



KLİNİK ÇALIŞMA

LARENKS SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARIN PROGNOZUNDA CLAUDİN 3, 4, 7'NİN YERİ

Dr. İrfan PIRTIK¹, Dr. Mustafa Deniz YILMAZ¹, Dr. Hülya EYİĞÖR¹, Dr. Dinç SÜREN², Dr. Ömer Tarık SELÇUK¹, Dr. Üstün OSMA¹, Dr. Levent RENDA¹, Dr. Ahmet Arda GÖKAY²

¹Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, KBB, Antalya, Türkiye ²Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji, Antalya, Türkiye

ÖZET

Amaç: Claudinler hücreler arası bağlantıları sağlayan sıkı bağlantılardır. Son yıllarda değişik claudin alt tiplerinin kanser prognozu üzerindeki etkisi hakkında çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle claudin-7'nin oral skuamöz hücreli karsinom üzerindeki prognostik değeri ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra kolorektal, meme, prostat kanserlerindeki önemine dair çalışmalar da vardır. Biz de kliniğimizde larenks patolojisi nedeniyle direkt laringoskopi uygulanmış ve postoperatif patolojisi larenks skuamöz hücreli karsinom olarak raporlanmış hastaların histopatolojik örneklerinde retrospektif olarak claudinlerle boyanma paterninin ve bunun larenks skuamöz hücreli karsinomlu hastalarının tanı aşamasındaki evresi ile ilişkisini araştırmayı planladık.

Gereç ve yöntem: Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi K.B.B. Kliniğinde tanı ve izlemi yapılan 60 larenks skuamöz hücreli karsinom olgusu çalışmaya alındı. Olguların 57'si (% 95) erkek, 3'ü (% 5) kadın idi. 28 (% 46,6) olgu erken evre, 32 (% 53,3) olgu ileri evre idi. Doku örnekleri % 10'luk formaldehitte tespit edilerek, parafine gömüldü ve histolojik kesitler hazırlandı. Hematoksilen eozin boyasıuygulanarak ışık mikroskopik inceleme yapıldı. İmmünohistokimyasal yöntem ile uygulanan claudin 3, 4 ve 7'nin boyanma şiddeti ve yaygınlığı değerlendirildi.

Bulgular: Erken evre grubuna göre ileri evre grubunda Claudin 7 boyanma yüzdesi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Claudin 7'nin erken evredeki boyanma yüzdesi % 30 iken ileri evredeki boyanma yüzdesi % 55 bulunmuştur. Diğer markerlerden bağımsız olarak Claudin 7 boyanmasındaki her %1'lik artış ileri evre olma ihtimalini 1,021 kat artırmaktadır. Claudin 3 ve 4'ün boyanma yüzdesinde ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Erken evre grubuna göre ileri evre grubunda Claudin 7 boyanma şiddeti istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Diğer markerlerden bağımsız olarak Claudin 7 boyanma şiddetindeki her bir derecelik artış ileri evre olma ihtimalini 2,844 kat artırmaktadır. Claudin 7'nin erken evredeki boyanma şiddeti yüzdesi % 78,6 iken ileri evredeki boyanma şiddeti yüzdesi % 96,9 olarak bulunmuştur. Claudin 3 ve 4'ün boyanma şiddetlerinde ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

Sonuç: Larenks skuamöz hücreli karsinom tanısı alan olguların Claudin 7 ile boyanma yüzdesindeki ve boyanma şiddetindeki artışın ileri evre olma olasılığını arttırdığı saptanmıştır. Claudin 4 ve 3'ün boyanma paternlerinin klinik ve prognoz olarak herhangi bir belirteç olarak kullanılamayacağı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Claudin, larenks skuamöz hücreli karsinom, boyanma yüzdesi boyanma şiddeti

THE IMPORTANCE OF CLAUDINE 3, 4, 7 AT THE PROGNOSIS OF LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS

SUMMARY

Objective: Claudines are tight junctions that provide connections between cells. In recent years a large number of studies have been conducted about the effect of the claudine- subtypes on the prognosis of cancer patients. Escepecially, the prognostic value of claudine 7 on the oral squamous cell carcinomas has been revealed. As well as, there are also studies about the importance on colorectal, breast and prostate cancers. We aimed to investigate the staining patterns of histopathological samples with claudines of patients, whose postoperative pathology have been reported as laryngeal squamous cell carcinoma.

Material and method: 60 patients with laryngeal squamous cell carcinoma whose diagnosis and observation were made in Antalya Education and Research Hospital, Ear Nose Throat Departement, had been enrolled in the study. 57 of the cases were men (95%) and 3 were women (5%). 28 cases were in (46.6%) the early stage, and 32 cases were (53.3%) in the advanced stage. 10% formaldehyde was used for tissue samples than these samples embedded in parafine and than histological sections were prepared. Light microscopic examinations were performed by applying hematoxylin eosin stain. The severity and extention of staining of claudine 3, 4 and 7 had been evaluated with immunohistochemical methods.

Results: The percentage of staining of claudine 7 in the advanced stage group was statistically significantly higher than the early stage group. The percentage of staining of claudine 7 in the early stage was 30% ; whereas the percentage of staining in the advanced stage was 55% . Independent from the other variables, each increase of 1% of the staining of the claudine 7, increases the possibility of being an advanced stage 1,021-fold. There was no significant difference in the percentage of staining in claudine 3 and 4. The intensity of staining of claudine 7 in the advanced stage group was statistically significantly higher than the early stage group. Independently from the other variables each increase of one-degree in the staining –intensity of claudine 7, increases the possibility of being an advanced stage 2.844-fold. The percentage of the intensity of staining of claudine 7 in the early stage was 78,6%; whereas the percentage of the intensity of staining of the advanced stage was 96,9%. There was no significant difference in the intensity of staining of claudine 3 and 4.

Conclusion: It has been determined, that the increase in the percentage of staining and in the intensity of staining of claudine 7 increases the possibility of being an advanced stage in patients with the diagnosis of laryngeal squamous cell carcinoma,. It was found, that the staining pattern of claudine 4 and 3, can not be used as a clinical and prognostic marker.

Keywords: Claudine, laryngeal squamous cell carcinoma, percentage of staining intensity of stain



GİRİŞ

Baş boyun yassı hücreli kanserleri en sık görülen beşinci kanser türüdür ve gelişmekte olan ülkelerde insidansı artış göstermektedir¹. Larenks kanseri erişkinlerde tüm kanserlerin % 2'sini oluşturur². Baş boyun yassı epitel hücreli kanser hastalarına yönelik tedavide büyük bir mesafe kat edilmesine rağmen yaşam beklentisini arttırmaya yönelik uzun yıllar bir sonuç elde edilememiştir.

Hücrelerde bulunan tight junctionlar sıvı ve iyonların hücre içine ve dışına taşınmasında bariyer oluşturarak parasetüler geçirgenlik ve iyonik seçiciliği düzenler³. İki membranı birbirine bağlayan transmembran bağlantı proteinleri claudin ve okludinlerdir^{4,5}. Her ikisi de sıkı bağlantı oluşumuna katılırlar da claudinler daha aktif rol oynarlar. Claudinler 20-27 kilodalton (kDa) ağırlığında olan transmembran proteinleridir. Claudinler 20 izomerden oluşan multijenik bir ailedir. Birçok dokuda çok sayıda claudin alt tipi eksprese edilir⁶.

Son yıllarda değişik claudin alt tiplerinin kanser prognozu üzerindeki etkisi hakkında çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle claudin 7'nin oral skuamöz hücreli karsinomlar üzerindeki prognostik değeri ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra kolorektal, meme, prostat kanserlerindeki önemine dair çalışmalar da vardır. Çalışmamızda biyopsi materyali larenks skuamöz hücreli karsinom olarak raporlanmış hastaların histopatolojik örneklerinde retrospektif olarak Claudinlerle boyanma paternini ve bunun larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının klinik prognozu üzerine etkisi araştırılmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi K.B.B. ve Patoloji Kliniklerinde Şubat 2009 – Şubat 2013 tarihleri arasında tanı konulmuş 60 larenks skuamöz hücreli karsinom olgusu çalışmaya alındı. Olguların 57'si (% 95) erkek, 3'ü (% 5) kadın idi. Hastaların ortalama yaşı 61,2 idi. 28 (%46,6) olgu erken evre, 32 (%53,3) olgu ileri evre idi.

Patoloji arşivimizden hastalara ait preparatlar tekrar incelenerek tümörlü alan içeren preparatlar doku boyutu, yeterliliği, tespit ve takip kalitesine bakılarak tekrar gözden geçirildi ve uygun bloklar seçildi. %10'luk formalinde tespit edilen dokular; LEICA ASP 300 model doku takip cihazında tespit edildi. Doku takip işleminden sonra dokular LEICA EG 1160 blok dökme cihazında bloklandı. LEICA RM 2255 model mikrotom cihazında 5 mikron kalınlığında parafin bloklardan kesitler yapılarak 50 °C'lik su banyosundan (LEICA HI 1210 model)

LEICA polysineli lamlara alındı. Çalışma grubuna alınan olguların parafin bloklarından hazırlanan kesitlere Strept Avidin –Biotin kompleks immünperoksidaz yöntemi ile Claudin- 3 (Rabbit x Poliklonal Ab 140349), Claudin -4 (Rabbit x Poliklonal Ab 15104), Claudin -7 (Rabbit x Poliklonal Ab 79481) uygulandı. Tüm antikorlar için (+) kontrol olarak normal böbrek ve kolon dokusu kullanıldı. Hazırlanan örnekler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Dokuların hazırlanması:

Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler 60 °C' lik ısıda etüvde 30-45 dakika arası sürede üzerindeki parafin eriyene dek bekletildi. Kesitler, aynı etüv içerisindeki ksilollü şale içerisinde 3-5 dakika tutuldu. Etüvden çıkarılan kesitler önce üç ayrı ksilollü şalede, sonra % 50, % 70, % 95 alkollü üç ayrı şalede beşer dakika tutularak çeşme suyunda iyice yıkanarak deparafinize edildikten sonra distile suda yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için % 3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) in distile sudaki solüsyonunda beş dakika inkübe edildi ve distile suda iyice yıkandı.

Boyanma evreleri:

1- Lamlar 2- 3 kez yıkanarak mikrodalgaya dayanıklı özel şalelerde pH 8 olan EDTA buffer solüsyonu içerisine sıralanarak Beko marka 1550 model mikrodalga fırında medium konumunda (yaklaşık 750 mikrodalga güç) yedişer dakika iki kez çevrilerek inkübe edildi. Daha sonra oda ısısında 20-30 dakika soğumaya bırakıldı.

2- pH 7,2-7,4 PBS (0,01M Phosphate Buffer Saline)'de 2-3 dakika yıkandı

3- Doku çevresi silinerek dokular nemli bir ortamda yatay konularak üzerine

PAB (primary antibody) damlatılarak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Üniversal kit. Novocastro Detection System Lot 6020608 kullanıldı.

-Claudin- 3 rabbit x Poliklonal Ab 140349 Dilüsyon 1/150

-Claudin -4 Rabbit x Poliklonal Ab 15104 Dilüsyon 1/300

-Claudin -7 Rabbit x Poliklonal Ab 79481 Dilüsyon 1/150

4- PBS'de 3-5 dakika yıkandı.

5- Kesit çevresi silindikten sonra Biotnyloted Sekonder Antibody damlatılarak 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.

6- PBS'de 3-5 yıkandı.



7- Kesit çevresi silindikten sonra Strepavidin-HRP damlatılarak 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.

8- PBS'de 3-5 dakika yıkandı.

9- Kesit çevresi silindikten sonra DAB kromojen damlatıldı ve 3-5 dak. arası mikroskopta kontrol edilerek distile suya alındı.

10- Mayer Hematoksilen'de 5 dakika zemin boyaması yapıldı ve musluk suyunda 3-5 dakika yıkandı.

11- Kesitler distile sudan geçirildi, Balzam ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Lechpammer ve arkadaşlarının yaptığı çalışma temel alındı.

Boyanma şiddeti 0-3 arasında skorlandı.

Hiç boyanma yok =0

Hafif şiddette boyanma = 1

Orta şiddette boyanma= 2

Şiddetli boyanma= 3 olarak değerlendirildi.

Tümör pozitif alan yüzdesi 0-100 arasında skorlandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Kesikli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler kesikli sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum şeklinde, sıralanabilir değişkenler ise olgu sayısı ve (%) şeklinde ifade edildi.

Gruplar arasında Claudin 7-4-3 boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti yönünden farkın önemliliği Mann Whitney U ile değerlendirildi. Boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti yönünden grupları birbirinden ayırt etmede Claudin 7-4-3 markerlerinin birlikte etkileri Çoklu Değişkenli Lojistik Regresyon Analizi ile araştırıldı. Her bir değişkene ait odds oranı ve %95 güven aralıkları hesaplandı. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olguların 57'si(% 95) erkek, 3'ü (% 5) kadın idi. Ortalama yaş 61,2 idi. 28 (% 46,6) olgu erken evre, 32 (% 53,4) olgu ileri evre idi. Erken evre grubuna göre ileri evre grubunda Claudin 7 boyanma yüzdesi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,026$). Erken evre grubu ile ileri evre grubu arasında Claudin 4 boyanma yüzdesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,748$). Erken evre grubu ile ileri evre grubu arasında Claudin 3 boyanma yüzdesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,982$).

Tablo 1'deerken ve ileri evre gruplarına göre Claudin 7, 4 ve 3 boyanma yüzdeleri gösterilmiştir.

Erken evre grubuna göre ileri evre grubunda Claudin 7 boyanma şiddeti istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,008$). Erken evre grubu ile ileri evre grubu arasında Claudin 4 boyanma şiddeti yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,600$). Erken evre grubu ile ileri evre grubu arasında Claudin 3 boyanma şiddeti yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,911$).

Tablo 2'deerken ve ileri evre gruplarına göre Claudin 7, 4 ve 3 boyanma şiddeti yönünden olguların dağılımı gösterilmiştir.

Erken ve ileri evre gruplarını ayırt etmede Claudin 7, 4 ve 3 boyanma yüzdeleri bir arada değerlendirildiğinde Claudin 4 ve 3'ten bağımsız olarak Claudin 7 boyanma yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirteç olduğu görüldü. Diğer markerlerden bağımsız olarak Claudin 7 boyanmasındaki her %1'lik artış ileri evre olma ihtimalini 1,021 kat (%95 Güven Aralığı: 1,002-1,041) artırmaktaydı ($p=0,029$).

Erken ve ileri evre gruplarını ayırt etmede Claudin 7, 4 ve 3 boyanma şiddetleri bir arada değerlendirildiğinde Claudin 4 ve 3'ten bağımsız olarak Claudin 7 boyanma şiddetinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirteç olduğu görüldü. Diğer markerlerden bağımsız olarak Claudin 7 boyanma şiddetindeki her bir derecelik artış ileri evre olma ihtimalini 2,844 kat (%95 Güven Aralığı: 1,286-6,292) artırmaktaydı ($p=0,010$).



Tablo 1. Erken ve İleri Evre Gruplarına Göre Claudin 7, 4 ve 3 Boyanma Yüzdeleri

Değişkenler	n	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	p-değeri
Claudin 7							0,026
Erken Evre	28	36,8	31,0	30,0	0,0	100,0	
İleri Evre	32	53,8	27,2	55,0	0,0	90,0	
Claudin 4							0,748
Erken Evre	28	48,8	38,8	45,0	0,0	100,0	
İleri Evre	32	50,9	37,7	45,0	0,0	100,0	
Claudin 3							0,982
Erken Evre	28	55,7	29,7	55,0	0,0	100,0	
İleri Evre	32	56,3	28,9	55,0	0,0	100,0	

Tablo 2: Erken ve İleri Evre Gruplarına Göre Claudin 7, 4 ve 3 Boyanma Şiddetleri Yönünden Olguların Dağılımı

Değişkenler	Erken Evre (n:28)	İleri Evre (n:32)	p-değeri
Claudin 7			0,008
Boyanma Yok	6 (%21,4)	1 (%3,1)	
1+	15 (%53,6)	14 (%43,8)	
2+	6 (%21,4)	13 (%40,6)	
3+	1 (%3,6)	4 (%12,5)	
Claudin 4			0,600
Boyanma Yok	6 (%21,4)	5 (%15,6)	
1+	4 (%14,3)	6 (%18,8)	
2+	13 (%46,4)	13 (%40,6)	
3+	5 (%17,9)	8 (%25,0)	
Claudin 3			0,911
Boyanma Yok	3 (%10,7)	1 (%3,1)	
1+	7 (%25,0)	13 (%40,6)	
2+	15 (%53,6)	12 (%37,5)	
3+	3 (%10,7)	6 (%18,8)	



Tablo 3: Erken ve İleri Evre Gruplarını Ayırt Etmede Claudin 7, 4 ve 3 Boyanma Yüzdelерinin Çoklu Değişkenli Lojistik Regresyon Analiziyle Birlikte Etkilerinin İncelenmesi

Değişkenler	Odds Oranı	%95 Güven Aralığı	p-değeri
Claudin 7	1,021	1,002-1,041	0,029
Claudin 4	0,999	0,985-1,014	0,909
Claudin 3	1,004	0,986-1,023	0,658

Tablo 4: Erken ve İleri Evre Gruplarını Ayırt Etmede Claudin 7, 4 ve 3 Boyanma Şiddetinin Çoklu Değişkenli Lojistik Regresyon Analiziyle Birlikte Etkilerinin İncelenmesi

Değişkenler	Odds Oranı	%95 Güven Aralığı	p-değeri
Claudin 7	2,844	1,286-6,292	0,010
Claudin 4	1,128	0,664-1,916	0,655
Claudin 3	1,333	0,664-2,674	0,419

TARTIŞMA

Claudinlerin tümör invazyon ve progresyonunda etkisi olabilir. Çeşitli kanser türlerinde tanısal ve prognostik bir belirleyici olarak kullanılabilir. Tek başına IHK'sal olarak kullanılamayabilir, fakat birkaç kanserin prognozu ve tanısal korelasyonundayardımcı olabilir^{8,9}.

Claudin 1,4,5,7,8,11,14 ve 19 permeabilite claudinleri olup ekspresyonunun artması epitelyal hücreler arasındaki TJ'lerin kuvvetlendiğine işaret eder^{10,11,12,13}. Claudin 2,10,12 ve 16 por oluşturan claudinlerdir, ekspresyonlarının artması TJ'leri zayıfladığını düşündürür¹⁴. Diğer claudinler 3,6,9,13,15,17 ve 18 iyon kanallarını ve hücre içi değişik porların oluşumunu sağlamaktadır^{15,16}. Hücreler arası adezyon kaybının transformasyonda önemli olduğu ve bu durumun da metastatik potansiyeli oluşturduğu gösterilmiştir¹⁷.

Claudin 3,4 ve 7 claudin protein ailesinin önemli üyeleridir. Bu claudinlerin ekspresyonlarının birçok malignitede değiştiği görülmüştür¹⁸. Bizde çalışmamızda ülkemizde saptanan larenks kanserli hastalarda bu claudinlerin ekspresyonlarını ve hastalık evresi ile ilişkisini ortaya koymaya çalıştık.

Genel olarak Claudinekspresyonunun kaybının TJ fonksiyonlarında azalmaya ve bunun

sonucunda da karsinogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu etkisi hücre proliferasyonu, hücre motilitesi ve kanser hücresinin invazyon artışı yoluyla olmaktadır¹⁸. Bu görüş ile benzer şekilde Nazofarenks karsinomlarında yapılan bir çalışmada Fluorourasil tedavisi ile nazofarenks hücresinde claudin 1 ekspresyonunun arttığını ve apoptozisin azaldığı gözlenmiştir¹⁹. Bu çalışmaların aksine, literatürde claudin ekspresyon kaybının karsinogeneizde rol oynadığı öne süren çalışmalar da vardır. Baş boyun karsinomu, metastatik meme karsinomu ve invaziv duktal meme karsinomlarında claudin 7 ekspresyonlarında azalma görülmüştür^{20,21,22}. Bizim çalışmamızda ise ileri evre larenks karsinomunda claudin 7 ekspresyonunda artış görülmüştür.

Claudin ailesinin esas fonksiyonu hücrenin hücreye adezyonudur. Bu nedenle claudinlerin ekspresyonunda bir azalma tümör hücrelerinin motilitesindeki artışa ve bunun sonucunda da invazyona neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında bazı kanser tiplerinde claudin ekspresyonu artmıştır. Biz de aynı şekilde Claudin 7 ekspresyonunda artış bulduk. Normalde ileri evre hastalarda claudin 7 ekspresyonunda azalma beklerken görülmemiş bu artışın sebebi adezyon etkisinin dışında başka fonksiyonlarının da



olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Şu an için temel olan görüşe göre claudinlerin neoplastik transformasyonu etkilemesi matriks metalloproteinazlar yoluyla olmaktadır. Claudin 1'in artışı oral kavite skuamöz hücreli karsinom invazyonunu matriks metalloproteinaz -1 ve 2 yoluyla ve claudin 3 ve 4'ün aşırı ekspresyonu over yüzey epitel invazyonu matriks metalloproteinaz-2 aktivitesiyle sağlandığı düşünülmektedir^{23,24}. Ama bizim çalışmamızda larenks kanserlerinde claudin 3 ve 4 ekspresyon artışında her hangi bir fark gözlenmedi.

Claudin ekspresyonu özefagus ve dil skuamöz hücreli karsinomlarında da gösterilmiştir. Özefagusta claudin 4 ekspresyonunda azalma daha yüksek metastaz oranıyla beraberken, claudin 3 skuamöz hücreli karsinomla adenokarsinom karşılaştırıldığında daha düşük gözlenmiştir^{25,26}. Bizim çalışmamızda ise claudin 3 ve 4'ün ekspresyonunda erken ve ileri evre larenks karsinomlu hastalar arasında fark bulunmadı.

Hsueh ve arkadaşlarının çalışmasında claudin 4 ve 7'nin nazofarenks karsinomlu hastalarında evre ve uzak metastazla ilişkili bulunmuştur²⁷. Bizim çalışmamızda da claudin7 ekspresyon artışının ileri evre ile ilişkili olduğu görüldü.

Dil skuamöz hücreli karsinomunda ise claudin 7'nin güçlü bir biçimde eksprese olduğu gözlenmiş ve claudin 7 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur²⁶. Bizim çalışmamızda da ise claudin 7 ekspresyonu ileri evre larenks karsinomlarında daha yüksek bulundu.

Claudin 3'ün deri skuamöz hücreli karsinomlarda artmış olduğu gösterilmiştir. Claudin 4'te düşük ekspresyon gözlenmiştir. Normal deri ile karşılaştırıldığında deri skuamöz hücreli karsinomunda claudin 4 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Aktinik keratozda fark saptanamamıştır. Claudin 7'nin deri skuamöz hücreli karsinomda normal deriye oranla daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir²⁸. Bizde benzer olarak ileri evre larenks karsinomlarında erken evreye oranla daha fazla bulduk.

Claudin 4 ve 7 ekspresyon kaybının epitelyalden mezenkimale transizyona sebep olduğu ve bunun da daha agresif bir fenotip neden olabileceği söylenmiştir. Claudin 4 ve 7 impermeabilite claudinleridir. Nazofarenks karsinomu ileri evre hastalarında claudin 4 ekspresyonunun daha fazla arttığı gözlenmiştir²⁷. Bizim çalışmamızda ise böyle bir fark gözlenmedi. Claudin 4 ve 7 ekspresyonunun artışı

surveyi azaltmaktadır. Bizim çalışmamızda ise claudin 7 ekspresyonundaki artış ileri evre larenks karsinomlarında erken evreye oranla daha fazla görüldü.

Literatürde claudin ekspresyonu over, özofagus, mesane, akciğer, meme, böbrek gibi çeşitli organ tümörlerinde gösterilmiştir. Ancak larenks tümörlerinde yapılan herhangi bir claudin çalışması yoktur. Bizim çalışmamız larenks kanserlerinde claudin ekspresyonunu amaçlayan ilk çalışmadır. Diğer çalışmalarda sıklıkla claudin 7, 8 değerlendirilmiştir^{8,9}. Bizde çalışmamızda claudin 3,4 ve 7 ekspresyonunu değerlendirdik.

Claudinler ayrıca inflamatuvar barsak hastalığı, retinopati, maküler dejenerasyon ve hepatitler gibi malign olmayan hastalıklarda da eksprese olmaktadır^{7,29,30,31}.

Birçok dokuda çok sayıda claudin alt tipi eksprese edilir⁶. Claudin4'ün TJ proteini olmak dışında hücre adezyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir. Gröne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kolorektal kanserlerde claudin 1 ve 12'nin aşırı eksprese olduğunu, claudin 8'in ekspresyonunda azalma olduğunu bulmuşlardır³². Meme karsinomlarında da Claudin 3 ve 4'ün, % 62 ve % 26 oranlarında eksprese olduğunu saptanmıştır³³. Claudin 3 ve 4 ekspresyonu over kanserinde de artmaktadır. Bu artış özellikle agresif davranış gösteren şeffah hücreli ve seröz papiller endometrial ve over seröz adenokarsinomlarında olmaktadır^{34,35}. Claudin 4 kolonik ve gastrik neoplazik dokuda güçlü bir şekilde eksprese olmaktadır, prostat, plasenta, akciğer ve pankreasda orta derecede, ince bağırsak, böbrek ve uterusda daha düşük oranda eksprese olmaktadır³⁶. Sobel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada servikal invaziv karsinomlarda ve servikal intraepitelyal neoplazilerde Claudin 1, 2, 4 ve 7 ekspresyonunun artış gösterdiğini bulmuşlardır. Claudin 1'in ise özellikle premalign dönemde artış olduğunu bildirmektedir; bu nedenle Claudin 1'in servikal intraepitelyal neoplazi lezyonlarının saptanmasında iyi bir immünohistokimyasal belirleyici olabileceğini belirtmektedirler³⁷. Claudin 1 transmembranöz bir protein olup özellikle karaciğer ile böbrekten eksprese olmaktadır⁷. Ayrıca claudin 1 yumuşak doku lezyonlarından perinöroma için tavsiye edilen bir belirteçtir^{38,39}.

Ekizve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada İHK'sal olarak Claudin 3 ile malign plevral mezotelyoma'ların (MPM) akciğer adenokarsinomlarına göre çok daha az boyandığı, Claudin 4 ile hiç boyanmadığı saptanmıştır. Bu İHK belirleyicilerinin, epitelyal tip MPM ve akciğer



adenokarsinomu ayırıcı tanısında yardımcı olacağı ve özellikle Claudin 4'ün immünohistokimya paneline eklenmesi gerektiği düşünülmektedir⁴⁰.

Çalışmamızda claudin 7 boyanma şiddeti 1+ erken evre grubunda 15 (% 53,6), ileri evre grubunda 14 (% 43,8) ; 2+ erken evre grubunda 6 (% 21,4), ileri evre grubunda 13 (% 40,6); 3+ erken evre grubunda 1 (% 3,6), ileri evre grubunda 4 (% 12,5) olgu olarak saptandı. Erken evre grubuna göre ileri evre grubunda Claudin 7 boyanma şiddeti daha yüksek bulundu. Claudin 4 boyanma şiddeti 1+ erken evre grubunda 4 (% 14,3), ileri evre grubunda 6 (% 18,8) ; 2+ erken evre grubunda 13 (% 46,4), ileri evre grubunda 13 (% 40,6); 3+ erken evre grubunda 5 (% 17,9), ileri evre grubunda 8 (% 25) olgu olarak saptandı. Claudin 3 boyanma şiddeti 1+ erken evre grubunda 7 (% 25), ileri evre grubunda 13 (% 40,6) ; 2+ erken evre grubunda 15 (% 53,6), ileri evre grubunda 13 (% 37,5); 3+ erken evre grubunda 3 (% 10,7), ileri evre grubunda 6 (% 18,8) olgu olarak saptandı. Erken evre grubu ile ileri evre grubu arasında Claudin 4 ve Claudin 3 boyanma şiddeti yönünden anlamlı farklılık görülmedi.

Claudin 3,4 ve 7 claudin protein ailesinin önemli üyeleridir. Bu claudinlerin ekspresyonlarının birçok malignitede değiştiği görülmüştür¹⁸. Biz de çalışmamızda bu nedenlerden dolayı bu claudinlerin larenks kanserindeki değişimini göstermeye çalıştık. Birçok hastalıkta çeşitli claudinlerin farklı ekspresyon paternleri saptanmıştır bu konunun netleştirilmesi için daha birçok prospektif klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Biz özellikle claudin 7'nin larenks kanserlerinde yapılacak olan daha fazla hasta sayılı çalışmalar sonucunda prognostik indikatörler olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ

Sonuç olarak larenks skuamöz hücreli karsinom tanısı alan olguların Claudin 7 ile boyanma yüzdesindeki ve boyanma şiddetindeki artışın ileri evre olma olasılığını arttırdığı saptanmış olup, Claudin 7 ekspresyon artışı daha agresiv bir tümör biyolojik davranışına işaret edebileceği için histopatolojik incelemelerde bakılması gereken bir kriter olabilir. Claudin 3 ve 4'ün rutin incelemeye girmesini destekleyecek somut veri elde edilemediği için farklı ve daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001; 94: 153–156.

2. Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Volume 1. 9 th ed. Elsevier, China, 2004: 335–359.

3. Anderson JM, Von Itallie CM. Tight Junctions and of the molecular basis for regulation and paracellular permeability; Am J. Physical 1995; 269: 6467-6475

4. Y Soini, Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours, Histopathology 2005, 46, 551-560.

5. Tsukita S, Furuse M, Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. Cell Biol, 2002; 14; 531-536

6. Morin PJ; Claudin proteins in human cancer. Promising new targets for diagnosis and therapy - Cancer Res 2005; 65: 9603-9606

7. Florian R. Fritzsche, Beibei Oelrich, Manfred Johannsen, Ilka Kristiansen, Holger Moch, Klaus Jung and Glen Kristiansen. Claudin-1 Protein Expression is a Prognostic Marker of Patient Survival in Renal Cell Carcinomas Clin Cancer Res 2008;7035 14(21) November 1, 2008

8. Rangel LBA, Agarwal R, D'Souza T, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. Clin Cancer Res 2003;9: 2567–2575.

9. Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, et al. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. Hum Pathol 2007;38:564–569.

10. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J and Blasig IE: Structure and function of claudins. Biochim Biophys Acta 1778:631–645, 2008.

11. Ouban A, Ahmed AA: Claudins in human cancer: a review. Histol Histopathol 25:83–90, 2010.

12. Will C, Fromm M and Muller D: Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. Perit Dial Int 28:577–584, 2008.

13. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA: Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. Cell Mol Life Sci 64:17–28, 2007.

14. Bornholdt J, Friis S, Godiksen S et al: The level of claudin-7 is reduced as an early event in colorectal carcinogenesis. BMC Cancer 11:65, 2011.

15. Will C, Fromm M and Muller D: Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. Perit Dial Int 28:577–584, 2008.

16. Tsukita S, Furuse M and Itoh M: Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2:285-293, 2001.

17. Fritzsche FR, Oelrich B, Johannsen M, Kristiansen I, Moch H, Jung K and Kristiansen G: Claudin-1 Protein Expression is a Prognostic Marker of Patient Survival in Renal Cell Carcinomas Clin Cancer Res;7035 14(21), 2008.

18. Singh AB, Sharma A and Dhawan P: Claudin family of proteins and cancer: an overview. J Oncol. 54:1957, 2010.

19. Lee JW, Hsiao WT, Chen HY, et al: Upregulated claudin-1 expression confers resistance to cell death of nasopharyngeal carcinoma cells. Int J Cancer. 15;126(6):1353-66, 2010.

20. Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al: 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;13: 2021–2033, 2003.
21. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, et al: Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Human Pathology* 37(5):569–577, 2006.
 22. Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K and Næss O: Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology* 16(4): 193–198, 2005.
 23. Oku N, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T and Osaki T: Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res* 66:5251–5, 2006.
 24. Agarwal R, D'Souza T and Morin PJ: Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 65: 7378–85, 2005.
 25. Takala H, Saarnio J, Wiik H, and Soini Y. Claudins 1,3,4,5 and 7 in esophageal cancer loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS* 2007; 115: 838–847.
 26. Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y and Salo T. Expression of claudins 1,4,5 and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Hum Pathol* 2008; 39: 1212–1223.
 27. Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, et al: Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol*. 41(7):944–50, 2010.
 28. Hintsala HR, Siponen M, Haapasaari KM, Karihtala P and Soini Y. Claudins 1,2,3,4,5 and 7 in solar keratosis and squamocellular carcinoma of the skin. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(12) : 2855– 2863.
 29. <http://www.molbio.uniqe.ch/citi/images/fig.2> Erişim tarihi: 24.05.2010
 30. Tai AW, Chung RT. The hepatitis C virus plot thickens: enter claudin-1. *Gastroenterology* 2007;133:1041– 2
 31. Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis* 2007;10:103–117.
 32. Gröne J, Weber B, Staub E, Heinze M, Klamann I, Pilarsky C, Hermann K, Castanos – Vele ZE, Röpcke S, Mann B. Rosenthal Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer; frequent dysregulation of Claudin -1, 8 and 12 *Int J. Colorectal Dis.* 2007; 22: 651–659
 33. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argoni P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins Claudin 3 and 4 . *Am J. Pathol* 2004; 164:1627–1633
 34. Choi YL, Kim J, Kwon MJ, et al. Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation. *Histopathol* 2007;22:1185–1195.
 35. Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear cell, and endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109:263–269.
 36. Zheng JY, Yu D, Foroozgar M, Ko E, Chan J, Kim N, Chin R, Pang S. Regulation of the expression of the prostate-specific antigen by claudin-7. *J Membr Biol* 2003; 194: 187–97.
 37. Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schoff Z; Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Human Pathol* 2005; 36: 162–169
 38. Paul FC, Spector G, Kaiser NT. Larenks ve Larengeofarenksin Tümörleri. In: Ballenger JJ, Snow BJ. Otorinolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. (Şenocak D. Türkçe Çeviri editörü). 15. baskı, Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 2000; 32: 585–652.
 39. Folpe AL, Billings SD, McKenney JK, Walsh SV, Nusrat A, Weiss SW. Expression of Claudin-1 a recently described tight junction-associated protein , distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. *Am. J. Surg. Pathol.* 2002; 26: 1620–1626
 40. Şule Ekiz, E. Tutar. Malign Mezotelyoma ve Akciğer Adenokarsinomlarında claudin 3 ve 4 immünreaktivitesi. *Türk patoloji dergisi* Vol. 25 No 2, 2009, 1–5