

SZENT ISTVÁN EGYETEM ÁLLATORVOS-
TUDOMÁNYI KAR
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

**Claudin-5 alapú immunhisztokémiai vizsgálatok lovak
haemangiosarcomájában**

Készítette: Molnár Szabina

Témavezető: Dr. Jakab Csaba Ph.D.

SZIE-ÁOTK, egyetemi tanársegéd

Budapest



2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. fejezet: Bevezetés	3
2. fejezet: Irodalmi áttekintés	4
2.1. Immunhisztokémia jelentősége a patológiában	4
2.1.1. Az immunhisztokémia története	4
2.1.2. Az immunhisztokémia módszer	4
2.1.3. Az immunhisztokémia célja	5
2.1.4. Az immunhisztokémiai eljárás algoritmus	5
2.1.5. Immunhisztokémia az állatorvosi daganatdiagnosztikában.....	5
2.1.6. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt markerek ismertetése	6
2.1.6.1. Claudinok	6
2.1.6.2. Claudin-5 marker	7
2.1.6.3. Claudin-expressziós vizsgálatok kutyán	7
2.1.7. Immunhisztokémiai vizsgálatok lovak szövetein	8
2.2. A haemangioma és haemangiosarcoma	8
2.2.1. Haemangioma	8
2.2.2. Haemangiosarcoma.....	11
3. fejezet: Anyag és módszer	13
3.1. A minták származása	13
3.2. A minták feldolgozása	13
3.3. A kórszövettani metszetek elemzése	14
4. fejezet: Eredmények	15
5. fejezet: Következtetések	20
6. fejezet: Összefoglalás	21
7. fejezet: Summary	22
8. fejezet: Irodalomjegyzék	23
9. fejezet: Köszönetnyilvánítás	26

1. FEJEZET: BEVEZETÉS

Az elmúlt években, a molekuláris onkológiai módszereknek köszönhetően, a lovak daganatos betegségeivel kapcsolatos klinikopatológiai ismereteink sokat bővültek. Ezen új ismeretanyag ellenére számos megválaszolatlan kérdéssel rendelkezünk a különböző hisztotípusú malignomák, a planocellularis carcinomák, a különböző eredetű sarcomák etiológiai, tumorprogressziós hátteréről.

A haemangiosarcoma az vérérképző szövetek rosszindulatú daganata, amely gyakori kutyákban, azonban lovakban ritkán fordul elő. A haemangiosarcoma agresszív, a környezetét mélyen infiltráló, szöveti destruktív tulajdonságú, gyors metastasisra hajlamos daganattípus. Lovakban ocularis, cutan és multicentrikus formában jelentkezhethet. Jelenleg hatásos gyógymód a visceralis forma esetében nem létezik, a bőr és a szem forma kezelése is gyakorta reménytelen.

Az immunhisztokémia közel 50 éve indult fejlődésnek és a '80-as évektől kezdve rohamléptékben fejlődött olyan magas színvonalú kutatómódszerré, hogy manapság a tumorpatológia- és diagnosztika szerves részévé vált.

A véréredetű daganatok (haemangiosarcoma, haemangioma) immunhisztokémiai diagnosztikájára endothel specifikus monoklonális (anti-claudin-5), vagy poliklonális (anti-CD31) ellenanyagokat vehetünk igénybe, amelyek segítségével egyértelműen elkülöníthetőek a nem véréredetű daganatoktól, proliferációktól.

2. FEJEZET: IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Immunhisztokémia jelentősége a patológiában

2.1.1. Az immunhisztokémia története

Az immunhisztokémia közel fél évszázados múltra tekinthet vissza, amely alatt rengeteget fejlődött technikai és szemléleti szempontból. A módszer alapközleménye *Coons és mtsai (1942)* nevéhez fűződik, akik először használtak fluoreszcens festékhez kötött antitestet *Pneumococcusok* azonosítására. A hatvanas évek második felében bevezették molekuláris vizsgálatokba a peroxidáz enzim mint jelzőanyagot használatát (*Nakane és Pierce, 1966*). A hetvenes években a peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) módszer (*Sternberger és mtsai, 1971*) fény- és elektronmikroszkópos alkalmazása, a monoklonális antitestek előállításának kidolgozása (*Köhler és Milstein, 1971*), valamint az aranykolloid (*Faulk és Teylor, 1971*) és az alkalikus foszfatáz enzim (*Mason és mtsai, 1978*) jelzőanyagként történő bevezetése révén fejlődött tovább az immunhisztokémia. A formaldehid-oldatban rögzített és paraffinba ágyazott, archivált szövetekben történő antigén kimutatás *Taylor és Burns (1974)* nevéhez fűződik. A nyolcvanas években dolgozták ki a streptavidin-biotin peroxidáz enzimkomplex (*Shi és mtsai, 1981*) és az ún. immunarany-ezüst (*IGGS, Holgate és mtsai, 1983*) módszereket. A monoklonális ellenanyag előállítás hatására ugrásszerűen megnőtt a kereslet az antitestek iránt, és a patológia nélkülözhetetlen diagnosztikai eszközévé nőtte ki magát. A kilencvenes évekre kialakultak az antitestek előállításának, tisztításának és a reagensekre vonatkozó részletes standardleírások.

2.1.2. Az immunhisztokémia módszer

Az immunhisztokémia egy speciális immunkémiai eljárás, amely a modern patológia és a tumordiagnosztika nélkülözhetetlen kutatómódszerévé vált. Segítségével a sejten belüli, a sejtmembránban, ill. az extracellularis antigének, haptének detektálhatók „in situ” a szövetekben, antigén-antitest kötődési reakció alapján. Az antigén-antitest kötődést a rendszerbe épített enzimek, fémkolloidok színes terméket eredményező katalitikus reakciójával, vagy fluorokrómok alkalmazásával teszik a fénymikroszkóposan detektálhatóvá. Az alkalmazott immunsavókat e célból jelölni kell enzimmel, fluoreszkáló színezékkel, vagy

aranykolloiddal. Használat előtt a gyártó által megadott, a savóra vonatkozó optimális hígítási és inkubálási időt figyelembe kell venni a specifikus, jól értékelhető immunfestődés elérése érdekében.

2.1.3. Az immunhisztokémia célja

Az immunhisztokémia segítségével nagy molekulatömegű vegyületeket: strukturális vagy funkcionális fehérjéket, glükoproteideket, poliszacharidokat, lipideket mutatunk ki a sejtekben vagy az extracelluláris térben a különféle megbetegedések kórisméjének pontos meghatározása céljából. Emellett alkalmasak a kórfolyamat kiterjedtségének meghatározására és a kóros sejtek biológiai jellemzőinek (szöveti eredet, reziduális tumorsejtcsoportok detektálása, apoptózis, sejtadhézió- és jelátvitel, transzmembrán transzportfolyamatok) megítélését teszik lehetővé, amelyek szoros kapcsolatban állnak a kórlefolyással és a betegség kimenetelével. A módszerrel szinte minden kimutatható, ami ellen kísérleti állatban ellenanyag termeltethető; így a hormonok, lektinek, enzimek, immunglobulinok, hemoglobin, mioglobin, fehérvérsejtek, protozoonok, baktériumok, vírusok is.

2.1.4. Az immunhisztokémiai eljárás algoritmusa

1. Konzerválás
2. Metszetkészítés
3. Deparaffinálás
4. Antigénfeltárás
5. Blokkolás
6. Inkubálás primer antitestekkel
7. Primer antitest kötődésének kimutatása
8. Magfestés és fedés

2.1.5. Immunisztokémia az állatorvosi daganatdiagnosztikában

Az állatorvosi gyakorlatban ma már az immunisztokémián alapszik a korrekt daganatdiagnosztika. Segítségével megállapítható a daganat primer vagy szekunder volta,

szöveti eredete, a jellegzetes antigén profilja, a neoplasticus elváltozás molekuláris háttere, illetve a prognózis és a metastasis hajlam. A szövettani metszetek immunhisztokémiai vizsgálata során a daganatok differenciálása, alcsoportokba sorolása, nyirokcsomó áttétek azonosítása, neoangiogenezis kimutatása történik, és ezek alapján megítélhető a prognózis és kigondolható a terápiás terv.

Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését hozzáértő, tapasztalt, megalapozott háttértudással rendelkező szakember végzi. Fontos ismerni a használt markerek indikációs területeit, antigénspecificitását, szenzitivitását, a keresztreakciókat, és az egyes markerek diagnosztikai specificitását. A fals negatív és fals pozitív reakciótermékeket fel kell ismernie, illetve tudnia kell, hogy melyik marker a sejt melyik alkotó elemével reagál. Különösen a daganatok hisztopatológiai vizsgálata során a markerek citoplazmatikus, magbeli, és membránban lokalizálódó kombinált reakcióival kell számolnunk.

2.1.6. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt markerek ismertetése

2.1.6.1. Claudinok

A claudin szó a latin „*claudere*” igéből származik, amelynek jelentése: „*zárni*”, ezzel is jelezve a membrán funkciójukat (*Mikio Furuse és mtsai, 1998*). A claudinok (CLDN) 17-27 kDa molekulatömegű integráns Tight Junction (TJ) membránfehérjék, amelyeknek fontos szerepe van a hámsejtek és az endothelsejtek fiziológiás, ill. patológiás paracellularis transzportfolyamataiban, továbbá a lumenaris barrier és a sejten belüli jelátviteli folyamatok fenntartásában. A TJ struktúrák feladata, hogy az epithelsejtek két oldalán helyeződő molekulák szabad diffúzióját meggátolják az apicalis és basolateralis oldalon, ennek érdekében egy szoros, intercelluláris illeszkedés alakult ki (Tight Junction), amelyek a lumen felé tekintő, apicalis felszín közelében teljesen körülölelik a sejtet. Ez nem átjárhatatlan barrier funkciót jelent, hanem a különböző hámtípusok permeabilitása eltérő: makromolekulák, fehérjék, lipidek, ionok, víz, növekedési faktorok paracellularis transzportját szabályozzák. Alapvető feladatuk, hogy megőrizték az apicalis és basolateralis membrán molekuláris összetételének különbségeit, a membránban található transzport fehérjék aszimmetrikus eloszlását, és biztosítsák az epithelialis sejtek fiziológiás polaritását. Jelenleg 24 féle claudintípust különítenek el humán vonalon, amelyek közül a claudin-1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18 markereket jól leírták a szakirodalomban. Azonban a claudin 9, 10, 12, 13, 17 és a 19-24 markerek még nem kerültek külön-külön karakterizálásra.

A claudinok olyan konzervatív fehérjék, amelyek négy transzmembrán doménből épülnek fel, és van egy citoplazmatikus amino- (N-terminális) és egy karboxil (C-terminális) végük, illetve rendelkeznek két hidrofób extracellularis hurokkal. Alkothatnak homo- vagy heteropolimereket, és ezeken belül homofil, és heterofil kapcsolódásuk lehetséges.

2.1.6.2. Claudin-5 marker

A claudin-5 az elsőként beazonosított endothelspecifikus fehérje, amely a Tight Junction-ökben jelenik meg. Genetikus hiánya a humán *velo-cardio-facialis szindrómát* okozza (Sirotkin és mtsai, 1997), amely veleszületett szívfejlődési rendellenességgel, szájpada-nomáliákkal és arcdysmorphiával járó tünetsoportot eredményez. Morita és mtsai (1999) leírták humán és egér endothelsejtekben. Kojima és mtsai (2002) leírták tranziens expresszióját a retinális pigment epithelium fejlődése során.

Ahogy a különböző szövetek vérereiben, úgy a vér-agy gáton is expresszálódik a claudin-5 fehérje, ahol fontos permeabilitás szabályozó funkciót tölt be, melyet egereken figyeltek meg.

2.1.6.3. Claudin-expressziós vizsgálatok kutyán

Hazai viszonylatban kisállatokon végeztek claudin-expressziós vizsgálatokat Dr. Jakab Csaba és mtsai kezdték el a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi karának Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékén. Elsőként kutyák emlőmirigyekben végeztek claudin-expressziós vizsgálatokat (2008), ahol a claudin-1, 2, 3, 4, 5, 7, és 10 fehérjék immunreaktivitását tanulmányozták a sejtkapcsoló struktúrák emlőcarcinogenesisben játszott szerepének kutatása kapcsán. Majd leszűkítették a kört a csak a claudin-5 fehérje expressziójának vizsgálatára, amelyet kutyák emlőmirigyek és emlőcarcinomáinak nyirokendothelsejtjein (2008) végeztek. 2009-ben egy ritka daganattípust diagnosztizáltak egy kutyán, a haemangioma orsósejtes formáját, amely vizsgálatában szintén bevetették a claudin-5 markert a diagnózis felállításában, melyről esetismerttetést is közöltek.

Jakab és mtsai (2011) bemutatták a claudin-5 hisztopatológiai és differenciál diagnosztikai jelentőségét kutyák haemangiosarcomájának immunhisztokémiai vizsgálata kapcsán. A vizsgálataik alapján a marker segít elkülöníteni a neoplasticus endothelsejt eredetű proliferációt a nem-vérér eredetű neoplasticus jelenségektől. Az immunhisztokémiai vizsgálataik alapján a claudin-5 nagyobb érzékenységet mutatott, mint a CD31 és vWf (von Willebrand's faktor) antigének.

2.1.7. Immunhisztokémiai vizsgálatok lovak szövetein

Jakab és mtsai (2008) lovak daganatos bőrelváltozásai közül, a sarcoidot vették górcső alá. Egy kétrészes közleményben az első részben a sarcoid etiológiáját, előfordulását, morfológiáját, klinikumát, és terápia lehetőségeit ismertették, majd a második részben a sarcoidos minták immunhisztokémiai vizsgálati módszereit vették sorra. A sarcoidos mintákat Ki-67 proliferációs markerrel, anti-vimentinnel, anti-dezminnel, anti-melan-A, anti-S-100 protein antigénekkkel reagáltatták, hogy kipróbálják a gyakorlatban használt immunhisztokémiai reagenseket lóbőrbióptátumokon is.

2.2. A haemangioma és haemangiosarcoma

A **haemangioma** és a **haemangiosarcoma** a vérérképző szövetek jóindulatú és rosszindulatú daganatai, amelyek lóban ritkábban fordulnak elő, mint a kutyákban. Mindkét típusú tumor az vérérképző szövetek neoplasiájának eredménye.

2.2.1. HAEMANGIOMA

Előfordulás

A haemangioma az endothelsejtek benignus tumora. A tumorban lévő érjáratok nagyságától függően capilláris vagy cavernosus típusok különíthetők el, előfordulhatnak külön-külön és együttesen is. Nehezen elkülöníthető a vascularis malformatiótól és a

granulációs szövettől. Leggyakrabban az idősebb kutyák bántalma, kevésbé gyakori más fajokban. Lóban viszonylag ritkán fordul elő.

A haemangioma típusai:

1. Haemangioma capillare et cavernosum

Kötőszövetes alapvázban különböző tágasságú, részben vörösvérsejtekkel, részben vérplazmával kitöltött vérerek láthatóak. Az ereket endothelsejtek bélelik, az erek körül savósan infiltrált kötőszövetes sövények húzódnak. A daganatra expanszív növekedés és primer multiplex megjelenés jellemző, de nem metastatizál.

2. Disszeminált cavernosus haemangioma

Ritka, de borjakban és sertésben leírták. Sertésben multiplex, kis tumorok formájában fordul elő a bőr alatt, belső szervekben, ínyben. Borjakban kongenitális haemangiomatosisnak vagy juvenilis bovin angiomatosisnak is nevezik, arra utalva, hogy soliter íny és gerincvelő vagy multiplex angiomatosis léziók alakulnak ki. Enzootiás hematuria esetén a húgyhólyagban is kialakulhat.

4. Meningoangiomatosis

Kutya, ló tehen benignus fokális vérér és meningoendothelsejt proliferációja a lágyagyburokokban és az alatta lévő agyparenchymában.

5. Glomangioma (glomus tumor)

Kisállatokban ritkán előforduló jóindulatú tumor. A neuromyoarteriális hőreceptorok tumora elsődlegesen az ujjakban, ahol elágazó vascularis csatornák vannak fibrosus stromában és glomus (simaizom-) sejtfelek benne. A glomus jugulare és a glomus pulmonare daganat kutyában expanszív növekedésű, és tokkal körülhatárolt.

6. Epitheloid haemangioma

Az epitheloid haemangioma a haemangioma egyik típusa, amely szintén bőrben alakul ki. Átlagosan 9-12 éves kor körül diagnosztizálják, túlnyomórészt herélt lovakban (A.L. Warren et al., 2007). Fajtadiszpozíció bizonyítottan nincs.

Klinikai tünetek

Lóban haemangioma leggyakrabban a lábakon, lágyékon, nyakon, arciori területen, szemhéjakon alakul ki, de egyébként bárhol megjelenhet a testen. Soliter, gömbölyded, vörösesfekete színű tumor, amely általában 0,5-3 cm nagyságú, és ha rávágunk, szivárog belőle a vér.

Diagnózis

Szövettanilag vérrel kitöltött vascularis tereket egy rétegben jól differenciált endothelsejtek bélelnek, és thrombotizáltak is lehetnek. Az erek szeparáltak a változó mennyiségű kötőszövetes stromától. Nincs a daganatot körülvevő tokja, nem képez áttéteket, és nem hajlamos a kiújulásra.

1. Congenitalis bőr haemangioma

Biopsziával (kimetszés vagy teljes eltávolítás) kell kórszövettanra mintát venni, és definitív diagnózishoz jutni.

2. Epitheloid haemangioma

Architekturálisan kicsi vérerek fűrtszerűen helyeződnek el benne, melyeket koncentrikusan megvastagodott neoplasticus epitheloid megjelenésű endothelsejtréteg bélel, emellett a vascularis lumenbe az endothelsejtek egyszerű és elágazó tubulusok és micropapillákat formálva nyúlnak be. Nincs cellularis atipia vagy mitotikus alakok. A tumorsejtekben intracytoplazmatikus vacuolumok lehetnek, amelyek eltolják a nucleust úgy, hogy az pecsétgyűrűszerűen jelenik meg a sejtben. A vakuolumokban 1-1 erythrocyta is felfedezhető.

2.2.2. HAEMANGIOSARCOMA

Előfordulás

A vérereket képező szövet malignus daganata. Leggyakrabban idősebb kutyákban fordul elő, és a haemangiomához képest kevésbé gyakori. Ritkán kialakul macskában, lóban, szarvasmarhában, juhokban. Bár a test bármely részén kifejlődhet, de kutyában predilekciós hely a jobb szívfülcse, a bőr, a lép, a máj; macskában a bőr, a lép, a belek, míg **lóban** főleg a **szem**, a **bőr (napsugárzás-indukált és epitheloid/histiocytoid)** illetve a **multicentrikus (belső szervek)** kialakulású haemangiosarcoma jellemző. De a primer tumor a karcsonton, hátcsigolyán, epidurál üregben, distalis végtagi ízületben/izomban, paranasalis sinusban, szájüregben, az epithelialis haemangiosarcoma az orrüregi mucosán is kialakulhat.

A haemangiosarcoma zömében de novo alakul ki, nem pedig egy preexistáló haemangioma malignizálásának eredménye. Destruktív és invazív növekedésű, gyorsan metastatizál. A lóban ritka, a prevalencia 0-0,7% körül mozog (*Francesco et al., 2012*).

1. Ocularis haemangiosarcoma

Lóban az ocularis értumороk nem gyakoriak. A haemangiosarcoma mégis gyakrabban alakul ki lovak ocularis szöveteiben, mint a haemangioma. A kötőhártya, a harmadik szemhéj, a szemhéjak, és a cornea érintett legtöbbször. Egy esetismertetésben leírtak olyan ló ocularis tumoros esetet, amelyben egy 12 éves, belga igás herélt lóban egy harmadik szemhéji primer tumoros elváltozáson belül haemangiosarcomát és carcinomát is azonosítottak egymás mellett (*Patricia M. G. et al., 2007*), ami nagyon ritka. A daganat immunhisztokémiai identifikálására von Willebrand faktor kapcsolt antigént használtak, amire a haemangiosarcoma pozitív, az egyéb angiosarcomák (lymphosarcoma) negatív reakciót adtak. A daganat háttérokai között a fajtaprediszpozíció, és a napsugárzás is feltételezhető.

2. Multicentrikus haemangiosarcoma

A multicentrikus forma az egyszerre több helyen kialakuló tumoros elváltozást jelenti, de akkor is használják, ha már olyan mértékben képezett áttéteket, hogy nem lehet megmondani a primer daganat helyét egyértelműen. Egy sok esetben későn diagnosztizált, komplett belgyógyászati kórkép. Nincs fajta, vagy nemi prediszpozíció. 2 és 22 éves kor

között, de átlagosan a 11-12 éves állatok érintettek. A primer daganat általában a májon, lépen alakulhat ki, de a valódi, egyidejű multicentrikus kialakulás a belső szerveken gyakoribb.

Diagnózis

Haemangiosarcoma szövettani megjelenése

Heterogén szöveti szerkezetben vascularis ürök vannak, amelyeket elongált, nagy magvú, anaplasticus endothelsejtek bélelnek több sorban. A tumorsejtek részben szolidan, részben differenciáltan proliferálnak. A proliferációs tumorterületeken kollagénrostos trabeculákkal elválasztott cavernosus vérürök, illetve capillarisszerű érképződmények ismerhetők fel. Magas a daganat mitotikus indexe. A tumor állományában kiterjedt vérzések, és necrotikus területek is kialakulnak. A nem differenciált haemangiosarcoma elkülönítése hasonló szerkezetű sarcomáktól, nem endotheliális malignus tumoroktól immunhisztokémiával lehetséges.

Gyógykezelés

1. Szem haemangiosarcoma

Aggresszív, destruktív szöveti tulajdonságú, a műtéti eltávolítás és a kiegészítő sugárterápia ellenére is zömében kilátástalan.

2. Multicentrikus haemangiosarcoma

Jelenleg nincs hatásos gyógymód, a lovakat el kell altatni.

3. FEJEZET: ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A minták származása

A vizsgálatainkban felhasznált laphámrákok (differentiált, low grade carcinoma planocellulare keratoides és differentiatlan, high grade carcinoma planocellulare non-keratoides), epitheloid haemangioma, conjunctivális haemangiosarcoma, a sarcoid, a papilloma, a fibrosarcoma és a gyulladáshos bőrminta a SZIE-ÁOTK, Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani tanszékére 2008. január - 2012. június között beérkezett ló bióptátumokból származtak. Az egészséges, elváltozásmentes ló szövetmintákat az Üllői Nagyállat Klinika Kórbonctani Osztályának diagnosztikai boncolási eseteiből gyűjtöttük be.

*1. ábra. Ló biopsias és necropsias minták
2008-2012*

Szövet	Mintaszám (n)
Intakt szövetek vérerei	15
Angiofibroblast szövet	15
Haemangioma	8
Haemangiosarcoma	12
Carcinoma planocellulare	10
Papilloma	10
Fibrosarcoma	10
Sarcoid	10

3.2. A minták feldolgozása

A frissen vett szövetmintákat 8 %-os pufferolt formaldehid-oldatban konzerváltuk, szobahőmérsékleten, 24 órán keresztül.

A 24 órás fixálást víztelenítés és paraffinos beágyazás követte. A paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszetek készültek, amelyeket haematoxilinnal és eosinnal festettük meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálati módszerhez a paraffinos blokkokból szilanizált tárgylemezre helyezük a mintákat. A 3-4 µm vastagságú metszetek tapadását a víz szívópapírral történő leitatásával segítjük elő. Majd 2x10 percig váltott xylollal, és 3x5 percig váltott alkoholban (100%, 70%, 50%) deparaffináljuk, és 1x foszfátpufferolt sóoldatban való

mosás után antigénfeltárássra került sor magas hőmérsékleten, mikrohullámmal (30 perc, 800 W).

A **claudin-5** fehérje kimutatásához a következő ellenanyagot használtuk: *anti-claudin-5* monoklonális egér ellenanyag, (4C3C2 klón, IgG1 izotípus, 1:100 hígítás, Zymed Inc., San Francisco, CA, USA). Az ellenanyagokat a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetének Molekuláris Osztálya biztosította.

Az endogén peroxidáz aktivitását 3 %-os hidrogén-peroxiddal blokkoljuk 5 percig. Az immunmorfológiai reakció streptavidin-biotin peroxidázrendszerrel (DAKO LSAB2 Kit) és AEC (3-amino-9-etilkarbazol, GeneTex) chromogennel tesszük láthatóvá. Háttérfestés Mayer-féle haemalaunnaal történik.

3.3. A kórszöveti metszetek elemzése

A metszeteket Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp segítségével elemeztük és Nikon Coolpix 4500 típusú digitális kamerával készítettünk róluk felvételeket.

4. FEJEZET: EREDMÉNYEK

A vizsgálat során egyrészt a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani tanszékre 2008 és 2012 között érkezett ló eredetű biopsias és necropsias, paraffinba ágyazott daganatarchívum mintáit, másrészt az Üllői Nagyállat Klinika Kórbonctani osztályán gyűjtött intakt szöveteket és gyulladásos bőr mintákat dolgoztuk fel. A vizsgálatot összesen **90 darab** mintán végeztük el. A 90 db mintából **60 db tumor, 15 db patológiás angiogenezist mutató granulációs (angiofibroblast) szövet, és 15 db intakt szövet.** A 60 db tumor: **8 db haemangioma** (epitheloid), **12 db haemangiosarcoma** (conjunctivális), **10 db carcinoma planocellulare** (low grade carcinoma planocellulare keratoides és high grade carcinoma planocellulare non-keratoides), **10 db papilloma, 10 db fibrosarcoma, és 10 db sarcoid.** Az angioblast szövetet lovak bőrlob mintáiban vizsgáltuk.

A standard körülmények között előkészített minták immunhisztokémiai vizsgálata során Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetének Molekuláris Osztálya által biztosított claudin-5 antitestet használtuk fel.

A véreredetű tumorok (haemangioma, haemangiosarcoma) mindegyike erős pozitív reakciót mutatott az antitesttel, míg az epitheliális és mesenchymális eredetű tumorok (carcinoma, papilloma, fibrosarcoma) mindegyike negatív reakciót adott. A kóros angiogenezist mutató granulációs szövet a krónikus bőrgyulladásos mintákban szintén pozitív reakciót adott a claudin-5 antitesttel. Az intakt szövetek vérér- és nyirokendothelje szintúgy claudin-5 pozitív reakciót mutatott.

A cutan angiosarcoma hisztopatológiai típusai: sinusoidális, solid epitheloid/orsósejtes és kevert típus. A sinusoidális típus esetén szövettanilag jól formált anasztomozáló érjáratok szelik át a dermiszt és a subcutan zsírszövetet, melyeket atipikus endothelsejtek bélelnek egy vagy több rétegben. A solid epitheloid/orsósejtes forma esetén orsósejtes és epitheloidsejtes szigetecskék és diffúz elrendeződésben kevés stromával. A kevert típusú angiosarcoma az előző két forma keveréke.

A haemangiosarcomában a daganatos endothelsejtek intenzív membrán- és citoplazmatikus claudin-5 pozitív reakciót mutatnak. Az immunreakció mérsékelt-erős intenzitású az erekben vagy sinusoidokban, míg erős és diffúz intenzitású a tumor solid komponenseiben. A claudin-5 szelektív a vérendothelsejtekre nézve, és specifikusan reagál az anasztomozáló erekkel is. A marker ott is pozitív, ahol más markerek (CD-31) csak gyengén vagy nem expresszálódnak. A claudin-5 ahogy azt korábban említettük, a tight junction-ökben expresszálódik és komponense a vér-agy és a vér-here gátnak is. Az endothelsejtekben

jelenlévő claudin-5 azt sugallja, hogy azok a tumorsejtek, amelyek claudin-5 fehérjét termelnek, nagy affinitással rendelkeznek a vérerekhez. Az itthoni vizsgálatokban kutyák haemangiosarcomájának claudin-5 expresszióját vizsgálva (Jakab et al., 2009) azt tapasztalták, hogy a fehérje a neoplasticus endohelsejtekben is expresszálódik, és nemcsak membrán, hanem citoplazmatikus pozitívítás is megjelenik, amelyet jelen vizsgálatok során lovak haemangiosarcomájában is megfigyeltünk.

A nem véréredetű daganatok, mint a carcinomák, a fibrosarcomák, a papillomák, a sarcoidok kivétel nélkül negatív reakciót adtak. Ezekben az elváltozásmentes vér- és nyirokerek endothelje tűnik elő.

A gyulladással szöveti területen a gyulladásra jellemző értágulat segítette az immunhisztokémiai vizsgálat elbírálását. Intenzív membránózus pozitívítás látható a gyulladással irhában, egyéb sejtek nem reagáltak.

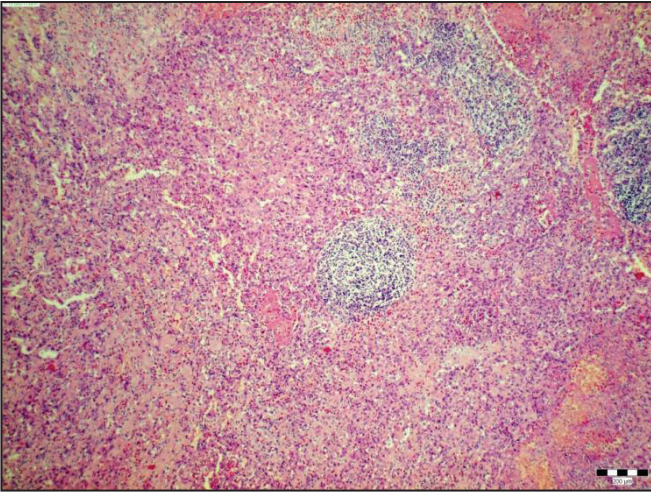
A claudin-5 antitest alkalmas a lovak véréredetű daganatainak hisztopatológiai diagnosztikájára, mert nem expresszálódik az intakt hámban, a jóindulatú hám eredetű proliferációkban, és a laphámrákokban. A szakirodalomban jelent meg publikáció (Miettinen M. et al., 2011) amelyben a laphámrákok esetében tapasztaltak claudin-5 pozitívítást, de a saját vizsgálataink alapján sem a low-grade carcinoma planocellulare keratoides, sem a high-grade carcinoma planocellulare non-keratoides esetén nem tapasztaltunk pozitív reakciót.

A claudin-5 pozitívítást mutat a tumor és krónikus gyulladással folyamat indukálta mikroerekben, emellett nyirokér endothelsejtekben.

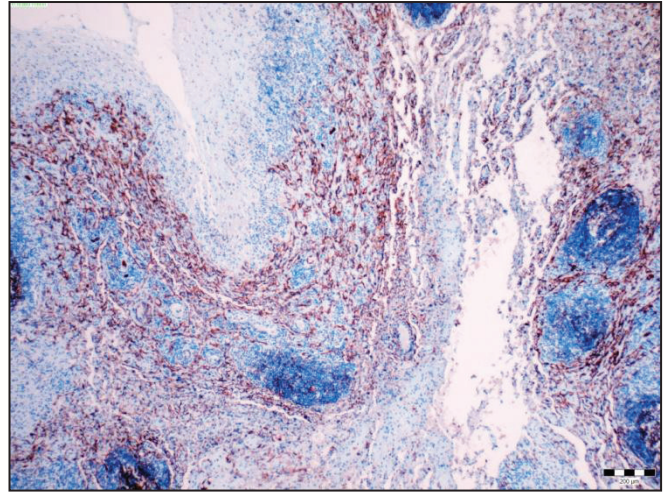
A kapott eredményeket egy táblázatban (2. ábra) foglaltuk össze, illetve a 3-19. ábra szemlélteti az egyes vascularis endothel, epithelialis, tumorok, illetve az intakt erek, és a granulációs szövet immunhisztokémiai reakcióit.

2. ábra. A minták anti-claudin-5 reakciójának eredménye

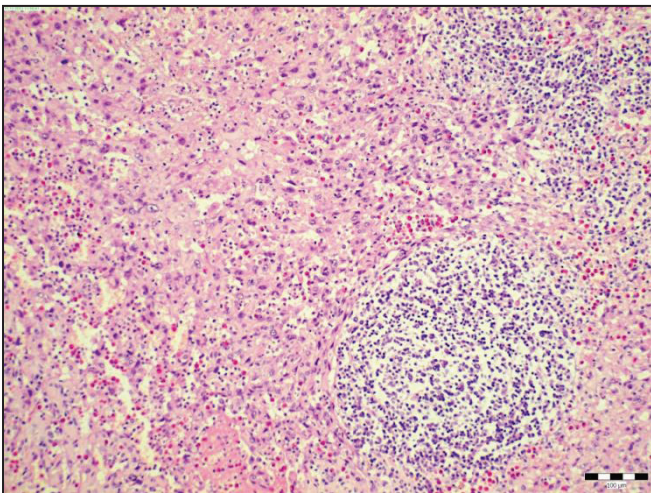
Szövet (n= mintaszám)	Claudin-5
<i>Intakt szövetek vér- és nyirokér endothelje (n=15)</i>	Pozitív
<i>Angiofibroblast szövet vérérendothelje (n=15)</i>	Pozitív
<i>Haemangioma (n=8)</i>	Pozitív
<i>Haemangiosarcoma (n=12)</i>	Pozitív
Carcinoma planocellulare (n=10)	Negatív
Papilloma (n=10)	Negatív
Fibrosarcoma (n=10)	Negatív
Sarcoid (n=10)	Negatív



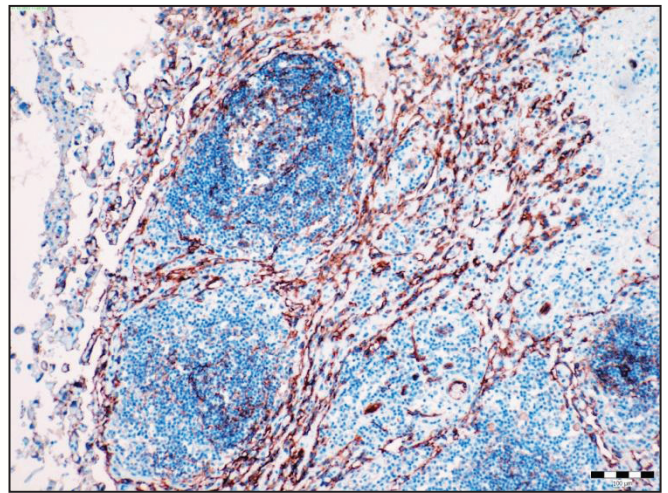
3. ábra. *Conjunctivalis haemangiosarcoma* H.-E., 40X,
Bar = 200 μ m.



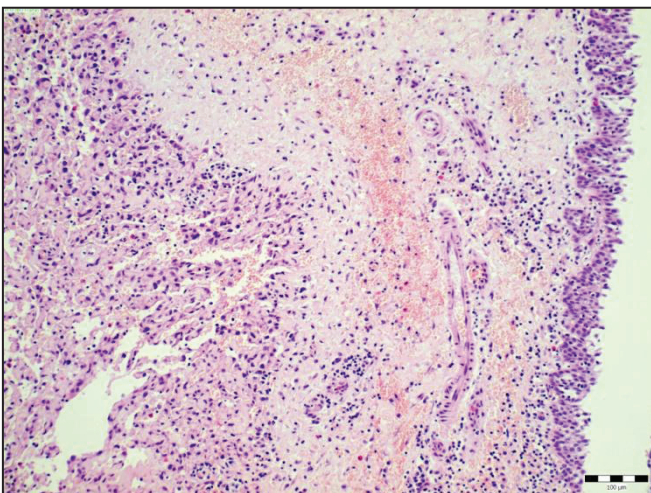
4. ábra. Klaudin-5 fehérje expressziós mintázata ló
haemangiosarcomájában IH., 40X, Bar = 200 μ m.



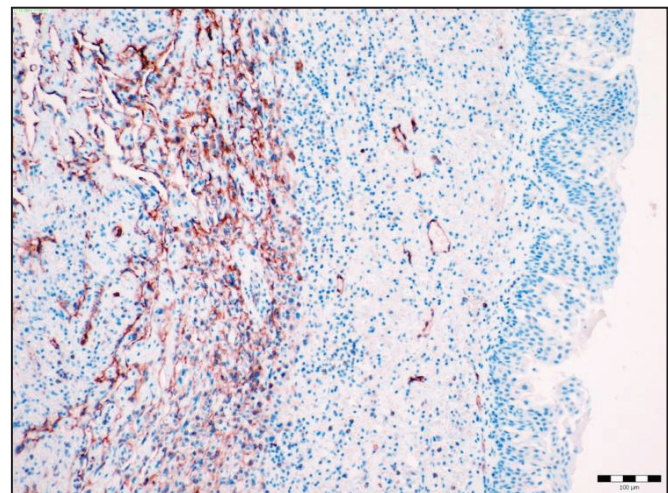
5. ábra. *Conjunctivalis haemangiosarcoma* H.-E., 100X,
Bar = 100 μ m.



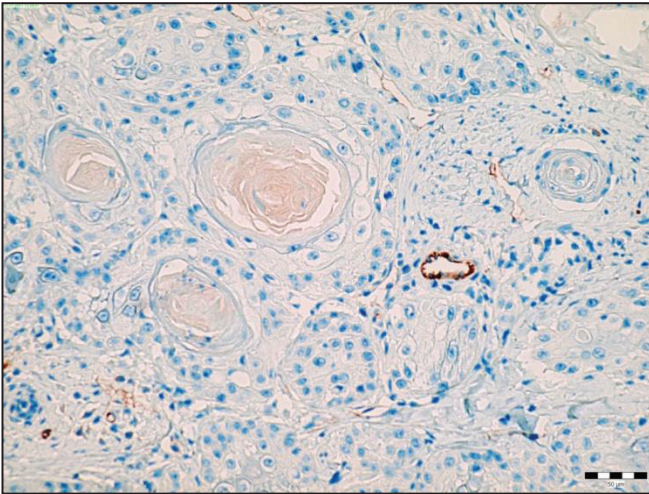
6. ábra. Intenzív claudin-5 membránpozitivitást (barna
színreakciót) mutató daganatos endothelsejtek IH., 100X,
Bar = 100 μ m.



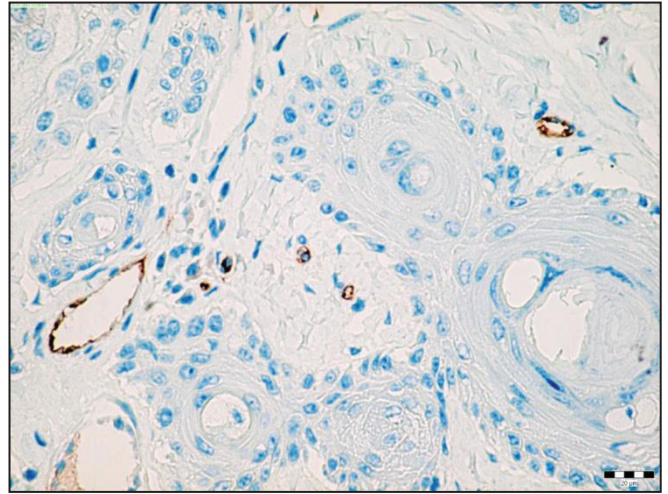
7. ábra. *Conjunctivalis haemangiosarcoma* H.-E., 100X,
Bar = 100 μ m.



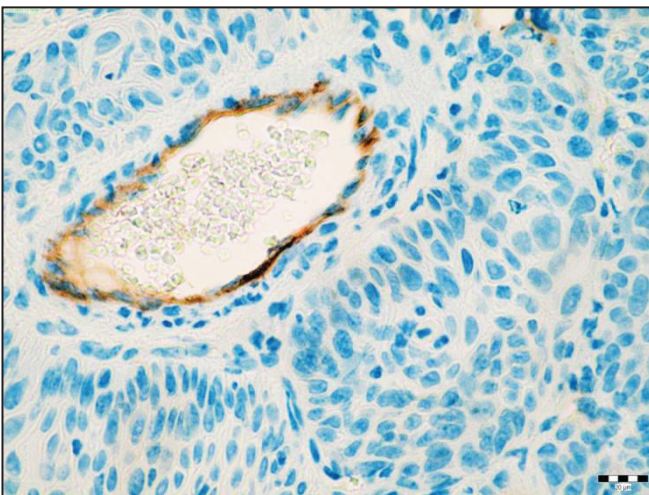
8. ábra. Klaudin-5 pozitívású daganatos
endothelioblastokban IH., 100X, Bar = 100 μ m.



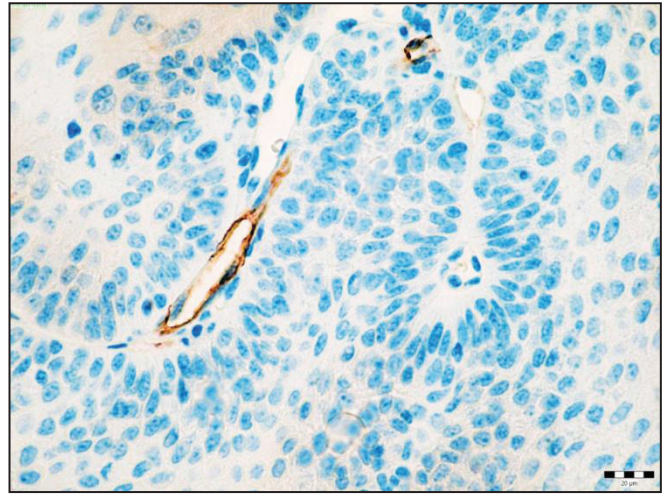
9. ábra. Low grade carcinoma planocellulare keratoides IH., 200X Bar = 50 μ m



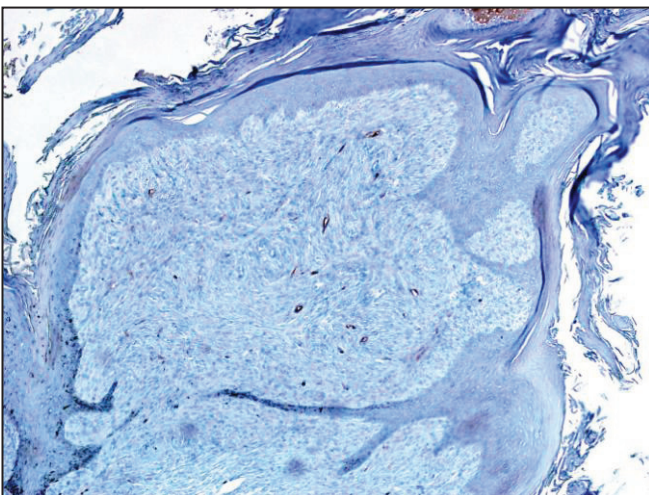
10. ábra. Low grade carcinoma planocellulare keratoides IH., 200X Bar = 20 μ m



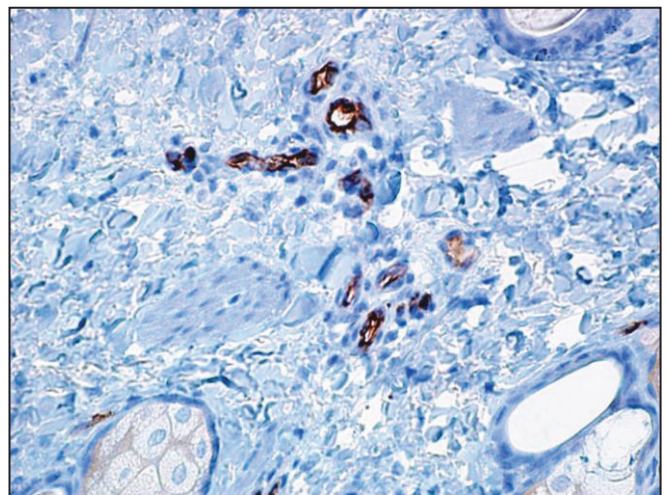
11. ábra. High grade carcinoma planocellulare non-keratoides IH., 400X Bar = 20 μ m



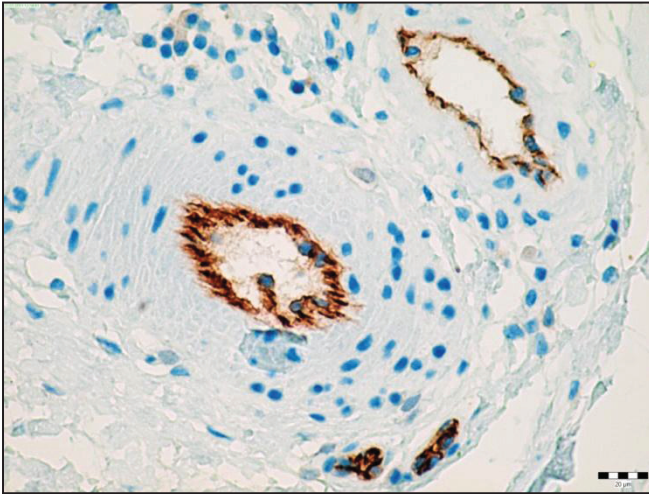
12. ábra. High grade carcinoma planocellulare non-keratoides IH., 400X Bar = 20 μ m



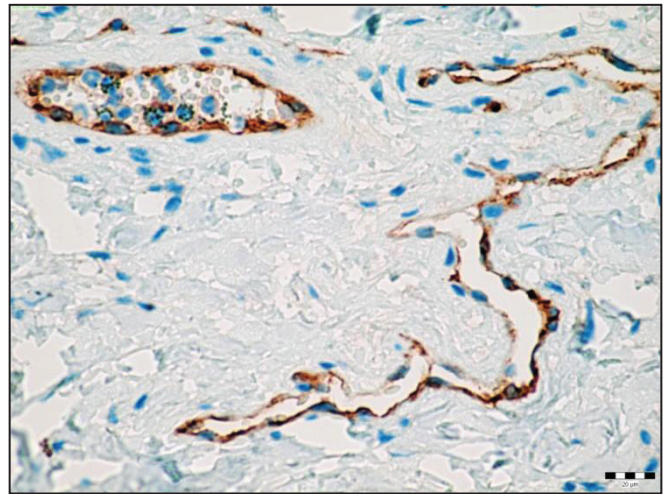
13. ábra. Sarcoid IH., 100X



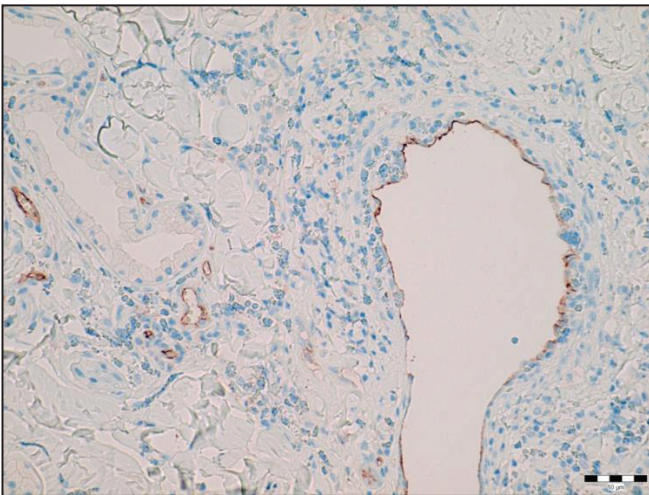
14. ábra. Sarcoid IH., 600X



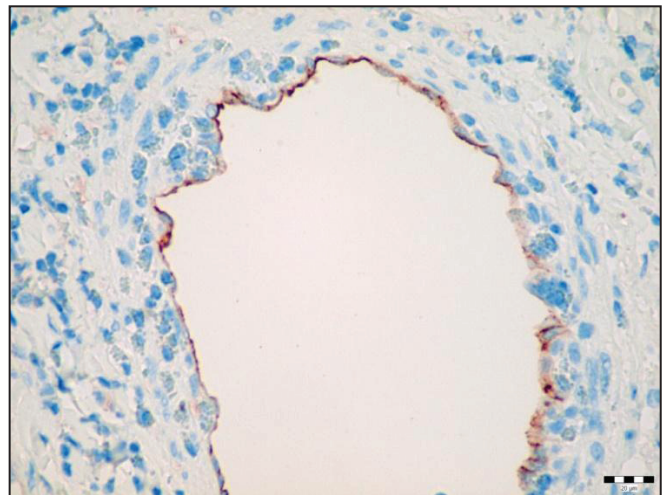
15. ábra. Intenzív claudin-5 membránpozitivitású intakt vérérendothel bőrben IH., 400X Bar = 20 μ m



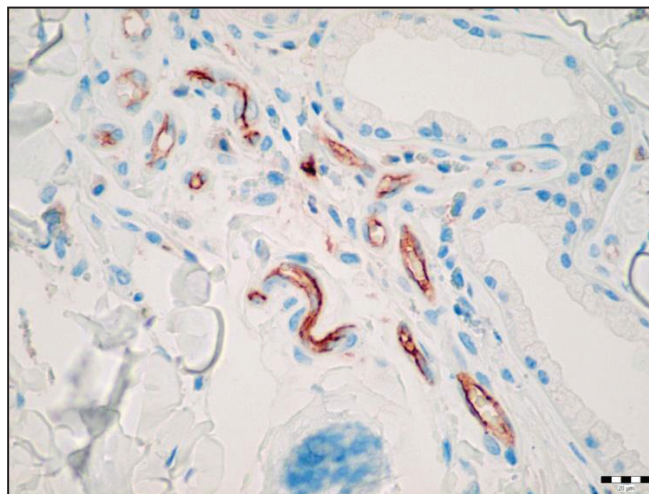
16. ábra. Claudin-5 pozitív (barna színreakciót) mutató vérér (bal), és nyirokér (jobb) IH., 400X Bar = 20 μ m



17. ábra. Intenzív claudin-5 membránpozitív endothelsejtekkel bélelt ér idült gyulladós bőrben IH., 20X Bar = 50 μ m



18. ábra. Intenzív claudin-5 pozitív endothelsejtek a CD-31 negatív érben IH., 40X Bar = 20 μ m



19. ábra. Intenzív claudin-5 membránpozitivitást (barna színreakciót) mutató endothelsejtek idült gyulladós bőr mikroereiben IH., 60X Bar = 20 μ m

5. FEJEZET: KÖVETKEZTETÉSEK

A claudin-5 endothel specifikus, tight junction, konzervatív fehérje kimutatására használ, monoklonális, anti-claudin-5 ellenanyag, megbízható markernek bizonyult a lovak elváltozásmentes artériák és vénák, ill. nyirokerek endotheliumának feltüntetésére, valamint az idült gyulladás- és a tumor indukálta mikroerek detektálására. Mindezek mellett a haemangioma és a haemangiosarcoma kiváló immunfenotipizáló markerének tekinthetjük lovakban is. Ez utóbbi malignoma esetében, különösen a solid szöveti szerkezetű, vagyis cavernákat, capillarisokat nem képző, differenciálatlan haemangiosarcománál vehetjük hasznát a patológiai diagnózis során. Az intenzív claudin-5 immunreaktivitás nemcsak a daganat histotipizálását, hanem biopsziák esetén a biopátum sebészi szélének pozitív (tumoros infiltráltság), vagy negatív (tumormentesség) állapotát is segít kimutatni.

A lovakból származó, claudin-5 negatív laphámrákokban, sarcoidban és egy fusocellularis daganatokban megjelenő, claudin-5 pozitív mikroerek, az immunreaktivitásuk révén alkalmasak a különböző mikroérsűrűség vizsgálatok kivitelezéséhez és a különböző antivasculáris terápiák prognosztikájához.

A vizsgálataink során, a lovakból származó szövetekben tapasztalt, intact lymphaticus endothel claudin-5 pozitív felveti a lehetőségét a lymphangioma és a lymphangiosarcoma immunreaktivitását is. Ezt a rendelkezésre álló szövet-, ill. tumorbank bővítése után lehet tesztelnünk.

6. FEJEZET: ÖSSZEFOGLALÁS

A lovak haemangiosarcomájának claudin-5 alapú immunhisztokémiai vizsgálata során a SZIE-ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani tanszék 2008-2012 között beérkezett tumorarchívumát és az Üllői Nagyállat Klinika Kórbonctani osztályának diagnosztikai boncolási eseteiből gyűjtött mintákat dolgoztuk fel összehasonlító céllal. A claudin-5 expressziós immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a vascularis endothel eredetű daganatok (haemangioma, haemangiosarcoma), a granulációs szövetek (krónikus bőrlob) illetve az intakt vér és nyirokerek anti-claudin-5 antitesttel pozitív, míg az epithelialis (carcinoma, papilloma) és mesenchymalis (fibrosarcoma) daganatok negatív reakciót adtak minden minta esetében.

A claudin-5 fehérje kimutatása immunhisztokémiai módszerrel a hisztopatológiai differenciál diagnózis fontos eszközévé vált a haemangioma és a haemangiosarcoma lovakban történő egyértelmű azonosítására.

Azonban annak kiderítésére, hogy milyen szerepet játszik a claudin-5 expressziója a tumor pathológiájában, még további vizsgálatok szükségesek.

7. FEJEZET: SUMMARY

Claudin-5 based immunohistochemistry studies in equine haemangiosarcoma

In this study, we examined the equine haemangiosarcoma with claudin-5 based immunohistochemistry. The equine biopsy és necropsy samples received at the Department of Pathology and Forensic Veterinary Medicine of the Faculty of Veterinary Science, Szent István University, between January 2008 and June 2012, and at the Large Animal Clinic of Üllő.

During the immunohistochemical examination of claudin-5 expression we compared the samples with each other. The tumours of vascular endothelial origin (haemangioma, haemangiosarcoma), the intact vessels, and the angiofibroblast tissue (chronic dermatitis) were positives, until the tumours of epithelial (carcinoma, papilloma) and mesenchymal (fibrosarcoma) origin were negatives with claudin-5 antibody.

The positive results suggest, that claudin-5 becomes a very important marker to make a difference between haemangioma/haemangiosarcoma and epithelial/mesenchymal tumours, with this protein with an unambiguous way we can identify the tumours of vascular endothelial origin.

Further studies are needed to explore the expression of these proteins in vascular tumor pathology.

8. FEJEZET: IRODALOMJEGYZÉK

1. TAYLOR, S.D. et al.: Gastric Neoplasia in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009. 23. vol. 5. no. p. 1097-1102.
2. PASCOE, R.R.R., KNOTTENBELT, D.C.: *Manual of Equine Dermatology*. London: W B Saunders, 1999. p. 241-279.
3. GEARHEART, P. M. et al.: Haemangioma and squamous cell carcinoma in the third eyelid of a horse. *Veterinary Ophthalmology*, 2007. 10. vol. 2. no. p.121-126.
4. FERRUCCI, F. et al.: Multicentric Haemangiosarcoma in the Horse: A Case Report. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2012. 32. vol. 2. no. p. 65-71.
5. HENDRIX, D.V. H.: Equine Ocular Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2005. 4. vol. 1. no. p. 87-94.
6. HAZEN, P. G. et al.: Use of Mohs Micrographically Controlled Surgery in the Management of Equine Penile Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2009. 29. vol. 2. no. p. 95-99.
7. PALMER, S.: Treatment of Common Cutaneous Tumors Using the Carbon Dioxide Laser. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2002. 1. vol. 1. no. (March) p. 43-50.
8. WARREN, A. L., SUMMERS, B. A.: Epithelioid Variant of Haemangioma and Haemangiosarcoma in the Dog, Horse and Cow. *Veterinary Pathology*, 2007. 44. vol. 1. no. p. 15-24.
9. McCOWAN, C., STANLEY, R. G.: Pigmented Squamous Cell Carcinoma of the Conjunctiva of a Horse. *Veterinary Ophthalmology*, 2004. 7. vol. 6. no. p. 421-423.
10. BARABAS, K. et al.: Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary Comparative Oncology*, 2008. 6. vol. 1. no. p. 1-18.
11. OTA, J. et al.: Local Photodynamic Therapy for Equine Squamous Cell Carcinoma: Evaluation of a novel treatment method in a murine model. *The Veterinary Journal*, 2008. 176. vol. 2. no. p. 170-176.
12. JAKAB CS. et al.: A gyulladássos angiogenezis immunhisztokémia vizsgálata klaudin-5, CD-31, α -SMA és kalponin segítségével kutyákban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 8. vol. 131. no. p. 477-482.

13. FERRER, L. et al.: Immunohistochemical Detection of CD-31 Antigen in Normal and Neoplastic Canine Endothelial Cells. *Journal of Comparative Pathology*, 1995. 112. vol. 4. no. p. 319-326.
14. JAKAB CS., et al.: Kutya orsósejtes haemangiómájának diagnózisa klaudin-5 marker segítségével. Esetismertetés. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 7. vol. 131. no. p. 402-406.
15. JAKAB CS.: Klaudin-5 pozitív in situ haemangiosarcoma kutyákban. Kórszövettani és immunhisztokémiai esettanulmány. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2011. 5. vol. 133. no. p. 280-284.
16. GAMBOA, A. M. A., MANSELL, J.: Epithelioid Haemangiosarcoma in the Ocular Tissue of Horses. *Journal of Comparative Pathology*, 2011. 144. vol. 4. no. p. 328-333.
17. JAKAB CS. et al.: Külső pozitív kontrollok alkalmazása claudinexpressziós immunhisztokémiai vizsgálatokban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008. 7. vol. 130. no. p. 433-438.
18. JAKAB CS. et al.: A claudin-5 fehérje expressziójának vizsgálata kutyák emlőmirigyek és emlőcarcinómájának nirokendotel sejtjein immunhisztokémiai módszerrel. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008. 5. vol. 130. no. p. 296-303.
19. JAKAB CS. et al.: Expression and Localisation of Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -10 Proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008. 56. vol. 3. no. p. 341-352.
20. JAKAB CS. et al.: A lovak daganatos és nem daganatos bőrelváltozásainak előfordulása és hisztopatológiája: 1. rész. Sarcoid. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2007. 9. vol. 129. no. p. 515-524.
21. JAKAB CS. et al.: A lovak daganatos és nem daganatos bőrelváltozásainak előfordulása és hisztopatológiája: 2. rész. A sarcoidos minták immunhisztokémiai vizsgálata. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2008. 2. vol. 130. no. p. 67-74.
22. JAKAB CS. et al.: Klaudinexpressziós vizsgálatok kutyák solid emlőrákjának tüdőáttéteiben. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 1. vol. 131. no. p. 33-41.
23. JAKAB CS. et al.: Angiogenesis. Irodalmi áttekintés: 1. rész. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 6. vol. 131. no. p. 373-380.

24. JAKAB CS. et al.: Angiogenesis. Irodalmi áttekintés: 2. rész. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 7. vol. 131. no. p. 417-425.
25. JAKAB CS. et al.: A kutyák haemangiosarcomájának klaudin-5-expressziós vizsgálata konfokális mikroszkóppal. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 11. vol. 131. no. p. 659-668.
26. JAKAB CS. et al.: Expression of Claudin-1, -2, -3, -4, -5 and -7 Proteins in Benign and Malignant Canine Mammary Gland Epithelial Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 2008. 139. vol. p. 238-245.
27. JAKAB CS. et al.: Evaluation of Microvessel Density (MVD) in Canine Mammary Tumours by Quantitative Immunohistochemistry of the Claudin-5 Molecule. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008. 56. vol. 4. no. p. 495-510.
28. MARTENS, A. et al.: Histopathological characteristics of five clinical types of equine arcoid. *Research in Veterinary Science*, 2000. 69. vol. 3.no. p. 295-300.
29. FOLPE, A. L.: Practical applications of immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue neoplasms. *Surgical Oncology*, 1999. 8. vol. 4. no. p. 197-203.
30. BARAKZAI, S.: *Handbook of Equine Respiratory Endoscopy*. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007. p. 1-135.
31. SLOVIS, N. M.: *Atlas of Equine Endoscopy*. Mosby, 2004. p. 37-97.
32. GRANT MAXIE M., ROBINSON W. F.: Cardiovascular system. In: Kennedy P.C., Palmer N.: *Pathology of domestic animals*. 5th ed., Vol III. Philadelphia, PA:Saunders; 2007. p. 1-105.
33. MIETTINEN M. et al.: Claudin-5 as an immunohistochemical marker for angiosarcoma and hemangioendotheliomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2011. 35. vol. 12. no. p.1848-56.
34. HARA H.: Endoglin (CD105) and claudin-5 expression in cutaneous angiosarcoma. *The American Journal of Dermatopathology*, 2012. 34. vol. 7. no. p. 779-82.

9. FEJEZET: KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a sok türelmet témavezetőmnek Dr. Jakab Csabának. A segítségének köszönhetően nyerte el a szakdolgozatom a jelenlegi formáját.

Szeretném még megköszönni a sok segítséget Pop Renátának is, amit a kórszöveti metszetek elkészítésében nyújtott, illetve az Üllői Nagyállat Klinika Kórbonctani Osztályának a minták gyűjtésében adott segítségét.