

# Claudin 2, 3 és 4 expressziója coeliakiás gyermekek proximális és disztális duodenumában

Nagy Szakál Dorottya oh., Gyórfy Hajnalka dr.<sup>1</sup>, Tőkés Anna-Mária dr.<sup>1</sup>,  
Arató András dr., Dezsőfi Antal dr., Veres Gábor dr.

Semmelweis Egyetem, I. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest (igazgató: Tulassay Tivadar dr.)

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, II. Patológiai Intézet, Budapest (igazgató: Schaff Zsuzsanna dr.)

LEVELEZÉSI CÍM:

Veres Gábor dr.

1083 Budapest, Bókay u. 53.

E-mail: vergab@gyer1.sote.hu

**Bevezetés:** A coeliakia diagnosztikájában alapvető szerepe van a szöveti mintavételnek, de pontosan nem ismert, hogy a duodenum melyik része a legalkalmasabb erre. A claudinok (CLDN), mint a tight junction alkotórészei jellemző expressziós mintázatot mutatnak különböző daganatos és gyulladásoz kórképekben, de megjelenésük coeliakiában még ismeretlen.

**Célkitűzés:** Rutin szövettani elemzés, Marsh-felosztás, CD3-expresszió, CLDN 2, 3 és 4 összehasonlító elemzése a duodenum proximális és disztális régiójában.

**Betegek és módszer:** 33 coeliakiás gyermek (életkor: 2–17 év, átlag: 6,4 év, 20 lány, 13 fiú) endoszkópos úton eltávolított biopsziás mintái a duodenum két különböző régiójából. Kontrollként 14 egészséges gyermek proximális és disztális duodenum mintái szolgáltak. Immunhisztokémiai vizsgálatnál monoklonális CD3 és CLDN 2, 3 és 4 elleni antitesteket alkalmaztunk. Az atrófia súlyosságát Marsh-féle módszerrel határoztuk meg.

**Eredmények:** A coeliakiás mintákban a CD3-pozitív T-sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a bulbusban ( $p=0,026$ ) és a disztális szegmensben ( $p=0,006$ ), mint a kontrollokban, de a coeliakiás betegekben sem a makroszkópos, sem a mikroszkópos kép (Marsh-felosztás, CD3) szignifikánsan a duodenum két régiójában egymástól nem különbözött. CLDN 2 expresszió a coeliakiás gyermekekben szignifikánsan fokozott volt az enyhébb boholykárosodásnál a disztális régióban ( $p=0,02$ ), súlyosabb atrófiában a bulbusban és a disztális régióban ( $p=0,001$ ) a kontrollhoz képest. A CLDN 2 expresszió a súlyosabb formában a bulbusban és a disztális régióban egyaránt fokozott volt az enyhébb formával szemben ( $p=0,04$  és  $p=0,03$ ). Ezt az összefüggést a CLDN 3 is mutatta (bulbus  $p=0,008$  és disztális régió:  $p=0,004$ ). A CLDN 3 expresszió a súlyosabb formában a bulbusban és a disztális duodenumban is magasabb volt a kontrollhoz képest. A CLDN 4 megjelenése nem mutatott jelentős eltérést a vizsgált csoportok között.

**Következtetés:** Mind a proximális, mind a disztális duodenum megbízható helye a biopsziás mintavételnek, hogy kimutassa a boholyatrófiát a coeliakiás betegekben. Azonban a disztális duodenum érzékenyebb vizsgálatokkal már a korai elváltozásokat is mutathatja, ezért enyhe károsodásban megfelelőbbnek tűnhet a mintavételre. A coeliakiásokban kimutatott fokozott CLDN 2 és 3 expresszió a tight-junction strukturális változására utal, amelynek szerepe lehet a coeliakiában megfigyelt fokozott permeabilitásban, illetve a megváltozott sejt-sejt kapcsolatban, proliferációban.

**KULCSSZAVAK:** CLAUDIN, IMMUNHISZTOKÉMIA, DUODENUM, BIOPSZIA, COELIAKIA

**A** coeliakia, vagy más néven gluténszenzitív enteropathia a vékonybél egyik leggyakoribb malabszorpcióhoz vezető betegsége, amelyet a gabonafélék gluténfrakciója idéz elő genetikailag fogékony egyéneknél (1, 2). A coeliakia gyakorisága, illetve felismerési aránya egyre növekszik, a szűrővizsgálatoknak köszönhetően már a kezdeti, enyhébb formák is jól kórismézhetők (3, 4), amit hazai adatok is alátámasztanak (5, 6). Bár a szerológiai vizsgálatok pozitív és negatív prediktív értékei coeliakiában kiválóak, a vékonybélből vett szövettani minta elemzése a diagnózis felállításához szükséges. A biopsziás mintavétel kapszuláris módszer segítségével is történhet (7), azonban az endoszkópos mintavételnek számos előnye van: makroszkóposan látjuk a nyálkahártyát a mintavétel során, illetve egyszerre több szövettani minta is nyerhető a kórosabbnak látszó területről (8, 9). Irodalmi adatok alapján nem ismert pontosan, hogy enyhébb boholykárosodásnál honnan érdemes a biopsziás mintát venni: a proximálisabban elhelyezkedő bulbusból vagy a disztálisabban fekvő duodeno-jejunalis átmenetből (10, 11). Vizsgálatunk egyik része ennek a kérdésnek a megválaszolására irányult.

Kutatásunk másik részének központjában a claudinok (CLDN) expressziójának elemzése állt. A CLDN központi szerepet játszanak a sejtadhézió, polaritás és a paracelluláris transzport szabályozásában (12). A CLDN a „tight junction” alkotórészei, 24 alcsoportja ismert (13). Mivel a daganatok patomechanizmusában fontos tényező a sejt-sejt közötti kóros kapcsolódás, nem meglepő, hogy CLDN vonatkozásában a legtöbb ismeret innen ered (14–16). Korábbi vizsgálatok alapján a fokozott permeabilitás, megváltozott sejtek közötti kapcsolat a coeliakia sajátossága is (17–20), így feltételeztük, hogy a CLDN expressziója a coeliakia patomechanizmusában is szerepet játszik.

Ennek alapján célkitűzésünk kettős, egyrészt meghatározása annak, hogy honnan érdemes a biopsziás mintát venni: a proximális vagy a disztális duodenumból. Marsh-féle morfológiai és immunhisztológiai (CD3) módszerek segítségével hasonlítottuk össze a két régió mucosáját. Ezen kívül a két bélszegmensben vizsgáltuk a CLDN expressziós mintázatát coeliakiás betegekben és kontrollokban.

## Betegek és módszer

33 újonnan kórismézett coeliakiás gyermek (életkor: 2–17 év, átlag: 6,4 év, 20 lány, 13 fiú) endoszkópos úton eltávolított biopsziás mintáit elemeztük a duodenum két különböző régiójában. Valamennyi gyermeknél pozitív szerológia (transzglutamináz) és boholykárosodás jelenléte alapján történt a diagnózis felállítása a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinikáján. Az endoszkópos mintavételnél a proximális biopszia a duodenum bulbusból, a disztális pedig a duodeno-jejunalis átmenetből történt. Kontrollként 14 olyan gyermek (11 lány, 3 fiú) hasonló lokalizációjú mintái szolgáltak, akiknél a felső endoszkópia organikus ok kizárása miatt történt, de a

makroszkópos kép, szövettani vizsgálat és laboratóriumi eredmények normálisak voltak, beleértve a normális transzglutamináz értéket is.

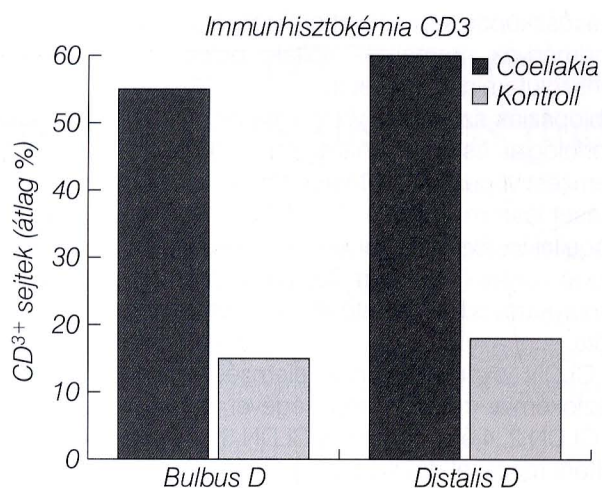
A biopsziák szövettani vizsgálatakor először Marsh-féle morfológiai és immunhisztológiai (monoklonális CD3) elemzést végeztünk. A Marsh-beosztás részletes ismertetését lásd másutt (21, 22). A Marsh-beosztás alapján a coeliakiás betegeinket két csoportra osztottuk, egy kevésbé súlyos (I. csoport, Marsh 3-ig) és egy súlyosabb boholykárosodást mutató (II. csoport, Marsh 4) populációra.

A CLDN expressziójának elemzése szintén immunhisztokémiai módszer segítségével történt (monoklonális CLDN 2, 4 és poliklonális CLDN 3). Az eltávolított szövettani mintákat 4%-os pufferolt formalinoldatba helyeztük 24 óráig, majd víztelenítettük. Ezután paraffinba ágyazva 3–5 mikrométeres metszeteket készítettünk, amiket hematoxilín-eozinnal festettük. Az antigén feltársa *Dako* antigénfeltárási odatával 30 percig mikrohullámú sütőben (42 fokon) történt, majd az inkubáció következtett primer antitesttel 1:80 hígítással 60 percen keresztül. A reakció láthatóvá tétele az avidin-biotin komplex segítségével történt (peroxidáz technika). Az értékelés pontrendszere a pozitív sejtek százalékos arányán alapult (0: 5%>; 1: 5–20%; 2: 20–40%; 3: 40–60%; 4: 60–80%; 5: 80–100%). A statisztikai számításokat a nonparametrikus értékek (*Shapiro–Wilk*-teszt) miatt először *Kruskal–Wallis*-módszerrel végeztük, majd faktoriális ANOVA-t és post hoc *Fisher*-tesztet alkalmaztunk, hiszen a CLDN (függő változó) változását két tényező (stádium és lokalizáció) is befolyásolta. Szignifikáns különbségnek a  $p < 0,05$  értéket tekintettük. A szülők írásban hozzájárultak a betegek szövettani mintáinak elemzéséhez.

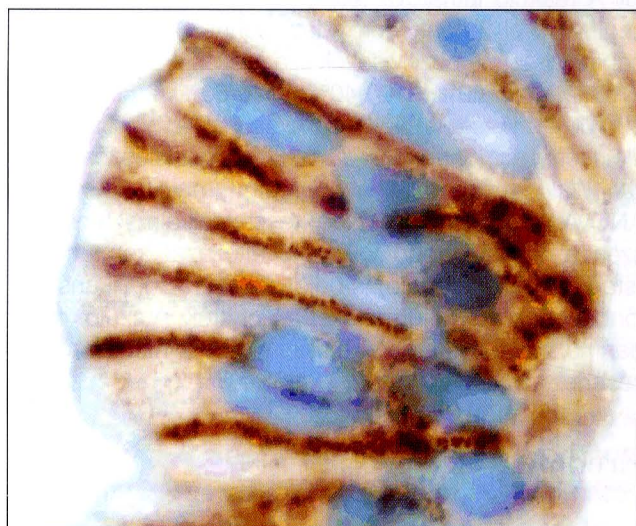
## Eredmények

Az endoszkópiás vizsgálatnál a coeliakiások duodenumának két különböző régiójában sokszor makroszkóposan is jól látható atrofias jeleket láttunk a kontrollhoz képest, de a proximális és a disztális régió között jelentős különbséget nem találtunk. A coeliakiásokban történt mikroszkópos vizsgálat és *Marsh*-elemzés sem igazolt a két duodenum szegmens között markáns különbséget. A korábban is már ismert adatoknak megfelelően a coeliakiás mintákban a CD3-pozitív T-sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a bulbusban ( $p = 0,026$ ) és a disztális szegmensben ( $p = 0,006$ ), mint a kontrollokban, de a két régió egymástól szignifikánsan nem különbözött (1. ábra). Bár a módszereknél ismertetettek szerint a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak, a pontosabb szignifikancia-értékeket is feltüntetjük, így jól látszik az a tendencia, hogy a disztális régióban a vizsgált paraméterek denzitása magasabb, mint a proximális területen. Ez a CD3 mellett a CLDN 2 és 3 vonatkozásában is megfigyelhető.

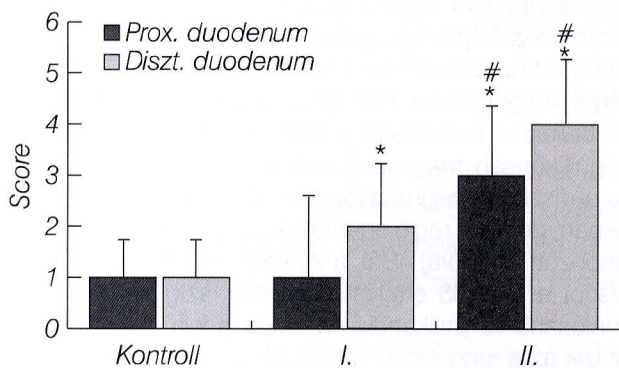
Az immunhisztokémiai módszerrel kimutatott CLDN 2 megjelenése a mucosalis sejtekben citoplazmatikus lo-



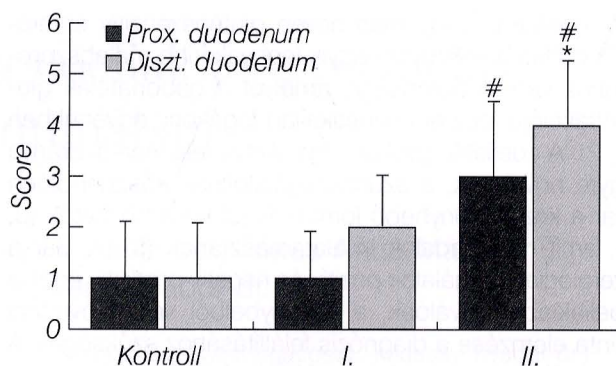
1. ábra: A CD3-expressziót mutató sejtek százalékos aránya coeliakiások és kontrollok intraepithelialis régióban. A coeliakiás mintákban a CD3-pozitív T-sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a bulbusban ( $p=0,026$ ) és a disztális szegmensben ( $p=0,006$ ), mint a kontrollokban



2. ábra: A CLDN 3 expressziója (barnás színreakció) coeliakiás epitheliumban. A CLDN 3 a citoplazma membránján jelenik meg, döntően lineárisan



3. ábra: A CLDN 2 expressziója coeliakiás betegek proximális és disztális duodenumában a kontrollmintákhoz képest. Az I. csoport Marsh-felosztás szerint (1–3) a kevésbé súlyos boholykárosodást, míg a II. csoport a súlyosabb (Marsh 4) léziójú egyéneket foglalja magába. (\* $p<0,05$  vs. kontroll, # $p<0,05$  vs. I. csoport)



4. ábra: A CLDN 3 expressziója coeliakiás betegek proximális és disztális duodenumában a kontrollmintákhoz képest. Az I. csoport Marsh-felosztás szerint (1–3) a kevésbé súlyos boholykárosodást, míg a II. csoport a súlyosabb (Marsh 4) léziójú egyéneket foglalja magába. (\* $p<0,05$  vs. kontroll, # $p<0,05$  vs. I. csoport)

kalizációjú és granuláris jellegű. Ezzel ellentétben a CLDN 3 expressziója a citoplazma membránján jelenik meg, döntően lineárisan (2. ábra). A CLDN 4 szintén a citoplazma membránján expresszálódik.

Kutatásunk egyik fontos eredménye, hogy a CLDN 2 és CLDN 3 expresszió coeliakiásokban kifejezettebb, mint a kontrollokban. Amennyiben a coeliakiásokat a boholykárosodás alapján két csoportra osztottuk, egy kevésbé súlyos (I. csoport, Marsh 3-ig) és egy súlyosabb boholykárosodást mutató (II. csoport, Marsh 4) populációra, akkor azt találtunk, hogy a CLDN-denzitás a súlyosabb, II. csoportban nagyobb. Eredményeinket részletesebben ismertetve: a CLDN 2 expresszió a coeliakiásokban szignifikánsan fokozott volt az enyhébb boholykárosodásnál a disztális régióban ( $p=0,02$ ), súlyosabb atrófiában a bulbusban és a disztális régióban ( $p=0,001$ ) egyaránt a kontrollhoz képest (3. ábra). A CLDN 2 expresszió a súlyosabb formában a bulbusban és a disztális régióban egyaránt nagyobb volt az enyhébb formával szemben ( $p=0,04$  és  $p=0,03$ ) (3. ábra). Ezt az összefüggést a CLDN 3 is mutatta (bulbus  $p=0,008$  és disztális régió:  $p=0,004$ ) (4. ábra). A CLDN 3 expresszió a súlyosabb formában a bulbusban és a disztális duodenumban is magasabb volt a kontrollhoz képest (4. ábra). A CLDN 4 megjelenése nem mutatott jelentős eltérést a vizsgált csoportok között.

## Megbeszélés

Vizsgálatunk alapján megállapítható, hogy a mindennapi gyakorlatban a duodenum proximális és disztális régiója egyaránt alkalmas a coeliakiás egyének boholykárosodásának igazolására. Bár a disztális területen a károsodás mértéke és a CD3-denzitás magasabb volt, mint proximálisan, a különbség nem érte el a szignifikancia határát. A CLDN 2 és 3 expressziója a disztális régióban nagyobb volt, mint proximálisan, ez indirekt módon szintén kissé jelentősebb mucosalis károsodásra utalhat, bár ennek jelentősége a klinikai gyakorlatban csekély lehet.

Korábbi vizsgálatok szerint felnőtt coeliakiásokban 95%-os egyezést találtak a proximális és a disztális biopsziás minták között (10). Csupán 3 esetben volt olyan eltérés, ahol a két régió egymástól jelentősen különbözött: proximálisabban enyhébb elváltozás, míg disztálisabban jelentősebb atrófia mutatkozott (10). *Ravelli és munkatársai* 120 gyermektől vettek biopsziás mintát a bulbustól a jejunumig (4 helyről). Eredményeik szerint a disztális szakaszokon szignifikánsan gyakrabban mutatkozott totális atrófia, bár összehasonlítva az egy betegből vett mintákat, a különbségek nem voltak szignifikánsak (11). Vizsgálataik alapján megállapították, hogy a diagnózis megbízható felállításához elegendő az egy helyről vett biopsziás minta, ami nem feltétlen a legtávolabbi bélszakasz. Eredményeink korreálnak ezekkel az adatokkal. Kutatásunk másik fontos megállapítása, hogy a CLDN 2 és CLDN 3 expressziója kezeletlen coeliakiás gyermekek mucosájában nagyobb, mint a kontrollban, továbbá a súlyosabb elváltozásban még nagyobb a denzitás. A CLDN expresszióját coeliakiásokban korábban még nem elemezték.

A CLDN a sejtközötti kapcsolóelem, a „tight junction” részei, felelősek a szövetenként eltérő elektromos rezisztenciáért és paracelluláris ionszelektivitásért is (23, 24). Mivel a daganatos kórképekben igen fontos tényező a sejt-sejt közötti integráció megbomlása, nem meglepő, hogy a CLDN-okkal kapcsolatos kutatások döntő részét a karcinogenezis területén végezték (25, 26). A karcinómákban a CLDN mindig jelen vannak és tumorspecifikusan expresszálódnak (27–29). Érdekes módon a nem epithelialis tumorokban (például lymphoma) a CLDN egyáltalán nem, vagy csak a citoplazmában jelennek meg. Hazai vizsgálatok szerint a CLDN 2 expressziója adenocarcinómában nagyobb, mint Barrett-oesophagusban, míg a CLDN 3 és 4 Barrett-oesophagusban és adenocarcinómában egyaránt emelkedett (14).

A CLDN szerepét gyulladással járó bélbetegségben (IBD) is vizsgálták (30, 31). A CLDN 2 expressziója fokozódott

az IBD-s betegekben, míg CLDN 3 és 4 expressziója csökkent vagy átrendeződést mutatott a szövettani mintákban (30).

Coeliakiában a megnövekedett permeabilitás háttérben szerepet tulajdonítanak a kóros sejt-sejt közötti kapcsolódásnak is, vagyis CLDN ebben a folyamatban szerepet játszhatnak. *Fasano és munkatársainak* korábbi vizsgálatai igazolták, hogy kezeletlen coeliakiásokban a „tight junction” fontos alkotójának, a zonulinnak expressziója fokozódik és a mucosális permeabilitás nő (18). További kutatások alapján megállapították, hogy a gliadin a zonulin-1 és occludin révén képes fokozni a permeabilitást (17), továbbá a gliadin szinte azonnal megváltoztatja a bélnyálkahártya barrier funkcióját, átszervezi az aktin-filamentumokat, növekszik az occludin, zonulin és E-kadherin expressziója, ezáltal csökken a transepithelialis rezisztencia és növekszik a permeabilitás (20). Vizsgálataink claudinokkal kapcsolatos eredményei, a fokozott CLDN 2 és 3 expresszió összhangban van ezekkel a megfigyelésekkel. A továbbiakban tervezük a CLDN expressziójának elemzését a gluténmentes étrendet követően.

## Következtetések

Vizsgálataink alapján megállapítható, a proximális és a disztális duodenum egyaránt megbízható helye a biopsziás mintavételnek, hogy igazoljuk a boholykárosodást a coeliakiás betegekben. Azonban a disztális duodenum finomabb módszerekkel már a korai elváltozásokat is mutathatja, ezért enyhe károsodásban megfelelőbbnek tűnhet a mintavételre. A coeliakiásokban kimutatott fokozott CLDN 2 és 3 expresszió a tight-junction strukturális károsodásra utal, amelynek szerepe lehet a coeliakiában megfigyelt fokozott permeabilitásban, illetve a megváltozott sejt-sejt kapcsolatban, proliferációban.

## SUMMARY

### Claudin 2, -3 and -4 expressions in proximal and distal part of duodenum in children with celiac disease

D. Nagy Szakál et al. <sup>1st</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest

**Background:** Duodenal biopsy is an important tool to diagnose celiac disease, however, the most reliable location of biopsy site is still questionable. Claudins (CLDN), members of a large family of adherent junction proteins showing characteristic expression pattern in patients with cancer or inflammatory disorders, nevertheless, CLDN expression in celiac disease is unknown.

**Aim:** Comparative study to examine the CLDN 2, 3 and 4 expressions in proximal and distal part of duodenum in children with celiac disease and in controls.

**Patients and methods:** 33 children (range: 2-17 years, mean age: 6.4, 20 girls, 13 boys) with newly diagnosed celiac disease were enrolled. 14 healthy children (11 girls, 3 boys) served as controls. Biopsies from proximal (duodenal bulb) and distal part (duodenojejunal junction) of duodenum were taken for routine histological

analysis. Severity of mucosal atrophy were determined by means of Marsh-scoring system. Immunohistochemistry were used to detect CD3+ intraepithelial lymphocytes and CLDN 2, 3 and 4 protein expressions.

**Results:** Macroscopic picture (endoscopy), routine histology and Marsh grade depicted no differences between biopsies taken from proximal or distal part of duodenum. The densities of CD3+ intraepithelial T lymphocytes were significantly higher in proximal duodenum ( $p=0,026$ ) and in distal duodenum in comparison to controls ( $p=0,006$ ). CLDN 2 expression was significantly increased in severe form of celiac disease in bulb and in distal duodenum ( $p=0,001$ ), and in distal part of non-severe celiac patients ( $p=0,02$ ), in comparison to controls. CLDN 2 expression was significantly increased in severe form in proximal and in distal

part also ( $p=0,04$  and  $p=0,03$ ) when compared with non-severe form. Similar association was found concerning CLDN 3 expression (bulb,  $p=0,008$ , distal,  $p=0,004$ ). Moreover, CLDN 3 expression was markedly increased in proximal and in distal part of duodenum in severe form in comparison to controls. Expression of CLDN 4 was similar in all groups studied.

**Conclusions:** Both proximal and distal mucosal duodenal biopsies are suitable for diagnosing villous atrophy in patients with

celiac disease, however, using more sensitive methods, the distal part of duodenum depicted earlier signs of mucosal deterioration. Therefore, to diagnose slight changes of mucosal abnormality the distal duodenum seems to be better location for intestinal biopsies. Increased expressions of CLDN 2 and 3 suggest structural changes of tight-junction in celiac disease which may be, at least in part, responsible for increased permeability and proliferation observed in celiac disease.

Keywords: claudin, immunohistochemistry, duodenum, biopsy, coeliac disease

## IRODALOM

1. DICKE WK. COELIAKIE. MD THESIS, UTRECHT, 1950.
2. MARSH MN. GLUTEN, MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX, AND THE SMALL INTESTINE. A MOLECULAR AND IMMUNOBIOLOGIC APPROACH TO THE SPECTRUM OF GLUTEN SENSITIVITY ('COELIAC SPRUE'). *GASTROENTEROLOGY* 1992; 102: 330–354.
3. VAN HEEL DA, WEST J. RECENT ADVANCES IN COELIAC DISEASE. *GUT* 2006; 55: 1037–46.
4. GREEN PH, CELLIER C. COELIAC DISEASE. *N ENGL J MED* 2007; 357: 1731–43.
5. KORPONAY-SZABÓ IR, KOVÁCS JB, CZINNER A, ET AL. HIGH PREVALENCE OF SILENT COELIAC DISEASE IN PRESCHOOL CHILDREN SCREENED WITH IgA/IgG ANTIENDOMYSIUM ANTIBODIES. *J PEDIATR GASTROENTEROL NUTR* 1999; 28: 26–30.
6. KORPONAY-SZABÓ IR, SZABADOS K, PUSZTAI J, ET AL. POPULATION SCREENING FOR COELIAC DISEASE IN PRIMARY CARE BY DISTRICT NURSES USING A RAPID ANTIBODY TEST. DIAGNOSTIC ACCURACY AND FEASIBILITY STUDY. *BMJ* 2007; 335: 1244–7.
7. EL-MATARY W. WIRELESS CAPSULE ENDOSCOPY: INDICATIONS, LIMITATIONS, AND FUTURE CHALLENGES. *J PEDIATR GASTROENTEROL NUTR* 2008; 46: 4–12.
8. O'LOUGHLIN EV, DUTT S, KAMATH R, ET AL. PROSPECTIVE PEER-REVIEW AUDIT OF PAEDIATRIC UPPER GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY. *J PAEDIATR CHILD HEALTH* 2007; 43: 551–4.
9. TURSI A, BRANDIMARTE G, GIORGETTI GM. ENDOSCOPIC FEATURES OF COELIAC DISEASE IN ADULTS AND THEIR CORRELATION WITH AGE, HISTOLOGICAL DAMAGE, AND CLINICAL FORM OF THE DISEASE. *ENDOSCOPY* 2002; 34: 787–792.
10. THIJIS WJ, VAN BAARLEN J, KLEIBEUKER JH, ET AL. DUODENAL VERSUS JEJUNAL BIOPSIES IN SUSPECTED COELIAC DISEASE. *ENDOSCOPY* 2004; 36: 993–6.
11. RAVELLI A, BOLOGNINI S, GAMBAROTTI M, ET AL. VARIABILITY OF HISTOLOGIC LESIONS IN RELATION TO BIOPSY SITE IN GLUTEN-SENSITIVE ENTEROPATHY. *AM J GASTROENTEROL* 2005; 100: 177–85.
12. KINUGASA T, SAKAGUCHI T, GU X, ET AL. CLAUDINS REGULATE THE INTESTINAL BARRIER IN RESPONSE TO IMMUNE MEDIATORS. *GASTROENTEROLOGY* 2000; 118: 1001–11.
13. GONZÁLEZ-MARISCAL L, BETANZOS A, NAVA P, ET AL. TIGHT JUNCTION PROTEINS. *PROG BIOPHYS MOL BIOL* 2003; 81: 1–44.
14. GYÓRFFY H, HOLCZBAUER A, NAGY P, ET AL. CLAUDIN EXPRESSION IN BARRETT'S OESOPHAGUS AND ADENOCARCINOMA. *VIRCHOWS ARCH* 2005; 447: 961–8.
15. AUNG PP, MITANI Y, SANADA Y, ET AL. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CLAUDIN-2 IN NORMAL HUMAN TISSUES AND GASTROINTESTINAL CARCINOMAS. *VIRCHOWS ARCH* 2006; 448: 428–34.
16. KINUGASA T, HUO Q, HIGASHI D, ET AL. SELECTIVE UP-REGULATION OF CLAUDIN-1 AND CLAUDIN-2 IN COLORECTAL CANCER. *ANTICANCER RES* 2007; 27: 3729–34.
17. DRAGO S, ET AL. GLIADIN, ZONULIN AND GUT PERMEABILITY: EFFECTS ON COELIAC AND NON-COELIAC INTESTINAL MUCOSA AND INTESTINAL CELL LINES. *SCAND J GASTROENTEROL* 2006; 41: 408–19.
18. FASANO A, NOT T, WANG W, ET AL. ZONULIN, A NEWLY DISCOVERED MODULATOR OF INTESTINAL PERMEABILITY, AND ITS EXPRESSION IN COELIAC DISEASE. *LANCET* 2000; 355: 1518–9.
19. UTECH M, BRÜWER M, NUSRAT A. TIGHT JUNCTIONS AND CELL-CELL INTERACTIONS. *METHODS MOL BIOL* 2006; 341: 185–95.
20. SANDER GR, CUMMINS AG, HENSHALL T, ET AL. RAPID DISRUPTION OF INTESTINAL BARRIER FUNCTION BY GLIADIN INVOLVES ALTERED EXPRESSION OF APICAL JUNCTIONAL PROTEINS. *TISSUE DEVELOPMENT AND REPAIR* 2005; 579: 4851–5.
21. GREEN, ROSTAMI, MARSH. DIAGNOSIS OF COELIAC DISEASE. *GASTROENTEROLOGY* 2005; 19: 389–400.
22. OBERHUBER G, GRANDITSCH G, VOGELSSANG H. THE HISTOPATHOLOGY OF COELIAC DISEASE: TIME FOR A STANDARDIZED REPORT SCHEME FOR PATHOLOGISTS. *EUR J GASTROENTEROL HEPATOL* 1999; 11: 1185–94.
23. FURUSE M. MOLECULAR MECHANISM BEHIND THE BARRIER FUNCTION OF TIGHT JUNCTIONS. *SEIKAGAKU* 2006; 78: 601–8.
24. TSUKITA S, FURUSE M. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF CLAUDINS, CELL ADHESION MOLECULES AT TIGHT JUNCTIONS. *ANN N Y ACAD SCI* 2000; 915: 129–35.
25. MORIN PJ. CLAUDIN PROTEINS IN HUMAN CANCER: PROMISING NEW TARGETS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY. *CANCER RES* 2005; 65: 9603–6.
26. SWISSHELM K, MACEK R, KUBBIES M. ROLE OF CLAUDINS IN TUMORIGENESIS. *ADV DRUG DELIV REV* 2005; 57: 919–28.
27. SOINI Y. EXPRESSION OF CLAUDINS 1, 2, 3, 4, 5 AND 7 IN VARIOUS TYPES OF TUMOURS. *HISTOPATHOLOGY* 2005; 46: 551–60.
28. KULKA J, TÖKÉS AM. CLAUDIN EXPRESSION IN BREAST TUMORS. *HUM PATHOL* 2005; 36: 859.
29. TÖKÉS AM, KULKA J, PAKU S, ET AL. THE EXPRESSION OF FIVE DIFFERENT CLAUDINS IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS: COMPARISON OF pT1pN1 AND pT1pN0 TUMORS. *PATHOL RES PRACT* 2005; 201: 537–44.
30. PRASAD S, MINGRINO R, KAUKINEN K. INFLAMMATORY PROCESSES HAVE DIFFERENTIAL EFFECTS ON CLAUDINS 2, 3 AND 4 IN COLONIC EPITHELIAL CELLS. *LAB INVEST* 2005; 85: 1139–62.
31. MANKERTZ J, SCHULZKE JD. ALTERED PERMEABILITY IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: PATHOPHYSIOLOGY AND CLINICAL IMPLICATIONS. *CURR OPIN GASTROENTEROL* 2007; 23: 379–83.