatív ductalis epithelium, jobb oldalon claudin-1 pozitív acinaris sejtpopuláció intact pancreasban (IH, 200x). **B.** Claudin-1 negatív Langerhans-sziget, környezetében claudin-1 pozitív intact acinaris sejtek (IH, 400x).

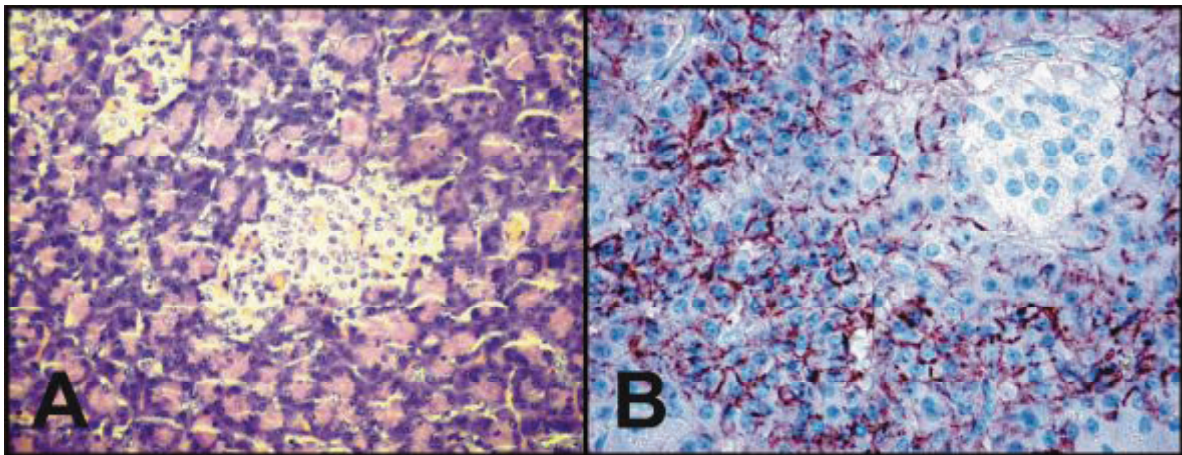


59. ábra A. Claudin-1 expresszió differenciált acinaris sejtes pancreas carcinomában (IH, 200x). **B.** Claudin-1 negatív, differenciálatlan acinaris sejtes pancreas carcinoma (csillag), környezetében claudin-1 pozitív intact acinaris sejtek (IH, 200x).



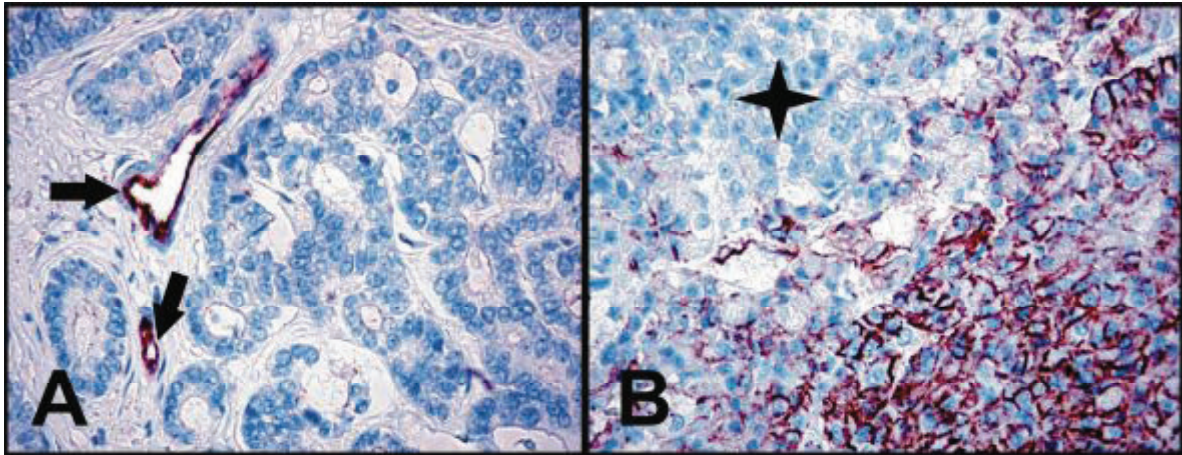
60. ábra A-B. Claudin-1 expresszió, a claudin-1 negatív differenciálatlan acinaris sejtes pancreas carcinoma áttét (csillag) körüli, intact periportalis májsejtekben. A nyílnál a gyenge claudin-1 membránpozitivitást adó cholangiocyták láthatók (IH, 100x, 200x).

A claudin-3 és -4 expressziós vizsgálatok során a claudin-1 expressziós mintázattal megegyező eredményt kaptunk az intact pancreas sejtek, a differenciált és differenciálatlan acinaris sejtes carcinomák esetén, viszont a periportalis hepatocyták és az epeút hámsejtek claudin-3 és -4 negatívak voltak. Az anti-claudin-5 ellenanyaggal végzett vizsgálataink során az intact acinaris sejtek diffúz, intenzív (++++) linearis membránpozitivitást mutattak. A ductalis hámsejtek és az endocrin sejtek claudin-5 negatívitást mutattak. A pancreas interstitiumában lévő erek endothel sejtjei intenzív claudin-5 immunreaktivitást adtak (**61. ábra**).



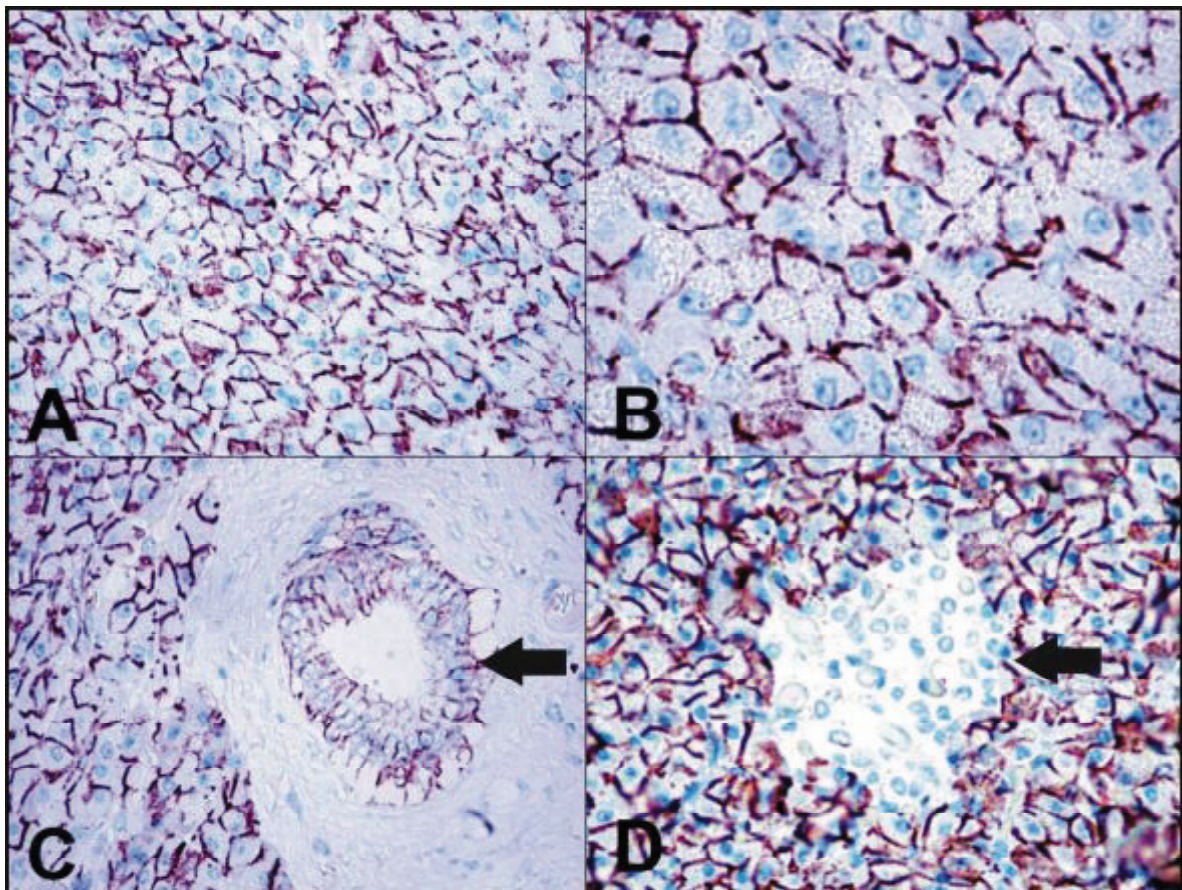
61. ábra A. Intact hasnyálmirigy acinaris sejtek és endocrin sejtek (HE, 100x). **B.** Claudin-5 pozitív intact acinaris sejtek és claudin-5 negatív endocrin sejtek (IH, 200x).

A differenciált és a differenciálatlan acinaris sejtes carcinomákban a claudin-5 expresszió elvesztését figyeltük meg (**62. ábra**). A májban sinusoidok és a portalis erek endothel sejtjei mutattak claudin-5 pozitívitást.



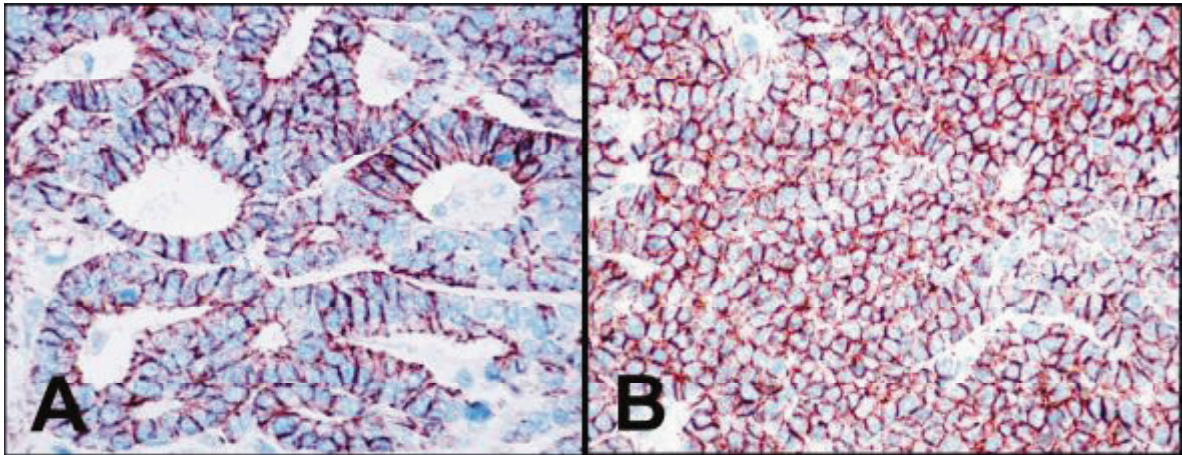
62. ábra A. Claudin-5 negatív, differenciált acinaris sejtés carcinoma. A nyilaknál intratumoralis, claudin-5 pozitív endothellessel rendelkező mikroerek (belső pozitív kontrollok) láthatók (HE, 200x). **B.** Claudin-5 negatív, differenciálatlan acinaris sejtés carcinoma (csillag) környezetében claudin-5 pozitív intact, peritumoralis acinaris sejtek (IH, 200x).

Az anti-claudin-7 ellenanyaggal végzett vizsgálataink során az intact acinaris sejtek és a ductalis hámszövetek diffúz, intenzív (++++) lineáris, membránpozitivitást mutattak. Az endocrín sejtek claudin-7 negatívak voltak (**63. ábra**).



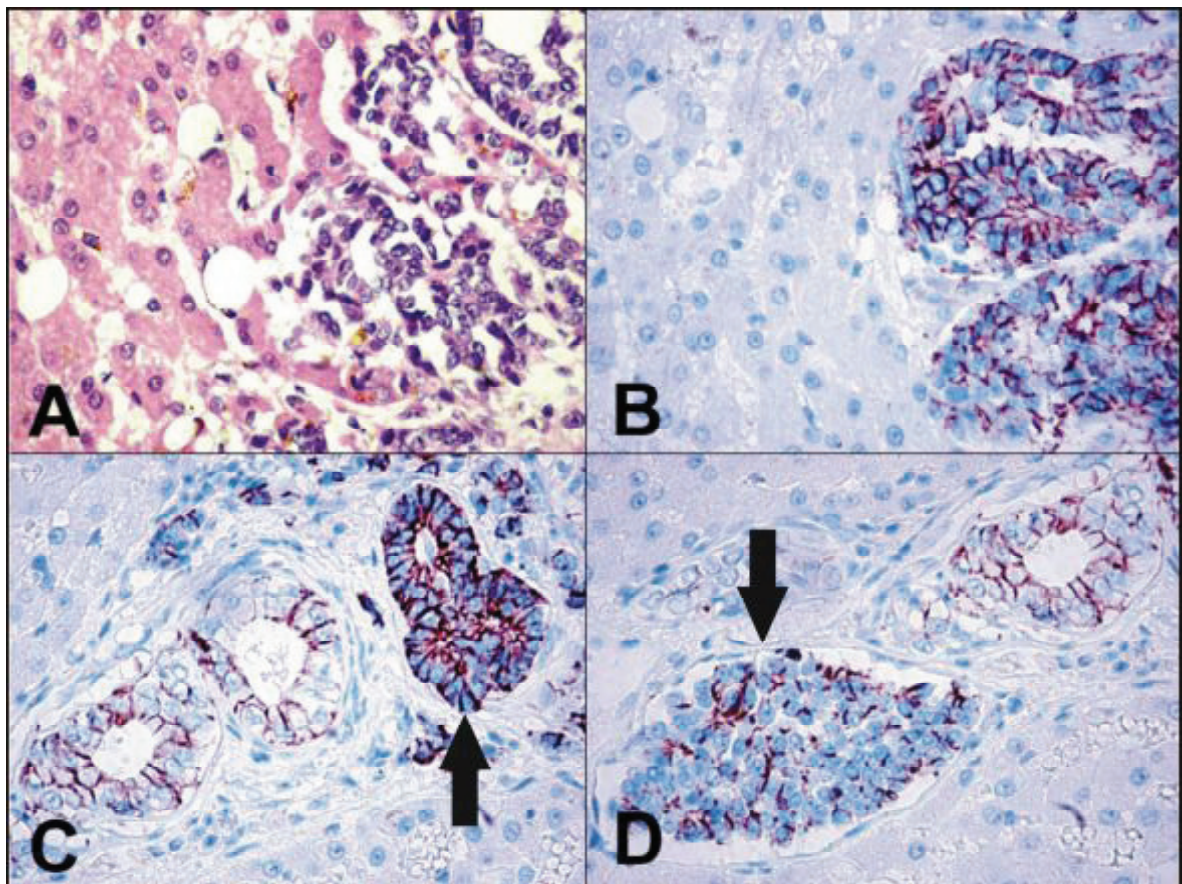
63. ábra A-B. Claudin-7 pozitív, intact acinaris sejtek (IH, A: 200x, B: 400x). **C.** Claudin-7 pozitív, pancreas elvezető cső (nyíl) környezetében claudin-7 pozitív, intact acinaris sejtek (IH, 200x). **D.** Claudin-7 negatív endocrín sejtek (nyíl) (IH, 200x).

A primer differenciált és a differenciálatlan acinaris sejtes carcinomák diffúz, intenzív (++++) linearis, membránpozitivitást mutattak (64. ábra).



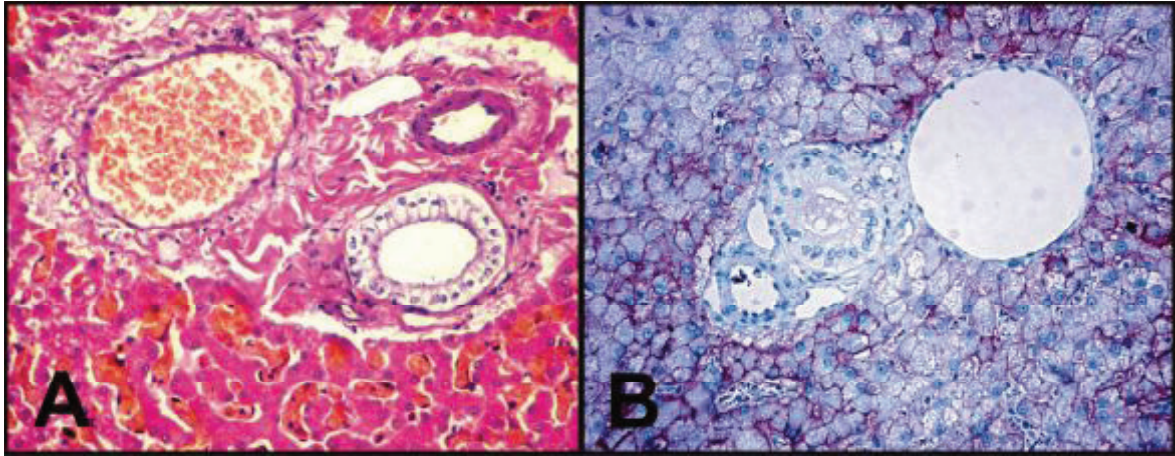
64. ábra A. Claudin-7 pozitív, differenciált acinaris sejtes carcinoma (IH, 200x). B. Claudin-7 pozitív, differenciálatlan acinaris sejtes carcinoma (IH, 200x).

A differenciált és a differenciálatlan áttéti, intrahepaticus acinaris sejtes pancreas carcinomák diffúz, intenzív (++++), linearis, membránpozitivitást mutattak. A májbeli intact epeúti hámsejtek, illetve a tumorembolusok szintén claudin-7 pozitívak voltak (65. ábra).



65. ábra A. Differenciált acinaris sejtes pancreas carcinoma intrahepaticus áttéte (HE, 200x). B. A kép jobb oldalán a claudin-7 pozitív, secunder intrahepaticus, differenciált acinaris sejtes carcinoma, környezetében a claudin-7 negatív, intact májsejtek (IH, 200x). C. Claudin-7 pozitív, differenciált acinaris sejtes carcinoma portalis metastasisa (nyíl), balra tőle intact, claudin-7 pozitív biliaris hámmal bélelt portalis epeutak (IH, 200x). D. Claudin-7 pozitív, intravasalódott, differenciálatlan acinaris sejtes carcinoma embolus (nyíl), jobbra tőle intact portalis epeút (IH, 200x).

A másodlagos intrahepaticus tumorok vizsgálata során az intact peritumoralis májterületeken multifocalis (nem diffúz) intenzív, claudin-1 membránpozitivitást tapasztaltunk a periportalis területeken lévő, a határoló lemezt alkotó májsejtekben és az azokat körülölelő 5-6 májsejtsorban (**66. ábra**). (**Következtetések: 7.2.4. fejezet, 98. oldal.**)

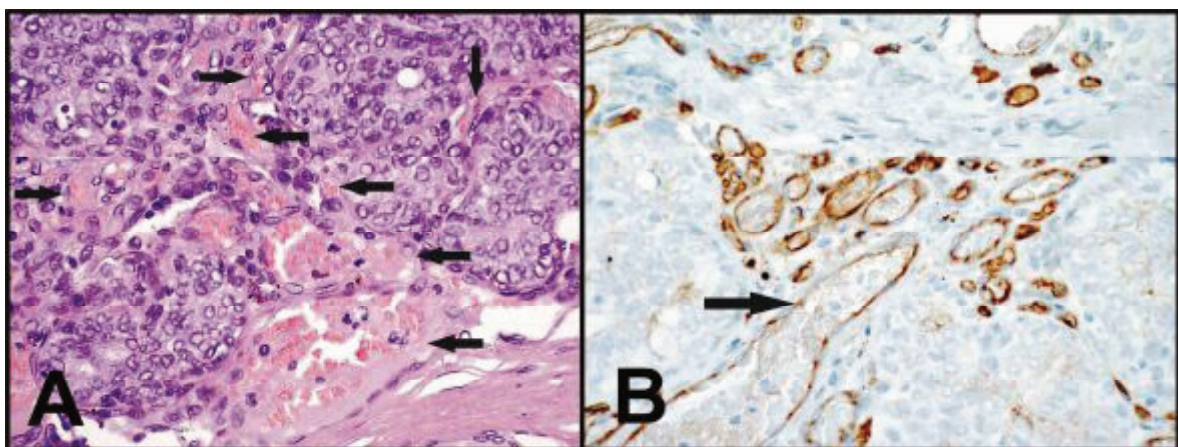


66. ábra. **A.** Elváltózásmentes portalis triád (ductus biliferus, portalis venula és hepaticus arteriola) kutyában (HE, 200x). **B.** Claudin-1 pozitív, intact, periportalis májsejtek kutyá egészséges májában (IH, 200x).

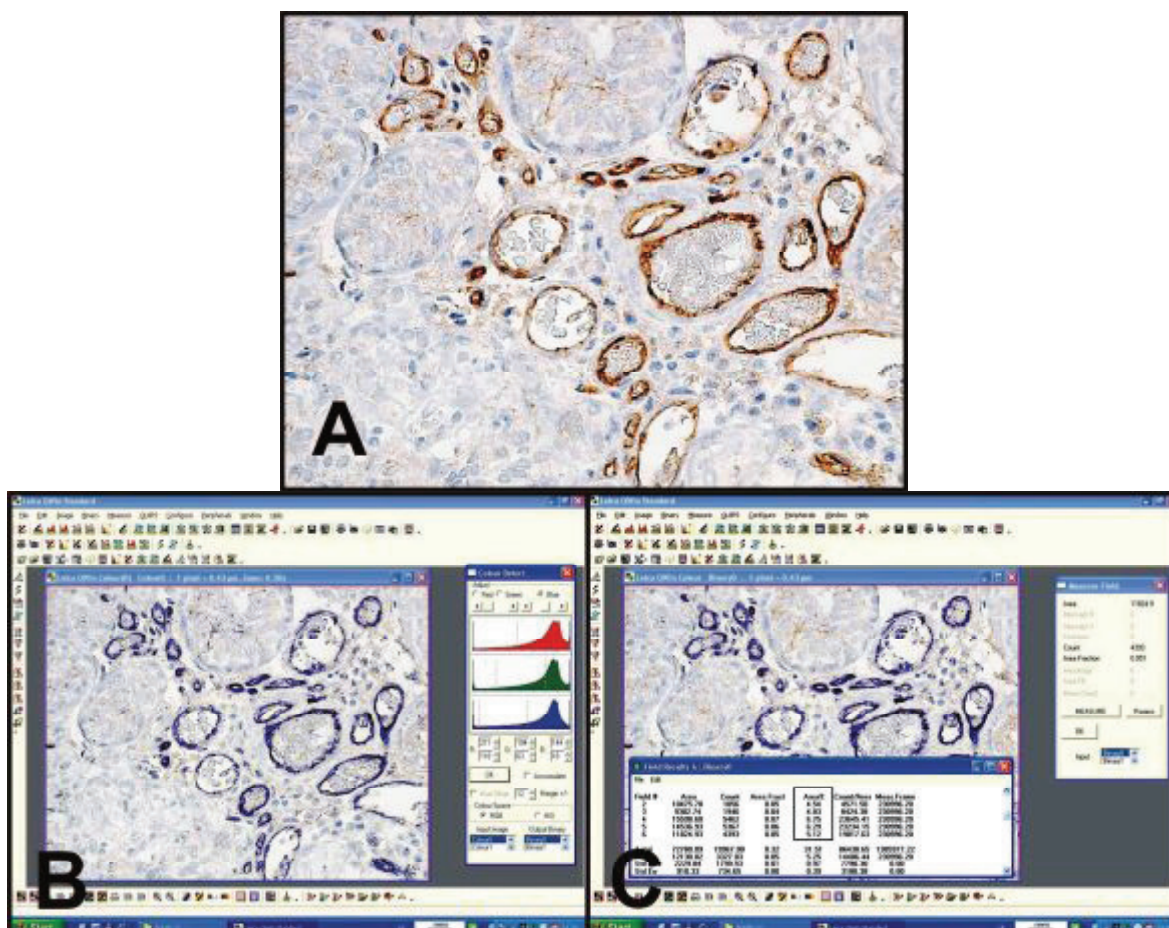
6.4. Angiogenesis vizsgálatok

6.4.1. *Claudin-5* alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban

Az érdenzitás vizsgálataink során a kutyákból származó emlőmirigy daganatokban kialakult, tumor-indukálta mikroerek endothel sejtjei intenzív, diffúz claudin-5 pozitivitást adtak (**67. ábra**). Ezt a pozitív reakciót használtuk fel az MVD mennyiségi meghatározására a számítógépes képanalitikai, morphometriai módszer segítségével (**68. ábra**).



67. ábra **A.** Grade III-as carcinoma simplex solidum infiltrans, állományában újonképzett, intratumoralis mikroerek (nyilak) (HE, 200x). **B.** Intenzív claudin-5 pozitívítás a daganat állományban lévő mikroerek endothel sejtjeiben (nyíl) (IH, 200x).



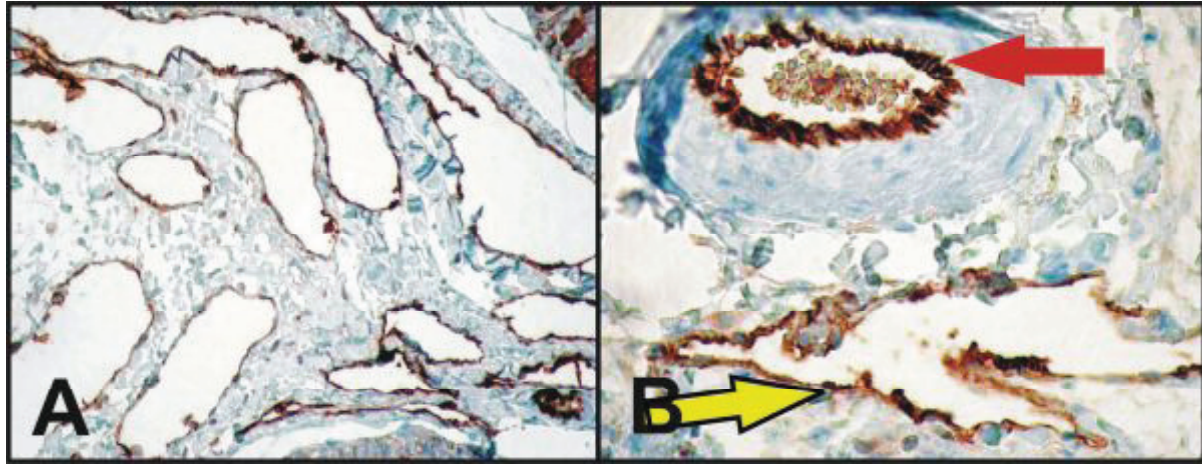
68. ábra A. A morphometria vizsgálatba bevont, jól vascularisalt tumorterület (ún. hot spot) a solid grade III-as simplex emlőmirigy carcinomában. Jól érzékelhető a változó átmérőjű mikroerek endothelsejtjeinek claudin-5 pozitivitása (IH, 200x). B-C. A Leica QWin V3.3.0 software által kék színben jelölt claudin-5 pozitív területek detektálása és a jelölt területek pixel %-os kvantifikálása (IH, 200x, 200x).

A kutyák intact emlőmirigyének stromájában lévő, eredeti erek adta érdenzítást és az emlőmirigy daganatokban észlelt MVD-t táblázatban foglaltuk össze (Táblázat 19.).

Szövetminta	Mintaszám (db)	Morphometriai MVD eredmény (pixel % pozitívítás)
1. Intact emlőmirigy	5	1,154 (0,99-1,318)
2. Simplex adenoma	12	0,66 (0,17-1,27)
3. Complex carcinoma	15	0,70 (0,34-0,91)
4. Grade I simplex carcinoma	20	1,98 (1,87-2,07)
5. Grade III simplex carcinoma	20	5,33 (4,03-6,33)
6. Grade III simplex carcinoma tüdőáttét	10	6,22 (4,86-7,49)

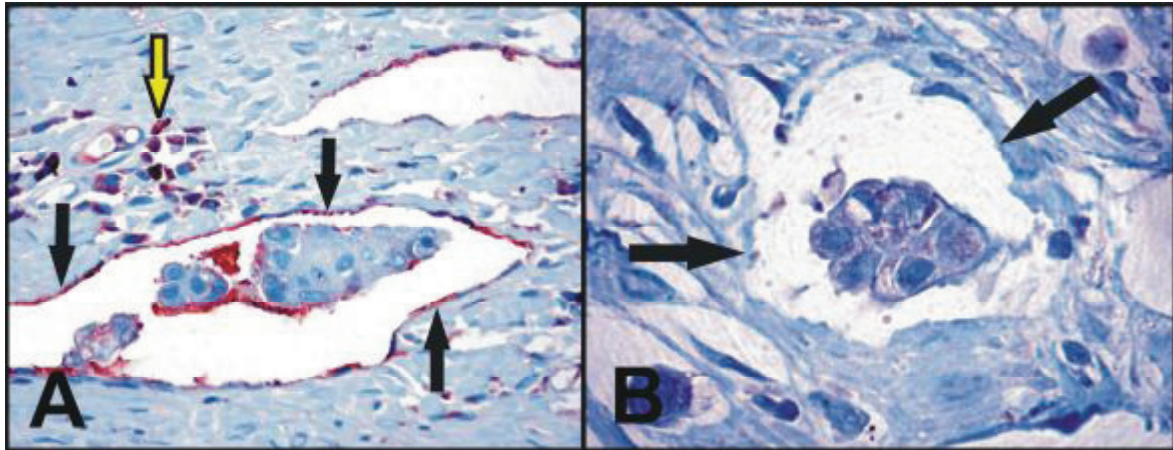
Táblázat 19. MVD morphometriai vizsgálati eredmények kutyák emlőmirigyében és annak tumoros elváltozásaiban.

Az intact emlőmirigy lebenykék körüli, fiziológias állapotukban collabált, továbbá a simplex solid carcinomák környezetében lévő, ún. peritumoralis (pericarcinomatous) kitégült nyirokerek endothel sejtjei, hasonlóan a vérerekhez, intenzív claudin-5 pozitivitást mutattak (69. ábra).



69. ábra A. A felvételen a perilobularis intact nyirokerek endothelbélésének claudin-5 pozitivitása látható, kutya normális emlőmirigyében (IH, 200x). **B.** Az immunhisztokémiai felvételen jól látható alul, a vörösvérsejteket nem tartalmazó, vékony falú nyirokér (sárga nyíl), illetve felül az erythrocytákat tartalmazó kis artéria endothelsejtjeinek (piros nyíl) erős claudin-5 pozitivitása kutya intact emlőmirigyében (IH, 400x).

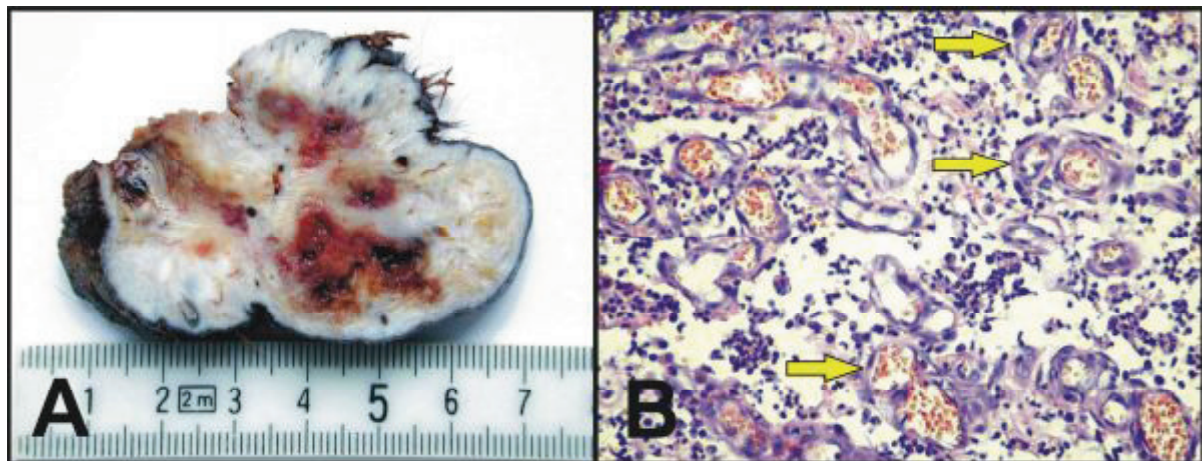
A kórszöveti metszetek vizsgálata során egyes peritumoralis, kitégült nyirokerekben azokat teljesen, vagy részben kitöltő tumorembolusokat figyeltünk meg (nyirokér invasio, intravasatio jeleit). Mindezek mellett a carcinomák infiltráló daganatos részein számos, egyértelműen nem elbírálható, érinvasio jelét utánozó, a formalinos konzerválás miatt kialakuló sejt- és szövetsugorodás (retractio) volt érzékelhető. Az anti-claudin-5 ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálat során a daganat kötőszöveti vázában lévő vér- és nyirokerek endothel sejtjei intenzív membránreakciót mutattak, ami lehetővé tette a nyirokerekben tovasodró, claudin-5 negativitást mutató tumorembolusok egyértelmű detektálását (70. A. ábra). A grade III-as infiltráló simplex carcinomák individualis, illetve multicellularis invasiv frontjának sejtjei claudin-5 negatívak voltak, így a claudin-5 segítséget nyújtott a szöveti retractio érinvasiótól történő, egyértelmű elkülönítésében is (70. B. ábra). A vizsgálat során a daganatos stromát infiltráló plasmasejtek, továbbá a vér- és nyirokerekben lévő plazma- és egyéb fehérjék fals pozitív reakciót adtak. (Következtetések: 7.3.1. fejezet, 102. oldal.)



70. ábra **A.** Intenzív claudin-5 pozitívítást mutató endothel sejtek (fekete nyilak) a peritumoralis nyirokerekben, amelyek lumenében a claudin-5 negatív daganatsejtek, tumorembolusok láthatók, felszínükre tapadt fals pozitív lymphával. A sárga nyílnál a fals pozitívítást mutató plasmasejtek láthatók (IHC, 200x). **B.** Az artefactualis szöveti retractio, nyirokérfalat utázó szövettani határa (nyilak) (IH, 400x).

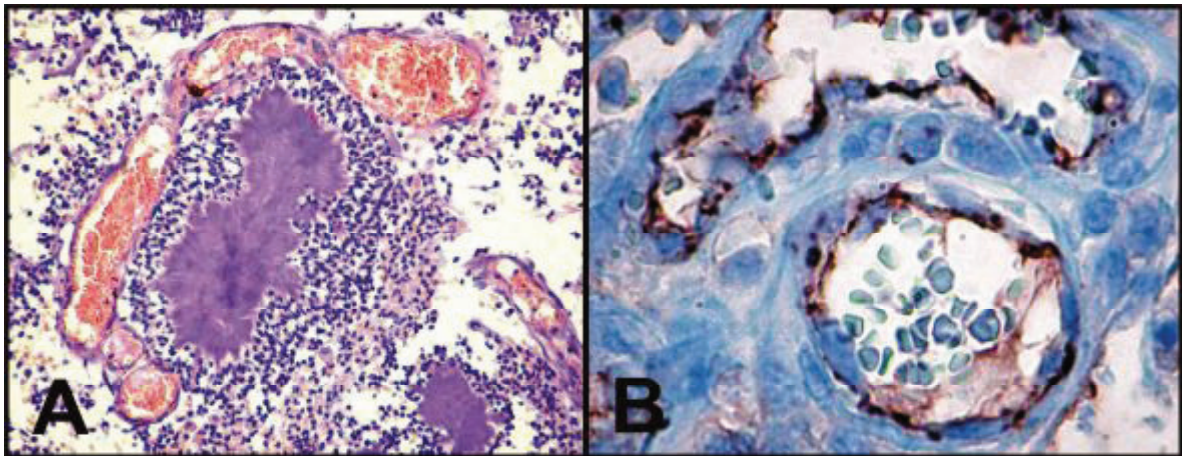
6.4.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban

A kutyák bőréből származó, klinikailag daganatnak imponáló (tumorszerű) elváltozások fénymikroszkópos vizsgálata során, valamennyi esetben idült, aktív gyulladást tapasztaltunk, kifejezett neoangiogenesisissal, mononuclearis sejtes infiltrációval, illetve fibroblastsejt burjánzással kísérvé. A proliferáló mikroerek arteriolaris típusúnak bizonyultak (71. ábra).



71. ábra **A.** Kutya idült, aktív, körülírt bőrgyulladásának sebészi bioptátuma. **B.** A kórszöveti felvételen kifejezett angiogenesisissel kísért, idült dermatitis látható. A gyulladásos sejtek között számos újonképzett arteriola átmetszete tűnik fel (sárga nyilak) (HE, 200x).

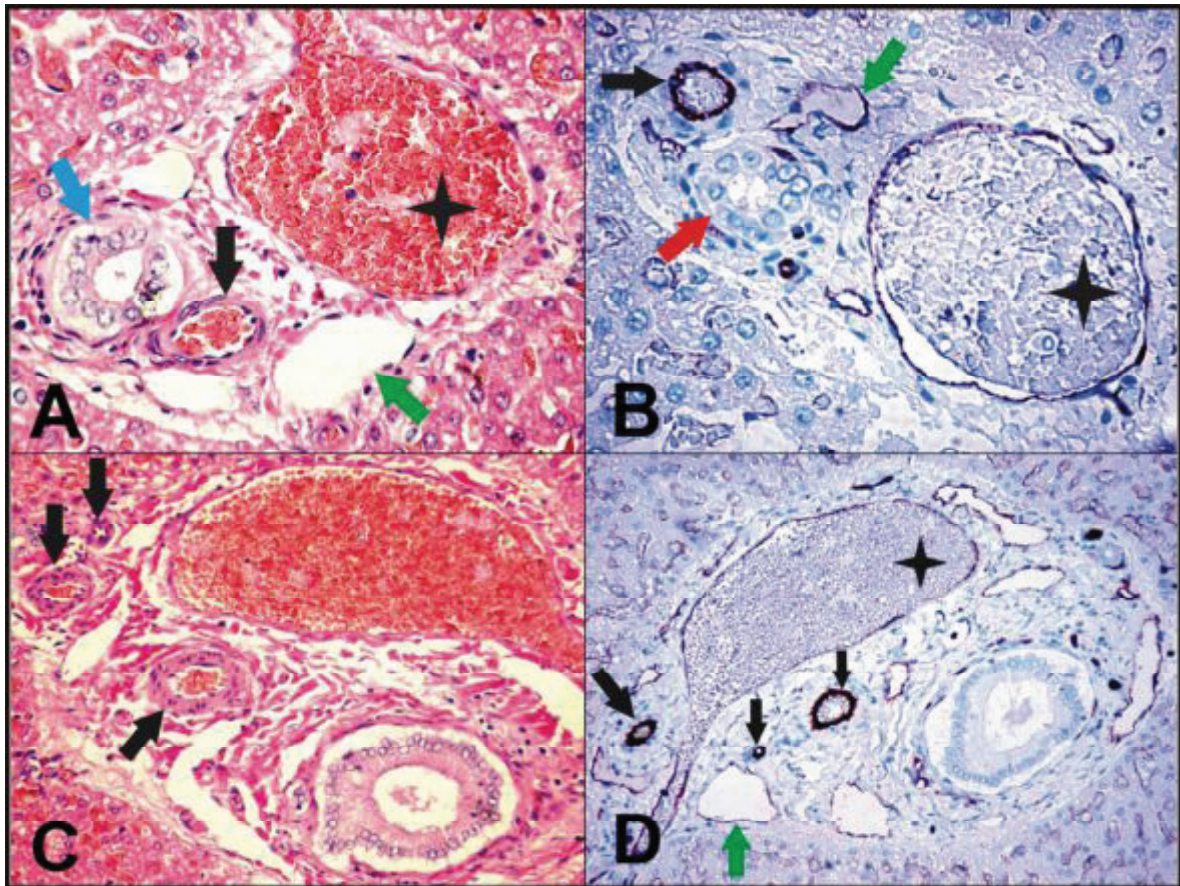
A duzzadt endothelsejttel bélelt, egymással anasztomizáló arteriolákat, orsóalakú, pericyták ölelték körül. A jól vasularisált, idült gyulladással szöveti területeken nem tapasztaltunk vérellátási zavar miatt kialakult necrosist. Az immunhisztokémiai vizsgálat során a claudin-5 protein intenzív membránpozitivitást mutatott az idült gyulladás folyamán képződött mikroerek endothelsejtjeiben (**72. ábra**). A pericyták, illetve a gyulladás területén jelenlévő egyéb eredetű mesenchymalis sejtek claudin-5 negatívak voltak. (Következtetések: 7.3.2. fejezet, 104. oldal.)



72. ábra A. A kórszövettani felvételen *Stapylococcus sp.* indukálta granuloma (pseudomycetoma) és az azt körülölelő újonképzett, vörösvérsejtekkel kitöltött arteriolák figyelhetők meg (HE, 200x). **B.** A nagy nagyítású felvételen a claudin-5 membránpozitivitást adó, gyulladás indukálta arteriolák átmetszetei láthatók (IH, 400x).

6.4.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában

A kétdimenziós kvantitatív histomorphometriai vizsgálatok során a kis portalis területek közé soroltuk a 90 - 300 µm legnagyobb longitudinális átmérővel rendelkezőket, a középnagy csoportba a 300 - 800 µm és a nagy csoportba 800 µm-nél nagyobb átmérővel rendelkező területeket. A hepaticus arteriolák, a portalis venulák, a portalis nyirokereket és a sinusoidok endothel sejtjei intenzív claudin-5 membránpozitivitást mutattak. A biliaris epithelsejtek, a portalis fibroblastok, a májsejtek és a Kupffer-sejtek claudin-5 negatívak (belső negatív kontrollok). A portalis vascularis képletek számának meghatározását nagyban segítette endothel sejtjeiknek claudin-5 immunreaktivitása (**73. ábra**).



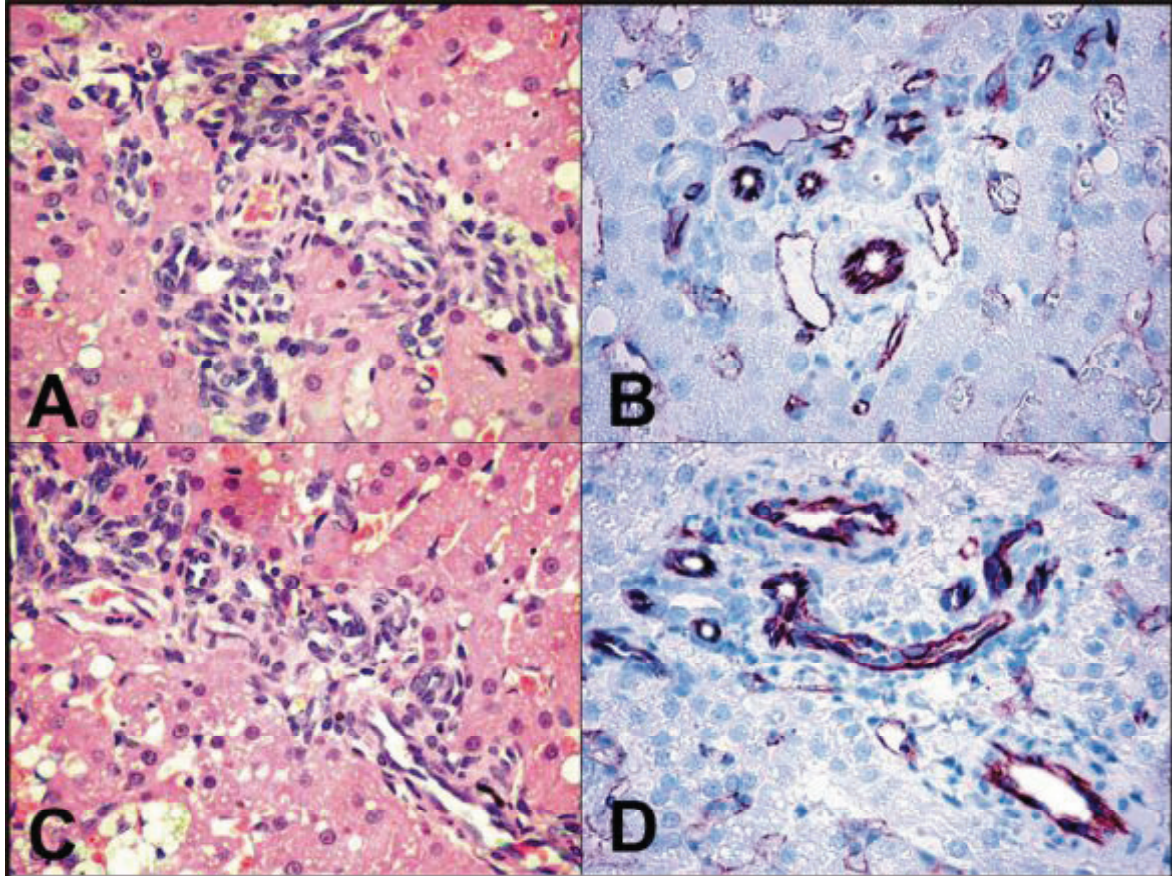
73. ábra **A.** Kórszöveti felvétel kutya intact májából származó kis portalis területről: hepaticus arteriola (fekete nyíl), ductus biliferus (kék nyíl), portalis venula (csillag) és nyirokerek (zöld nyíl) (HE, 200x). **B.** A hepaticus arteriola (fekete nyíl), a portalis venula (csillag) és a nyirokér (zöld nyíl) endothelsejtjei intenzív claudin-5 pozitívítást muttak. A biliaris epithelsejtek (piros nyíl) claudin-5 negatívak voltak (IH, 200x). **C.** A középnagy portalis area kórszöveti felvétele három hepaticus arteriolával (nyilak) (HE, 100x). **D.** Claudin-5 pozitívítás a hepaticus arteriolákban (fekete nyilak), a portalis venulában (csillag) és a nyirokerekben (zöld nyíl). A periportalis területeken jól észlelhető a sinusoid rendszer endothel sejtjeinek a claudin-5 pozitívítása (IH, 100x).

A histomorphometriai vizsgálataink során a kis portalis területeken 1 hepaticus arteriolát, 1 portalis venulát és 2-3 nyirokeret; a középnagy portalis areákban 2-3 hepaticus arteriolát, 1 portalis venulát és 2-6 nyirokeret; a nagy portalis mezőkben pedig 4-5 hepaticus arteriolát, 1 portalis venulát és 8-11 nyirokeret figyeltünk meg (**Táblázat 20.**).

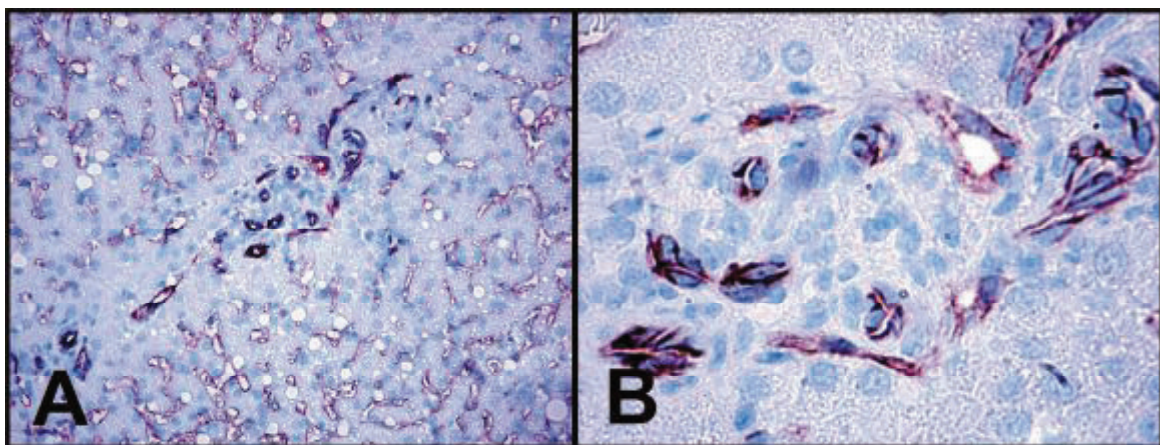
Histomorphometriai praméterek	<i>Kis portalis terület</i>	<i>Középnagy portalis terület</i>	<i>Nagy portalis terület</i>
Legnagyobb hosszanti átmérő	90 – 300 µm	300 – 800 µm	800 µm <
Hepaticus portalis arteriolák száma	1	2 - 3	4 - 5
Portalis venulák száma	1	1	1
Portalis nyirokerek száma	2 - 3	2 - 6	8 - 11

Táblázat 20. A kutya intact májában lévő különböző méretű portalis mezők vascularis képleteinek száma.

Valamennyi májbiopsiás mintában a proliferáló portalis arteriolák, venulák és nyirokerek endothelsejtjei intenzív claudin-5 immunreaktivitást mutattak. A mintákban, a hyperplasticus hepaticus arteriolák száma, a kis portalis területeken 5-6, a középnagy portalis mezőkben 8-12 és a nagy portalis areákban 15-20 volt. A kórosan burjázó arteriolákat bélelő endothel sejtek megnagyobbodottak, hypertrophisáltak voltak a normális erekhez viszonyítva, illetve irregularitás, fokozott spirális, csavarulatos megjelenés volt tapasztalható. A csökkent átmérőjű portalis venula száma a májbiopsiás minták valamennyi portalis mezőjében 0-1 volt (74. és 75. ábra). (Következtetések: 7.3.3. fejezet, 106. oldal.)



74. ábra A-B. Kóros arteriolaris hyperplasia, kis portalis területen (A: HE, 200x; B: IH, 200x). C-D. Csavarulatos megjelenésű, proliferáló arteriola hosszanti átmetszete (C: HE, 200x; D: IH, 200x).



75. ábra A-B. Proliferáló 10-12 hepaticus arteriola, középnagy portalis mezőben. A felvételen a portalis venula hiánya észlelhető (IH, A: 100x; B: 400x).

7. Következtetések

7.1. Tumordiagnosztika

7.1.1. *Claudin-5* expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában

A HSA a vérérképző szövetek rosszindulatú daganata (Smith, 2003). Egyes külföldi felmérések szerint a kutyák daganatainak kb. 0,3 - 2%-a HSA. Kutyákban leggyakrabban a lépből (az esetek 50-65%-ában), a jobb szívpitvarból, illetve a jobb szívfülcéből (az esetek 3-25%-ában), a bőrből, illetve a bőr alatti kötőszövetből (az esetek 13-17%-ában) és a májból (az esetek 5-6%-ában) indul ki elsődleges HSA. Egyéb szöveti területek, amelyekből primer HSA alakulhat ki a tüdő, az aorta, a vese, a szájüreg, a vázizomzat, a csont, a húgyhólyag subserosalis területe, a bél, a nyelv, a prosztata, a vulva/vagina, a kötőhártya és a hashártya. A lép eredetű HSA-ák, az esetek több mint a 25%-ában szinkron (szimultán) jobb szívpitvari, illetve jobb szívfülcsebeli primer HSA-ával együtt jelenik meg. A lép eredetű HSA főként az omentumba, a bélfodorba és egyéb hasüregi szervekbe, a jobb szívfülcse eredetű HSA pedig elsősorban a tüdőbe képez áttéteket. Kutyákban a HSA incidenciája a 8 - 13 év között, illetve a nagy testű fajtákban a legnagyobb (Brown et al., 1985). A kutyák HSA-ának terápiája és kórjósolata a daganat anatómiai helyeződésétől függően változó. A legeredményesebb az időben elvégzett sebészi terápia: splenectomia, tumorectomia. Sajnos az esetek nagy részében már a klinikai diagnózis időpontjában áttétek vannak a szervezetben (Clifford et al., 2000).

A kutyák HSA-ájának patológiai diagnózisát nagyban segíti az endothel markerekre: a CD31-re (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Ferrer et al., 1995), a von Willebrand faktorra (vWF, factor VIII-related antigen, F VIII Rag) alapozott immunhisztokémiai vizsgálat. A von Beust és mtsai (1988) által megvizsgált, kutyákból származó 47 HA közül valamennyi (100%), míg a 36 HSA közül 32 (89%) mutatott vWF-pozitivitást (von Beust et al., 1988). Ferrer és mtsai (1995) összehasonlító immunhisztokémiai vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a formaldehid-oldatban konzervált, paraffinba ágyazott 15 HSA minta közül 11 (73%) mutatott vWF pozitivitást, ezzel szemben valamennyi minta (100%) CD31 pozitív volt. Eredményeik bizonyították, hogy a CD31 megbízhatóbban használható endothel marker, mint a vWF a kutyák HSA-jának patológiai diagnosztikájában (Ferrer et al., 1995). Tapasztalataikat jelen tanulmányunk alátámasztotta, amely során a megvizsgált 26 HSA közül 8-ban (30,77%) vWf negativitást észleltünk (3 differenciált, cavernosusban és 5 differenciálatlan, solidban). Ezzel szemben valamennyi HSA minta (100%) intenzív diffúz CD31 és claudin-5 membránpozitivitást mutatott. A vizsgálatainkat a CD31 és claudin-5 markerek összehasonlításával folytattuk. Ennek során, semiquantitatív scoring (pontozásos) rendszerünk alapján, különbséget észleltünk a két marker immunreaktivitásában. A differenciált HSA-ában **70-100% CD31** pozitívítás (átlagpont: **4,88**) és **90-100%-a claudin-5** pozitívítás (átlagpont: **4,96**) volt

tapasztalható. A solid, differenciálatlan HSA mintákban ez a különbség jóval nagyobb volt: **40-100% CD31** pozitívitas (átlagpont: **4,44**), illetve **90-100% claudin-5** pozitívitas (átlagpont: **4,84**). A szelektált paraffinba ágyazott minták standard körülmények között lettek konzerválva, 20 °C, 24 órán át, 8 %-os pufferolt, neutralis formaldehid-oldatban. A gyakorlati tapasztalataink szerint előfordul, hogy a kutyák műtéti eltávolításra került daganatainak fixálása során, a klinikus kollégák csapvízzel, nem kellően higítják az általuk megvásárolt általában 44%-os nem pufferolt, nem neutralis formaldehid-oldatot és a javasolt 24 óra helyett 2-3 hétig konzerválják. A SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék paraffinos blokkokba ágyazott tumorbankjából 10 nem optimálisan konzervált HSA mintán teszteltük, illetve hasonlítottuk össze az anti-CD31 és az anti-claudin-5 monoclonalis egér ellenanyagokat. A különbség egyértelmű volt: valamennyi, nem pufferolt, nem semleges, 15 %-os formaldehid-oldatban, 2-4 hétig túlfixált HSA minta esetében jól értékelhető diffúz, intenzív claudin-5 membránpozitívitas tapasztaltunk, viszont a tízből nyolc minta CD31 negatívnak bizonyult, illetve a két CD31 pozitív túlkonzervált minta egyikében csak gyenge, nem diffúz, multifocalis volt a CD31 immunreaktívitas (Jakab et al., 2009a). Tanulmányainkat konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal is alátámasztottuk (Jakab et al., 2009j).

A **CD31 molekula** (*PECAM, platelet endothelial cell adhesion molecule*) az immunoglobulin G szupercsaládba tartozó 135 kDa, 764 AS-at tartalmazó, transzmembrán glükoprotein. A korábbi human tanulmányok szerint megtalálható az artériák, arteriolák, vénák, venulák és a nem sinusoidalis jellegű capillarissok endothelsejtjeinek membránjában, illetve expresszálják a vérlemezkék, a monocyták, a macrophagok, a Kupffer-sejtek, neutrophil-, eosinophil granulocyták, T/NK sejtek, lymphocyták, megakaryocyták, fibroblastok, osteoclastok. Expressziója megfigyelhető a különböző endothelialis daganatokban. Ig-szerű extracellularis doménje a sejt-sejt homophiliás kapcsolatok kialakításában játszik szerepet (Jackson, 2003).

A **claudin-5** az elsőként identifikált, 22kDa, 302 AS-at tartalmazó, endothelspecifikus claudinfehérje. Hiánya, deletioja okozza a human ún. velo-cardio-facialis syndromát, amely veleszületett szívfejlődési rendellenességgel, szájpád-anomáliákkal és arcdysmorphiával járó tünetcsoport (Morita et al., 1999). Morita és mtsai kutatásaik során leírták human és egér bőr irharétegének ér-endothelsejtjeiben (Morita et al., 2003). Soini (2005) immunhisztokémiai tanulmánya során azt tapasztalta, hogy a claudin-5 a human angiosarcomában és a benignus vascularis tumorokban expresszálódik, így segíti az egyéb nem endothelis lágyszöveti tumoroktól való differenciálást (Soini, 2005).

A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az claudin-5 endothel marker intenzívebb immunreaktívitas mutat a kutyák HSA-jában, szemben az anti-CD31-el, ami különösen szembetűnő a nem optimálisan konzervált minták esetén (Jakab et al., 2009a). A formaldehid (és oldatában kialakuló származékai: metanol, hangyasav aldehid, formiol hidrát

vagy metaldehid) képes kémiai kapcsolatot kialakítani a különböző aminosavakkal: a lizinnel, a hisztidinnel, az argininnel (bázikus oldalláncú aminosavakkal), az aszparaginsavval (savas oldalláncú aminosavakkal), a ciszteinnel, a tirozinnal és a glutaminnal (poláros oldalláncú aminosavakkal) (Frost et al., 2000). A formaldehid konzerváló kapacitása, tehát annak köszönhető, hogy alkilálja a fehérjékben előforduló amino- és szulfhidril-csoportokat, valamint a purinbázisok gyűrűjében található nitrogéneket. A formaldehid alapú szöveti konzerválás során tehát a sejtekben, a sejtközötti állományban fellelhető proteinek természetes konformációját többnyire irreverzibilisen megváltoztató keresztkötések létesülnek a fehérjék és a formaldehid molekulák között (ún. formaldehid-kelátok), amelyek révén az antigén determinánsok (epitópok), az IH vizsgálatok során, az ellenanyagok számára hozzáférhetetlenné válhatnak (Frost et al., 2000). A túlfixált minták esetén nagyszámú formaldehid-kelát alakulhat ki a mintában, ami gyenge, vagy fals negatív immunreaktivitást eredményezhet (Ramos-Vara, 2005). Feltételezhető, hogy a túlkonzervált HSA mintáink esetén részben ez okozta a nagyobb molekulatömegű (135 kDa), illetve nagyobb (764) aminosav tartalmú CD31 molekulák gyengébb immunreaktivitását a kisebb molekulatömegű (22kDa), illetve alacsonyabb számú (302) aminosavat tartalmazó claudin-5-tel szemben, hiszen a nagyobb számú aminosav tartalom hajlamosabbá teszi a fehérjét formaldehid-kelát képződésre. Mindezek mellett a claudinok, így a claudin-5 molekula is homo-, illetve heterodimerizálódhat, polimerizálódhat, ami fokozhatja antigenitásukat.

Rutin HE-metszetekben számos fusocellularis daganat, a fibro-, a leiomyo-, a myxo-, a rhabdo-, a neurofibrosarcoma (malignus perifériás ideghüvely tumor) és egyéb differenciálatlan sarcoma, továbbá a pericytoma, az amelanoticus orsósejtes melanoma állományában kiterjedt vérzésekkel, illetve a fokozott tumor-indukált neovascularisatio utánoszhatja a differenciált HSA-t, valamint a solid területeken a differenciálatlan HSA kórszöveti fenotípusát.. Különösen nehéz a patológiai differenciál diagnózis azokban az esetekben, amikor nem az egész tumor, hanem annak csak kisebb kimetszett része (incisionalis-, vastagtű-biopsia) kerül feldolgozásra. Ezekben az esetekben a claudin-5 endothel marker kimutatására alapozott IH vizsgálat egyértelművé teszi az endothelialis eredetet. A claudin-5 negatív HSA-szerű kórszöveti megjelenésű orsósejtes tumorokban az újonképzett mikroerek endothel sejtjei megbízható belső pozitív kontrollként használhatók (Jakab et al., 2009a).

A claudin-5 és a CD31 a benignus endothelialis tumorokban azonos immunreaktivitást mutat (Jakab et al., 2009a), és nagyban segítették az orsósejtes haemangioma (Jakab et al., 2009e), illetve az angioma komponensű benignus vegyes tumorok (mesenchymomák) pontos diagnóziást (Jakab et al., 2010g), továbbá transplantációs folyamatok során, az endothelialis transdifferentiatio kontrollját (Csébi et al., 2011).

Mivel a claudin-5 mind a HA-ákban, mind a lymphangiómákban, továbbá mind a HSA-ákban, mind a lymphangiosarcomákban egyértelmű és azonos pozitívítást adott, ezért csak egyéb nyirokendothel markerek bevonásával alkalmas erek differenciálására.

A kutyák heterogen endothel sejtpopulációval rendelkező lépében végzett vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a CD31 negatív discontinualis sinus endothel sejtek diffúz, intenzív claudin-5 pozitívítást mutatnak. A lép patológiai vizsgálatok során tehát a claudin-5 megbízhatóbb marker, mint a CD31, mivel a sinus endothelium pozitívítás jól értékelhető claudin-5 belső kontrollként szolgál az endothelialis, illetve nem endothelialis daganatok indukálta léphaematómák differenciálásában (Jakab et al., 2009a).

Tapasztalataink alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy az anti-claudin-5 a vWf-al és az anti-CD31-el szemben megbízhatóbb, szenzitívebb endothel markernek bizonyult, a kutyák malignus endothelialis eredetű daganatának, a HSA-nak patológiai diagnosztikájában, mind az optimálisan, mind a nem megfelelően formaldehid-konzervált minták esetében. Ezen előnyös tulajdonsága főként a differenciálatlan, solid HSA minták és a sebészileg nem teljesen eltávolított (incisionálisan kimetszett bioptátumok) esetében nyilvánul meg és ezek megbízható patológiai diagnosztiká segíti. Megállapíthatjuk, hogy a kutyákból származó mintákban tapasztalt pozitív claudin-5 immunreaktivitás optimálisan kielégítette az IH-rekációk három fő követendő szempontját: a specificitást, a szenzitivitást és a reprodukálhatóságot (Jakab et al., 2009a). A claudin-5 kimutathatóságát más állatfajokban is vizsgálták. Megállapították, hogy egér (Morita et al., 2003), patkány (Rahner et al., 2001), tengerimalac (Butt et al., 2011), degu (Jakab et al., 2010e), macska (Kovács et al., 2009), teknős (Gál et al., 2009; Gál et al., 2010), varánusz (Jakab et al., 2011b), ló (Jakab et al., 2008f), illetve papagáj endothelsejteiben (Jakab et al., 2010j) is megbízható keresztreakciót ad, ezért alkalmasnak bizonyul további onkológiai, valamint egyéb comparatív IH-i vizsgálatokra. Tanulmányunk során kimutattuk, hogy az claudin-5 kimutatása kutyák lépelváltozásainak, a daganat, továbbá nem daganat-indukálta léphaematómáknak patológiai diagnózisában megbízhatóbb, szenzitívebb markernek bizonyult, mint a CD31 detektálás, mivel a CD31 negatív discontinualis sinus endotheliumban is intenzív, diffúz pozitívítást mutat. Ez lehetővé teszi, hogy a sinus endothel, az anti-claudin-5-el végzett IH-i reakció kiértékelése során elengedhetetlen pozitív belső kontrollként szolgáljon a kutyákból származó lépminták patológiai diagnosztikájában, segítve a vascularis, illetve nem vascularis tumor, vagy nem daganat (pl. lymphoid hyperplasia) indukálta intrapulparis vérömleny azonosítását (Jakab et al., 2009a).

7.1.2. Claudin-7 expressziós vizsgálatok kutyák cholangiocellularis és hepatocellularis proliferatív elváltozásaiban

A kutyák májából kiinduló leggyakoribb primer malignus tumorok a cholangiocellularis carcinoma és a hepatocellularis carcinoma. A HE metszetekben, az állatorvos patológus számára komoly kihívást jelent a kutyából származó differenciált cholangiocellularis carcinoma (dCCC) és a tubularis szerkezetű, adenoid típusú, differenciált hepatocellularis carcinoma (dHCC), továbbá a tubularis képződményeket nem tartalmazó, solid sejtmézökből felépülő differenciálatlan cholangiocellularis carcinoma (nCCC) és a dHCC, illetve differenciálatlan hepatocellularis carcinoma (nHCC) elkülönítése (Patnaik et al., 1981; Trigo et al., 1982). Számos immunhisztokémiai marker: a **hepatocyte paraffin 1** (Hep Par 1) (Ramos-Vara et al., 2001), a **cytokeratin-7** (CK 7), az **alpha-foetoprotein** (AFP) és a **carcinoembrionalis antigén** (CEA) segíti az daganatpatológiai, differenciál diagnosztikai kérdés eldöntését (De las Mulas et al., 1995; Ramos-Vara et al., 2001).

Munkánk során a **claudin-7** expressziós mintázatot tanulmányoztuk kutyák intact májszövetében, továbbá benignus és proliferatív primer elváltozásaiban. Valamennyi intact cholangiocyta, valamint azok jóindulatú és rosszindulatú proliferátuma intenzív, diffúz, linearis claudin-7 membránpozitivitást mutatott. Ezzel szemben az egészséges, a hyperplasticus és a daganatos májsejtek claudin-7 negatívnak bizonyultak.

Korábbi külföldi, állatorvosi immunhisztokémiai tanulmányban megállapították, hogy a kutyák intact májsejtjei diffúz, cytoplasmaticus Hep Par 1 pozitivitást mutatnak, viszont az epeúti hámsejtek és az egyéb nem májsejt eredetű komponensek Hep Par 1 negatívak. A nodularis májsejt hyperplasiákban, májadenomákban szintén egyértelmű Hep Par 1 pozitivitást és az epeúti benignus proliferációkban Hep Par 1 negativitást észleltek. A primer májrák minták 92,5 %-a adott Hep Par 1 pozitív reakciót és az epeúti rákok negatívak voltak (Ramos-Vara et al., 2001).

Lódi és mtsai (2006) human cholangiocellularis carcinoma (hCCC) és a human hepatocellularis carcinoma (hHCC) differenciáldiagnosztikai markereként az anti-claudin-4 antitestet használták, amely intenzív membránpozitivitást adott a hCCC-ban, viszont a hHCC claudin-4 negatívnak bizonyult. A vizsgálataik szerint az intact biliaris epithelsejtek gyenge claudin-4 membránpozitivitást, míg a normál májsejtek claudin-4 negativitást mutattak (Lódi et al., 2006). A kutyák intact májszövetében végzett claudin-4 expressziós vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a májsejtek, az epeúthámsejtek, a májszövet portalis és sinusoidalis endothelsejtjei, továbbá a fibroblast sejtek, a Kupffer-sejtek, a portalis arteriolák simaizomsejtjei claudin-4 negativitást mutattak (Jakab et al., 2010h).

Egy másik, human tanulmányban, Németh és mtsai (2009) claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, és -10 protein expressziós vizsgálatokat végeztek human intact epeutakban és epeúti

carcinomákban. A claudin-7 expressziós tapasztalataikat, összehasonlítva eredményeinkkel, táblázatba foglaltuk össze (**Táblázat 21.**).

	<i>Claudin-7 intenzitás</i>	<i>Claudin-7 pozitív sejtek aránya</i>
1.a. Human intact cholangiocyták	gyenge	50-74%
1.b. <i>Kutya intact cholangiocyta</i>	erős	100%
2.a. Human cholangiocarcinoma	gyenge	0-24%
2.b. <i>Kutya cholangiocarcinoma</i>	erős	75-100%
3.a. Human extrahepaticus epeút	gyenge	25-49%
3.b. <i>Kutya extrahepaticus epeút</i>	erős	100%
4.a. Human epehólyag	gyenge	50-74%
4.b. <i>Kutya epehólyag</i>	erős	100%

Táblázat 21. A human és a kutya epeúti hámsejtekben és carcinomákban tapasztalható claudin-7 expressziós mintázat összehasonlítása (Németh et al., 2009; Jakab et al., 2010c).

Az eredményeik alapján kijelenthetjük, hogy a claudin-7 expresszió fokozottabban, intenzívebben érzékelhető a kutyák intact epeút hámsejtjeiben, valamint azok benignus és malignus tumoraiban, szemben a human biliaris epithelsejtekkel és azok neoplasticus elváltozásaival. Ugyanez mondható el az extrahepaticus utak hámrétegéről is (Németh et al., 2009; Jakab et al., 2010c).

Eredményeik alapján kijelenthetjük, hogy az anti-Hep Par 1 és az általunk kutyáknál elsőként használt cholangiocellularis differenciációs, új epeúti marker, az anti-claudin-7 együttesen, immunhisztokémiai panelba építve, kiválóan alkalmas a kutyák intact hepatocytáinak és biliaris epithelsejtjeinek, azok tumorszerű burjánzásaiaknak (HNH, CCH), a benignus (HAD, CAD) és malignus daganatos primer elváltozásainak (a hepatocellularis és a cholangiocellularis ráknak) az elkülönítésére (Jakab et al., 2010c).

7.1.3. Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák fusocellularis daganataiban

Kutyák perifériás ideghüvely daganatai (canine peripheral nerve sheath tumor, cPNST) leggyakrabban az agyidegekből, a gerincvelői idegekből, illetve a plexus brachialisból indulnak ki (Chijiwa et al., 2004). Ezek a daganatok az orsósejtes tumorok egyik csoportját képviselik. A fusocellularis daganatok szintén komoly diagnosztikai kihívást jelentenek mind az állatorvos mind a human patológus számára, különösen a kisméretű biopsziás minták esetében. A cPNST-nak, egyéb szöveti-, valamint sejteredetű fusocellularis daganatoktól való elkülönítését számos, megbízható neuralis antitest (marker) segíti (Chijiwa et al., 2004; Sawamoto et al., 1999).

Jelen munkánkban humanizált anti-claudin-1 antitesttel végeztünk IH-i vizsgálatokat kutyák orsósejtes daganataiban, vizsgálva, vajon alkalmas-e az ellenanyag a cPNST, egyéb sejteredetű, fusocellularis tumortól való elkülönítésre. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy kutyák intact perifériás idegeiben a perineurium alkotásában résztvevő orsó alakú, perineurialis epitheloid sejtek intenzív claudin-1 pozitivitást, S-100 protein negativitást adnak, szemben az S-100 protein pozitív Schwann sejtekkel, illetve az S-100 protein negatív perineurialis fibroblastokkal (Jakab et al., 2011e). Folpe és mtsai (2002) írták le először hasonló tapasztalataikat human perifériás idegeket vizsgálva. Munkájuk során megvizsgált perineuriomák, az esetek 92 %-ában, szintén claudin-1 pozitivitást adtak (Folpe et al., 2002).

A BPNST-ok három alcsoportra oszthatók: (1) a *schwannomákat* a daganatosan burjánzó Schwann sejtek, a (2) *neurofibromákat* a neoplasticus Schwann sejtek, perineurialis fibroblastok és perineurialis epitheloid sejtek, (3) míg a *perineuriomákat* a tumorosan proliferáló perineurialis epitheloid sejtek alkotják (Lazarus and Trombetta, 1978). Ezidáig az állatorvosi szakirodalomban Cornelis és mtsai (2009) írtak le egy 4 éves Leonbergi szuka kutyában claudin-1 pozitív perineuriomát (Cornelis et al., 2009). Jelen vizsgálatunkban, 213 kutyából származó mintát vizsgáltunk meg, amelyek 10 intact perifériás ideget és 203 biopsiás és necropsiás vizsgálati anyagot tartalmaztak. A **schwannomák** claudin-1 negativitást, S-100 protein diffúz, intenzív (+++ - +++) pozitivitást, a **neurofibromák** nem diffúz, intenzív (+ - +++) claudin-1 és S-100 protein nem diffúz, intenzív (++) - (+++) pozitivitást, valamint a **perineuriomák** diffúz, intenzív (++++) claudin-1 pozitivitást és S-100 protein negativitást mutattak. Eredményeikre alapozva megállapíthatjuk, hogy az anti-claudin-1 és anti-S-100 protein ellenanyagok kombinált alkalmazása lehetővé teszi a kutyákban előforduló BPNST alcsoportok egymástól történő elkülönítését. A human tumorpatológia három szövettani típusát különíti el a perineuriomáknak: a reticularist, a sclerotisálót és a plexiformot (Piña-Oviedo és Ortiz-Hidalgo, 2008). Munkánk során a kutyából származó, valamennyi perineurioma, a human histotípusokkal összehasonlítva, plexiformnak bizonyult. További morfológiai vizsgálatok szükségesek a kutyák egyéb szövettani típusú perineuriomái, claudin-1 expressziós mintázatának feltérképezéséhez.

A munkánk során analizált, valamennyi **cMPNST** minta intenzív (++) - (+++) claudin-1 és intenzív (+ - +++) S-100 protein pozitivitást mutatott. A kutyák perifériás ideghüvely daganatait differenciál diagnosztizálni kell az egyéb eredetű, fénymikroszkóposan orsósejtes megjelenésű daganatoktól: a perivascularis érfal eredetű daganatoktól (a haemangiopericytomától, a myopericytomától, az angioleiomyomától, az angioleiomyosarcomától, az angiofibromától), a nem érfali eredetű fibromától, leiomyomától, leiomyofibromától, a myxomától, az orsósejtes haemangiomától, az orsósejtes lipomától, a fibrosarcomától, a nem érfali eredetű leiomyosarcomától, a myxosarcomától, a solid haemangiosarcomától, az anaplasticus sarcomától, az orsósejtes amelanoticus melanomától, a histiocytás sarcomától, az orsósejtes laphámráktól, a myoepitheliomától, a

complex emlőmirigy carcinomától, a meningeomától, a cardialis rhabdomyosarcomától, a synovialis sarcomától, az osteosarcomától és a chondrosarcomától. Alapvető kérdésként merülhet fel, hogy ha a claudin TJ molekulákat az epithelialis, illetve az endothelialis nem daganatos és daganatos sejtek expresszálják, akkor miért van szükséges mesenchymalis eredetű, kutyákból származó fusocellularis daganatokban claudin-1 expressziós vizsgálatok végezésére? A kérdésre a választ az utóbbi évtized újabb human kutatásai adják meg. Győrffy (2009) human leiomyomában tapasztalt claudin-2 pozitivitást, claudin-1 negativitást, leiomyosarcomában claudin-1 pozitivitást, továbbá leiomyosarcomában és gastrointestinalis stroma tumorban claudin-2, -3, -4, -5 és -7 pozitivitást (Győrffy, 2009). Jelen vizsgálatunk során a kutyákból származó leiomyomák, leiomyosarcomák claudin-1 negatívnak bizonyultak. Smith és mtsai (2005), vizsgálataik során, human epitheloid sarcomában tapasztaltak claudin-1 expressziót (Smith et al., 2005). Thway és mtsai (2009) human perineuriomaszerű low-grade fibromyxoid sarcomában találtak claudin-1 pozitivitást (Thway et al., 2009). Vizsgálataink során a kutyákból származó fibrosarcomák, myxosarcomák, anaplasticus sarcomák claudin-1 negatívnak bizonyultak. Thway és mtsai, (2010) nem differenciált liposarcoma mintákban (4/5; 80%) írtak le focalis claudin-1 expressziót (Thway et al., 2011). A munkánk során megvizsgált, kutyákból származó differenciált liposarcomák, claudin-1 negatívnak bizonyultak. További vizsgálatok szükségesek a kutyákból származó differenciálatlan liposarcomák claudin-1 expressziójának feltárására.

Az anti-claudin-1 ellenanyaggal végzett morfológiai analízisünk során a kutyákból származó neurofibroma, perineurioma és cMPNST mellett, a **haemangiopericytoma (cHP)**, a **myopericytoma (cMPC)**, az **orsósejtes laphámrák (cSCC)** és a **complex emlőmirigy carcinomában** tapasztaltunk claudin-1 pozitivitást.

Az orsósejtes perivascularis eredetű daganatok (PWT) patológiai kórisméje további komoly kihívást jelent mind a human, mind az állatorvosi diagnosztikai munkában. A PWT számos alcsoportot tartalmaz: az AGF-át, az ALM-át, az ALMS-át, a HP-át, a MPC-át, az angiomyofibroblastomás és a glomus tumort. Avallone és mtsai (2007) kutyák perivascularis érfal eredetű orsósejtes daganatait (cPWT) a kórszövettani megjelenésre és az anti-smoothelin, anti-myosin, anti-desmin, anti-pan-actin, anti- α -SMA, anti-heavy caldesmon, anti-calponin, anti-laminin és anti-CMG-3G5 ellenanyagokkal végzett IH vizsgálatokra alapozva hat nagyobb csoportba (cHP, cMPC, cALM, cALMS, angiofibroma cAGF, adventitialis tumor) sorolták (Avallone et al., 2007). A vizsgálatunk során 31 cPWT: 10 cHP, 8 cMPC, 6 cALM, 4 cALMS, és 3 cAGF mintát elemeztünk. Ezek közül a **cHP** (10/10; 100%) diffúz, intenzív (+++ - ++++), illetve a **cMPC** (8/8; 100%) gyenge, elszórt (+) claudin-1 pozitivitást mutatott. A többi cPWT claudin-1 negatívnak bizonyult. Rajaram és mtsai (2004) 15 megvizsgált human meningealis HP közül kettőben (13%) észleltek focalis claudin-1 pozitivitást (Rajaram et al., 2004). Eredményeink alapján az anti-claudin-1-re alapozott IH vizsgálattal a cHP és a cMPC jól elkülöníthető egymástól, illetve az egyéb cPWT-től, viszont önmagában a marker nem

alkalmas a cPNST-tól való elkülönítésre. Ehhez legalább három antitestet tartalmazó immunhisztokémiai panelre van szükség. A javasolt markerek: az *anti-claudin-1*, az *anti- α -SMA* és az *anti-S-100 protein*. A ***claudin-1 pozitív cPNST [neurofibroma (cBPNST), perineurioma (cBPNST), cMPNST]*** közül a neurofibroma claudin-1 és S-100 protein pozitív, illetve α -SMA negatív; a perineurioma claudin-1 pozitív és S-100 protein, illetve α -SMA negatív; a ***schwannoma*** S-100 protein pozitív, illetve claudin-1 és α -SMA negatív. Ezekkel szemben ***cHP*** claudin-1 és α -SMA pozitív és S-100 protein negatív. A hasonló immunreaktivitású ***cMPC***, a cHP-vel szemben, gyenge, elszórt (+) claudin-1 pozitivitású (Táblázat 22.).

<i>Tumor / Antitest</i>	<i>Claudin-1</i>	<i>α-SMA</i>	<i>S-100 protein</i>
Schwannoma	Negatív	Negatív	Pozitív (+++ - +++)
Neurofibroma	Pozitív (+ - +++)	Negatív	Pozitív (++ - +++)
Perineurioma	Pozitív (++++)	Negatív	Negatív
cMPNST	Pozitív (++ - +++)	Negatív	Pozitív (+ - +++)
cHP	Pozitív (intenzív, +++ - +++)	Pozitív (+++ - +++)	Negatív
cMPC	Pozitív (gyenge, +)	Pozitív (+++ - +++)	Negatív

Táblázat 22. IH panel a cPWT (cHP, cMPC) és a cPNST (schwannoma, neurofibroma, perineurioma, cMPNST) differenciál diagnosztikájához.

Az SCC ritka előfordulású laphámrák típus (Martin és Stewart, 1935). Vizsgálataink során a ***cSCC*** diffúz, linearis, intenzív (++++) claudin-1 pozitivitást mutatott. A cPNST és a cSCC elkülönítésére négytagú IH panelt javasolunk: *anti-claudin-1*, *anti-pancytokeratin*, *anti-S-100 protein* és *anti-vimentin* markerekkel. A ***claudin-1 pozitív cPNST (neurofibroma, cMPNST)*** pancytokeratin negatív, S-100 protein, illetve vimentin pozitív; ***claudin-1 pozitív perineurioma*** pancytokeratin és S-100 protein negatív, valamint vimentin pozitív; a claudin-1 pozitív ***cSCC*** pancytokeratin pozitív, S-100 protein és vimentin negatív (Táblázat 23.).

<i>Tumor / Antitest</i>	<i>Claudin-1</i>	<i>α-SMA</i>	<i>S-100 protein</i>	<i>Pancytokeratin</i>
Schwannoma	Negatív	Negatív	Pozitív (+++ - +++)	Negatív
Neurofibroma	Pozitív (+ - +++)	Negatív	Pozitív (++ - +++)	Negatív
Perineurioma	Pozitív (++++)	Negatív	Negatív	Negatív
cMPNST	Pozitív (++ - +++)	Negatív	Pozitív (+ - +++)	Negatív
cSCC	Pozitív (++++)	Negatív	Negatív	Pozitív

Táblázat 23. IH panel a cSCC és a cPNST (schwannoma, neurofibroma, perineurioma, cMPNST) differenciál diagnosztikájához.

A kutyák **complex emlőmirigy carcinómája** olyan bifázisos tumor, amelyben a luminalis (simplex) hámsejtek és a kosársejtek (myoepitheliocyták) daganatos, kevert burjánzása figyelhető meg (Hahn et al., 1992). Vizsgálataink során a complex carcinómák nem diffúz, linearis, intenzív (+ - ++) claudin-1 pozitivitást mutattak. A daganatban a neoplasticus, luminalis hámsejtek mutattak claudin-1 immunreaktivitást. A tumorosan burjánzó myoepitheliocyták claudin-1 negatívnak bizonyultak. A cPNST és a complex carcinoma differenciál diagnosztikájához javasolt IH panel négy antitestet tartalmaz: *anti-claudin-1*, *anti-S-100 protein*, *anti- α -SMA* és *anti-pancytokeratin*. A complex emlőmirigy carcinoma (+ - ++) claudin-1, (++) - (+++) α -SMA, (++) - (+++) S-100 protein és (++) - (+++) pancytokeratin pozitivitást mutatott (**Táblázat 24.**).

Tumor / Antitest	Claudin-1	α-SMA	S-100 protein	Pancytokeratin
Schwannoma	Negatív	Negatív	Pozitív (+++ - ++++)	Negatív
Neurofibroma	Pozitív (+ - +++)	Negatív	Pozitív (++ - +++)	Negatív
Perineurioma	Pozitív (++++)	Negatív	Negatív	Negatív
cMPNST	Pozitív (++ - +++)	Negatív	Pozitív (+ - +++)	Negatív
Complex cc	Pozitív (+ - ++)	Pozitív (++ - +++)	Pozitív (++ - +++)	Pozitív (++ - +++)

Táblázat 24. IH panel a complex emlőmirigy carcinoma (complex cc) és a cPNST (schwannoma, neurofibroma, perineuroma, cMPNST) differenciál diagnosztikájához.

Ramos-Vara és mtsai (2010) vizsgálataik során cytoplasmaticus, illetve cytoplasmaticus-membrán claudin-1 pozitivitást észleltek a kutyák meningeomáiban (21/36; 58,3%). A vizsgálataikba bevont, különböző szövettani típusú meningeomák közül 4 psammomatosus jellegű volt. Ezek macskákból származó minták voltak, amelyek közül kettő claudin-1 negatívnak, kettő pedig claudin-1 pozitívnak bizonyult (Ramos-Vara et al., 2010). A vizsgálataink során a kutyák elváltozásmentes leptomeningocytáiban és a psammomatosus meningeomákban, egyértelmű, claudin-1 negativitást tapasztaltunk. Ezzel szemben Ramos-Vara és mtsai (2010) kutyákból származó, 13 transitionalis meningeomából 8-ban (61,5%), 4 fibroblastos meningeomából 2-ben (50%) és valamennyi anaplasticus meningeomában (5) claudin-1 pozitivitást észleltek. A microcystás és a myxoid meningeomák claudin-1 negatívnak bizonyultak. Munkájuk során kutyákból származó psammomatosus meningeomát nem vizsgáltak (Ramos-Vara et al., 2010). Hahn és mtsai (2006) 10 human anaplasticus meningeomából 6-ban (60%), 20 human fibrosus meningeomából 8-ban (40%) és 10 human meningothelialis meningeomából 7-ben (70%) tapasztaltak claudin-1 immunreaktivitást (Hahn et al., 2006). A korábbi vizsgálati eredmények (Ramos-Vara et al., 2010) és saját megfigyeléseink alapján megállapíthatjuk, hogy a kutyák claudin-1 pozitív transitionalis,

fibroblasztos, anaplasticus meningeomáinak a cPNST-től való differenciálásához egyéb markerek bevonására van szükség.

Szemben a human daganatpatológiai tapasztalattal, amely szerint a claudin-1 molekula melanocytákban, valamint a melanocytás elváltozásokban (melanocyt hyperplasia, malignus melanoma) jól érzékelhetően expresszálódik (Leotlela et al., 2007), kutyák amelanoticus melanomáiban, továbbá az intact melanocytákban nem tapasztaltunk claudin-1 pozitivitást.

Billings és mtsai (2004) human monofázisos synovialis sarcomák 28,5%-ában (4/14) tapasztaltak claudin-1 pozitivitást. A human bifázisos synovialis sarcomákban a mirigyhám komponensek 92,3%-ban (12/13), míg az orsósejtes komponensek 46,15% (6/13) mutattak claudin-1 expressziót (Billings et al., 2004). A vizsgálatainkba bevont, kutyákból származó, kisszámú (4) monofázisos synovialis sarcoma claudin-1 negatívnak bizonyult. Az ízületi belhártya daganatok közül nem vizsgáltunk kutyából származó bifázisos és anaplasticus synovialis sarcomát, amelyek mirigyhám komponensei, hasonlóan a human tumorokhoz, expresszálhatják a claudin-1 molekulát.

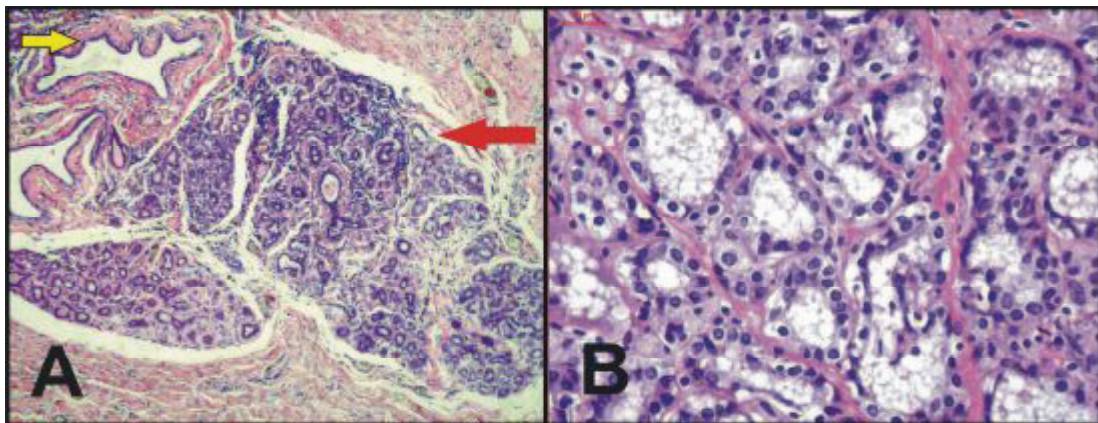
Schuetz és mtsai (2005) human Ewing sarcomában tapasztaltak (19/30; 63%) claudin-1 expressziót (Schuetz et al., 2005). Munkánk során a kutyákból származó osteosarcomák claudin-1 negatívnak bizonyultak.

7.2. Tumorprogressio

A daganatok malignus potenciáljának (invasivitas, metastasisképzés) növekedését tumorprogressiónak nevezzük. A tumorprogressio folyamata magába foglalja egy sejt daganatos átalakulását, annak clonalis proliferációját, az így kialakult tumorszövet helyi invasivitasát és végül a malignitás alapvető kritériumát az áttétképzést. A daganatprogressió folyamat során szelektálódnak azok a tumorsejt-szubpopulációk, amelyek kevésbé antigenicusak, citostaticumokkal szemben ellenállóbbak, gyors növekedésre, metastasisra hajlamosak és kis növekedési faktor-igénnyel jellemezhetők. Így olyan subclonok válnak dominánssá, amelyek a szervezet szelekciós tényezőivel szemben rezisztensebbnek bizonyultak. A humán tumorprogressió kutatások célul tűzték ki a daganatsejtek közötti jelátviteli folyamatok, daganatos progressióban kifejtett szerepének elmélyült tanulmányozását és az ennek megfelelő ún. jelátviteli terápiás megoldások bevezetését. Számos kedvező human eredmény született ezzel kapcsolatosan: Herceptin-human emlőrák terápia, Glivec-gastrointestinalis stromalis tumor (GIST) terápia, Iressa-tüdőrák gyógykezelés (Kopper és Tímár, 2007).

7.2.1. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák emlődaganataiban

A kutyák testének ventralis falán, a bőr alatti kötőszövetben az anatómiai középsík két oldalán paramedian, a mellkastól a lágyéktájáig terjedően találunk tejmirigyeket (ún. tejléceket). Az emlőbimbók, illetve az emlőmirigy complexumok száma egy-egy oldalon 5, amelyek közül kettő mellkasi, kettő hasi, egy pedig lágyéki. Az emlőmirigy fejlődését tekintve módosult verejtékmirigy, melynek terméke a tej (Fehér, 1980; Guzsal, 1981). A mirigyállomány egymással anasztomizáló, faágszerűen elágazódó rendszer, melynek legtávolabbi és legkisebb egysége az ún. terminalis ductalis lobularis egység (angol neve /terminal ductal lobular unit/ után TDLU). A TDLU-t az alveolaris mirigyvégkamrából felépülő mirigylebenyke (lobulus), az intralobularis és extralobularis szakasszal rendelkező terminalis ductulus (tejelvezető csatorna) és az acinusok (alveolusok) körüli, laza, glikozaminoglikánokban gazdag ún. intralobularis kötőszövet alkotja. A kb. 0,1-0,25 mm átmérőjű alveolusok egyrétegű mirigyhámból, myoepithelből és alaphártyából épülnek fel, melyet a perialveolaris kötőszövet egészít ki. A tej szekrécióját végző mirigyhámsejtek mind morfológiai, mind funkcionális szempontból azonos típusúak és értékűek. A legkisebb vezetékek, a terminalis vezetékek falát szekréciós típusú hámsejtek, myoepithel és alaphártya képezi. Az interlobularis vezetékek az intralobularisoknál tágabbak, gyakoriak rajtuk a befűződéses, ami miatt öbölszerű tágulatok alakulnak ki, illetve a hámbélésük kétrétegűvé válik és a myoepithel sejtek elmaradnak (**50. ábra**) (Kopper és Schaff, 2006).



50. A. ábra. Kutyából származó normális emlőmirigy ún. terminalis ductalis lobularis egysége (piros nyíl) környezetében két interlobularis ductulus (sárga nyíl) (HE, 40x). **B.** Egyrétegű mirigyhámmal bélelt alveolusok, kutya intact emlőmirigyében (HE, 200x).

A kutyák intact emlőmirigyében végzett vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a claudin-1, -3, -4, -5 és -7 molekulák az alveolaris luminalis mirigyhámsejtek és a tejelvezető csatornákat bélelő hámsejtek tight junction struktúráiban expresszálódnak, integráns membránfehérjék. Az emlőmirigyek kötőszöveti vázában lévő vér- és nyirokerek endothelsejtjeiben intenzív claudin-5 pozitívást tapasztaltunk (Jakab et al., 2008b). Vizsgálataink során szöveti multiblokk (TMA) technikát alkalmaztunk (Jakab et al., 2007). A TMA technikát eredetileg Wan, Fortuna és Furmanski írta le (Wan et al., 1987) és a

patológiai laborokban történő alkalmazása, populárisá tette Juha Kononen és mtsai nevéhez fűződik. Megállapításaik szerint az elfogadható maximális, paraffinba ágyazott szövethenger, illetve a belőlük készített szöveti array minták száma egy tárgylemezen 600 darab. Ennek megfelelően a mintakorongok átmérője 0,6 mm, amelyek egymástól 0,7-0,8 mm távolságra vannak, valamint a minták területe kb. 2-3 nagy nagyítású mikroszkópos mezőnek megfelelő. Az újabb array technikák lehetővé teszik, hogy akár 2000, vagy annál több minta kerülhessen egyetlen tárgylemezre. Ahogyan a molekuláris biológiában a DNS-chip technológia a különböző gének komplex vizsgálatát teszi lehetővé, úgy a szöveti antigének immunmorfológiai kimutatása a szöveti mikrosorozatok bevezetésével kapott új lendületet (Kononen et al., 1998). A TMA blokkokból készített szöveti mikrosorozatok validálása, minőségi ellenőrzése alapvető, a diagnosztikai gyakorlatba való alkalmazást megelőző kritérium. Ez nem könnyű feladat, hiszen számos nehézséggel kell számolni, pl. daganatok esetében gyakorta tapasztalható intratumoralis (egy daganaton belüli), illetve intertumoralis (daganat és áttétei közötti) fenó- és genotípusos heterogenitás (morfológiai és genetikai különbözőség). Ez azt jelenti, hogy a hagyományos paraffinos blokkokból készített metszeten lévő egyetlen tumormintán belüli daganatsejtek egymástól eltérő mértékű biomarker-expressziót (pl. az immunhisztokémiával detektálható antigént) mutathatnak. Ilyen esetekben felmerül a kérdés, hogy az adott daganatból készített hagyományos metszetek tanulmányozása során, milyen mennyiségű és minőségű területeket kell kijelölni a TMA blokkok készítéséhez úgy, hogy az így készült szöveti mikrosorozatok reprezentatívak, diagnosztikailag elfogadható minőségűek legyenek. A TMA érzékenysége, minősége a szöveti mikrosorozatok számának növelésével fokozható (Matthev, 2004). Kutyák emlőmirigyekben végzett claudinexpressziós vizsgálatainkat a konfokális mikroszkópos módszer is megerősítette, alátámasztotta (Jakab et al., 2009h).

A claudin fehérjéknek a sejtpolaritás, a paracellularis transzport folyamatok fenntartásában alapvető, mintegy tumorsuppressív szerepük van. A sejtpolaritás elvesztése, a paracellularis transzport folyamatok károsodása, zavara potenciális auto-, illetve paracrin daganatindukáló, carcinogenetikus kóros molekuláris esemény (Mullin, 1997). Ez utóbbi, új, tudományos felismerés, ennek igazolására kutyák emlőmirigy carcinogenesisének (emlődaganat-progressiójának) tanulmányozására az intact emlőmirigyek mellé, lobularis hyperplasiákat, simplex adenomákat, továbbá primer simplex és secunder pulmonalis solid carcinomákat válogattunk be vizsgálatainkba. A benignus proliferatív emlőelváltozások claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós mintázata nem mutatott eltérést az intact mirigyéhez képest. A malignus elsődleges daganatok közül az *in situ* carcinomákban, az intact emlőmirigyekhez, a jóindulatú emlőmirigy proliferatumokhoz képest, jelentős claudin-1 expresszió csökkenést (nem diffúz, multifocalis, intenzív, <25 % tumorsejt pozitivitás), illetve a simplex infiltráló carcinomák valamennyi típusában (Jakab et al., 2008g) és a solid differenciálatlan egyszerű rákok távoli áttéteiben a claudin-1 molekula elvesztését

tapasztaltuk (Jakab et al., 2009c). Tőkés és mtsai, hasonlóan a mi tapasztalatinkhoz, csökkent claudin-1 molekula expressziót figyeltek meg a kutyáéhoz hasonló szövettani típusú, human malignus emlődaganatokban (Tőkés et al., 2004). Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a kutyák simplex emlőmirigy-carcinogenesisében, tumorprogressiójában, a sejtek közötti kapcsolatok fellazulása miatt kialakult sejtpolaritás és paracellularis transzport zavar, disorientatio, sejtleválás és invazivitás fokozódás révén szerepe van a claudin-1 molekula expresszió vesztésének.

Epthelialis-mesenchymalis transitiónak (EMT) nevezzük azt a folyamatot, amelynek során az átalakuló epithelialis sejtek elveszítik az adhesiós tulajdonságaikat, polaritásukat és *de novo* mesenchymalis sejtekre jellemző fehérjéket (pl. vimentin, α -SMA) kezdenek termelni. Az EMT lehet fiziológias (I-es típusú) pl. embryogenesis, organogenesis során és lehet kóros pl. fibrosis, szöveti hegesedés (II-es típusú), illetve carcinogenesis (III-as típusú) esetében (Hay, 1995; Kalluri és Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Molekuláris vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy EMT esetén a sejtek a sejtkapcsoló fehérjék (claudinok, occludin, zonula occludens proteinek és E-cadherin) deletiója miatt elnyúlt orsóalakot vesznek fel, intercellularis kapcsolataik fellazulnak, felszakadoznak és elveszítik adhesiós tulajdonságaikat. A sejtek elveszítik továbbá apicobasalis polaritásukat, sejtvázuk átrendeződik, α -SMA-t termelnek, ami miatt fokozódik migrációs, invasiós készségük. Ezek mellett fokozódik a matrix-metalloproteináz termelésük, így degradálják a velük kapcsolatban lévő alaphártyákat (Thiery és Sleeman, 2006; Kalluri, 2009). Sarrió és mtsai (2008) vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a human emlőcarcinomák közül elsősorban, basalis típusúakban tapasztalható az EMT jelensége, a különböző EMT-markerek (α -SMA, vimentin, N-cadherin, cadherin-11) expressziójának fokozódása az epthelialis markerek (E-cadherin, cytokeratin) redukciója mellett (Sarrió et al., 2008). Prat és mtsai (2010) a human ún. claudin-low emlőcarcinoma altípusban, amely a claudin-3, -4 és -7 molekulákat csökkent mértékben expresszálja, megfigyelték, hogy a mesenchymalis markerek (vimentin) expressziója fokozódott, ami az EMT egyik molekuláris jele (Prat et al., 2010). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a kutyákból származó rosszindulatú elsődleges és másodlagos hám eredetű emlőmirigydaganatokban jelentős csökkent, illetve megszűnt a claudin-1 expresszió (*in situ* carcinoma: < 25 % claudin-1 tumorsejtpozitivitás; infiltráló simplex carcinoma grade I, -II, -III típus és solid carcinoma áttét: claudin-1 negativitás). Továbbá az elsődleges simplex carcinomákban csökkent a claudin-5 expresszió (*in situ* carcinoma és infiltráló simplex carcinoma grade I típus: 25-50 % claudin-5 tumorsejtpozitivitás; infiltráló simplex carcinoma grade II típus: < 25 % claudin-5 tumorsejtpozitivitás; infiltráló simplex carcinoma grade III típus: claudin-5 negativitás) (Jakab et al., 2008g; 2009c). Feltételezhető, hogy a kutyák emlőmirigy-carcinogenesis során észlelhető EMT részletjelensége a claudin-1 molekula elvesztése, ami fokozza a dagagantsejt motilitását, invazivitását, metastasis

hajlamát. További kiegészítő immunhisztokémiai, valamint molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek a feltételezés tisztázása érdekében.

A *Clostridium perfringens* enterotoxinjáról (CPE) már több mint 15 éve ismert, hogy az emlős somaticus sejtekben, rapid, direkt cytolisist képes indukálni (McClane et al., 1988). A közelmúltban vált ismertté, hogy a claudin-3 és -4 molekula a CPE receptora. A CPE protein C-terminálisa kötődik a claudin-3 és -4 molekulákhoz, míg az N-terminálisa pórusokat formál a megtámadott sejt plazmamembránjában, gyors sejt feloldódást okozva (Katahira et al., 1997). Ez a folyamat a toxin terápiás alkalmazhatóságát teszi lehetővé olyan daganatokban, amelyek magas claudin-3 és/vagy claudin-4 expressziót mutatnak. Kominsky és mtsai (2004) vizsgálataik során claudin-3 és -4 fehérjéket overexpresszáló human in vitro emlőráksejtvonalakban indukáltak dózisdependens, rapid cytolysist (tumorslysis) CPE-vel (Kominsky et al., 2004). Saját vizsgálataink során, mind kutyákból származó intact emlőmirigyekben, mind azok benignus elváltozásaiban, valamint primer simplex carcinomáiban és távoli áttéteikben a tumorsejtekben diffúz, intenzív, 50-100 % claudin-3 és -4 pozitivitást tapasztaltunk (Jakab et al., 2009c). Mivel az említett esetekben a claudin-3 és -4 fokozottan expresszálódik, felveti annak lehetőségét, hogy a CPE direkt, cytoliticus hatását tanulmányozzák kutyák primer és secunder emőrákjából izolált daganatsejteken. Kísérleteink szerint carcinomákban a claudin-3 és -4 a claudin-1, -5 és -7 molekulákhoz képest fokozottabban expresszálódott. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az emberrel azonos környezetben élő, így hasonló carcinogen tényezőknek kitett kutyákban indukálódott, a human emlőrákokkal azonos szövettani megjelenésű, claudin-3 és/vagy -4 molekulát fokozottan expresszáló simplex kutya emlőrákot, human modellként használjuk fel az onkológiai kutatásokban. Az állatorvosi klinikai gyakorlatban nem a sebészileg viszonylag könnyen kezelhető, kutyákban kialakult elsődleges simplex emlőrákok, hanem azok távoli (pulmonalis) áttéteinek terápiás kezelése, redukciója jelent kihívást. Az esetleges terápiás hatás esetén (a tüdőáttétek kezelése során) alapvető kérdést vet fel a claudin-3 és -4 TJ fehérjéket expresszáló, fiziológias tüdőszöveti sejteknek: alveolaris-, hörgőcske- és hörgő hámszöveteknek a CPE cytoliticus hatásától való védeleme, mentesítése.

A vizsgálataink során tapasztalt claudin-5 expresszió elsősorban az alapszöveti vér- és nyirokereket, illetve a tumor stromájában lévő mikroerek endothel sejtjeiben okozott intenzív immunreaktivitást, szemben a nem daganatos és daganatos epithelialis emlőmirigysejtekkel. A claudin-5 kutyák emlődaganataiban tapasztalt jelentőségéről a neoangiogenesis fejezetben foglalkozunk.

Korábbi onkológiai tanulmányok során azt tapasztalták, hogy a claudin-7 molekula expressziója a human invazív ductalis emlőmirigycarcinomákban csökken a normális emlőmirigyhez viszonyítva és ez a gyengébb claudin-7 expressziós mérték korrelált a szövettani gradus (a malignitás) fokozódásával (Kominsky et al., 2003). Vizsgálataink során a kutyák elsődleges rosszindulatú simplex carcinomáiban az intact emlőmirigyhez és a

benignus proliferatív elváltozásaihoz képest, a claudin-7 molekula csökkent expresszióját figyeltük meg. Az áttéti solid simplex carcinomákban az elsődleges malignus tumorokhoz képest emelkedett claudin-7 expressziót tapasztaltunk (Jakab et al., 2009c).

A kutyák emlőmirigy daganataiban végzett claudin expressziós vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy az emlőmirigy carcinogenesis összetett, bonyolult molekuláris hátterének szerves alkotóeleme a claudin-1, -5 és -7 molekulák tumorprogressio során tapasztalt, redukálódó expressziója a paracellularis transzport folyamatok és a sejtpolaritás zavara, a cellularis dysorientatio, sejtleválás és invazivitas fokozása révén (Jakab et al., 2008g; 2009c).

7.2.2. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák low grade colorectalis adenocarcinomáiban

Külföldi felmérések szerint a kutyák béldaganatainak kb. 60 %-a ered a colorectalis szövetekből (Holt and Lucke, 1985). A colorectalis adenocarcinomák elsősorban idősebb kutyákban, 8-9 éves kor között jelennek meg. A hím állatokban gyakrabban észlelhetők, mint a szukákban (Patnaik et al., 1977; Schaffer és Schieffer, 1968). Kutyákban, az emberhez hasonlóan, megfigyelték a vastagbélrák rákmegelőző állapotait az adenomákat (polypusokat) (Silverberg, 1971). A human megfigyelések szerint a legtöbb vastagbélrák polypus adenomatosusból indul ki. A polypok malignus átalakulásának kockázata a polypok számával, méretével arányosan nő. A colorectalis carcinogenesis több lépcsős folyamat: normál vastagbél → kisméretű polyp → nagyméretű polyp → vastagbélrák. A folyamat 10-15 évet vesz igénybe (Jass, 2001). A kutyák vastagbél carcinomája a bélfali, ill. az extraintestinalis nyirokutakon keresztül képezhet locoregionalis áttétet a nyirokcsomókba, terjedhet a subperitonealis szöveti területekbe, és a véráram útján adhat távoli (tüdő, máj, csont, agyvelő) metastasisokat (Brunnert et al., 1993; Stampely et al., 1987). Az állatorvosi daganatpatológiában szövettani típus alapján elkülönítünk a mirigyhámból kiinduló colorectalis adenocarcinomát, mucinosus adenocarcinomát, pecsétgyűrűsejtes carcinomát, scirrosus (fibroplasticus) carcinomát és laphámrákot. A differenciáltság szempontjából a vastagbélráknak két nagy csoportját különítik el: a differenciált, low grade, tubulopapillaris és a differenciálatlan, high grade, solid típust. A makroszkópos kép alapján ulceratív, fungosus, stenotizáló és egyéb típus különböztethető meg (Head et al., 2002).

Dhawan és mtsai (2005) korábbi human tanulmányukban leírták, hogy az emberi intact colorectumban az epithelialis sejtek membránjában a claudin-1 molekula nem expresszálódik (Dhawan et al., 2005). Jelen tanulmányunkban, a kutyák elváltozásmentes colorectalis szövetei, a human megfigyelésekhez hasonlóan, claudin-1 negatívnak bizonyultak (Jakab et al., 2010b). Resnick és mtsai, az emberi colorectalis carcinogenesis

során a claudin-1 molekula fokozott expresszióját figyelheték meg, legkifejezettebben az áttéti carcinomákban. Azóta a claudin-1 molekulát prognosztikai faktorként alkalmazzák a human klinikopatológiában (Resnick et al., 2005). Tanulmányunkban, a claudin-1 molekula nem diffúz (multifocalis) intenzív, linearis, 25-50 % tumorsejtpozitivitású membránreakcióját figyeltük meg a cLGCC minták 45 %-ában (9/20). A minták 55 %-ában (11/20) cytoplasmaticus pozitívítást észleltünk. Eredményeink alapján a kutyák molekuláris colorectalis carcinogenesisében szerepe van a claudin-1 molekula fokozódó expressziójának (Jakab et al., 2010b). Ezen eredményünk ellentétes a korábban a kutyák emlőmirigy carcinogenesisében tapasztaltakkal, ahol a claudin-1 molekula csökkent expressziója, illetve elvesztése volt érzékelhető a malignus simplex carcinomákban a normális emlőmirigyekhez, valamint azok benignus proliferatumaihoz viszonyítva (Jakab et al., 2008g; 2009c).

A cLGCC-ák egy részében (11/20; 55%) non-junctionalis gyenge cytoplasmaticus claudin-1 immunreaktivitást észleltünk. Korábbi human onkológiai tanulmányokban azt tapasztalták, hogy a vastagbélrákokban a claudin-1 nem a membránban, hanem a sejtmagban, illetve a cytoplasmában expresszáldott. Ez a non-junctionalis claudin-1 expresszió fokozottan volt észlelhető a human vastagbélrák áttéteiben (Dhawan et al., 2005).

Vizsgálataink során diffúz, intenzív, junctionalis, pontszerű claudin-3 és -4 pozitív reakciót találtunk a kutyák elváltozásmentes colorectalis hámszöveiteiben, ugyanakkor a cLGCC-ákban a claudin-3 és -4 molekulák fokozott, linearis membránexpressziója volt megfigyelhető (Jakab et al., 2010b). A kutyák simplex emlőrákjaihoz hasonlóan tehát, a cLGCC is, a CPE receptorait, a claudin-3 és-4 molekulákat fokozottan expresszálja, így alkalmassá válhat human terápiás stratégiák tanulmányozására modell állatként.

A megvizsgált kutyákból származó intact colorectalis szövetekben és a cLGCC-ákban az alapszöveti vér- és nyirokereket, illetve a tumor stromájában lévő mikroerek endothel sejtjei muttattak claudin-5 pozitívítást.

A claudin-7 molekula fokozott expresszióját tapasztalták human chromophog veserákban szemben az oncocytomával és az egyéb vesedaganatokkal. Ezek alapján differenciációs markerként hasznosítható a human vesedaganatok patológiai vizsgálataiban (Hornsby et al., 2007). Leírták fokozott expresszióját human gyomordysplasiákban és adenocarcinomákban. Feltételezik, hogy a gyomorcarcinomák tumorprogressiós folyamata során korai molekuláris onkológiai jelenség a fokozott claudin-7 expresszió (Johnson et al., 2005). A kutyák intact colorectalis szöveiteinek hámsejtjeiben diffúz, intenzív claudin-7 membránpozitivitást, továbbá a cLGCC mintákban fokozott claudin-7 expressziót figyeltük meg. Az utóbbi minták 50 %-ában membrán és cytoplasmaticus pozitívítást észleltünk. További molekuláris vizsgálatok szükségesek a nem membrán helyeződésű claudin-7 expresszió, tumorprogressióban, carcinogenesisben betöltött szerepének tisztázásához.

A human colorectalis adenocarcinoma stádiumbeosztására az Astler és Coller által módosított Dukes klasszifikációt javasolják: Stage A = csak a mucosa érintett, Stage B₁ = muscularis propria érintett (a nyirokcsomó negatív), Stage B₂ = muscularis réteg infiltrált, a tumor eléri serosát (a nyirokcsomó negatív), Stage C₁ = a tumor a serosán nem tör át (a nyirokcsomó pozitív), Stage C₂ = a tumor áttöri a serosát (a nyirokcsomó pozitív), Stage D = távoli metastasis (Astler és Coller, 1954). Vizsgálatainkba bevont cLGCC minták e human stádiumbeosztás alapján a Stage A-B₁-ba tartoztak, vagyis a bélfalat mélyebb rétegekbe infiltráló tumort, nyirokcsomó metastasist és távoli áttéteket, továbbá differenciálatlan típusú colorectalis adenocarcinomát nem sikerült claudinexpressziós vizsgálatok alá vetni. Ennek oka a gazdák által idejében felismert tünetek (véres, fájdalmas bélsárürítés) és a korai sebészi beavatkozás miatt, kezdeti stádiumban történő állatorvosi kezelés. A jelen vizsgálataink kiegészítése végett, további claudinexpressziós vizsgálatok szükségesek a bélfalat infiltráló primer és a secunder colorectalis carcinomák esetében.

7.2.3. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hepatoid-sejtes mirigydaganataiban

A perianalis, circumanalis, vagy hepatoid-sejtes mirigyek csak a kutyafélékben kifejlődött nem szekretoros, módosult faggyúmirigyek, amelyek többnyire a perianalis bőrben lokalizálódnak, de megtalálhatók a farok proximalis harmadában, a tasak lateralis területén, a dorsalis ágyéki-keresztcsonti régióban, illetve a hasfal ventralis középsíkjában. A mirigylebenyek differenciált, érett mirigyhámsejtekből és perifériás helyeződésű basalis, pótló sejtekből (össejtekből) épülnek fel. Az érett mirigyhámsejtek fénymikroszkópos cytomorphológiája nagyban emlékeztet az ép májsejtekére. Innen ered a perianalis mirigyek hepatoid-sejtes mirigy elnevezése (Isitior és Weinman, 1979). A jóindulatú proliferatív mirigyelváltozások: a nodularis (göbös) hyperplasia, az adenoma, az epithelioma, a jól differenciált és a rosszul differenciált (differenciálatlan) carcinoma. A hepatoid-sejtes mirigyhyperplasia és az adenoma gyakori, 8-18%-a a kutyákban előforduló a bőrtumoroknak. Az alacsony malignitású hepatoid-sejtes epitheliomák jelentős részben a daganatosan burjánzó basalis sejtekből és kisebb részt daganatos, differenciált hepatoid-sejtekből épülnek fel (Goldschmidt és Hendrick, 2000). A jól differenciált hepatoid-sejtes carcinomák hasonló fénymikroszkópos megjelenésűek, mint a jóindulatú adenomák, de helyi inváziós képességgel rendelkeznek és áttétet is képezhetnek. Az adenomák állományában kialakuló, jól differenciált carcinomás góccok esetén használjuk az *in situ carcinoma* elnevezést (Ihrke et al., 2006).

Jelen immunhisztokémiai tanulmányunk során kutyákból származó, 10 elváltozásmentes és 67 proliferatív, nem daganatos és daganatos hepatoid-sejtes mirigy

elváltozásnak claudinexpressziós mintázatát analizáltuk. Vizsgálataink során a kutyák intact hepatoid-sejtes mirigyeiben diffúz, intenzív (+++++) linearis membrán claudin-1, -3, -4, -5 és -7 coexpressziót tapasztaltunk. Ezek a claudin molekulák tehát mind a differenciált hepatoid-mirigyhámsejteknek, mind pedig a basalis helyeződésű pótlósejteknek constitutív alkotóelemei, integráns membránfehérjéi az intact hepatoid-sejtes mirigyek TJ strukturáinak. Ezzel megegyező claudin-1, -3, -4, -5 és -7 molekula coexpressziót észleltünk a benignus proliferatív elváltozásokban is: a nodularis hyperplasiákban és az adenomákban. Az epitheliomákban gyenge, multifocalis, linearis claudin-1, -3, -4 és -5 membrancoexpressziót figyeltünk meg, illetve claudin-7 negativitást. Ezekben a daganatokban a neoplasticusan burjánzó basalis, pótlósejtek nem expresszálták a claudin-1, -3, -4 és -5 molekulát, viszont a multiplex góccokban felimerhetők, tipikus hepatoid-sejtmorfológiájú (bőséges, eosinophil cytoplasma, nagy vesicularis sejtmag) daganatsejtek, lateralis claudin-1, -3, -4 és -5 membránpozitivitást mutattak. Ezen eredmény alapján feltételezhetjük, hogy a kutyák hepatoid-sejtes epitheliomáinak tumorigenesises folyamatát részben a mirigyek őssejtjeinek, vagy basalis pótlósejtjeinek sejtmagjában lévő claudin-1, -3, -4 és -5 gént érintő különböző DNS-elváltozások is befolyásolhatják (Jakab et al., 2009b; 2010a; 2010d; 2010i). Mindezek mellett, elszórta, néhány perifériás helyeződésű (az invazív front részét képező) epitheliomasejt (kb. 1-5 %-a a tumorsejteknek) finom, vagy durva granularis cytoplasmaticus claudin-1 pozitivitást mutatott. A hepatoid-sejtes epitheliomák központi területein nem tapasztaltunk ún. non-junctionalis claudin-1 expressziót a daganatsejtekben (Jakab et al., 2010i). A nem junctionalis (nem a tight junctionokban való) claudin-1 expresszió jelenségét leírták már patkány mellékherében (Gregory et al., 2001), sertés agyvelő kapillárisainak endothel sejtszélén (Ishizaki et al., 2003) és szelektált MDCK sejtvonalakban (Amasheh et al., 2002). Néhány esetben a nem-junctionalis claudin-1 expressziót összefüggésbe hozták a tumorigenesisel és/vagy a daganatos áttétképződéssel (Miwa et al., 2000). Korábbi human tanulmányban fokozott claudin-1 expressziót tapasztaltak vastagbélrákokban, a sejtmembránból a sejtmagba és a cytoplasmába történő claudin-1 mislocalisatio jeleivel. Az áttéteket képező vastagbélrák sejtek expresszálták legnagyobb mértékben a sejtmagokban és a cytoplasmában a claudin-1 molekulát (Dhawan et al., 2005). Elképzelhető, hogy a kutyák hepatoid-sejtes epitheliomáinak alacsony mértékű és a perifériás területein tapasztalt, a membránból a cytoplasmába mislocalisált (nem a fiziológiai körülményeknek megfelelő helyen a membránban, hanem a cytoplasmában megjelenő) claudin-1 expresszió a morfológiai molekuláris jele az epithelioma tumorsejtek fokozódó, kóros disorientáltágának (a sejtpolaritás elvesztésének), elkülönülő motilitásának és inváziós készségének. További funkcionális vizsgálatokra van szükség ezen histotípusú daganatban észlelt claudin-1 expresszió különböző biológiai szerepének tisztázása érdekében (Jakab et al., 2010i)

A vizsgálataink során intenzív, diffúz linearis membrán claudin-1, -3, -4, -5 és -7 molekula coexpressziót figyeltünk meg a differenciált hepatoid-sejtes carcinomákban. A

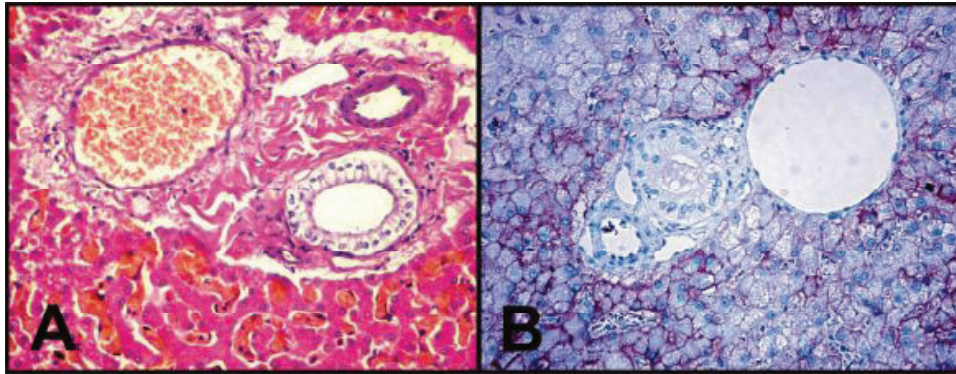
differentiálatlan hepatoid-sejtes carcinomákban a claudin-3, -4, -5 és -7 molekulák cooverexpressziója volt érzékelhető, illetve a claudin-1 molekula elvesztése (Jakab et al., 2009b; 2010a; 2010d; 2010i). A vizsgálati eredményeink alapján feltételezzük, hogy a claudin-1 expresszió elvesztése a sejtpolaritás megszűnéséhez, a sejtek disorientáltságához, elkülönüléséhez és inváziójához vezet a differentiálatlan hepatoid-sejtes carcinomákban. További funkcionális tanulmányokra van szükség a claudin-1 pontos biológiai feladatának tisztázásához a kutyák különböző histotípusú hepatoid-sejtes daganataiban.

Jelen tanulmányunkban kimutattuk, hogy a claudin-1 diffúzan, intenzíven expresszálódott a differenciált hepatoid-sejtes mirigyhámrákokban, nem diffúzan, multifocalisan, gyengébben expresszálódott az epitheliomákban és elveszítette claudin-1 expresszióját a differentiálatlan hepatoid-sejtes mirigyhámrák. Úgy tűnik, hogy a claudin-1 molekula immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása segít a kutyák differentiálatlan hepatoid-sejtes carcinomáit elkülöníteni, a jól differenciált hepatoid-sejtes mirigyhámráktól és a hepatoid-sejtes epitheliomától. Mindezek mellett e marker segít megkülönböztetni a kutyák hepatoid-sejtes epitheliomáját a jól differenciált carcinomától (Jakab et al., 2010i).

7.2.4. Claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatok kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtes exocrin carcinomáiban

A hasnyálmirigy összetett, külső és belső elválasztású, exocrin és endocrin funkciót ellátó szerv. A több mint 20 féle emésztőenzimet termelő exocrin részének alkotásában az acinusokat (alveolusokat) felépítő ún. acinus, vagy acinaris sejtek vesznek részt. Az általuk termelt emésztőnedv, az exocrin rész másik alkotóelemén, az intercalaris-, az intralobularis, az interlobularis ductulusokon, majd a pancreas nagyobb elvezető csatornáin át a duodenumba kerül. A kutyákban a hasnyálmirigy malignus daganatainak a legnagyobb hányadát az exocrin acinaris sejtes, vagy acinus sejtes carcinoma képviseli (Chang et al., 2007). Ezzel szemben emberben a pancreas eredetű carcinomák 90 %-a ductusok epithelialis rétegéből indul ki (Kopper és Schaff, 2006). Gyakorlati tapasztalatok alapján, a kutyákban észlelt exocrin pancreas carcinomák, a klinikai diagnózis felállításakor az esetek túlnyomó többségében már előrehaladott, áttétképző állapotban vannak. Az acinaris sejtes carcinoma metastasiszt képezhet a peritonealis felszínre, a májba, a mesenterialis nyirokcsomókba, a vesékbe, a tüdőbe, az agyvelőbe, a submandibularis, a mediastinalis nyirokcsomókba, a perioesophagealis szöveti területekbe és a tonsillákba. Differentiáltság szempontjából az acinaris sejtes carcinoma két nagyobb csoportba osztható: (1) differenciált és (2) nem differenciált, vagy differentiálatlan típusokba (Head et al., 2002).

Tanulmányunk során claudin-1, -3, -4, -5 és -7 expressziós vizsgálatokat végeztünk kutyák intact hasnyálmirigyében, valamint elsődleges és másodlagos acinaris sejtes exocrin pancreas carcinomáiban (Jakab et al., 2011a; 2011d). Borka és mtsai, korábbi tanulmányukban, human pancreas daganatok claudinexpressziós mintázatait vizsgálták (Borka et al., 2007). Kutyák kóros elváltozásoktól mentes pancreasainak acinaris sejtjeiben intenzív, linearis claudin-1, -3, -4, -5 és -7 coexpressziót tapasztaltunk. Az intact ductalis hámsejtek csak a claudin-7 molekulát expresszálták, illetve claudin-1, -3-, -4 és -5 negativitást mutattak (Jakab et al., 2011a; 2011d). Hasonlóan a kutyák pancreas acinus sejtjeihez a human hasnyálmirigy acinus sejtek is claudin-1, -3, -4 és -7 pozitivitást mutatnak. A human pancreas ductalis hámsejtjei, a kutyák ductalis hámsejtjeivel szemben, amelyek claudin-7 pozitívak, claudin-1, -3, -4 és -5 negatívak, claudin-1, -3-, -4 és -7 coexpressziót mutatnak (Borka et al., 2007). Kutyák elváltozásmentes hasnyálmirigyének endocrin sejtjei valamennyi általunk felhasznált claudin molekulára negativitást mutatnak (Jakab et al., 2011a; 2011d). Ezzel szemben a human pancreas Langerhans szigetének sejtjei claudin-3 és -7 coexpressziót, ill. claudin-1 és -4 negativitást adnak (Borka et al., 2007). Kutyák elsődleges és áttéti differenciált acinaris sejtes exocrin carcinomáiban a neoplasticus acinusokat, a tubulusokat felépítő daganatsejtjeikben nem linearis apicalis, a TJ területére korlátozódó, intenzív claudin-1, -3, -4 coexpressziót, fokozott claudin-7 linearis membránexpressziót (overexpressziót), továbbá claudin-5 negativitást tapasztaltunk (Jakab et al., 2011a; 2011d). Ezzel szemben a human pancreas acinus sejtes carcinomáira claudin-1 pozitívítás, valamint claudin-3, -4 és -7 negativitás a jellemző (Borka et al., 2007). A kutyák primer és a secunder differenciálatlan, solid acinaris sejtes pancreas carcinomákban claudin-1, -3, -4 és -5 negativitást és claudin-7 fokozott expressziót észleltünk (Jakab et al., 2011a; 2011d). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kutyák hasnyálmirigyének acinaris sejtjeiből kiinduló carcinomák kialakulásában és a tumor progressiójában szerepe van a claudin-1, -3, -4 és -5 molekula elvesztésének. További molekuláris vizsgálatok szükségesek a kutyák acinaris sejtes exocrin carcinomáiban tapasztalt fokozott claudin-7 molekula expresszió carcinogenesisben betöltött szerepének tisztázására. Részben a másodlagos intrahepaticus tumorok (Jakab et al., 2011a), részben pedig az intact májminták immunhisztokémiai vizsgálata során a májban multifocalis (nem diffúz), intenzív, claudin-1 membránpozitivitást tapasztaltunk a periportal területen lévő, a határoló lemezt alkotó májsejtjeiben és az azokat körülölelő 5-6 májsejtsorban (**80. ábra**) (Jakab et al., 2010h).



80. ábra. A. Elváltozásmentes portális triád (ductus biliferus, portális venula és hepaticus arteriola) kutyában (HE., 200x). **B.** Claudin-1 pozitív periportális májsejtek kutya egészséges májában (HE., 200x).

Véleményünk szerint a kutyák májában specifikusan a határolólemezzre, illetve a portális területek körüli, egészséges májsejtekre jellemző claudin-1 expresszió immunhisztokémiai kimutatása segítheti a kutyákból származó biopsiás és necropsiás minták pontosabb kiértékelését. Megkönnyíti az állatorvos patológus munkáját, a kutyák interface hepatitisének kiértékelésében azáltal, hogy a periportális májelváltozás, a piecemeal necrosis pontos mennyiségi és minőségi meghatározását teszi lehetővé a claudin-1 expresszió elvesztésének kimutatása alapján. A claudin-1 pozitív, 5-6 májsejtsorra kiterjedő, periportális májsejt elfajulás, necrosis, valamint apoptosis minősítési rendszerét enyhefokú (a határoló lemezt érintő), mérsékelt (a periportális 2-3 májsejtsorra kiterjedő) és súlyosfokú (a periportális 5-6 májsejtsorra kiterjedő) elváltozásra javasoljuk felosztani. Valamennyi esetben a claudin-1 membrán expressziójának periportális elvesztése pontosan meghatározható a humanizált anti-claudin-1 ellenanyagra alapozott kiegészítő immunhisztokémiai módszerrel.

7.3. Angiogenesis vizsgálatok

A többsejtű szervezetek sejtjeinek növekedéséhez, osztódásához, differenciálódásához, a szöveti homeostasis biztosításához nélkülözhetetlen a gázcsere, az oxigén felvétele és a szén-dioxid leadása, mivel a sejtek központi energiatároló, makroerg anyaga, az adenzin-trifoszfát termelődése a sejtlegzésen alapszik. A szervezet szöveteiben az optimális oxigénkoncentrációt, a szövetekkel összhangban növekvő, differenciálódó és azokat kellő sűrűséggel behálózó hajszálérrendszer biztosítja (Carneilet, 2005; Folkman et al., 1967; Folkman, 1971; 1996). Új vérerek képződése a szervezetben kétféle mechanizmus, a *vasculogenesis* és az *angiogenesis* révén lehetséges. A *vasculogenesis* során, az embrionális fejlődés korai szakaszában, a szikhólyag falát borító visceralis mesodermasejtek egyes populációi vérsejteké és vérerekké differenciálódnak. Ezek a

sejtek ún. vérszigeteket (*insulae sanguineae*) alkotnak. A vérszigetek központi helyeződésű sejtjeiből fejlődnek a *haemopoeticus* őssejtek, illetve a perifériás helyeződésűekből az *angioblastok* (endothelialis őssejtek) (Kopper és Tímár, 2007). Az angiogenesis során a szervezetben, a korábban a vasculogenesis révén már kialakult, meglévő (egzisztáló) véredényekből indul ki az érképződés folyamata. Az érújdonképződés (*angiogenesis*, görög: *angeion*=ér, *vérér*) során komplex érstruktúrák képződnek nyugvó endotheliocyttákból több szinten szabályozott élettani mechanizmusok révén. A *postnatalis* életben lezajló *angiogenesis* lehet *fiziológiás* pl.: a sebesülések utáni regenerációs folyamatokban, a tengerszint feletti nagy magasságokban (alacsony oxigénkoncentráción) élő szervezetekben, a nőkben a nemi ciklus során a menstruatio után újraalakuló endometriumban, a placentában, az ovuláció után átalakuló tüszőben, és lehet *patológiás* pl.: az idült gyulladások, a tumor-indukált angiogenesis és a perfúziós zavarokhoz csatlakozó kóros érburjánzások (pl. portalis arteriolaris hyperplasia a májban) során (Carmeilet, 2005; Kopper és Tímár, 2007).

Új hajszálerek azokból a legkisebb átmérőjű erekből fejlődnek (többnyire a venulákból), amelyeknek falát csupán endothelsejtek és az alaphártya alkotja. Az angiogenesis (*neovascularisatio*) során a kapillárisokat követő venulák (szülői erek) aktivált endothelsejtjei által termelt fehérjebontó enzimek elbontják az ér basalis membránját. Az alaphártya proteolitikus lebontása után az aktivált angiogen fenotípusú endothelsejtek, az angiogen hatás irányába vándorolnak, burjánzanak (új sejtadhéziós fehérjéket expresszálva) miközben az extracellularis mátrixot is degradálják, helyet teremtve az endothelsejt vándorlásnak és az ezzel párhuzamosan zajló osztódásnak. Az endothelsejtek ezek után linearisan csatlakoznak egymáshoz és csővé záródva kialakítják az ér üregét. Egy-egy ilyen növekmény (sarj, hajtás) vége összetapad az eredeti érrel, kapillárisurkot képezve. Minden hurokból új hajtások és új kapillárisálózat jöhet létre. A folyamat teljessé az egyéb muralis sejtek: a pericyták megjelenésével és az új érhálózat stabilizálódásával válik (Jakab et al., 2009d; 2009f; Kopper és Tímár, 2007; Paku és Döme, 2006).

Az angiogenesiset befolyásoló molekuláris tényezők: a (*pro*)*angiogen*- (angiogenesiset serkentő) és az *antiangiogen faktorok*, illetve az endothelsejteken található *receptoraik* közötti egyensúlyeltolódás/interakció határozza meg, hogy új vérerek képződnek vagy vérér regresszió következik be. Az angiogenesiset serkentő faktorok az endothelsejteket osztódásra, vándorlásra készítetik, míg az angiogenesiset gátló citokinek (pl.: angiostatin, endostatin, vasostatin) az előbbiekkal ellentétes hatásúak. Jelenleg több mint 200 angiogen faktort ismerünk. Ezen tényezők aktuális aránya határozza meg az adott fiziológiás vagy patológiás folyamatban az angiogenesis folyamatát, amelynek aktiváló, valamint inaktíváló citokinjeit a szervezet normális sejtjei pl.: az endothelsejtek, immunsejtek, macrophagok és egyes tumorsejtek termelik. A sejt-sejt közötti molekuláris kommunikáció közege az extracellularis matrix, amely közvetítő funkcióján kívül az érújdonképződés szempontjából

egyéb feladatokat is ellát, pl.: angiogenicus növekedési faktorokat raktároz, amelyeket a normális sejtekből vagy a daganatsejtekből felszabaduló fehérjebontó enzimek szabadítanak fel. A proteázok az extracellularis matrix fehérjéinek lebontásával emellett szabad mikroteret biztosítanak az endothelsejtek vándorlásának, burjánzásának, valamint az új kapilláris hálózat kialakulásának (Kopper és Tímár, 2007; Paku és Döme, 2006).

7.3.1. Claudin-5 alapú, tumor-indukált neoangiogenesis vizsgálatok kutyák emlőtumoraiban

Judah Folkman (1971) ismerte fel, hogy a legtöbb solid tumor esetén a daganatsejtek, bizonyos tumorátmérő, illetve méret (1-2 mm³, tūhegynyi nagyság) elérése után, pusztán a diffúzió által nem képesek oxigén és tápanyagigényeiket kielégíteni, ezért a további növekedéséhez a daganat saját ér hálózatot alakít ki. Az ér hálózat a növekvő daganatszövetben kialakuló hypoxia hatására felszabaduló angiogen faktorok, valamint a daganatstroma sejtjei által termelt különféle citokinek révén indukálódik. (Folkman, 1971). A daganatnak a növekedési tendenciához alkalmazkodó, állandóan megújuló, a tumorsejtekkel kommunikáló ér hálózatot kell fenntartania. A daganatok gyors növekedése 1-2 mm³ nagyság felett az újonképzett erek nélkül megáll, mivel az oxigén diffúziós kapacitása elégtelen. Mind fiziológias, mind patológias körülmények között a különböző sejteknek, hogy a megfelelő oxigén mennyiséghez diffúzió útján hozzájussanak kb. 200-250 µm távolságban (diffúziós távolság) kell lenniük a szomszédos kapilláristól. Megfigyelték, hogy a legközelebbi kapilláristól mért távolság függvényében meredeken csökken a daganatsejtek proliferációs indexe (Folkman, 1971; 1996; Tímár et al., 2001).

A tumor-indukált angiogenesis (TIA) mechanizmusai egymás jelenlétét nem kizáró, párhuzamosan is megjelenő, helyenként egymásra épülő, heterogen folyamatok (**Táblázat 27.**).

1. Endothelbimbózás	4. Daganatsejtes erek (pseudovasculogenesis): vascularis mimikri, tumor-sinusok, mozaik erek
2. A gazdaszövet ereinek incorporatiója	5. Intussusceptiv angiogenesis
3. Glomeruloid angiogenesis	6. Postnatalis angiogenesis, keringő endothelialis praecursorok, őssejtek .

Táblázat 27. A tumor-indukált angiogenesis mechanizmusai.

Az elsődleges daganatban kialakult TIA-t primer neoangiogenesisnek, az áttétekben kialakultat pedig secunder neoangiogenesisnek nevezzük (Folkman, 1971; 1996; Kopper és Tímár, 2007; Paku és Döme, 2006; Tímár et al., 2001).

Kutyák emlőmirigydaganataiban végzett MVD vizsgálataink során, a daganat állományában képződött mikroerek endothelsejtjeiben tapasztalt intenzív claudin-5

immunreaktivásra alapozott, számítógépes morphometriai módszerrel elemeztük az érdenzitást. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a biológialag agresszívabb, primer simplex emlőcarcinomákban nagyobb mikroérsűrűség tapasztalható (grade I = 1, 98 pixel %, grade III = 5,33 pixel %), mint a benignus simplex adenomában (0,66 pixel %), vagy a biológialag kevésbé agresszív viselkedésű, elsődleges complex carcinomákban (0,70 pixel %). Egyértelműen érezhető volt a primer, tumor-indukálta angiogenesisben az MVD különbség a high grade, solid infiltráló simplex carcinomák (5,33 pixel %) és a low grade, tubularis, vagy tubulopapillaris infiltráló simplex carcinomák (1, 98 pixel %) között. Az előbbi histotípusú emlőmirigy tumorok angiogenicusabbnak bizonyultak az utóbbiakhoz viszonyítva (Jakab et al., 2008c). Restucci és mtsai anti-CD 31 ellenanyagra alapozott MVD vizsgálatokat végeztek kutyák elsődleges emlőmirigy daganataiban (Restucci et al., 2000). Eredményeink az említett szerzők korábbi tapasztalatait alátámasztották és felhívták a figyelmet arra, hogy a kutyák emlőmirigy carcinomáiban a malignitás fokozódásának egyik alapvető tényezője az emlőmirigy carcinomasejtek által indukált, elsődleges neoangiogenesis, amely a korai metastasisoknak lehetőséget adhat.

A kutyák leggyakoribb malignus emlőtumoraiban, a complex carcinomákban, amelyek daganatos luminalis epithel sejtekből és myoepithelsejtekből épülnek fel, jóval kisebb érsűrűséget (0,70 pixel %) állapítottunk meg, mint a simplex carcinomákban. Ez az alacsony MVD érték magyarázatul szolgál a complex carcinomák centralis területein gyakorlatilag mindig kialakuló coagulation necrosisok jelenlétére (Jakab et al., 2008c). Feltételezhetően, a kevésbé angiogenicus fenotípusú complex carcinomákban a daganatos myoepithelsejtek okozzák a simplex carcinomákhoz képest visszafogottabb érújdonképződést, mivel proangiogen ciktokin termelésük kisebb mértékű. További vizsgálatok szükségesek viszont a complex carcinoma távoli áttétekben tapasztalható MVD feltérképezésére.

A solid emlőmirigy carcinomák tüdőáttéteiben kialakult secunder tumor-indukált angiogenesisnél végzett MVD vizsgálataink során, az elsődleges emlőmirigy carcinomákhoz viszonyítva nagyobb (6,22 pixel %) érdenzitást (mikroérsűrűséget) kaptunk (Jakab et al., 2009c). Feltételezzük, ez részben annak köszönhető, hogy a tüdő a szervezet egyik legjobban érzett szövete és az áttéti emlőmirigy carcinomáknak a secunder tumor-indukált neoangiogenesisük során az eredeti alapszövetben nagyobb lehetőségük volt a már korábban is jelenlévő, a többi szövethez viszonyítva nagyobb mennyiségű/sűrűségű erek incorporációjára. Másrészt feltételezhető, hogy az áttéti emlőmirigy daganatsejtek fokozottabban termelnek proangiogen, érújdonképződést kiváltó citokineket, mint az elsődleges emlőmirigy tumorsejtek. Elképzelhető, hogy a tüdőszövet, amely gyakori áttéti állomása a különböző malignus tumoroknak, az extracellularis matrixában, fiziológiásan a többi szöveti területekhez viszonyítva, nagyobb mennyiségű angiogenicus növekedési faktorokat raktároz, amelyeket a daganatsejtekből felszabaduló fehérjebontó enzimek szabadítanak fel. Tapasztalataink felvetik az antivascularis terápia lehetőségét az

előrehaladott, távoli emlőrákáttektől szenvedő kutyák esetében. Az antivaszularis daganatterápia alapvetően az angiogenezist gátló gyógyszerekre épül. Az előbbieket közé tartozik pl. a neoangiogenesis során az endothelsejtek burjánzását előidéző mitogéneket gátló szerek (pl. interferon), vagy a vaszularis növekedési faktor (VEGF) inhibitorai (Tímár et al., 2001). Az anti-claudin-5 ellenanyag alkalmas kutyák, nem emlőmirigy eredetű benignus tumorainak primer (Jakab et al., 2009l) és metastaticus daganatainak secunder neoangiogenesisének feltűntetésére is (Jakab et al., 2009k).

Az emlődaganatok a kutyák egyik leggyakoribb neoplasticus elváltozásait képviselik, amelyekre a kifejezett heterogen morfológiai, biológiai és klinikai tulajdonság a jellemző (Rutteman et al., 2001). A kutyákban klinikailag észlelt, műtétileg kezelt emlőtumorok kb. 50 %-a rosszindulatú, ezért hasonlóan a humán onkológiai procedúrához, a korrekt kórjóslothoz a kisállatgyógyászatban is szükség van a klinikumban jól hasznosítható prognosztikai markerekre (Karayannopoulou et al., 2005). Kutyák emlődaganatainak kiemelten fontos prognosztikus jellemzője a lymphogen- és/vagy haematogen invasio, ezért fontos minden kórszövettani, ill. immunhisztokémiai technikai segítség, amellyel közelebb kerülünk a korrekt, teljes értékű definitív diagnózishoz, így segítve a további gyógykezelési eljárásokat. Vizsgálataink szerint kutyák differenciálatlan, rosszindulatú simplex emlőcarcinomái esetén a nyirokérinvasio egzaktabban kimutatható claudin-5 immunhisztokémiával. Kutyák emlőrákjainak nyirokérinvasiója, a claudin-5 negatív tumorembolusok és az erős claudin-5 pozitívást adó endothelsejtek miatt egyértelműen detektálható volt. A kórszövettani analízisre küldött malignus hámeredetű emlőmirigy daganatok haematoxilinnal és eosinnal festett metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálata során, gyakorta tapasztalható histotechnikai műtermékként, hogy az egyes daganatos sejtfészkek, vagy individualis invasiv carcinomasejtek leválnak az őket közvetlenül körülölelő daganatstromáról (kötőszöveti vázról) és így a tumor és a kötőszövet között kialakult artefactualis hézag kitágult nyirokér átmetszet benyomását keltheti. Anti-claudin-5 ellenanyag (marker) segítségével a daganat kötőszövetes vázának elválásával kialakult szöveti hézag a nyirokerekteől elkülöníthető (Jakab et al., 2008d; 2009i).

7.3.2. Claudin-5 alapú, idült gyulladás hatására kialakuló neoangiogenesis vizsgálat kutyákban

A szervezetben a kóros érújdonképződés különféle okok miatt létrejövő szövetkárosodáskor, illetve hypoxia hatására következik be. A sejtek oxigén-deficitus állapotra adott molekuláris válasza során a két alegységből (α , β) felépülő hypoxia-indukálható faktor-1 (HIF1), az angiogenesis kezdeményezésére célgéneket (hypoxiagéneket):

VEGF, eritropoetin, tejsav-dehidrogenáz-A és a glükóztranszporter fehérje-1 hypoxiareszponzív elemeihez kapcsolódik és elindítja ezek transzkripcióját. A tumorokban elsősorban a hypoxiás parenchymasejtek, idült gyulladásban pedig az infiltráló leukocyták (macrophagok) termelik az angiogenesis iniciátorokat (Kopper és Tímár, 2007; Paku és Döme, 2006).

Az idült gyulladások esetén tapasztalható patológiás neoangiogenesis lehet kontrollált, valamint nem kontrollált. Ezek során differenciált, komplett szerkezetű kapilláris vagy arteriolaris típusú erek képződnek. Az újonképzett gyulladásos ereket a differenciált endothelsejtek egy rétegben bélelik és az erek általában megfelelő pericytaköppennyel rendelkeznek. Megfigyelték, hogy az endothelsejtek körüli, megfelelő számú pericyta hiányában, szabálytalan, kontrollálatlan mikroérhálózat alakul ki. A daganatos mikroerekkel szemben a gyulladásos mikroerek nem, illetve csekély szerkezeti heterogenitással rendelkeznek. A gyulladásos neovasculatura oxigént és tápanyagot, továbbá a szöveti reparációban fontos szerepet játszó leukocytákat szállít, juttat az érintett szöveti területre. A gyulladásos területet monocyták, macrophagok, thrombocyták, mastocyták és lymphocyták infiltrálhatják. Ezek a sejtek gyulladásos és/vagy angiogen faktorokat termelnek, amelyek elsősorban a VEGF és az angiopoetin-1 (Ang-1), vagy más sejteket stimulálnak. A gyulladás során kialakult erekben elsősorban a mutációmentes növekedési faktor gének fokozott expressziója tapasztalható. A gyulladásos stimulus megszűnte után az endothelsejtek apoptosia, az alaphártya lebontása és a multiplex thrombotisatio révén megindul az újonnan képződött kapillárisok regressziója. A daganatokhoz hasonlóan a gyulladásos területen fellépő hypoxia a HIF-1-en keresztül, kontrollálatlan, abnormális angiogenesisist indukálhat. A kontrollálatlan idült gyulladásos elváltozások hajlamosíthatják a különböző szöveteket (pl. bőr, gyomor) a daganatok kialakulására. A gyulladásos angiogenesisissel összefüggő tumorszerű, kóros szöveti elváltozások a polypus, a hypertrophiás heg, vagy a keloid (Carmeilet, 2005; Kopper és Tímár, 2007).

A kutyák idült gyulladásos folyamataiban tapasztalt patológiás angiogenesis immunhisztokémiai vizsgálata során, a gyulladásos sejtekből (leukocyták, monocyták, macrophagok, lymphocyták, mastocyták) és thrombocytákból felszabaduló angiogen citokinek hatására kialakult arteriolák endothelsejtjei, intenzív claudin-5 membránpozitivitást mutattak, hasonlóan a tumor-indukált mikroerekhez. A korábbi vizsgálati eredményeinket figyelembe véve alapvető különbség a daganat-indukált mikroerekhez képest, hogy a gyulladásos folyamatokban indukálódó többnyire homogen morfológiájú, arteriolaris típusú mikroerek, komplett pericytaköppennyel, differenciált szerkezettel rendelkeznek. Ezzel szemben a daganatos mikroerek inkább kapilláris típusúnak, heterogen morfológiájúnak és pericytaborítás nélkülinek bizonyultak (Jakab et al., 2009g). A kutyák idült gyulladásos folyamataiban, szemben a malignus daganatokkal, nem tapasztaltunk hypoxiás, anoxiás alapon kialakult necrosisokat, ami a hatékonyabb, valamint jobb vérellátásra, továbbá az

angiogen faktorokkal való egyenletesebb ellátásra utalhat. A daganatok állományában az angiogen túlsúly, a daganatsejtek fokozottabb angiogen faktor termelése főleg a daganat perifériás részén érzékelhető, szemben a necrosisal terhelt centralis részekkel. Az idült gyulladás során az érintett szöveti területet elárasztó gyulladásos sejtek ehhez képest egyenletesebb angiogén citokin szekréciót biztosítanak az újdonszövő mikroerek számára (Kopper és Tímár, 2007).

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az anti-claudin-5 marker segítheti, kiegészítheti a rutin kórszövettani vizsgálatot az idült gyulladásos folyamatokban lezajló érújdonszövődés detektálása, illetve tanulmányozása végett. Az érújdonszövődést gátló terápia, a kutyákban lezajló, angiogenesisel kísért idült, aktív, gyulladások esetén még nem kutatott gyógykezelési eljárás.

7.3.3. Claudin-5 alapú, arteriolaris hyperplasia vizsgálatok kutyák májában

A kutyák májbetegségeinek korrekt klinikopatológiai vizsgálata összetett folyamat, amelyben a patológus kórszövettani diagnózisának jelentős szerepe van. A kórelőzményi adatok, a fizikális- és laboratóriumi vizsgálatok, illetve a képalkotó eljárások segítségével megállapítható, hogy a beteg állatnak van-e májkárosodása, és ha igen akkor ez diffúz, vagy gócos jellegű. Innen diagnosztikailag továbblépni csak a májszövet morfológiai vizsgálatával lehet. Az állatorvosi gyakorlatban a klinikai hepatológiai diagnosztikai tevékenységet elsősorban a fizikális, az ultrahangos és a laboratóriumi vizsgálatok képviselik. A diffúz és gócos májbetegségek definitív alaktani vizsgálata, a biopsiás mintavételen alapuló kórszövettani analízis, az állatorvoslásban még nem rutinszerű, invazív diagnosztikai módszer annak ellenére, hogy a májbiopsia nélkül számtalan kérdés megválaszolatlan marad. A patológiai lelet alapvető, semmi mással nem helyettesíthető adatokat nyújt a májelváltozás jellegéről, megfelelő terápiás vonzatokkal és kórjósllattal. Habár nem minden esetben sikerül egyértelmű diagnózist felállítani, de ezekben az esetekben is a kórszövettani vizsgálattal kizárhatunk fontos kórképeket, a szöveti elváltozások leírásával pedig szűkíthetjük a szóba jöhető patológiás folyamatok körét. A májban kialakuló hisztológiai elváltozások száma kisebb, mint a májkárosító hatásoké, ezért a patológiai leletből nem minden esetben derül ki a májelváltozás oktana. Mindezek mellett a nem megfelelő mintakezelés, a klinikus és a patológus közötti hiányos információáramlás rontják a biopsiás anyag vizsgálati eredményét (Jakab et al., 2008a).

A májbetegségek klinikai vizsgálatokkal, biokémiai (laboratóriumi), morfológiai, képalkotó és immunológiai eljárásokkal állapíthatók meg (Kendrey, 2003). A morfológiai vizsgálatokhoz szükséges mintavételi módszereket az 18. táblázat tartalmazza (**Táblázat 28.**).

I. Per cutan vaktűbiopszia/vékonytű aspiratio
II. Per cutan UH-al vezérelt tűbiopszia/ aspiratio
III. Laparoscopos célzott biopsia
IV. Intraoperatív sebészi mintavétel
V. Májresectio

Táblázat 28. A májból történő mintavételi módszerek

A klinikus állatorvos feladata a megfelelő máj mintavételi módszer kiválasztása, amellyel a legtöbb informatív anyagot nyerjük a beteg számára legkevésbé megterhelő módon. A mintavétel történhet diagnosztikus céllal és a gyógykezelések eredményességének megítélése érdekében. A patológus a májminta vizsgálata során nem egy bizonyos betegséget lát a mikroszkópban, hanem a májnak egyes károsító effektusokra adott valamilyen reakcióját, amely lehet hepatocellularis szintű, complex sejtszintű és szöveti szintű (Fehér és Lengyel, 2001).

A májbiopsia akkor szükséges, ha a kevésbé invazív módszerek alkalmazása nem elegendő ahhoz, hogy a beteg állapot gyógykezelését és sorsát meghatározó döntést hozzunk. A biopsia során szöveti struktúrába rendezett anyag kerül kivételre. A májbiopsia javallatait a 29. táblázatban, kontraindikációit a 30. táblázatban foglaltuk össze (Kendrey, 2003).

1. Ismeretlen eredetű májelégtelenség	6. Ismeretlen oktanú hepatomegalia és microhepathia
2. Nem ismert oktanú ascites	7. Daganatos májbetegség vizsgálata
3. Perzisztálisan emelkedett májenzim aktivitás	8. Sorozatbiopszia a májbetegség progressziójának vizsgálatára
4. Ismeretlen oktanú elhúzódó hyperbilirubinaemia	9. Sorozatbiopszia a gyógykezelés eredményének vizsgálatára
5. Az idiopathicus májlipidosis megállapítása macskákban	

Táblázat 29. A májbiopsia indikációi.

1. Haemorrhagias diathesis	4. Acut-subacut cholangitis
2. Extrahepaticus epeút elzáródás	5. Intrahepaticus heamangio(sarco)ma
3. Májtályog	6. 1 cm-nél kisebb fokális elváltozás

Táblázat 30. A májbiopsia kontraindikációi.

A máj elemi egysége a lobulus olyan hexagonalis parenchymamassza, amelynek középpontjában a *v. centralis* található és *marginalis* részén, a határoló lemezen kívül a portalis triád (*ductus biliferus*, *v. interlobularis* = portalis venula, *a. interlobularis* = hepaticus portalis arteriola) helyezkednek el. A portalis mezőben (Glisson-háromszög) található még a máj kisebb nyirokerei és idegrostjai (Samuelson, 2007). A kutyák, *v. portae* hypoperfúzió okozta, különböző májbetegségeinek: az elsődleges *v. portae* hypoplasiának, a congenitalis portosystemas shuntnek, az intrahepaticus arterio-venosus fistulának és a *v. portae* obstrukciónak (thrombosis, embolisatio, gyulladásos-, daganatos elzáródás) a legmarkánsabb kórszövettani jellemzője a portalis területekben kialakuló, kóros hepaticus portalis arteriola hyperplasia, vagy proliferatio, amely nem daganatos, nem gyulladásos jellegű, kóros, intrahepaticus neoangiogenesis. Portalis hypertóniával kísért májcirrhosis, májfibrosis, idült májgyulladás esetén szintén tapasztalható a májban arteriola hyperplasia (Rothuizen et al., 2006).

Vizsgálataink során részben rutin szövettani metszetekben, részben anti-claudin-5 ellenanyagra alapozott immunhisztokémiai módszer segítségével feltérképeztük az általunk, három csoportba (kis, középnagy, nagy) sorolt, kutyák intact májszöveti portalis mezőinek vascularis komponenseinek számát. A portalis arteriola, venula, nyirokerek és a sinusoidok endothel sejtjei intenzív claudin-5 immunreaktivitást mutattak. A portalis ductus biliferusok, a fibroblastok, a májsejtek és a Kupffer-sejtek claudin-5 negativitásuk révén megbízható belső negatív kontrollok voltak. Felhasználva a megnagyobbodott, hypertrophisált endothel sejtekben tapasztalt intenzív claudin-5 immunreaktivitást, megvizsgáltuk a *v. portae* keringési rendellenesség (hypoperfusio, hypertonia) kórelőzményi adatokkal rendelkező kutyák májából származó bioptátumokban a hepaticus arteriola számbeli eltéréseit. Azt tapasztaltuk, hogy a kis portalis területeken 5-6, a középnagy portalis mezőkben 8-12 és a nagy portalis areákban 15-20 proliferáló hepaticus arteriola volt (Jakab et al., 2010f). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kutyák sebészi és endoscopos májminta biopsziáinak HE és egyéb klasszikus kórszövettani festési eljárással készített metszeteire alapozott patológiai vizsgálatát, kórisméjét az anti-claudin-5 ellenanyagra alapozott immunhisztokémiai vizsgálat kiegészíti, segítve a korrekt definitív diagnózis felállítását. Az anti-claudin-5 endothel marker kiválóan alkalmasnak bizonyult a *v. portae* keringési rendellenességeihez társuló, portalis arteriolaris hyperplasiák egyértelmű detektálására, a különböző méretű portalis mezőkben. Tapasztalataink alapján javasoljuk a kutyák májbiopsziás mintáinak patológiai feldolgozásánál az anti-claudin-5 marker használatát, különösen *v. portae* perfúziós zavar esetén.

8. Új tudományos eredmények

1. Az indirekt immunhisztokémiai vizsgálatok során bizonyítottuk, hogy a humanizált anti-claudin-1, -3, -4, -5 és -7 ellenanyagok kereszt reagálnak kutyákból származó elváltozásmentes, tumoros és gyulladásos szövetekben, továbbá kutyákból származó szövetekben megbízható pozitív kontrollokat szelektáltunk.
2. Az anti-claudin-5 ellenanyag alkalmas kutyák haemangiosarcomájának, orsósejtes haemangiómájának, valamint egyéb haemangioma komponenssel rendelkező, vegyes szöveti összetételű daganatainak patológiai és differenciál diagnosztikájára. Alkalmas továbbá kutyákból származó lépminták sinus rendszerét bélelő, nem continuális endothelium alaktani feltűntetésére, a lépben kialakuló neoplasticus és nem neoplasticus (lymphoid hyperplasia) eredetű haematomák elkülönítésére, valamint kiküszöböli a formaldehid konzerválások során elkövetett technikai hibákat,
3. Kutyák epeúti hámsejtjei és jóindulatú, valamint rosszindulatú daganatai claudin-7 pozitivitást mutatnak, amely alapján a differenciálatlan cholangiocellularis carcinoma a differenciálatlan máj carcinomától jól elkülöníthető. Kutyák orsósejtes daganatainak, perifériás ideghüvely tumorai és érfal eredetű tumorai elkülönítésére több antitestet tartalmazó immunhisztokémiai panelt dolgoztunk ki. A claudin-1, -3, -4, -5 és -7 konstitutív komponense kutyák intact emlőmirigy simplex hámsejtjeinek, míg az emlőmirigy daganatok carcinogenesis és tumorprogressioja során a claudin-1, -5 és -7 redukáltan, a claudin-3 és -4 fokozottan expresszálódik. A claudin-3 és/vagy -4 fokozott expresszió miatt a comparativ onkológiai kutatásokban kutyák simplex emlőrákja human modellként használható.
4. A claudin-3, -4, és -7 konstitutív komponense kutyák intact claudin-1 és -5 negatív colorectalis hámsejtjeinek, míg a colorectalis carcinogenesisben a claudin-1 fokozódó expressziójának van szerepe. A claudin-1, -3, -4, -5 és -7 kutyák intact hepatoid-sejtes mirigyhámsejtjeinek konstitutív komponense, míg a claudin-1 expresszió elvesztése a differenciálatlan hepatoid-sejtes carcinomák kialakulásában játszik szerepet. Kutyák intact pancreasban, az acinaris sejtek claudin-1, -3, -4, -5 és -7, az intact ductalis hámsejtek csak a claudin-7 expressziót mutatnak, míg a hasnyálmirigy acinaris sejtjeiből kiinduló carcinomák kialakulásában döntő folyamat a claudin-1, -3, -4 és -5 expresszió elvesztése.
5. Anti-claudin-1 ellenanyaggal kutyák intact májában a periportal területen a határoló lemezt alkotó májsejtjeiben és az azokat körülölelő 5-6 májsejt sorban membrán pozitívitas mutatható ki. Az ellenanyaggal kutyák idült gyulladásos folyamataiban lezajló érújdonképződés detektálható, az intact májszövetben a portalis mezők vascularis komponenseinek száma feltérképezhető. Ezzel a módszerrel megállapítottuk, hogy primer simplex emlőcarcinomákban nagyobb a mikroérsűrűség, mint a benignus simplex adenomában és a simplex emlőmirigy carcinoma nyirokérbetörései megbízhatóan detektálhatók.

9. Irodalom

Adachi S., Doi R., Mitani K., Iwamoto Y., Furumoto A., Yamashita M., Cho H. (2010): Atypical soft tissue perineurioma in the tongue of a young girl. *Pathol. Int.* 60, 787-791.

Agaimy A., Stoehr R., Vieth M., Hartmann A. (2010): Benign serrated colorectal fibroblastic polyps/intramucosal perineuriomas are true mixed epithelial-stromal polyps (hybrid hyperplastic polyp/mucosal perineurioma) with frequent BRAF mutations. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 1663-1671.

Agaimy A., Bohle R.M., Schick B., Bumm K. (2011): Perineurioma of the parotid gland: first case report. *Hum. Pathol.* 42, 904-908.

Al-Daraji W.I. (2008): Granular perineurioma: the first report of a rare distinctive subtype of perineurioma. *Am. J. Dermatopathol.* 30, 163-168.

Al Moustafa A.E., Alaoui-Jamali M.A., Batist G., Hernandez-Perez M., Serruya C., Alpert L., Black M.J., Sladek R., Foulkes W.D. (2002): Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2634–2640.

Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H., Schöneberg T., Mankertz J., Schulzke J.D., Fromm M. (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 4969-4976.

Astler V.B., Collier F.A. (1954): The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann. Surg.* 130, 846-852.

Avallone G., Helmbold P., Caniatti M., Stefanello D., Nayak R.C., Roccabianca P. (2007): The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Vet. Pathol.* 44, 607-620.

Bailey D.W., Dunlap K.A., Frank J.W., Erikson D.W., White B.G., Bazer F.W., Burghardt R.C., Johnson G.A. (2010): Effects of long-term progesterone on developmental and functional aspects of porcine uterine epithelia and vasculature: progesterone alone does not support development of uterine glands comparable to that of pregnancy. *Reproduction.* 140, 583-594.

Bernardi M.A., Logullo A.F., Pasini F.S., Nonogaki S., Blumke C., Soares F.A., Brentani M.M. (2011): Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol. Rep. (Közlésre elfogadva)*

Billings S.D., Walsh S.V., Fisher C., Nusrat A., Weiss S.W., Folpe A.L. (2004): Aberrant expression of tight junction-related proteins ZO-1, claudin-1 and occludin in synovial sarcoma: an immunohistochemical study with ultrastructural correlation. *Mod. Pathol.* 2, 141-149.

Bizikova P., Linder K.E., Olivry T. (2011): Immunomapping of desmosomal and nondesmosomal adhesion molecules in healthy canine footpad, haired skin and buccal mucosal epithelia: comparison with canine pemphigus foliaceus serum immunoglobulin G staining patterns. *Vet. Derm.* 22, 132-142.

Borka K., Kaliszky P., Szabó E., Lotz G., Kupcsulik P., Schaff Z., Kiss A. (2007): Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virch. Arch.* 450, 549-557.

- Bornholdt J., Friis S., Godiksen S., Poulsen S.S., Santoni-Rugiu E., Bisgaard H.C., Lothe I.M., Ikdahl T., Tveit K.M., Johnson E., Kure E.H., Vogel L.K. (2011): The level of claudin-7 is reduced as an early event in colorectal carcinogenesis. *BMC Cancer*. 11, 65.
- Brown N.O., Patnaik A.K., MacEwen E.G. (1985): Canine hemangiosarcoma: Retrospective analysis of 104 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 56-58.
- Brunnert S.R., Deel L.A. Herron A.J., Altman N.H. (1993): Primary linitis plastica (signet ring) carcinoma of the colon in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 29, 75-77.
- Butt O.I., Buehler P.W., D'Agnillo F. (2011): Blood-brain barrier disruption and oxidative stress in guinea pig after systemic exposure to modified cell-free hemoglobin. *Am. J. Pathol.* 178, 1316-1328.
- Carreilet P. (2005): Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Chang S.C., Liao J.W., Lin Y.C., Liu C.I., Wong M.L. (2007): Pancreatic acinar cell carcinoma with intracranial metastasis in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 91-93.
- Chao Y.C., Pan S.H., Yang S.C., Yu S.L., Che T.F., Lin C.W., Tsai M.S., Chang G.C., Wu C.H., Wu Y.Y., Lee Y.C., Hong T.M., Yang P.C. (2009): Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Amer. J. Resp. Critic. Care Med.* 179, 123–133.
- Chen R.W., Jakobiec F.A., Zakka F.R., Kazim M. (2011): Orbital perineurioma in the setting of dacryocystitis. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* (Közlésre elfogadva)
- Chijiwa K., Uchida K., Tateyama S. (2004): Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet. Pathol.* 41, 307-318.
- Cohn M.L., Goncharuk V.N., Diwan A.H., Zhang P.S., Shen S.S., Prieto V.G. (2005): Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. *J. Cutan Pathol.* 32, 533-536.
- Clifford C.A., Macking A.J., Henry C.J. (2000): Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 a beyond. *J. Vet. Inter. Med.* 5, 479-485.
- Cornelis I., Chiers K., Kramerz M., Ducatelle R., D'Herdey K., Van Ham L. (2009): Expression of claudin-1 in a canine perineurioma. *J. Comp. Pathol. ESVP/ECVP Proceedings*, 274-275.
- Csébi P., Németh T., Jakab Cs., Patonai A., Garamvölgyi R., Manczur F., Spitzner A., Arany-Tóth A., Kóbori L. (2011): Experimental results of using autologous rectus fascia sheath for venous patch grafts in dogs. *Acta Vet. Hung.* 59, 373-384.
- Dahiya N., Becker K.G., Wood W.H., Zhang Y., Morin P.J. (2011): Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PLoS One*. 6, e22119.
- Diesing A.K., Nossol C., Dänicke S., Walk N., Post A., Kahlert S., Rothkötter H.J., Klues J. (2011): Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS One*. 6, 17472.
- Duncan A.R., Sadowska G.B., Stonestreet B.S. (2009): Ontogeny and the effects of exogenous and endogenous glucocorticoids on tight junction protein expression in ovine cerebral cortices. *Brain Res.* 1303, 15-25.

- Duncan L., Tharp D.R., Branca P., Lyons J. (2010): Endobronchial perineurioma: an unusual soft tissue lesion in an unreported location. *Patholog. Res. Int.* 613824.
- De las Mulas J.M., Gomez-Villamandos J.C., Perez J., Mozos E. (1995): Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratins and vimentin. *Res. Vet. Sci.* 59, 124–127.
- Dhawan P., Singh A.B., Deane N.G., No Y., Shiou S.R., Schmidt C., Neff J., Washington M.K., Beauchamp R.D. (2005): Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* 115, 1765–1776.
- Fehér Gy. (1980): A háziállatok funkcionális anatómiája III., Budapest, Mezőgazdasági Kiadó, 735-741.
- Fehér J., Lengyel G. (2001): *Hepatológia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest*, 31-41., 123-125., 343-350.
- Ferrer L., Fondevila D., Rabanal R.M., Vilafranca M. (1995): Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *J. Comp. Pathol.* 112, 319-326.
- Fritzsche F.R., Oelrich B., Johannsen M., Kristiansen I., Moch H., Jung K., Kristiansen G. (2008): Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 14, 7035-7042.
- Folkman M.J., Long D.M., Becker F.F. (1963): Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16. 453–467.
- Folkman, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285. 1182-1186.
- Folkman, J. (1996): Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 333. 1757–1763.
- Folpe A.L., Billings S.D., McKenney J.K., Walsh S.V., Nusrat A., Weiss S.W. (2002). Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. *Am. J. Surg. Pathol.* 12, 1620-1626.
- Frost A.R., Sparks D., Grizzle W.E. (2000): Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8, 236-243.
- Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S. (2001): Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153, 263-272.
- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. (2002): Claudin based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1 deficient mice. *J. Cell Biol.* 156. 1099–1111.
- Furuse M., Sasaki H., Tsukita S. (1999): Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147. 891-903.
- Gál J., Jakab Cs., Szabó Z., Pazár P., Psáder R., Roeber F., Hegyi Á., Lefler K.K., Farkas B., Mándoki M. (2009): Haemangioma in the oesophagus of a Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*). *Acta Vet. Hung.* 57, 477-484.

Gál J., Mándoki M., Sátorhelyi T., Jakab Cs. (2010): *In situ* complex adenocarcinoma on the femoral area of the hind limb in an Asian Leaf Turtle (*Cyclemys dentata*). Acta Vet. Hung. 58, 431-440.

Goldschmidt M., Hendrick M. (2000): Tumors of the skin and soft tissue. In: Meuten, D. (Ed.), Tumor in domestic animals, 4th edition, Iowa State Press, 68-70.

Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V. (2011): Classification and grading of canine mammary tumors. Vet. Pathol. 1, 117-131.

Graham C., Simmons N.L. (2005): Functional organization of the bovine rumen epithelium. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 288, 173-181.

Gregory M., Dufresne J., Hermo L., Cyr D. (2001): Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinol. 2001. 854-863.

Guzsal E. (1981): Háziállatok szövettana. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 343-351.
tr6d

Gyórfy H. (2009): Claudinok és prognosztikai faktorok vizsgálata egyes gastrointestinalis betegségekben. Magy. Onkol. 53, 377-383.

Hahn K.A., Richardson R.C., Knapp D.W. (1992): Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 28, 251-256.

Haider S.A., Lemberger R.J., Fisher C., McCulloch T.A. (2008): Epithelioid perineurioma: an unusual variant. J. Clin. Pathol. 61, 1130-1132.

Hay E.D. (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. Acta. Anat. (Basel) 154, 8-20.

Head K.W., Else R.W., Dubielzig R.R. (2002): Tumors of the intestines. In: Meuten D.J. (2002): Tumors in domestic animals. Forth edition. Iowa State Press, 461-469.

Head K.W., Else R.W., Dubielzig R.R. (2002): Tumors of the exocrine pancreas. In: Tumors in Domestic Animals, ed. Meuten, D. J., Iowa State Press, Ames, IA 478–481.

Holt P.E., Lucke V.M. (1985): Rectal neoplasia in the dog: A clinicopathological review of 31 cases. Vet. Rec. 116, 400-405.

Hornick J.L., Bundock E.A., Fletcher C.D. (2009): Hybrid schwannoma/perineurioma: clinicopathologic analysis of 42 distinctive benign nerve sheath tumors. Am. J. Surg. Pathol. 33. 1554-1561.

Hornsby C.D., Cohen C., Amin M.B., Picken M.M., Lawson D., Yin-Goen Q., Young A.N. (2007): Claudin-7 immunohistochemistry in renal tumors: a candidate marker for chromophobe renal cell carcinoma identified by gene expression profiling. Arch. Pathol. Lab. Med. 131, 1541-1547.

Hough C.D., Sherman-Baust C.A., Pizer E.S., Montz F.J., Im D.D., Rosenshein N.B., Cho K.R., Riggins G.J., Morin P.J. (2000): Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. Cancer Res. 60, 6281-6287.

Ihrke P.J., Walder E.J., Affolter V.K. (2006.) Skin diseases of the dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis. 2nd edition, Blackwell Publishing, 655-665.

Ishizaki T., Chiba H., Kojima T., Fujibe M., Soma T., Miyajima H., Nagasawa K., Wada I., Sawada N. (2003): Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Experim. Cell Res.* 290, 275-288.

Isittor G.N., Weinman D.E. (1979): Origin and early development of canine circumanal glands. *Am. J. Vet. Res.* 40, 487-492.

Jackson D.E. (2003): The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Letters* 540, 7-14.

Jakab Cs., Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Pekár M., Keszthelyi R., Meczker Á., Kulka J. (2007): Szöveti multiblokk (tissue micro-array-TMA) technika az állatorvosi onkopatológiai vizsgálatokban. *Magy. Állatorv. Lapja* 129, 310-315.

Jakab Cs., Dudás Gy.Z., Horváth É., Tóth A., Halász J. (2008a): A májbiopsziás vizsgálatok jelentősége a kisállatpraxisban. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 39-47.

Jakab Cs., Halász J., Szász A.M., Batmunkh E., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2008b): Expression and localistaion of claudin-1,-2, -3, -4, -5, -7, and -10 proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Vet. Hung.* 56, 341-352.

Jakab Cs., Halász J., A Kiss, Schaff Zs., Szász A.M., Rusvai M., Zs Abonyi T.Zs., Kulka J. (2008c): Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative claudin-5 molecule immunohistochemistry. *Acta Vet. Hung.* 56, 495-510.

Jakab Cs., Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Pekár M., Szabára Á., Kulka J. (2008d): Claudin-5 fehérje expressziójának vizsgálata kutyák emlőmirigyének és emlőcarcinomáinak nyirokér endothelsejtjein immunhisztokémiai módszerrel. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 296-303.

Jakab Cs., Halász J., Kiss A., Szász A.M, Schaff Zs., Rusvai M., Kulka J. (2008e): Külső pozitív kontrollok alkalmazása claudin-expressziós immunhisztokémiai vizsgálatokban. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 433-438.

Jakab Cs., Szabára Á., Rohn E., Molnár J., Rusvai M. (2008f): Ló villámcsapás okozta balesete. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 707-717.

Jakab Cs., Halász J., Szász A.M., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2008g): Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 proteins in benign and malignant canine mammary gland epithelial tumours. *J. Comp. Pathol.* 139, 238-245.

Jakab Cs., Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2009a): Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol. Histopathol.* 24, 801-813.

Jakab Cs., Rusvai M., Szabó Z., Szabára Á., Kulka J. (2009b): Expression of claudin-4 molecule in benign and malignant canine hepatoid gland tumours. *Acta Vet. Hung.* 57, 463-475.

Jakab Cs., Szász A.M., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Szabára Á., Kulka J. (2009c): Claudin-expressziós vizsgálatok kutyák solid emlőrákjának tüdőáttéteiben. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 33-41.

Jakab Cs., Schaff Zs., Kulka J., Szász A.M., Demeter Z., Gálfi P., Rusvai M. (2009d): Angiogenesis. Irodalmi áttekintés 1. rész. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 373-380.

Jakab Cs., Balka Gy., Rusvai M., Gálfi P., Stark R., Kulka J. (2009e): Orsósejtes haemangioma diagnózisa claudin-5 marker segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 402-407.

Jakab Cs., Schaff Zs., Kulka J., Szász A.M., Demeter Z., Gálfi P., Rusvai M. (2009f): Angiogenesis. Irodalmi áttekintés 2. rész. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 417-426.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2009g): A gyulladásszerű angiogenezis immunhisztokémiai vizsgálata claudin-5, CD31, α -SMA és calponin segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 477-482.

Jakab Cs., Rusvai M., Szabó Z., Kulka J., Tátrai P. (2009h): Claudin-expressziós vizsgálatok kutyák intakt emlőmirigyében konfokális mikroszkóppal. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 552-556.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Szabó Z., Csébi P., Szabára Á., Kulka J. (2009i): Kutya lipidizált emlőrák nyirokérinváziójának vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 610-619.

Jakab Cs., Rusvai M., Szabó Z., Csébi P., Kulka J., Tátrai P. (2009j): Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában konfokális mikroszkóppal. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 659-668.

Jakab Cs., Szász A.M., Kulka J., Baska F., Rusvai M., Gálfi P., Németh T. (2009k): Secondary tumoural valvulopathy in dog. Case report. *Acta Vet. Hung.* 57, 63-67.

Jakab Cs., Szász A.M., Kulka J., Rusvai M., Németh T., Gálfi P. (2009l): Cutaneous mast cell tumour within lipoma in a boxer. *Acta Vet. Hung.* 57, 263-274.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Mándoki M., Demeter Z., Szabó Z., Kulka J. (2010a): Expression of claudin-5 molecule in hepatoid gland biopses. *Vet. Dermatol.* 21, 276-281.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Szabó Z., Szabára Á., Kulka J. (2010b): Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 proteins in low grade colorectal carcinoma of canines. *Histol. Histopathol.* 25, 55-62.

Jakab Cs., Kiss A., Schaff Zs., Szabó Z., Rusvai M., Gálfi P., Szabára Á., Sterczler Á., Kulka J. (2010c): Claudin-7 protein differentiates canine cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Histol. Histopathol.* 25, 857-864.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2010d): Expression of claudin-7 molecule in canine hepatoid gland tumors. *Acta Vet. Brno* 79, 127-133.

Jakab Cs., Rusvai M., Bíró N., Szabó Z., Gálfi P., Kulka J. (2010e): Claudin-5 positive angioleiomyoma in the uterus of a degu (*Octodon degus*). *Acta Vet. Hung.* 58, 331-340.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Szabára Á., Szabó Z., Kulka J. (2010f): Immunohistochemical detection of arteriolar hyperplasia in canine liver biopsy samples by claudin-5 marker. *Acta Vet. Hung.* 58, 423-430.

Jakab Cs., Németh T., Jerzsele Á., Horváth Á., ifj. Horváth L. (2010g). Angiolipoma diagnózisa claudin-5 marker segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 145-150.

Jakab Cs., Rusvai M., Balka Gy., Gálfi P., Sterczler Á. (2010h): Klaudinexpressziós vizsgálatok kutyák májszövetében. Immunhisztokémiai tanulmány. 1. rész. Klaudin-1, -3 és -4 expresszió kutyák egészséges májszövetében. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 413-417.

Jakab Cs., Gálfi P., Jerzsele Á., Balogh L., Thuróczy J., Szász V., Sterczer Á. (2010i): Claudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák cirumanalis mirigyeiben. Immunhisztokémiai tanulmány. *Expression of claudin 1 molecule in canine circumanal gland tumours. Immunohistochemical study.* Magy. Állatorv. Lapja, 132, 591-600.

Jakab Cs., Mandoki M., Szász V. (2010j): Claudin-5 és CD31 endothelialis markerrel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok hullámos papagáj (*Melopsittacus undulatus*) ép artériái, kapillárisai és vénái endothelsejtjeiben. Immunhisztokémiai tanulmány. *Immunohistochemical analysis of endothelial cells of the intact arteries, capillaries and veins from buderigar (Melopsittacus undulatus) by claudin-5 and CD31 endothelial markers.* Immunohistochemical study. Magy. Állatorv. Lapja 132, 613-618.

Jakab Cs., Szabára Á., Jakab L. (2010k): Arteriovenosus haemangioma kutyanyelvben. Onkológiai eseteírás. Magy. Állatorv. Lapja 132, 722-727.

Jakab Cs., Rusvai M., Gálfi P., Halász J., Kulka J. (2011a): Expression of claudin-5 in canine pancreatic acinar cell carcinoma – An immunohistochemical study. *Acta Vet. Hung.* 59, 89-100.

Jakab Cs., Rusvai M., Szabó Z., Gálfi P., Marosán M., Kulka J., Gál J. (2011b): First occurrence of claudin-7 positive synchronous spontaneous intrahepatic cholangiocarcinoma, adenocarcinoma and adenomas of the gallbladder in a Bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *Acta Vet. Hung.* 59, 101-114.

Jakab Cs. (2011c): Claudin-5 pozitív in situ haemangiosarcoma kutyában. Kórszövettani és immunhisztokémiai esettanulmány. Magy. Állatorv. Lapja 133, 280-284.

Jakab Cs., Rusvai M., Demeter Z., Gálfi P., Szabó Z., Kulka J. (2011d): Expression of claudin-4 molecule in canine exocrine pancreatic acinar cell carcinomas. *Histol. Histopathol.* 26, 1121-1126.

Jakab Cs., Gálfi P., Jerzsele Á., Szabó Z., Németh T., Sterczer Á., Rusvai M., Ózsváry L. (2011e): Expression of claudin-1 in canine peripheral nerve sheath tumors and perivascular wall tumours. *Histol. Histopathol.* (Közlésre elfogadva)

Jass J.R. (2001): Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg. Clin. N. Am.* 82, 891-894.

Johnson A.H., Frierson H.F., Zaika A., Powell S.M., Roche J., Crowe S., Moskaluk C.A., El-Rifai W. (2005): Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* 167, 577-584.

Kaarteenaho R., Merikallio H., Lehtonen S., Harju T., Soini Y. (2010): Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir. Res.* 11, 59-60.

Kaarteenaho-Wiik R., Soini Y. (2009): Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 187-195.

Kalluri R. (2009): EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417-1419.

Kalluri R., Weinberg R.A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420-1428.

Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C., Dessiris A. (2005): Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 133, 246-252.

Karen S., Robert M., Manfred K. (2005): Role of claudins in tumorigenesis. *Adv. Drug Del. Rev.* 57, 919-928.

Karim M.J., Biswas S., Bhattacharjee P., Paterson C.A. (2011): Comparison of tight junction protein expression in the ciliary epithelia of mouse, rabbit, cat and human eyes. *Biotech. Histochem.* 86, 161-167.

Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y., Matsuda M., Sugimoto N. (1997): Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Cell Biol.* 136, 1239–1247.

Kendrey G.: *Májpatológia klinikusoknak*. Allitter Kiadó és Oktatásfejlesztő Alapítvány. Budapest, 2003.

Kominsky S.L., Argani P., Korz D., Evron E., Raman V., Garrett E., Rein A., Sauter G., Kallioniemi O.P., Sukumar S. (2003): Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22, 2021-2033.

Kominsky S.L., Vali M., Korz D., Gabig T.G., Weitzman S.A., Argani P., Sukumar S. (2004): *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Amer. J. Pathol.* 164, 1627-1634.

Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Bärlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P. (1998): Tissue microarrays for highthroughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 4, 844-847.

Kopper L., Schaff Zs. (2006): *Patológia I-II.*, Kulka, J.: Az emlő patológiája. Második javított kiadás, Budapest, Medicina Kiadó.

Kopper L., Tímár J. (2007): *Molekuláris onkológia*. Budapest, Semmelweis Kiadó.

Koutlas I.G., Scheithauer B.W., Folpe A.L. (2010): Intraoral perineurioma, soft tissue type: report of five cases, including 3 intraosseous examples, and review of the literature. *Head Neck Pathol.* 4, 113-120.

Kovács K., Jakab Cs., Szász A.M. (2009): Laser-assisted removal of a feline eosinophilic granuloma from the back of the tongue a case report. *Acta Vet. Hung.* 57, 417-426.

Légrády A. Jakab Cs., Rusvai M., Balka Gy., Kulka J. (2010): Kutya kludin-5 pozitív perianalis collisiós vegyes bőrdaganata. *Onkológiai eset ismertetése. Magyar. Állatorv. Lapja* 132, 461-465.

Leotlela P.D., Wade M.S., Duray P.H., Rhode M.J., Brown H.F., Rosenthal D.T., Dissanayake S.K., Earley R., Indig F.E., Nickoloff B.J., Taub D.D., Kallioniemi O.P., Meltzer P., Morin P.J., Weeraratna A.T. (2007): Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene.* 26, 3846-3856.

Li R., Zhang D., Cai C., Dong J. (2011): The clinical significance of Claudin-7 and slug expression in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 14, 492-496.

Lioni M., Brafford P., Andl C., Rustgi A., El-Deiry W., Herlyn M., Smalley K.S. (2007): Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 170, 709-721.

- Long H., Crean C.D., Lee W.H., Cummings O.W., Gabig T.G. (2001): Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* 61, 7878-7881.
- Lódi Cs., Szabó E., Holczbauer Á., Batmunkh E., Szíjártó A., Kupcsulik P., Kovalszky I., Paku S., Illyés Gy., Kiss A., Schaff Zs. (2006): Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod. Pathol.* 19, 460–469.
- Lyons J.A., Dickson P.I., Wall J.S., Passage M.B., Ellinwood N.M., Kakkis E.D., McEntee M.F. (2011): Arterial pathology in canine mucopolysaccharidosis-I and response to therapy. *Lab. Invest.* 91, 665-674.
- Malaeb S.N., Sadowska G.B., Stonestreet B.S. (2007): Effects of maternal treatment with corticosteroids on tight junction protein expression in the cerebral cortex of the ovine fetus with and without exposure to in utero brain ischemia. *Brain Res.* 1160:11-19.
- Martin H.E., Stewart F.W. (1935): Spindle cell epidermoid carcinoma. *Am. J. Cancer.* 24, 273-297.
- Matthiev R. (2004): Tissue microarrays in histopathology. *The Biomedical Scientist* 1279-1284.
- McClane B.A., Hanna P.C., Wnek A.P. (1988): *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Microb. Pathogen.* 4. 317–323.
- Mentzel T., Kutzner H. (2005): Reticular and plexiform perineurioma: clinicopathological and immunohistochemical analysis of two cases and review of perineurial neoplasms of skin and soft tissues. *Virchows. Arch.* 447, 677-682.
- Michl P., Buchholz M., Rolke M., Kunsch S., Löhr M., McClane B., Tsukita S., Leder G., Adler G., Gress T.M. (2001): Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterol.* 121, 678-684.
- Miettinen M., Sarlomo-Rikala M., Wang ZF. (2011): Claudin-5 as an immunohistochemical marker for angiosarcoma and hemangioendotheliomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 12, 1848-1856.
- Miwa N., Furuse M., Tsukita S., Niikawa N., Nakamura Y., Furukawa Y. (2000): Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* 12. 469-476.
- Miyamoto K., Kusumi T., Sato F., Kawasaki H., Shibata S., Ohashi M., Hakamada K., Sasaki M., Kijima H. (2008): Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed. Res.* 29, 71-76.
- Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. (1999): Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 147, 185-194.
- Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S., Miyachi, Y. (2003): Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Experim. Derm.* 12, 289-295.
- Morohashi S., Kusumi T., Sato F., Odagiri H., Chiba H., Yoshihara S., Hakamada K., Sasaki M., Kijima H. (2007): Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 20, 139-143.
- Mullin J.M. (1997): Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J. Exp. Zool.* 279, 484-489.

Németh Zs., Szász M.A., Tátrai P., Németh J., Gyórfy H., Somorác Á., Szíjártó A., Kiss A., Schaff Zs. (2009): Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 113-121.

Ohta H., Adachi H., Takiguchi M., Inaba M. (2006): Restricted localization of claudin-16 at the tight junction in the thick ascending limb of Henle's loop together with claudins 3, 4, and 10 in bovine nephrons. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 453-463

Ohta H., Yamaguchi T., Rajapakshage B.K., Murakami M., Sasaki N., Nakamura K., Hwang S.J., Yamasaki M., Takiguchi M. (2011): Expression and subcellular localization of apical junction proteins in canine duodenal and colonic mucosa. *Am. J. Vet. Res.* 72, 1046-1051.

Paku S., Döme B. (2006): A tumorindukált angiogenezis formái. *Orvosképzés.* 3. 185-192.

Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Johnson G.F. (1977): Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet. Pathol.* 14, 547-555.

Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H., Johnson G.F. (1981): Canine hepatocellular carcinoma. *Vet. Pathol.* 18, 427-438.

Piña-Oviedo S., Ortiz-Hidalgo C. (2008): The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv. Anat. Pathol.* 15, 147-164.

Prat A., Parker J.S., Karginova O., Fan C., Livasy C., Herschkowitz J.I., He X., Perou C.M. (2010): Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68.

Rahner C., Mitic L.L., Anderson J.M. (2001): Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterol.* 120, 411-422.

Rajaram V., Brat D.J., Perry A. (2004): Anaplastic meningioma versus meningeal hemangiopericytoma: immunohistochemical and genetic markers. *Hum. Pathol.* 35, 1413-1418.

Ramos-Vara J.A. (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42, 405-426.

Ramos-Vara J.A., Miller M.A., Johnson G.C. (2001): Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. *Vet. Pathol.* 38, 636-643.

Ramos-Vara J.A., Miller M.A., Gilbreath E., Patterson J.S. (2010): Immunohistochemical detection of CD34, E-cadherin, claudin-1, glucose Transporter 1, laminin, and protein gene product 9.5 in 28 canine and 8 feline meningiomas. *Vet. Pathol.* 47, 725-737.

Resnick M.B., Konkin T., Routhier J., Sabo E., Pricolo V.E. (2005): Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod. Pathol.* 18, 511-518.

Restucci B., De Vico G., Maiolino P. (2000): Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumours by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 37, 297-300.

Rothuizen J., Bunch S.E., Charles J.A., Cullen J.M., Desmet V.J., Szatmári V., Twedt D.C., van den Ingh T.S.G.A.M., van Winkle T.J., Washabau R.J. (2006): WSAVA Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease. Saunders Elsevier, 45-60.

Rutteman G.R., Withrow S.J., MacEwen E.G. (2001): Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, MacEwen BR (eds) Small animal clinical oncology. Saunders, Philadelphia, 455-477.

Saitoh M., Kurashige Y., Nishimura M., Yamazaki M., Igarashi S., Kaku T., Abiko Y. (2009): Expression of claudin-4 and -7 in porcine gingival junctional epithelium. *Med. Mol. Morphol.* 42, 212-215.

Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T., Tsukita S. (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* 141, 397-408.

Saitoh M., Kurashige Y., Nishimura M., Yamazaki M., Igarashi S., Kaku T., Abiko Y. (2009): Expression of claudin-4 and -7 in porcine gingival junctional epithelium. *Med. Mol. Morphol.* 42, 212-215.

Samuelson D.A. (2007): Textbook of veterinary histology. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 358-366.

Sarrió D., Rodríguez-Pinilla S.M., Hardisson D., Cano A., Moreno-Bueno G., Palacios J. (2008): Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68, 989-997.

Sato K., Ueda Y., Miwa S., Yokogawa A., Ozaki M., Katsuda S. (2008): Low-grade malignant soft-tissue perineurioma: interphase fluorescence in situ hybridization. *Pathol. Int.* 58, 718-722.

Satterfield M.C., Dunlap K.A., Hayashi K., Burghardt R.C., Spencer T.E., Bazer F.W. (2007): Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinol.* 148, 3922-3931.

Sawamoto O., Yamate J., Kuwamura M., Hagiwara R., Kurisu K.J. (1999): A canine peripheral nerve sheath tumor including peripheral nerve fibers. *Vet. Med. Sci.* 61, 1335-1338.

Schaffer, E., Schieffer, B. (1968): Incidence and types of canine rectal carcinomas. *J. Small Anim. Pract.* 9, 491-595.

Schuetz A.N., Rubin B.P., Goldblum J.R., Shehata B., Weiss S.W., Liu W., Wick M.R., Folpe A.L. (2005): Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod. Pathol.* 18, 1403-1410.

Silverberg S.G. (1971): Carcinoma arising in adenomatous polyps of the rectum in a dog. *Dis. Colon Rectum* 14, 191-194.

Singh A., Mishra A.K., Ylaya K., Hewitt S.M., Sharma K.C., Saxena S. (2011): Wilms Tumor-1, claudin-1 and ezrin are useful immunohistochemical markers that help to distinguish schwannoma from fibroblastic meningioma. *Pathol. Oncol. Res. (Közlésre elfogadva)*

- Sheehan G.M., Kallakury B.V.S., Sheehan C.E., Fisher H.A.G., Kaufman Jr. R.P., Ross J.S. (2007): Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Human Pathol.* 38, 564–569.
- Smith A.N. (2003): Hemangiosarcoma in dogs and cats. In: *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice, Advances in Medical Oncology*. W.B. Saunders Co, Philadelphia, 533-552.
- Smith M.E., Awasthi R., O'Shaughnessy S., Fisher C. (2005): Evaluation of perineurial differentiation in epithelioid sarcoma. *Histopathol.* 47, 575-581.
- Soini Y. (2004): Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum. Pathol.* 35, 1531-1536.
- Soini Y. (2005): Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathol.* 46, 551-560.
- Soini Y., Tommola S., Helin H., Martikainen P. (2006): Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch.* 448, 52-58.
- Stampley A.R., Swayne D.E., Prasse K.W. (1987): Meningeal carcinomatosis secondary to a colonic signet-ring cell carcinoma in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 23, 655-658.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery J.P., Sleeman J.P. (2006): Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131-142.
- Thway K., Fisher C., Debiec-Rychter M., Calonje E. (2009): Claudin-1 is expressed in perineurioma-like low-grade fibromyxoid sarcoma. *Hum. Pathol.* 40, 1586-1590.
- Thway K., Robertson D., Thway Y., Fisher C. (2011): Dedifferentiated liposarcoma with meningotheial-like whorls, metaplastic bone formation, and CDK4, MDM2, and p16 expression: a morphologic and immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 356-363.
- Tímár J., Döme B., Fazekas K., Janovics Á., Paku S. (2001): Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol. Oncol. Res.* 7, 85-95.
- Tőkés A.M., Kulka J., Paku S., Szik A., Paska C., Novak P.K., Szilak L., Kiss A., Bogi K., Schaff Zs. (2005): Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* 7, 296-305.
- Trigo F.J., Thompson H., Breeze R., Nash A.S. (1982): The pathology of liver tumours in the dog. *J. Comp. Pathol.* 92, 21-37.
- Truong L.D., Shen S.S. (2011): Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 135, 92-109.
- Tsukita S., Furuse M. (1999): Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends. Cell Biol.* 9, 268-273.
- Tsukita S., Furuse M., Itoh M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285-293.

Tsukita S., Furuse M. (2002): Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 531-536.

Turunen M., Talvensaaari-Mattila A., Soini Y., Santala M. (2009): Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 29, 5185-5189.

Van Itallie C.M., Fanning A.S., Anderson J.M. (2003): Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285, 1078-1084.

Von Beust B.R., Suter M.M., Summer B.A. (1988): Factor VIII related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 25, 251-255.

Wan W.H., Fortuna M.B., Furmanski P. (1987): A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J. Immunol. Methods* 103, 121-129.

Weng X.H., Beyenbach K.W., Quaroni A. (2005): Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, 705-717.

Wludarski S.C., Leal I.I., Queiroz H.F., da Cunha T.M., Bacchi C.E. (2011): Ileal perineurioma as a cause of intussusception. *Sao Paulo Med. J.* 129, 51-53.

Yoshida T., Kinugasa T., Akagi Y., Kawahara A., Romeo K., Shiratsuchi I., Ryu Y., Gotanda Y., Shirouzu K. (2011): Decreased expression of claudin-1 in rectal cancer: a factor for recurrence and poor prognosis. *Anticancer. Res.* 31, 2517-2525.

10. A doktori kutatás eredményeinek közlései

10.1. A témában megjelent tudományos publikációk

1. **Jakab Cs.**, Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Pekár M., Keszthelyi R., Meczker Á., Kulka J. (2007): Szöveti multiblokk (tissue micro-array-TMA) technika az állatorvosi onkopatológiai vizsgálatokban. *Magy. Állatorv. Lapja* 129, 310-315. **IF: 0.104***
2. **Jakab Cs.**, Dudás Gy.Z., Horváth É., Tóth A., Halász J. (2008): A májbiopsziás vizsgálatok jelentősége a kisállatpraxisban. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 39-47. **IF: 0.104***
3. **Jakab Cs.**, Halász J., Szász A.M., Batmunkh E., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2008): Expression and localistaion of claudin-1,-2, -3, -4, -5, -7, and -10 proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Vet. Hung.* 56, 341-352. **IF: 0.624***
4. **Jakab Cs.**, Halász J., A Kiss, Schaff Zs., Szász A.M., Rusvai M., Zs Abonyi T.Zs., Kulka J. (2008): Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative claudin-5 molecule immunohistochemistry. *Acta Vet. Hung.* 56, 495-510. **IF: 0.624***
5. **Jakab Cs.**, Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Pekár M., Szabára Á., Kulka J. (2008): Claudin-5 fehérje expressziójának vizsgálata kutyák emlőmirigyének és emlőcarcinomáinak nyirokér endothelsejtjein immunhisztokémiai módszerrel. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 296-303. **IF: 0.104***
6. **Jakab Cs.**, Halász J., Kiss A., Szász A.M, Schaff Zs., Rusvai M., Kulka J. (2008): Külső pozitív kontrollok alkalmazása claudin-expressziós immunhisztokémiai vizsgálatokban. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 433-438. **IF: 0.104***
7. **Jakab Cs.**, Halász J., Szász A.M., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2008): Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 proteins in benign and malignant canine mammary gland epithelial tumours. *J. Comp. Pathol.* 139, 238-245. **IF: 1.494***
8. **Jakab Cs.**, Halász J., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2009): Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol. Histopathol.* 24, 801-813. **IF: 2.404***
9. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Szabó Z., Szabára Á., Kulka J. (2009): Expression of claudin-4 molecule in benign and malignant canine hepatoid gland tumours. *Acta Vet. Hung.* 57, 463-475. **IF: 0.642***
10. **Jakab Cs.**, Szász A.M., Kiss A., Schaff Zs., Rusvai M., Szabára Á., Kulka J. (2009): Claudin-expressziós vizsgálatok kutyák solid emlőrákjának tüdőáttéteiben. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 33-41. **IF: 0.2***
11. **Jakab Cs.**, Schaff Zs., Kulka J., Szász A.M., Demeter Z., Gálfi P., Rusvai M. (2009): Angiogenesis. Irodalmi áttekintés 1. rész. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 373-380. **IF: 0.2***
12. **Jakab Cs.**, Balka Gy., Rusvai M., Gálfi P., Stark R., Kulka J. (2009): Orsósejtes haemangioma diagnózisa claudin-5 marker segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 402-407. **IF: 0.2***
13. **Jakab Cs.**, Schaff Zs., Kulka J., Szász A.M., Demeter Z., Gálfi P., Rusvai M. (2009): Angiogenesis. Irodalmi áttekintés 2. rész. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 417-426. **IF: 0.2***
14. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2009): A gyulladós angiogenezis immunhisztokémiai vizsgálata claudin-5, CD31, α -SMA és calponin segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 477-482. **IF: 0.2***

15. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Szabó Z., Kulka J., Tátrai P. (2009): Claudin-expressziós vizsgálatok kutyák intakt emlőmirigyében konfokális mikroszkóppal. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 552-556. **IF: 0.2***
16. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Szabó Z., Csébi P., Szabára Á., Kulka J. (2009): Kutya lipidizált emlőrák nyirokérinváziójának vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 610-619. **IF: 0.2***
17. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Szabó Z., Csébi P., Kulka J., Tátrai P. (2009): Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában konfokális mikroszkóppal. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 659-668. **IF: 0.2***
18. **Jakab Cs.**, Szász A. M., Kulka J., Rusvai M., Németh T., Gálfi P. (2009): Cutaneous mast cell tumour within lipoma in a boxer. *Acta Vet. Hung.* 57, 263-274. **IF: 0.642***
19. **Jakab Cs.**, Szász A.M., Kulka J., Baska F., Rusvai M., Gálfi P., Németh T. (2009): Secondary tumoural valvulopathy in dog. Case report. *Acta Vet. Hung.* 57, 63-67. **IF: 0.642***
20. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Mándoki M., Demeter Z., Szabó Z., Kulka J. (2010): Expression of claudin-5 molecule in hepatoid gland biopses. *Vet. Dermatol.* 21, 276 -281. **IF: 1.647***
21. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Szabó Z., Szabára Á., Kulka J. (2010): Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 proteins in low grade colorectal carcinoma of canines. *Histol. Histopathol.* 25, 55-62. **IF: 2.502***
22. **Jakab Cs.**, Kiss A., Schaff Zs., Szabó Z., Rusvai M., Gálfi P., Szabára Á., Sterczér Á., Kulka J. (2010): Claudin-7 protein differentiates canine cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Histol. Histopathol.* 25, 857-864. **IF: 2.502***
23. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2010): Expression of claudin-7 molecule in canine hepatoid gland tumors. *Acta Vet. Brno* 79, 127-133. **IF: 0.534***
24. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Bíró N., Szabó Z., Gálfi P., Kulka J. (2010): Claudin-5 positive angioleiomyoma in the uterus of a degu (*Octodon degus*). *Acta Vet. Hung.* 58, 331-340. **IF: 1,264***
25. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Szabára Á., Szabó Z., Kulka J. (2010): Immunohistochemical detection of arteriolar hyperplasia in canine liver biopsy samples by claudin-5 marker. *Acta Vet. Hung.* 58, 423-430. **IF: 1.264***
26. **Jakab Cs.**, Németh T., Jerzsele Á., Horváth Á., ifj. Horváth L. (2010). Angiolipoma diagnózisa claudin-5 marker segítségével kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 145-150. **IF: 0.3***
27. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Balka Gy., Gálfi P., Sterczér Á. (2010): Klaudinexpressziós vizsgálatok kutyák májszövetében. *Immunhisztokémiai tanulmány. 1. rész.* Klaudin-1, -3 és -4 expresszió kutyák egészséges májszövetében. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 413-417. **IF: 0.3***
28. **Jakab Cs.**, Gálfi P., Jerzsele Á., Balogh L., Thuróczy J., Szász V., Sterczér Á. (2010): Klaudin-1 expressziós vizsgálatok kutyák cirumanalis mirigyeiben. *Immunhisztokémiai tanulmány. Expression of claudin 1 molecule in canine circumanal gland tumours. Immunohistochemical study.* *Magy. Állatorv. Lapja*, 132, 591-600. **IF: 0.3***

29. **Jakab Cs.**, Mandoki M., Szász V. (2010): Klaudin-5 és CD31 endothelialis markerrel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok hullámos papagáj (*Melopsittacus undulatus*) ép artériái, kapillárisai és vénái endothelsejtjeiben. Immunhisztokémiai tanulmány. *Immunohistochemical analysis of endothelial cells of the intact arteries, capillaries and veins from buderigar (Melopsittacus undulatus) by claudin-5 and CD31 endothelial markers. Immunohistochemical study.* Magy. Állatorv. Lapja 132, 613-618. **IF: 0.3***
30. **Jakab Cs.**, Szabára Á., Jakab L. (2010): Arteriovenosus haemangioma kutyanyelvben. Onkológiai eseteleírás. Magy. Állatorv. Lapja 132, 722-727. **IF: 0.3***
31. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Gálfi P., Halász J., Kulka J. (2011): Expression of claudin-5 in canine pancreatic acinar cell carcinoma – An immunohistochemical study. *Acta Vet. Hung.* 59, 89-100. **IF: 1,264***
32. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Szabó Z., Gálfi P., Marosán M., Kulka J., Gál J. (2011): First occurrence of claudin-7 positive synchronous spontaneous intrahepatic cholangiocarcinoma, adenocarcinoma and adenomas of the gallbladder in a Bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *Acta Vet. Hung.* 59, 101-114. **IF: 1,264***
33. **Jakab Cs.** (2011): Klaudin-5 pozitív in situ haemangiosarcoma kutyában. Kórszövettani és immunhisztokémiai esettanulmány. Magy. Állatorv. Lapja 133, 280-284. **IF: 0.3***
34. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Demeter Z., Gálfi P., Szabó Z., Kulka J. (2011): Expression of claudin-4 molecule in canine exocrine pancreatic acinar cell carcinomas. *Histol. Histopathol.* 26, 1121-1126. **IF: 2.502 ***
35. Seregi A., **Jakab Cs.**, Manczur F. (2008): A mellékvesekéreg egyoldali elváltozásainak diagnosztikája és sebészi terápiája kutyában. Magy. Állatorv. Lapja 130, 521-530. **IF: 0.088***
36. Gál J., **Jakab Cs.**, Szabó Z., Pazár P., Psáder R., Roeber F., Hegyi Á., Lefler K.K., Farkas B., Mándoki M. (2009): Haemangioma in the oesophagus of a Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*). *Acta Vet. Hung.* 57, 477-484. **IF: 0.642***
37. Gál J., Mándoki M., Sátorhelyi T., **Jakab Cs.** (2010): *In situ* complex adenocarcinoma on the femoral areae of the hind limb in an Asian Leaf Turtle (*Cyclemys dentata*). *Acta Vet. Hung.* 58, 431-440. **IF: 1.264***
38. Kovács K., **Jakab Cs.**, Szász A.M. (2009): Laser-assisted removal of a feline eosinophilic granuloma from the back of the tongue. A case report. *Acta Vet. Hung.* 57, 417-426. **IF: 0.642***
39. Légrády A. **Jakab Cs.**, Rusvai M., Balka Gy., Kulka J. (2010): Kutya klaudin-5 pozitív perianalis collisiós vegyes bődagánata. Onkológiai eset ismertetése. Magy. Állatorv. Lapja 132, 461-465. **IF: 0.3***
40. Szász A.M., Tőkes A.M., Micsinai M., Krenács T., **Jakab Cs.**, Lukács L., Németh Zs., Baranyai Zs., Dede K., Madaras L., Kulka J. (2011): Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin. Exp. Metast.* 28, 55-63. **IF: 4.113***
41. Csébi P., Németh T., **Jakab Cs.**, Patonai A., Garamvölgyi R., Manczur F., Spitzner A., Arany-Tóth A., Kóbori L. (2011): Experimental results of using autologous rectus fascia sheath for venous patch grafts in dogs. *Acta Vet. Hung.* 59, 373-384. **IF: 1.264***

42. **Jakab Cs.**, Gálfi P., Jerzsele Á., Szabó Z., Németh T., Sterczer Á., Rusvai M., Ózsváry L. (2011e): Expression of claudin-1 in canine peripheral nerve sheath tumors and perivascular wall tumours. *Histol. Histopathol.* (Közlésre elfogadva) **IF: 2.502***

IF: 34.446

10.2. A témában tartott előadások

1. **Jakab Cs.**: Claudin-expressziós vizsgálatok kutyák intakt és daganatos emlőmirigyeiben. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2008. január. 24.)

2. **Jakab Cs.**: Claudin-5 protein expresszió alapuló mikroérsűrűség (Microvessel density) vizsgálatok kutyák emlőmirigy daganataiban. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2008. január. 24.)

3. **Jakab Cs.**, Kiss A., Schaff Zs, Rusvai M., Gálfi P, Kulka J.: Claudinológiai vizsgálatok állati szövteken (Fiatal pathologusok fóruma, SOTE, I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézet, Budapest, 2008. június 13.)

4. **Jakab Cs.**: A claudin-5 protein szerepe a kutyák haemangiosarcomájának differenciál-diagnosztikájában. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2009. január 24.)

5. **Jakab Cs.**: Az immunhisztokémia segítő szerepe a kisállatpraxisban. (Kisállat szakállatorvosi postgraduális képzés, 2009, Budapest, SZIE ÁOTK)

6. **Jakab Cs.**, Kiss A., Schaff Zs., Szabó Z., Rusvai M., Gálfi P., Szabára Á., Sterczer Á. és Kulka J.: Claudin-7 új immunhisztokémiai marker a kutyák cholangiocarcinomájának és hepatocellularis carcinomájának differenciál diagnosztikájában. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2010. január. 28.)

7. **Jakab Cs.**, Rusvai M. és Demeter Z.: Claudin-1-el végzett immunhisztokémiai vizsgálatok kutyák orsósejtes daganataiban. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2011. január. 27.)

8. **Jakab Cs.**, Oppe N. és Rusvai M.: Claudin-5 pozitív mucin termelő cholangiocellularis carcinoma libák májában. (Akadémiai beszámoló, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi bizottsága, 2012. január. 19.)

10.3. A témában tartott poszterek nemzetközi konferenciákon

Jakab Cs., Kiss A., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. and Fekete S.Gy.: Claudin-5 expression examinations of hemangiosarcoma in canines. I. KÖZÉP- ÉS KELET-EURÓPAI LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI KONFERENCIA (CEELA-2009) (Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Budapest1078 Budapest, István utca 2. AULA, 2009. május 23.)

11. Egyéb közlemények referált lapokban

Magyar Állatorvosok Lapja

1. Gál J., Mándoki M., **Jakab Cs.**, Kiss K., Radványi Sz. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* okozta hurutos-gennyes tüdőgyulladás zöld fapitonban [*Chondropyton (Morelia) viridis*]. Magy. Állatorv. Lapja 124, 739-741. **IF: 0.051***
2. Antal Á., Gál J., **Jakab Cs.** (2003): Kígyók fejlődési rendellenességei. Magy. Állatorv. Lapja 125, 233-238. **IF: 0.051***
3. Gál J., Mándoki M., **Jakab Cs.**, Sós E., Marosán M. (2003): Entamoebosis zöld leguánban (*Iguana iguana*). Magy. Állatorv. Lapja 125, 422-424. **IF: 0.051***
4. **Jakab Cs.**, Gál J., Kovács R.E. (2004): Gemistocytás astrocytoma esete 7 hónapos macskában. Magy. Állatorv. Lapja 126, 487-492. **IF: 0.158***
5. **Jakab Cs.**, Csébi P., Kovács R.E. (2004): Negyedik agykamrai plexus chorioideus papilloma esete tibeti masztiffban. Magy. Állatorv. Lapja 126, 743-750. **IF: 0.158***
6. Gál J., Vincze Z., **Jakab Cs.**, Ari Cs., Lefler K.K. (2005): Multiplex nyeles fibroma homoki tigriscápa (*Carcharias (Odontaspis) taurus*) állkapcsán. Magy. Állatorv. Lapja 127, 242-246. **IF: 0.114***
7. Pétsch M., **Jakab Cs.**, Balka Gy., Vörös K., Manczur F. (2005): Glomerulonephritis következtében kialakult pulmonalis thromboembolia kutyában. Magy. Állatorv. Lapja 127, 428-436. **IF: 0.114***
8. **Jakab Cs.**, Bánky Á., Kincses K., Balka Gy., Demeter Z. (2006): A kutyák bőrdaganatainak előfordulása és hisztopatológiai vizsgálata. Magy. Állatorv. Lapja 128, 140-150. **IF: 0.155***
9. Gál J., Szabó Gy., **Jakab Cs.**, Géczy Cs., Sátorhelyi T. (2006): Mór teknős (*Testudo graeca*) mellékpajzsmiriyében kialakuló adenocarcinoma metaplasziás laphámzsigetekkel. Magy. Állatorv. Lapja 128, 632-637. **IF: 0.155***
10. **Jakab Cs.**, Izing S., Veres S., Talpag B., Molnár J., Kutasi O. (2007): A lovak daganatos és nem daganatos bőrelváltozásainak előfordulása és hisztopatológiája – 1. rész. Sarcoid. Magy. Állatorv. Lapja 129, 515-524. **IF: 0.104***
11. **Jakab Cs.**, Fehér M., Kisgergely J., Szabára Á., Szabó Gy. (2007): Anaplasticus emlőcarcinoma és bőr mastocytoma együttes előfordulása boxer kutyában. Magy. Állatorv. Lapja 129, 623-628. **IF: 0.104***
12. **Jakab Cs.**, Veres S., Izing S., Szabó Gy. (2008): A lovak daganatos és nem daganatos bőrelváltozásainak előfordulása és hisztopatológiája – 2. rész. Immunhisztokémiai vizsgálatok sarcoidos mintákon. Magy. Állatorv. Lapja 130, 67-75. **IF: 0.088***
13. **Jakab Cs.**, Arany-Tóth A., Csébi P., Szász A.M., Rusvai M., Gálfi P., Kulka J. (2008): Nervus hypoglossusból kiinduló rosszindulatú perifériás ideghüvely daganat (MPNST) esete kutyában. Magy. Állatorv. Lapja 130, 671-679. **IF: 0.088***
14. **Jakab Cs.**, Szabára Á., Rohn E., Molnár J., Rusvai M. (2008): Ló villámcsapás okozta balesete. Magy. Állatorv. Lapja 130, 707-717. **IF: 0.104***

15. **Jakab Cs.**, Szentgáli Zs., Psáder R., Szász A.M., ifj. Horváth L., Horváth Á., Rusvai M., Gálfi P. (2008): Laryngealis chondrolipoma esete kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 130, 733-740. **IF: 0.088***
16. Heteyi Cs., **Jakab Cs.**, Mándoki M., Németh T. (2009): Scirrhusus, idült eosinophilsejtes gyomorgyulladás 7 éves, hím, keverék kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 91-100. **IF: 0.2***
17. **Jakab Cs.**, Csébi P., Szász A.M., Szabó Z., Patónai A. (2009): Krónikus, óriásredős gyomorgyulladás kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 601-609. **IF: 0.2***
18. Balogh B., **Jakab Cs.**, Demeter Z. (2009): Szájüregi, tüdő és bőr daganat egyidejű előfordulása boxer kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, **22-31**. **IF: 0.2***
19. Demeter Z., Palade E.A., **Jakab Cs.**, Hornyák Á., Rusvai M., Mándoki M. (2010): Végzetes kimenetelű macska parvovírus járvány egy kisszámú oroszlán (*Panthera leo*) csoportban Magyarországon. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 32-38. **IF: 0.3***
20. Szabára Á., **Jakab Cs.** (2010): A kutyák emlődaganatainak immunhisztokémiai vizsgálata cytokeratin 14 segítségével. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 85-92. **IF: 0.3***
21. Balogh B., **Jakab Cs.**, Demeter Z. (2010): Cutan lymphoma és meningeoma szinkron előfordulása macskában. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 101-113. **IF: 0.3***
22. **Jakab Cs.**, Jerzsele Á., Szabára Á. (2010): A kutyák emlőrákjának őrszem (sentinel) nyirokcsomó áttéteinek vizsgálata pancytokeratin segítségével. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 163-170. **IF: 0.3***
23. Stark R., Gazsi N., Földvári N.Cs., **Jakab Cs.** (2010): Az epehólyag cisztás-mucinosusos hyperplasiája kutyában. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 176-185. **IF: 0.3***
24. **Jakab Cs.**, Szabára Á., Rusvai M., Kulka J. (2010): Faggyúmirigy irányú differenciálódás jeleit mutató szimplex emlőadenoma kutyában. Esetismertetés. *Simple mammary adenoma with sebaceous differentiation in a dog. Case report.* *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 265-271. **IF: 0.3***
25. Csébi P., **Jakab Cs.**, Ipolyi T., Arany T.A., Sére V. (2010): Kutya *Cryptococcus neoformans* okozta meningitise. Klinikopatológiai eset feldolgozása. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 341-348. **IF: 0.3***
26. Oppe N., **Jakab Cs.**, Szabó Z., Thuróczy J., Perge E., Balogh L., Gál J. (2010): Immunhisztokémiai vizsgálatok vadászgörényből (*Mustela putorius furo*) származó szövetekben. 1. rész. Immunhisztokémiai vizsgálatok vimentinnel. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 418-424. **IF: 0.3***
27. Szabó L., Balka Gy., **Jakab Cs.** (2010): Aortatest (glomus caroticum) chemodectoma, bilaterális heredaganat és cholangiocellularis cystadenoma együttes előfordulása idős kutyában. Onkológiai esetismertetés. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 537-544. **IF: 0.3***
28. Tóth P., **Jakab Cs.**, Balka Gy., Izing S. (2010): Esetek a Kórbonctani Múzeumból. 1. A pataporcok elcsontosodása. *Magy. Állatorv. Lapja* 132, 635-639. **IF: 0.3***
29. **Jakab Cs.**, Tóth P., Izing S. (2011): Granulosasejtes petefészekdaganat lovakban. Irodalmi áttekintés. *Magy. Állatorv. Lapja* 133, 195-199. **IF: 0.3***
30. Balka Gy., Heteyi Cs., **Jakab Cs.** (2011): Házimacska liliommérgezése. Esetismertetés. *Magy. Állatorv. Lapja* 133, 290-294. **IF: 0.3***

31. Szabára Á., **Jakab Cs.**, Mándoki M., Gál J. (2011): Nyelvgyulladás dzsungáriai törpehőrcsögbe (*Phodopus sungorus*). Patológiai eset ismertetése. Magy. Állatorv. Lapja 133, 295-298. **IF: 0.3***
32. **Jakab Cs.**, Kutasi P., Dunay M.P. (2011): Kutyák száj- és garatüregi daganatainak gyakorisága-retrospektív vizsgálata. Magy. Állatorv. Lapja 133, 353-364. **IF: 0.3***
33. **Jakab Cs.**, Gyöngy F., Mándoki M., Majoros G. (2011): Setariosis okozta hashártyagyulladás és helyi perineuritis szarvasmarhában. Esetismertetés Magy. Állatorv. Lapja 133, 387-395. **IF: 0.3***
34. Bálint K., Balogh L., Pöstényi Z., Kovács H.V., Polyák A., **Jakab Cs.**, Thuróczy J., Kollár E., Müller L., Andócs G., Jánoki G., Jánoki Gy., Szász A. (2011): A kutyák malignus melanomájának diagnosztikai és terápiás kérései. 2. rész. Magy. Állatorv. Lapja 133, 424-431. **IF: 0.3***
35. **Jakab Cs.**, Mándoki M., Szabára Á., Kollár E., Thuróczy J. (2011): Faggyúmirigy irányú differenciálódást mutató komplex emlőmirigy-carcinoma cocker spaniel kutyában. Kórszövettani esetismertetés. *Mammary complex carcinoma with sebaceous differentiation in a Cocker Spaniel. Histopathological case report.* Magy. Állatorv. Lapja 133, 481-488. **IF: 0.3***
36. **Jakab Cs.**, Mándoki M., Kutasi P., Dunay Miklós P., Németh T. (2011): Garatüregi nyeles angiofibrolipoma Magyar vizslában. Esetismertetés Magy. Állatorv. Lapja 133, 533-539. **IF: 0.3***
37. Csébi P., Balogh L., **Jakab Cs.**, Ipolyi T., Molnár P., Arany Tóth A. (2011): Intracranialis meningeoma macskában. Klinikopatológiai esetismertetés Magy. Állatorv. Lapja 133, 727-734. **IF: 0.3***
38. Hajdú P., Nagy B., Gál J., **Jakab Cs.** (2012): Generalizált áttétet képező, elsődleges méhmyxosarcoma esete házinyúlban. Magy. Állatorv. Lapja 134, 89-96. **IF: 0.3***

Acta Veterinaria Hungarica

39. Rita G., Petrási Zs., Hevesi Á., **Jakab Cs.**, Vajda Zs., Gobner P., Repa I. (2006): Magnetic resonance imaging technique for the examination of canine mammary tumours. *Acta Vet. Hung.* 54, 143-159. **IF: 0.541***
40. Gál J. **Jakab Cs.**, Balogh B., Tóth T., Farkas B. (2007): First occurrence of periosteal chondroma (juxtacortical chondroma) in *Uromastyx Maliensis* (Reptilia:Sauria: Agamidae) *Acta Vet. Hung.* 55, 327-331. **IF: 0.474***
41. Csébi P., **Jakab Cs.**, Jánosi K., Sellyei B., Ipolyi T., Szabó Z., Arany T.A., Németh T. (2010): Vertebral osteomyelitis and meningomyelitis caused by *Pasteurella canis* in a dog – Clinicopathological case report. *Acta Vet. Hung.* 58, 413-421. **IF: 1.264***
42. Becskei Zs., Aleksić-Kovačević S., Rusvai M., Balka Gy., **Jakab Cs.**, Petrović T., Knežević M. (2010): Distribution of porcine circovirus 2 Cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Vet. Hung.* 58, 483-498. **IF: 1.264***
43. Sterczer Á., Németh T., Mándoki M., Gálfi P., **Jakab Cs.** (2011): A case of synchronous hepatocellular carcinoma and aortic body chemodectoma in a dog. *Acta Vet. Hung.* 59, 115-123. **IF: 1.264***

44. Balka Gy., **Jakab Cs.**, Szabó J. (2011): Endometrial adenoacanthoma in a dog. Acta Vet. Hung. 59, 225-236. **IF: 1.264***

45. Demeter Z., Palade E.A., Balogh É., **Jakab Cs.**, Farkas R., Tánzos B., Hornok S. (2011): First report on small babesia-like morphology of *Babesia canis*. Acta Vet. Hung. 59, 427-432. **IF: 1.264***

46. **Jakab Cs.**, Balka Gy. (2012): First occurrence of a malignant collision skin tumour with malignant melanoma and anaplastic sarcoma components in a dog. Acta Vet. Hung. 60. (Közlésre elfogadva) **IF: 1.264***

Egyéb külföldi cikkek

47. Andócs G., Helmu R., Balogh L., Fonyad L., **Jakab Cs.**, Szasz A. (2009): Strong synergy of heat and modulated electromagnetic field in tumor cell killing. Strahlentherap. Onkol. 185, 120-126. **IF: 3.35***

48. Palade E.A., Kisary J., Benyeda Zs., Mándoki M., Balka Gy., **Jakab Cs.**, Végh B., Demeter Z., Rusvai M. (2011): Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. Avian Pathol. 40, 191-197. **IF: 1.967***

49. Erzsébet P.-G., Edina Cs.-N., Krisztina Sz., **Csaba J.**, Péter G. (2011): Acute oxidative stress affects IL-8 and TNF- α expression in IPEC-J2 porcine epithelial cells. Inflamm. (Közlésre elfogadva) **IF: 1.77***

50. A. Jerzsele, K. Szeker, R. Csizinszky, **Cs. Jakab**, J J. Mallo, P. Galfi (2011): Efficacy of protected sodium butyrate, protected essential oils, their combination and *B. amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. Poultry Science, (Közlésre elfogadva) **IF: 1.582***

IF: 29.182

Össz IF: 34.446+ 29.182 = 63.628

12. Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastruktúrális feltételeinek maradéktalan biztosításában, valamint a Tanszékünkön tapasztalható kollegiális, baráti légkör megteremtéséért szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Rusvai Miklós tanszékvezetőnek.

Köszönettel tartozom Dr. Halász Judit human patológus kolléganőnek, aki 2008-ban javasolta, hogy végezzek immunhisztokémiai vizsgálatokat az akkori SOTE II. számú Pathologiai Intézetének Immunhisztokémiai Laboratóriumában validált, a kutatásaikban bevált, humanizált anti-claudin ellenanyagokkal, kutyákból származó emlőmirigy daganatokban.

Köszönöm Prof. Schaff Zsuzsának, Dr. Kulka Janinának és Dr. Kiss Andrásnak, hogy a Semmelweis Egyetem II. számú Pathologiai Intézetében lehetőséget biztosítottak számomra, a SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék konvencionális paraffinos blokkokban archivált, kutyákból származó tumoros mintáinak immunhisztokémiai vizsgálataira.

Köszönöm Pop Renáta szövettani asszisztens lelkiismeretes, megbízható munkáját.

Külön köszönöm türelmét, fáradozásait Pekár Magdolna szövettani asszisztensnek, aki az immunhisztokémiai metszetek elkészítésének fázisaiban nyújtott kiemelkedő segítséget.

Köszönöm Prof. Vetési Ferencnek, témabizottságom tagjának, hogy a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékre kerülésemtől kezdve pártolta, és segítette munkámat.

Külön köszönöm továbbá kollégáimnak, Dr. Mándoki Mirának, Dr. Palade Alinának, Dr. Gál Jánosnak, Dr. Balka Gyulának és Dr. Demeter Zoltánnak hogy a kutatáshoz szükséges mintagyűjtés céljából végzett munkáim során segítettek.

Köszönöm Családom, feleségem, gyermekeim türelmét és azt, hogy támogatásukkal, gondoskodásukkal lehetővé tették számomra, hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.

Köszönöm Szüleim állatorvosi pályám kezdetétől tanúsított, erőteljes támogatását.