

Doktori (Ph.D.) értekezés

**A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRANZIENS RECEPTOR
POTENCIÁL VANILLOID 1 (TRPV1) RECEPTOR SZEREPE AZ ORÁLIS LICHEN
PLANUS PATOMECHANIZMUSÁBAN**



Dr. Bán Ágnes

**Gyógyszertudományok - Neurofarmakológia Program
Téma- és programvezető: Dr. Pintér Erika**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET**

2009

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
A lichen és a lichenoid reakció	4
A neurogén gyulladás mechanizmusa	10
A kapszaicin	12
A kapszaicin TRPV1 receptor.....	13
Célkitűzések	18
I. Fejezet: A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptor expressziójának vizsgálata orális lichen planusban	19
Bevezetés	19
Anyagok és módszerek.....	20
Eredmények	24
Következtetések	29
II. Fejezet: A neonatális kapszaicin deszenzibilizáció hatásának vizsgálata higanykloriddal (HgCl₂) kiváltott lichenoid reakcióra patkány orális mukózában	32
Bevezetés	32
Anyagok és módszerek.....	33
Eredmények	38
Következtetések	44
Új eredmények összefoglalása	46
Irodalomjegyzék	48
Köszönetnyilvánítás	58
Az értekezés alapját képező publikációk	59

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

12-HPETE: 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav

AEA: arachidonoil-etanol-amin

APES: 3-aminopropil-trietoxiszilán

CGRP: calcitonin gén-rokon peptid

DAB: diamino-benzidin

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleinsav

ECAC: epithelial Ca²⁺ channel (epiteliális kalciumion csatorna)

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HgCl₂: higany-klorid

HPV: humán papillóma vírus

IFN γ : interferon γ

IL: interleukin

mRNS: messenger ribonukleinsav

NADA: N-arachidonoil-dopamin

NO: nitrogén-monoxid

NK: neurokin

OLP: orális lichen planus

qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció)

RTX: reziniferatoxin

SP: substance P (P anyag)

TNF α : tumor nekrozis faktor α

TRPV: tranziens receptor potenciál vanilloid receptor

VR1: vanilloid receptor 1

VRL: vanilloid receptor-like (vanilloid receptorszerű)

WHO: World Health Organization

BEVEZETÉS

A lichen és a lichenoid reakció

Az orális lichen planus (OLP) és a lichenoid reakciók a szájnyálkahártya krónikus gyulladással járó lezárásai. A lichen oris a lichen ruber planus szájnyálkahártyán megjelenő formája. A lichen ruber planusban a nyálkahártya érintettség az esetek 50%-ában jelen van, ez lehet orális és genitális. Az esetek 25%-ában izolált formában csak a szájnyálkahártyán jelennek meg tünetek. A szájtünetek megelőzhetik az évek múlva kialakuló bőrtüneteket (Sonkodi 1996). Mindkettő gyakoribb nőknél, mint férfiakon, és a betegek többsége a 30-60 életév közötti korcsoportból származik. Pontos eredete ismeretlen, a kóroki tényezők közül egyre inkább előtérbe kerül az autoimmun hatás, T-sejt-mediált folyamatként írják le, főként a T_{helper1} citokinek (interferon gamma: $IFN\gamma$ és tumor nekrosis faktor alfa: $TNF-\alpha$) fokozott termelése állhat a háttérben (Scully és mtsai 2000), ami további folyamatokat generál, az epiteliális bazális sejtek apoptózisához vezetve. Sugerman és munkatársai az antikeratinocita autocitotoxikus T-sejtek szövettani mintákban való megjelenését írták le, lehetséges antigénnek pedig a hő-sokk proteint tartják (Sugerman és mtsai 2000). Az OLP kialakulása bizonyos antigének megjelenéséhez kötött, erre utal a T-limfocitáinak $v\beta$ génjének csökkent expressziója, ami oligo- vagy monoklonális aktivációt jelez (Zhou és mtsai 1996). Ezek a mechanizmusok vezetnek a típusos klinikai kép megjelenéséhez, létrehozván az apoptózis és a sejtproliferáció egymáshoz viszonyítva különféle arányban való megjelenését. A hámstratum basale sejteinek fokozott apoptózisát valószínűleg a szomszédos környezetben elhelyezkedő aktivált $CD8+$ sejtek működése hozza létre. A keratinocita apoptózis elindításának feltételezett útjai 1) a makrofágok által termelt $TNF-\alpha$ a hámsejtek felszínén található $TNF-\alpha R1$ receptorhoz kötődik, 2) $CD95L$ T-sejtfelszíni receptor a hámsejt

felszínének CD95 receptorához kapcsolódik, 3) a T-sejtek által kiválasztott granzim B a keratinociták felületén lévő pórusokon át a sejtbe jut, elindítva ezzel az apoptózist (Sugerman és Savage 2002). Az apoptózis mellett azonban sejtproliferációt kiváltó tényezők is jelen vannak, ugyanezen CD8⁺ sejtek makrofág-migrációt gátló faktort és RANTES faktort is termelnek (Zhao és mtsai 2002). A RANTES faktor indukálja a fokozott sejtproliferációt, amely valószínűleg válasz a kiváltott bazális rétegben bekövetkező degenerációra. Abban az esetben, ha az apoptózis rátája meghaladja a proliferáció rátáját, a klinikai képből atrófia, majd erózió jelenik meg; amennyiben viszont a proliferációs ráta haladja meg az apoptózist, úgy a retikuláris, papuláris, plakk típusok alakulnak ki (Zhao és mtsai 2002; Brant és mtsai 2008).

A diabétesz és az OLP közötti összefüggésre már 1966-ban Greenspan és munkatársai rámutattak (Grinspan és mtsai 1966), ezt később több tanulmány is megerősítette (Howell és Rick 1973; Petrou-Amerikanou és mtsai 1998). A diabéteszes betegek esetében az OLP atrófiás és eróziós típusainak megjelenése volt gyakori (Borghelli és mtsai 1993). Diabéteszben kimutatható a fagocita sejtek funkciózavara, valamint egyes citokinek (például a TNF- α) termelődésének emelkedése. A kollagenáz aktivitásának fokozódása a gyulladások kifejezettebbé válását és a regeneráció csökkenését eredményezi (Tar és Márton 2009).

A pszichés faktorok (neurózis) szerepe, és a hipertónia is hajlamosító tényező lehet. A korábban feltételezett bakteriális, vírusos eredetet nem sikerült egyértelműen kimutatni, bár számos tanulmány utal arra, hogy a humán papillóma vírus (HPV), ami egy epiteliotrop DNS vírus, befertőzheti a bőr és a nyálkahártya laphámsejtjeit. A papillóma vírusos DNS az OLP-lézióban 19,7%-tól (Campisi és mtsai 2004) 42%-ig (Vesper és mtsai 1997) vagy 65%-ig (Jontell és mtsai 1990) mutatható ki. A klinikailag normál nyálkahártyán is sikerült kimutatni a HPV-t, 10%-tól 36%-ig (Sugiyama és mtsai 2003). Ennek ellenére napjainkig nem pontosan bizonyított a vírus oki szerepe az OLP patogenezisében. A hepatitis C vírus számos

extrahepatikus tünetet produkál, melyek között az OLP is előfordul (Carrozzo és Gandolfo 2003). A hepatitis C vírushoz társuló OLP egyes országokban (pl. Olaszország) a HLA-DR6 allélhoz kötött (Carrozzo és mtsai 2005). A HCV pozitív hepatitisz elsősorban az OLP vörös formáival társulva fordul elő.

Klinikailag a lichen planus a legtöbb esetben kétoldali (Niissalo és mtsai 1999), míg a lichenoid reakció egy oldalon megjelenő folyamat, bár ismert a lichen planus egyoldali és a lichenoid reakció kétoldali előfordulása is. Mindkettőre jellemző a vonalkázott, papulával borított atrofizáló vagy erozív lézió, a két elváltozás azonban klinikailag élesen nem elkülöníthető. Lodi és munkatársai összefoglaló cikkükben oly módon különböztetik meg az OLP-t az orális lichenoid reakciótól, hogy orális lichenoid reakciónak azokat a léziókat tekintik, amik szövettanilag csak részlegesen felelnek meg az OLP kritériumainak (Lodi és mtsai 2005). Orális lichenoid reakció kialakulhat egyes gyógyszerek szedése esetén (**1. táblázat**), és különböző fogászati restaurációs anyagok mellett (amalgám, arany- és ezüst-palládium-ötvözetek, valamint kompozitok) is. A fogászati anyagok esetében kontakt allergizáló szerepet feltételeznek. Csontvelő-transzplantáció következtében gyakran alakul ki graft-versus-host betegség, amelyet az orális lichenoid reakció is jellemez (Scully és Carrozzo 2008). Aromanyagok (fahéj, mentol, borsmenta) kontakt lézió útján szintén kiválthatnak orális lichenoid reakciót, ezek általában ízesítő anyagként vannak jelen rágógumikban, szájvizekben, fogkrémekben.

<u>Gyógyszercsoportok</u>	<u>Hatóanyagok</u>
antimikrobás szerek	ethambutol, griseofulvin, ketokonazol, streptomycin, tetraciklin, trovafloxacin
antihisztamin szerek	ranitidin, roxatin
antihipertenzív szerek	kaptopril, enalapril, doxazozin, propranolol, metildopa, prazosin, nifedipin
maláriaellenes szerek	kloroquin, hidroxi-kloroquin, kinidin
antidepresszánsok, antipszichotikumok	amitriptilin, carbamazepin, klórpromazin, imipramin, lorazepam, fenitoin
diuretikumok	hidroklorotiazid, furosemid, spironolakton
antidiabetikumok	glimepirid, tolazamid,
fémek	aranyosó, arzénsó, bizmut, higany, palládium
nem-szteroid gyulladáscsökkentők	acetilszalicilsav, benoxaprofen, diflunisal, fenclofenac, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, naproxen, sulindac
lipidcsökkentők	pravastatin, simvastatin
egyéb szerek	allopurinol, aminofenazon, cinnarizin, ciánamid, dapson, gemfibrozil, hidroxiurea, hepatitisz B-vakcina, imatinib, immunglobulin, IFN α , L-tiroxin, levamisol, penicillamin, procainamid, mesalamin, lítium, omeprazol, pyrimetamin, pyritioxin, sildenafil, kinin, sotalol, sulfasalazin, trihexifenidil, ursodeoxicholsav

1. táblázat: Orális lichenoid reakciót okozó gyógyszerek (Shiohara és Kano 2003 nyomán)

Az OLP-nek különböző klinikai manifesztációi léteznek, melyeket először Andreasen határozott meg 1968-ban (Andreasen 1968). A retikuláris (lichen oris reticularis) formát klinikailag a finom, mattfehér hálózatos vagy páfrányszerű rajzolat jellemzi, ezt leírójáról Wickham striának nevezzük. A rajzolat egy eritémás vagy változatlan szájnyálkahártyán jelenik meg. Ha a retikuláris rajzolat köralakban jelenik meg, akkor annuláris formáról (lichen oris annularis) beszélünk (Tyldesley 1974). A papulláris forma (lichen oris papulosus) esetében az apró fehér papullák a szájnyálkahártyán önállóan vagy kisebb-nagyobb csoportokban helyezkednek el. A fehér plakkszerű formára (lichen oris plaqueforma) jellemző, hogy a plakkok széléből vékony retikuláris rajzolatok indulnak. Ez a forma nagyon

gyakran jelentkezik a többi formával ellentétben a nyelvháton, de előfordulhat a bukka nyálkahártyáján is. Az atrófiás (lichen planus atrophicus) forma esetében vörös elváltozást látunk, ami a halványtól a sötétvörösre változhat. Amennyiben az atrófiás forma a nyelvháton jelentkezik, ez mindig a nyelvpapillák elvesztéséhez, és a nyelven egy vékony sima nyálkahártya kialakulásához vezet. Az eróziós vagy ulceratív (lichen planus ulcerosus) forma esetében kis hámsérülések, illetve fekélyek alakulnak ki, amelyeket fibrinos álhártya (pszeudomembrán) fed. A ritkán előforduló bullózus forma (lichen planus bullosus) jellegzetessége, hogy a bukka nyálkahártyáján 1-2 mm-től 1 cm-ig terjedő hólyag vagy hólyagok jelennek meg. A hólyagok felrepedése következtében eróziós, fájdalmas hólyagalap válik szabaddá. A különböző klinikai formák egymással minden variációban és kombinációban felléphetnek, vagy egymásba átalakulhatnak. Létezik egy nagyon ritkán előforduló, pigmentált forma (lichen oris pigmentosus), ami az etnikailag pigmentációra hajlamosabb pácienseknél fordul elő az eróziós formák gyógyulása után.

Az Eisen szerinti felosztás (2002) három csoportot különít el: a retikuláris csoportba sorolja az összes fehér rajzolattal, plakkal és papullákkal járó formát, a következő csoportot atrófiás és eritémás formák képezik, a harmadik, eróziós csoportba tartoznak az ulceratív és bullózus formák. Klinikai morfológiai megjelenése rendkívül sokszínű, ezért határozottan el kell különíteni más, a szájnyálkahártyán hasonló tüneteket produkáló betegségektől (**2. táblázat**).

A lichen planus és a lichenoid reakció szövettani jellegzetességeit a World Health Organization (WHO) először 1978-ban, majd 1997-ben gyűjtötte össze és kategorizálta. A lichen planus hisztológiai képe szalagszerű, szubepiteliális limfocita infiltrációval karakterizálható. Az epitéliumban az orto- és parakeratózis megjelenése, valamint az akantózis fokozódása jellemzi. A lichen planusra jellemző a jól definiált, limfociták beszűrődéssel járó szubepiteliális gyulladás, míg a lichenoid reakcióban kifejezettebb a mélyre terjedő diffúz gyulladás (**1. ábra**). A lichenoid reakció diagnosztikus kritériumai

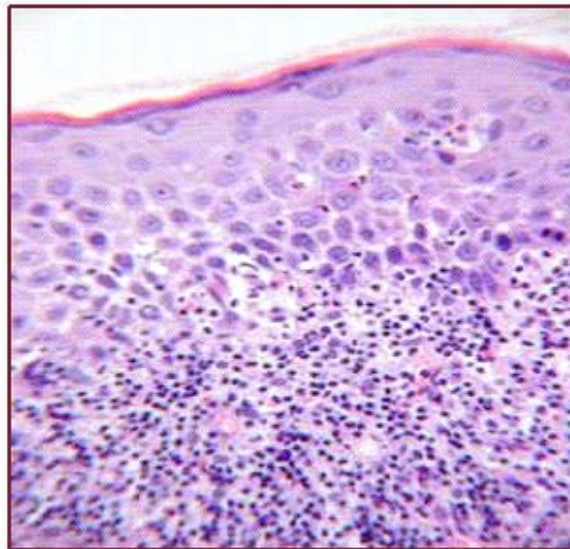
között szerepel a plazmasejtek és az eozinofil sejtek jelenléte. Mindkét lézióban fellelhető a bazális sejtréteg elfolyósodása és az epitél hiperkeratinizációja. A gyulladásos sejtek és szöveti antigének jelenléte megfigyelhető mindkét elváltozásban, a neurogén faktorok szerepe azonban egyelőre vitatott ezekben a betegségekben.

Orális lichen planus klinikai formái	Differenciáldiagnosztika
Retikuláris forma	Morsicatio buccarum et labiorum Morsicatio linguae szájnyálkahártya epiteliális lízise (fogkrém, szájvíz) discoïd lupus erithematodes Haar leukoplakia
Papuláris forma	pseudomembranosus candidiasis Koplik-folt
Plakkszerű forma	leukoplakia leuko-ödéma fehér szájnyálkahártya naevus szisztémás és diszkoid lupus erithematodes szájnyálkahártya savártalmi (aszpirin)
Eritémás (atrófiás) forma	erythroplakia erythremás candidiasis szisztémás és diszkoid lupus erithematodes pemphigus vulgaris pemphigoid betegségcsoport erithema exsudativum multiforme
Ulceratív forma	pemphigus és pemphigoid betegségcsoport Crohn-betegség orális manifestációja gyógyszermellékhatások (orális fekély)
Bullózus forma	pemphigus és pemphigoid betegségcsoport lineáris IgA dermatózis

2. táblázat: Az orális lichen planus differenciáldiagnózisa

A krónikus gyulladás módosítja a neurotranszmitterek kiáramlását a perifériás érzőidegekből, amelyek kapcsolatban állnak a beidegzésben bekövetkező hosszú távú változásokkal, mint

amilyen az idegrostok összehúzódása vagy destrukciója, illetve sarjadzása és formálódása. A perifériás beidegzés hiánya mintegy gátolja a bőr normális növekedését és regenerációját, amely az érintett terület kifehélyesedését okozza. A gyulladásos sejtek által termelt helyi gyulladásos mediátorok aktiválhatják az érzőidegeket, ami pozitív visszacsatolást jelent a szimpatikusan mediált gyulladás és fájdalom számára.



1. ábra: A lichen szövettani képe

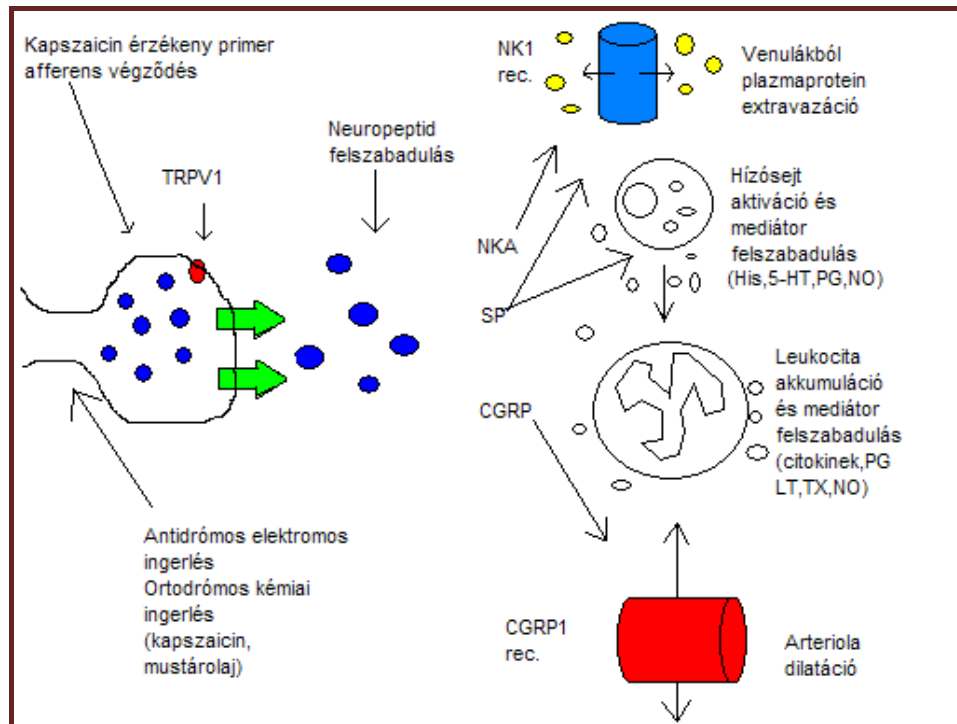
A neurogén gyulladás mechanizmusa

A szenzoros idegrendszer fő feladatai közé tartozik a külső és belső környezetből érkező ingerek felvétele a perifériás idegvégződéseken, mely ingereket érzőrostokon keresztül a központi idegrendszer felé továbbítja. 1876-ban Stricker felfedezte, hogy a gerincvelő hátsó gyökerének ingerlésével a bőrben vazodilatáció váltható ki; ezt a jelenséget Bayliss „antidrómos vazodilatációnak” nevezte el (Bayliss 1901). Az axonreflex teórián alapuló elképzelés az volt, hogy az antidrómos vazodilatációért felelős mediátorok egyes primér

afferensek specializálódott effektor végződéseiből szabadulnak fel. Ma már kísérletesen is alátámasztották, hogy egyes érző axonterminálisok afferens és efferens funkcióval is rendelkeznek, azaz inger hatására a vezikulák formájában raktározott neuropeptideket közvetlenül, axonális vezetés nélkül is képesek felszabadítani (Szolcsányi 1984; Maggi és Meli 1988). A gerincvelői érzőneuronok között vannak tisztán afferens, kevert kettős funkciójú „szenzoros-efferens” neuronok, illetve feltételezik, hogy léteznek tisztán lokális effektor funkciót betöltő neuronok is az érződúcban (Holzer 1988). A szenzoros idegvégzésekkel felszabaduló neuropeptidek közül a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) vazodilatációt, a tachikininek, mint pl. a P-anyag (substance P: SP) és a neurokinin A (NKA), illetve neurokinin B (NKB) a beidegzési területen plazmakiáramlást okoznak, emellett aktiválják a hízósejteket, valamint leukocita akkumulációt idéznek elő. Ezeket a folyamatokat összefoglalva neurogén gyulladásnak nevezzük (**2. ábra**), amely ezen érzőideg-végzések lokális efferens működésének következménye (Pintér és Szolcsányi 1995; Németh és mtsai 1998). Jelentős szerepet tulajdonítanak a neurogén gyulladáshoz számos betegség, a reumatoid arthritisz, asztma bronchiale, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, gyulladáshoz vezető bélbetegségek és gyulladáshoz vezető szembetegségek patomechanizmusában (Maggi 1995; Szolcsányi 1996). Jelenleg nincs forgalomban egyetlen olyan gyógyszerkészítmény sem, ami hatékonyan tudná gátolni egy gyulladással járó betegség neurogén komponensét (Helyes és mtsai 2003).

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében működő kutatócsoport munkája során derült fény arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégzésekkel az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végzések harmadik, szisztémás efferens funkciója (Szolcsányi és mtsai 1998a,b; Helyes és mtsai 2000,

2004), amit az endokrin és parakrin hatás mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin hatásnak nevezett el (Szolcsányi és mtsai 2004).

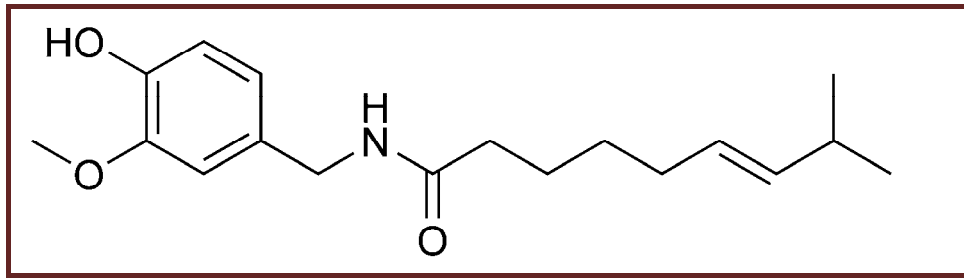


2. ábra: A neurogén gyulladás folyamata

A kapszaicin

Az erős paprika Amerikában őshonos növény. Az aztékok chilinek hívták és ez a név terjedt el Latin-Amerikában. Az Óvilág azonban piros paprikának nevezte el. A chili paprikának tudományos nevet (*Capsicum annuum*) de Tournefort, egy francia botanikus adott.

Az erős paprika aktív összetevőjét Thresh izolálta először 1846-ban (Thresh 1846). Rámutatott arra is, hogy a kapszaicin és a vanillin szerkezete hasonló. 1919-ben azonosították először a kapszaicin struktúráját, ami kémiaailag 8-metil-N-vanillyl-6-nonénamid (**3. ábra**).



3. ábra: A kapszaicin molekula szerkezete

A komplett szintézisre még 20 évet kellett várni. 1912-ben Wilbur Scowille „mérte meg” az erős paprika „csípősségét”. Innen származik a Scowille-egység, ami a csípősség mértékét fejezi ki. Ha egy paprika 50000 Scowille-egységet tartalmaz, ez azt jelenti, hogy 1: 50000-es alkoholos hígítású oldattal kiváltható a nyelven a csípős érzés. A legerősebb paprika, a mexikói habenero 350000 Scowille-egység erősségű.

A népi gyógyászatban már évszázadok óta használják a kapszaicint ízületi betegségek kezelésére, illetve fájdalomcsillapításra, a kapszaicines kenőcsök, illetve tapaszok enyhíthetik a hátfájást, csillapíthatják a reumás ízületi gyulladás és a szenzoros neuropátia tüneteit. Analgetikus hatására mutat rá, hogy az amerikai őslakosok az erős paprika hüvelyét helyezték az ínyükre, ha fáj a foguk. 1850-ben a Dublin Free Press-ben megjelent egy cikk a kapszaicin terápiás használatára vonatkozóan, mely szerint fogfájásra erős paprika alkoholos kivonatát kell alkalmazni (Bevan és Docherty 1993).

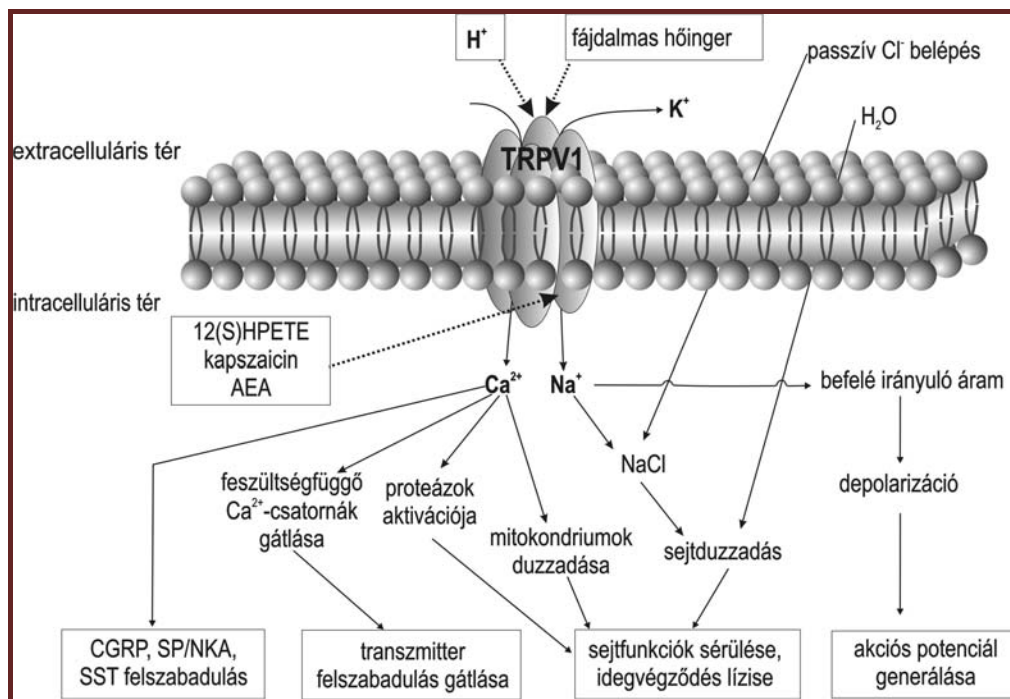
A kapszaicin TRPV1 receptor

A kapszaicin receptor létezésének lehetőségét először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka vetették fel egy 1975-ös cikkben, amelyben kapszaicin és más vanilloid analógok nociceptív hatását vizsgálták patkányon. A vegyületek szerkezete és hatása között tapasztalt

összefüggések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kapszaicinnek receptorális úton kell hatnia. A receptor hipotetikus modelljét is megszerkesztették ekkor (Szolcsányi és Jancsó-Gábor 1975, 1976). A kapszaicin receptort expresszáló gén megtalálása és a receptor szerkezetének megismerése azonban több mint 20 évig váratott még magára, bár 1990-ben patch clamp vizsgálatokkal sikerült bizonyítani, hogy a kapszaicin és a reziniferatoxin ugyanazt a kation-csatornát nyitja az érzőneuronok plazmamembránján (Bevan és Szolcsányi 1990). 1997-ben Julius és munkacsoportja klónozták a kapszaicin receptort, amit a szintén vanilloid struktúrát tartalmazó reziniferatoxinnal való aktiválhatósága miatt vanilloid 1 receptornak (VR1) neveztek el (Caterina és mtsai 1997). Ezt az elnevezést később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatura szerint megváltoztatták, a receptort a tranziens receptor potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták, és a vanilloid család 1-es számú tagjaként tranziens receptor potenciál vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték (Gunthorpe és mtsai 2002). Érdekes, hogy a TRPV család többi receptorára (TRPV2-6) nem hatnak olyan vanilloid struktúrájú vegyületek, mint a kapszaicin és reziniferatoxin, ezek ugyanis valójában csak vanilloid receptorszerű struktúrák és epitheliális Ca^{2+} -csatornák, melyeket a régebbi nomenklatura rendre vanilloid receptor-like (VRL), illetve epithelial Ca^{2+} channel (ECAC) névvel illetett (Gunthorpe és mtsai 2002).

A később klónozott humán TRPV1 receptor 92%-os hasonlóságot mutat a patkány receptor szerkezetével (Hayes és mtsai 2000; McIntyre és mtsai 2001). Ez a receptor 838 aminosavból álló fehérje, amit 6 β -redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel. A csatornarégiót az 5. és 6. alegység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja. Ezek a struktúrák a membránban négy egységből álló tetramerré rendeződve ioncsatornát alkotnak, amely kationokra nem szelektíven érzékeny (**4. ábra**). A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na^+ - és Ca^{2+} -ionok áramlanak be, melyet K^+ -ion sejtéből való kiáramlása követ. A Na^+ -ion főként az akciós potenciál generálásáért felelős, aminek következtében nocicepció, fájdalomérzet alakul ki. A

Ca²⁺-ion beáramlása elsősorban a szenzoros neuropeptidek idegvégződésekből való felszabadulásához vezet. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására a sejtben felhalmozódó kationok magas koncentrációi a citoplazma és a mitokondrium duzzadását okozzák, ennek hosszú távú következményeként a sejtek energiaforgalma csökken, az idegvégződés működésképtelenné válik. Ez a folyamat adja a molekuláris hátterét a nagy dózisu kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzitizációnak (4. ábra), ilyenkor az axonterminálisok működése hónapokig károsodik (Bevan és Szolcsányi 1990; Szolcsányi 1993; Helyes és mtsai 2003).



4. ábra: A TRPV1 receptor felépítése és működése

A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, tehát többféle módon, fizikai vagy kémiai ingerekkel aktiválható intra- és extracellulárisan is. A TRPV1 fájdalmas, 43°C feletti hőingerrel (Tominaga és mtsai 1998; Wang és Woolf 2005), valamint pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható. Számos növényi eredetű vanilloid, a kapszaicinen kívül például a

mexikói kutyatejféleiben (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin (RTX), a borsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérben (*Zingiber officinale*) előforduló zingeron képes nyitni az ioncsatornát. Érdekes módon a kapszaicin, lipofil jellegéből adódóan, a sejtmembránon átjutva intracellulárisan kötődik a receptorhoz, így aktiválva azt (Oh és mtsai 1996). Ezen kívül léteznek a receptornak endogén ligandjai is, például az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (AEA), vagy más néven anandamid (Caterina és mtsai 1997), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE), vagy az N-arachidonoil-dopamin (NADA). Az is ismert, hogy a bradikinin, az egyik legerősebb fájdalomkeltő mediátor, a B₂ receptorokon hatva szenzitizálja a TRPV1-et az intracellulárisan működő másodlagos messenger mechanizmusok révén, valamint a lipoxigenáz termékek szintézisének szabályozásával, foszfolipáz A₂ enzim aktiválásán keresztül (Piomelli és mtsai 2000; Shin és mtsai 2002). Emellett a csatorna működését jelentős mértékben fokozzák a prosztaglandinok, például a gyulladáshoz vezető folyamatokban kulcsfontosságú prosztaglandin E₂, vagy a prosztaciklin néven ismert prosztaglandin I₂ (Szállási és Blumberg 1999; Chuang és mtsai 2001). A receptor potens, valódi endogén ligandja azonban egyelőre nem ismert.

A kapszaicin-érzékeny idegvégződés akut gyulladáshoz és fájdalommodellekben betöltött szerepének vizsgálatára kapszaicinnal vagy RTX-szel kiváltott deszenzibilizációt használnak, amely ismételt, nagy dózissal történő előkezelést jelent. Ezzel a módszerrel a teljes végződés hosszú távú funkcióvesztése, működéskiesése érhető el (Szállási és Blumberg 1993; Ács és mtsai 1994, 1997). A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével lehetőség nyílt génhányos egerek előállítására, ezek segítségével adott fehérje szerepe in vivo szelektíven vizsgálható.

A neurogén gyulladáshoz a vaszkuláris válaszokon kívül más reakciókat is beindít, ilyen a CGRP hatására bekövetkező pozitív inotróp és kronotróp hatás a szívben, vagy a hólyagrelaxáció, illetve a tachikininek által kiváltott m. sphincter pupillae és uréter simaizom összehúzódás,

vagy a szeromukózus mirigyszekréció. Tengerimalacban a TRPV1-et expresszáló idegvégződésekből felszabadult SP, NKA bronchokonstriktiót, patkányban és egérben viszont nitrogén-monoxid (NO)/prosztanoid mediálta bronchodilatációt idéz elő. Emberben a tengerimalachoz hasonlóan bronchokonstriktió lép fel (Bevan és Szolcsányi 1990).

TRPV1 receptor expressziót leírtak korábban már a perifériás és a központi idegrendszerben (Caterina és mtsai 1997; Caterina és Julius 2001), azonban csak nemrégiben azonosították immunhisztokémiai és PCR technikákkal frissen izolált normál humán keratinocitán (Inoue és mtsai 2002; Southall és mtsai 2003), humán epidermiszben (Denda és mtsai 2001), hízósejteken (Stander és mtsai 2004), dendritikus sejteken (Basu és Srivastava 2005), epiteliális sejteken, vaszkuláris endotélsejteken, a nazális mukóza szubmukózus mirigyeiben (Seki és mtsai 2006), valamint az urotéliumban (Avelino és Cruz 2006), és a gasztrikus mukózában (Faussonne-Pellegrini és mtsai 2005).

CÉLKITŰZÉSEK

I. Munkánk során célul tűztük ki, hogy egészséges önkéntesek és orális lichen planusban szenvedő betegek szájnyálkahártya kimetszéseiből immunhisztokémiai módszerekkel megvizsgáljuk a TRPV1 receptorok jelenlétét, illetve molekuláris biológiai módszerekkel kimutassuk a TRPV1 receptor expressziójának változásait patológias körülmények között.

II. Szakirodalmi adatokból ismeretes, hogy az amalgámtömés a szájnyálkahártyán lichenoid reakciót válthat ki. Kísérletsorozatunknak célja volt patkánymodellben megvizsgálni, hogy a higany-klorid (HgCl_2)-oldattal történő szájnyálkahártya ecsetelés kivált-e lichenoid reakciót, a reakcióban hogyan változik a TRPV1 receptorok jelenléte a normál szájnyálkahártyához viszonyítva, illetve, hogy a szenzoros rostok kapszaicinnel történő deszenzibilizációja befolyásolja-e a TRPV1 receptorok expresszióját és a HgCl_2 -dal indukált gyulladást.

I. FEJEZET:
A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID 1 (TRPV1) RECEPTOR
EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ORÁLIS LICHEN PLANUSBAN

BEVEZETÉS

Az orális lichen planus pontos patomechanizmusa még mindig ismeretlen. Feltételezik, hogy autoimmun betegségek, stressz, egyéb szisztémás betegségek, mint például diabétesz, magas vérnyomás, malignus betegségek, traumák, fertőző betegségek, illetve fogászati anyagok, elsősorban az amalgámtömések, szerepet játszanak a patogenezisben (Niissalo és mtsai 1999). Neurogén komponensek szintén befolyásolhatják a gyulladást. A kapszaicin-érzékeny érzőidegekből a TRPV1 receptor aktivációjával felszabaduló neuropeptidek kiváltják az általános bevezetőben részletesen ismertetett neurogén gyulladás folyamatát. A TRPV1 receptorokat nem-neuronális sejteken, például keratinocitákon, gyulladássos és immunsejteken, illetve érendotéleken is kimutatták, de ezen receptorok pontos funkcionális jelentőségét és élettani szerepét nem ismerjük.

Kísérleteink célja az volt, hogy immunhisztokémiai módszerekkel kimutassuk a TRPV1 receptor jelenlétét normál és lichenes nyálkahártyákban, és expressziójának változásait orális lichen planusban a mukóza különböző rétegeinek sejtjeiben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Mintavétel

Az orális lichen planust klinikai jelek alapján diagnosztizáltuk (**5. ábra**), amit rutin hisztológiai vizsgálatok is alátámasztottak. A mintavétel előtt az orális mukózát 1 ml 2%-os lidokain-adrenalin injekcióval infiltráltuk. Az orális mukóza biopsziáját 0,5x0,5 cm nagyságban 18 páciensen végeztük el, 5 férfin és 13 nőn, akiknek életkora 40 és 60 év között volt. A mintavételt 5 egészséges önkéntes páciensnél (3 férfi és 2 nő) is elvégeztük, akiknek életkora 30 és 40 év között volt.



5. ábra: Lichen oris a bukkális nyálkahártyán

A betegek többségének anamnézisére jellemző volt, hogy a lichen mellett egyéb szisztémás alapbetegségben is szenvedtek: magas vérnyomás, alacsony szérum-vas koncentráció, diabétesz, krónikus bronchitisz, allergia, immunológiai háttérbetegség, mélyvénás trombózis, ízületi problémák, lichen ruber planus. E betegek jelentős részénél nem csak egy, hanem több

alapbetegség is előfordult. Egy esetben pedig az orális lichen planus mellett a bőrtüneteket mutató lichen planus is kialakult (**3. táblázat**).

<u>páciens</u>	<u>életkor</u>	<u>alapbetegség</u>
1. nő	51 év	lichen ruber planus
2. nő	60 év	magas vérnyomás
3. férfi	47 év	magas vérnyomás, diabétesz, hiperkoleszterinémia, alacsony szérumvas
4. nő	53 év	Raynaud-szindróma, tüdőfibrózis, poliartritisz, hipertónia
5. nő	53 év	hipertónia, menopauza
6. nő	59 év	allergia
7. nő	58 év	magas vérnyomás, ízületi gyulladás
8. nő	54 év	alacsony szérumvas, autoimmun betegség
9. nő	41 év	nincs
10. férfi	59 év	magas vérnyomás, alacsony szérumvas, enyhén magas éhgyomri vércukor
11. nő	52 év	mélyvénás trombózis
12. férfi	50 év	diabétesz, magas vérnyomás, ízületi panaszok
13. férfi	51 év	krónikus bronchitisz
14. nő	40 év	szívritmuszavar, magas vérnyomás
15. nő	52 év	magas vérnyomás, hiperkoleszterinémia, szívérgörcs
16. nő	59 év	magas vérnyomás, asztma, dermatitisz
17. nő	60 év	magas vérnyomás, neurózis, szívritmuszavar
18. férfi	59 év	magas vérnyomás, diabétesz, hiperkoleszterinémia

3. táblázat: A páciensek alapbetegségei

A vizsgálatban résztvevő páciensek nem kaptak sem lokális, sem szisztémás szteroid terápiát.

A lichenes elváltozást mutató bukkális nyálkahártyából kimetszett szövetmintákat két darabra vágtuk, az egyik darabot RNAlaterbe tettük és -80°C-on tároltuk. A másik darabot 4%-os

paraformaldehiddel fixáltuk, majd parafinos beágyazás után immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk.

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta. A vizsgálatban résztvevő páciensek írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a kísérletben való részvétel előtt.

2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A deparaffinizált és rehidrált szöveti mintákat pH 6-on citrát pufferben inkubáltuk mikrohullámú sütőben, 3x5 percig, 750 W-on, antigénfeltárás céljából. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 3%-os hidrogén-peroxidban (H₂O₂) való inkubációval gátoltuk. A másodlagos antitest nem specifikus kötődését megakadályozandó a mintákat normál kecske szérumban inkubáltuk 20 percig. Ezután a metszeteket előbb 1:1000-es hígításban nyúl poliklonális anti-TRPV1 antitesttel (Tocris Bioscience Ltd.) inkubáltuk 1 órán keresztül, majd másodlagos torna-peroxidázzal konjugált EnVision system anti-nyúl szekunder antitesttel (Dako-Cytomation) 30 percig. Végül a TRPV1 receptorok immunlokalizációját diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő 10 percig, magfestést hematoxilinnal végeztünk.

A TRPV1 receptorok immunpozitivitását szemikvantitatív pontozással határoztuk meg egy kísérletektől független patológus segítségével. Image Pro Plus 4,5-ös szoftverrel analizáltuk a metszetekről készült képeket, és az immunspecifikus festődés alapján azonosítottuk az immunpozitív pixeleket. Az adatokat a vizsgált régióban százalékos arányban adtuk meg.

3. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív, valós idejű PCR mérést ABI Prism 7000 szekvenciadetektáló rendszeren (Applied Biosystems), 5' nukleáz esszé felhasználásával végeztük el. A teljes RNS tartalom 3 µg-jából 15 egység AMV reverz transzkriptáz (Promega) és 0,025 µg/ml random primer

(Promega) segítségével komplementer DNS-t készítettünk. A PCR amplifikációt TaqMan primerekkel végeztük (esszé azonosító: Hs00218912_m1 humán TRPV1-re). TaqMan univerzális PCR mastermix protokoll alapján. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), illetve β -aktin mRNS szintek meghatározását használtuk.

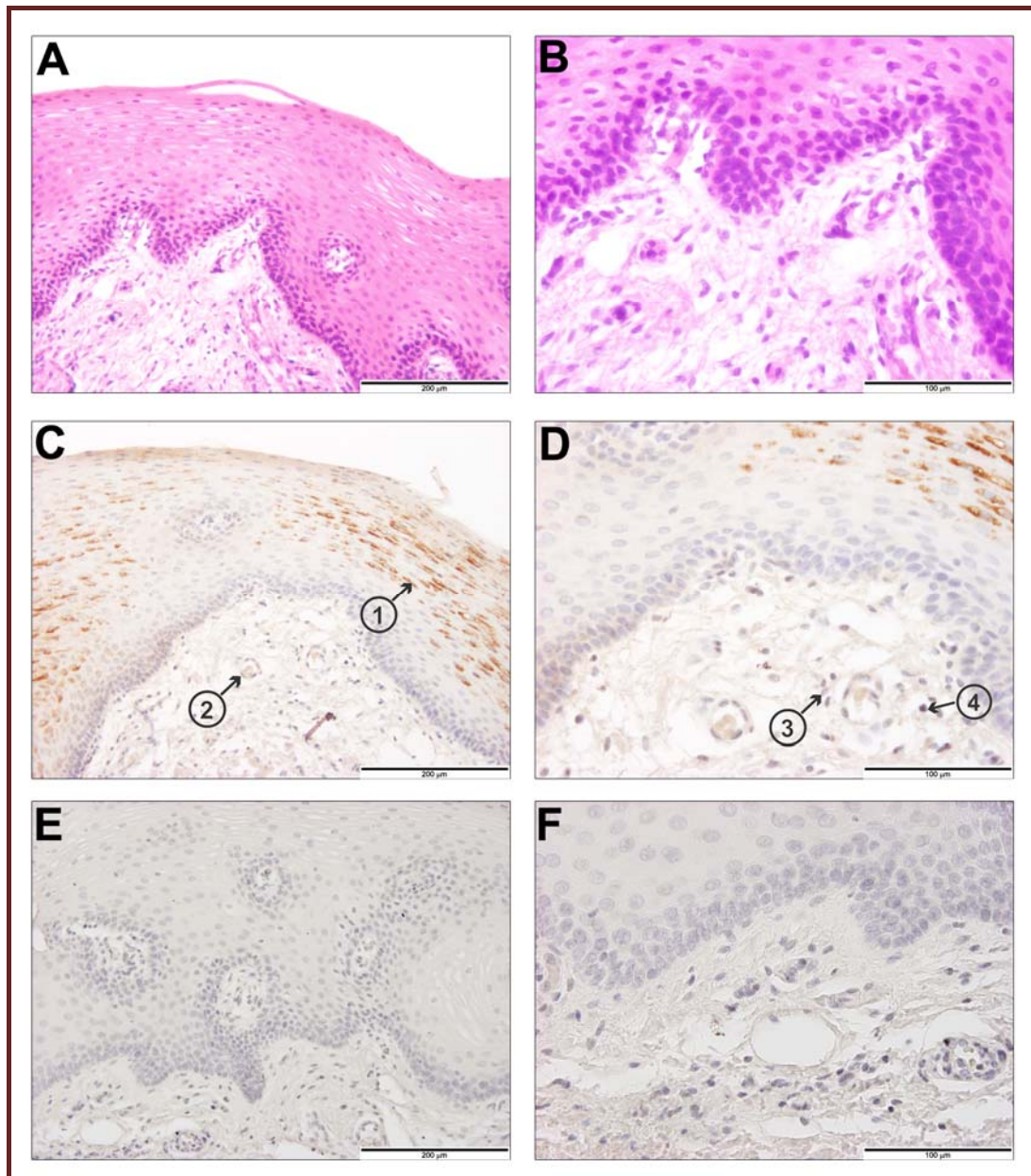
4. Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag \pm átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki. A statisztikai eltérések értékeléséhez egyutas variancia analízist (ANOVA), majd Bonferroni-féle módosított t- tesztet használtunk.

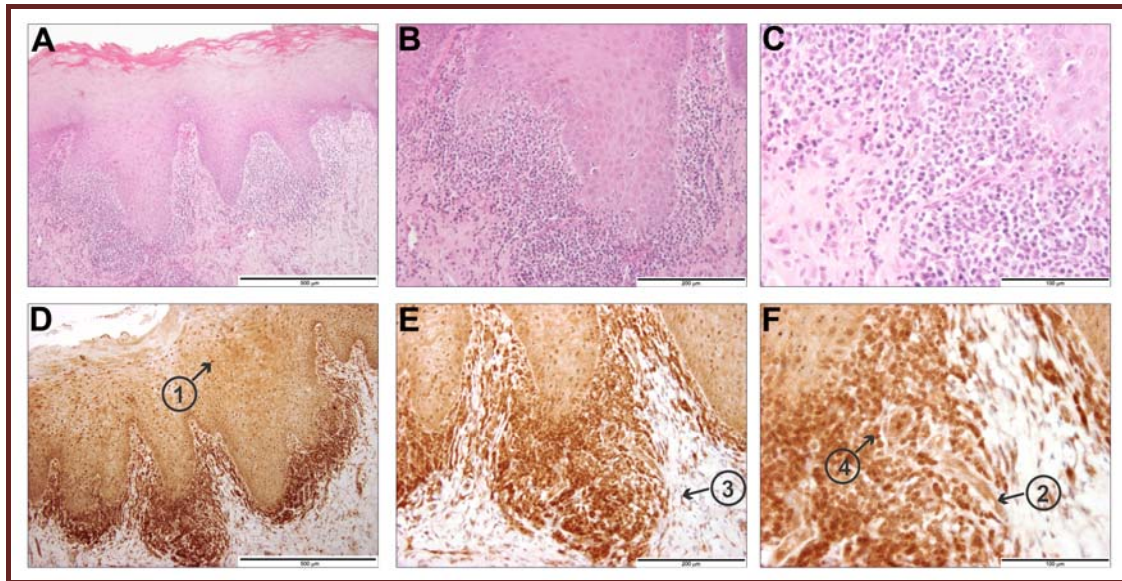
EREDMÉNYEK

A normál bukkális mukózus membrán közepes TRPV1 receptor antitest pozitívást mutatott intracellulárisan az epitelsejtekben, összehasonlítva a negatív kontrollal, ahol a primér antitestet nem tettük a mintához. Az epiteliális sejtekben intracitoplazmatikus festődés látszott. Immunfestődést figyelhettünk meg minden epiteliális sejtrétegben, a bazálistól a szuperficiális sejtrétegig, a nyálkahártyában. Minimális jelölődés volt az endotél sejteken, a limfociták és fibroblasztok negatívak voltak **(6. ábra)**.

A lichenes mintákban intenzív immunpozitivitás volt kimutatható az epitélium teljes szélességében, és a szubepiteliális szövetekben. Kifejezett immunfestődés volt a nyálkahártyában, az epiteliális sejtekben, a bazális, a parabazális, az intermedier és szuperficiális sejtrétegekben. Detektálható volt az immunpozitivitás a citoplazmában, és néhány sejtben intranukleáris pozitívást is láttunk. Nagy számban az immigráns limfociták, illetve a fibroblasztok is immunpozitivitást mutattak a szubepiteliális régióban. Intranukleáris és intracitoplazmatikus festődés volt kimutatható a limfocitákban és a fibroblasztokban. Sokkal intenzívebb festődés volt látható a kapilláris endotelsejtekben és a szubepiteliális régióban **(7. ábra)**, amit a pontozással kapott eredmények is alátámasztottak **(4. táblázat)**.



6. ábra: Normál nyálkahártya fénymikroszkópos metszete hematoxilin-eozinnal festve (A, 200x; B, 400x). TRPV1 receptorok immunohisztokémiai jelölése az epitelsejteken (C, 200x; D, 400x). Gyenge immunfestődés figyelhető meg a keratinocitákon ①, kis mértékű pozitivitás látszik az endotelsejteken ②, nincs detektálható reakció a fibroblasztokon ③ és a limfocitákon ④. A primer antitest nélküli negatív kontroll szintén nem mutat immunjelölődést (E, 200x; F, 400x).

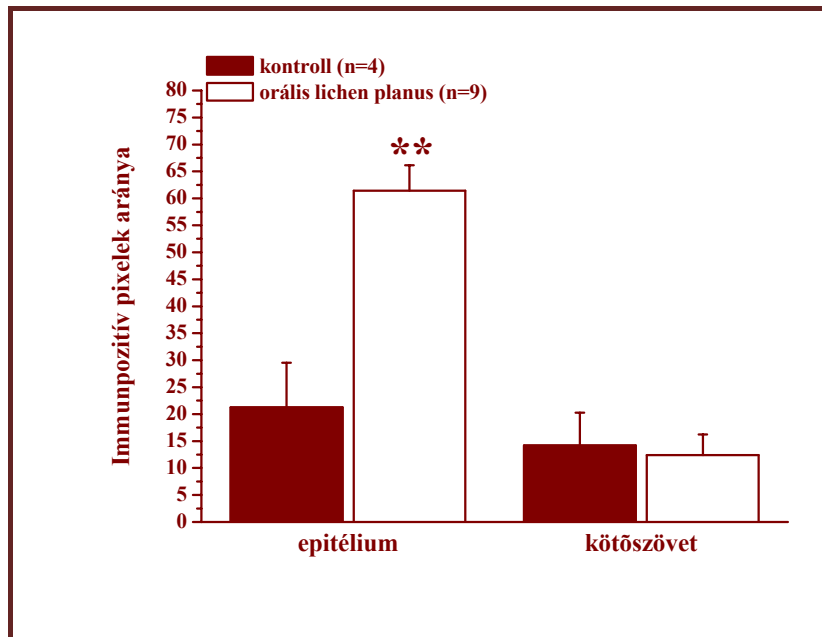


7. ábra: Lichen oris szövettani képe fénymikroszkópos metszeten hematoxilin-eozinnal festve (A: 100x; B: 200x; C: 400x). Intenzív TRPV1 antitest jelölődés figyelhető meg a lichenes bukkális nyálkahártya mintákban (D: 100x). A ① keratinociták intenzív immunfestődést mutatnak a mukózus membránban a bazálistól a szuperficiális sejtrétegekig. Intranukleáris pozitivitás is megfigyelhető néhány sejtben (E: 200x). Nagyszámú ④ limfocita, és ③ fibroblaszt mutat immunpozitivitást a szubepiteliális régióban (E: 200x, F: 400x). A ② vaszkuláris endoteliális sejtek szintén jelölődtek (F: 400x).

	epitelsejtek	kapilláris endotelsejtek	limfociták	fibroblasztok
kontroll (n=5)	++	+	-	-
OLP (n=18)	+++	+++	+++	+++

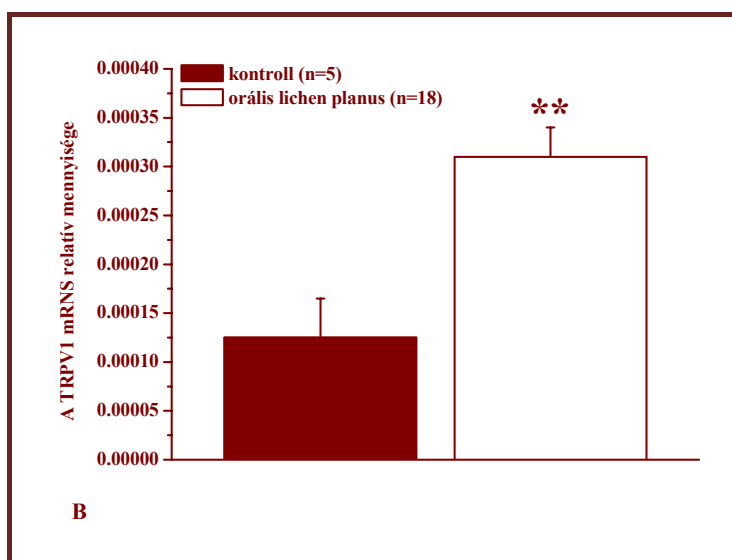
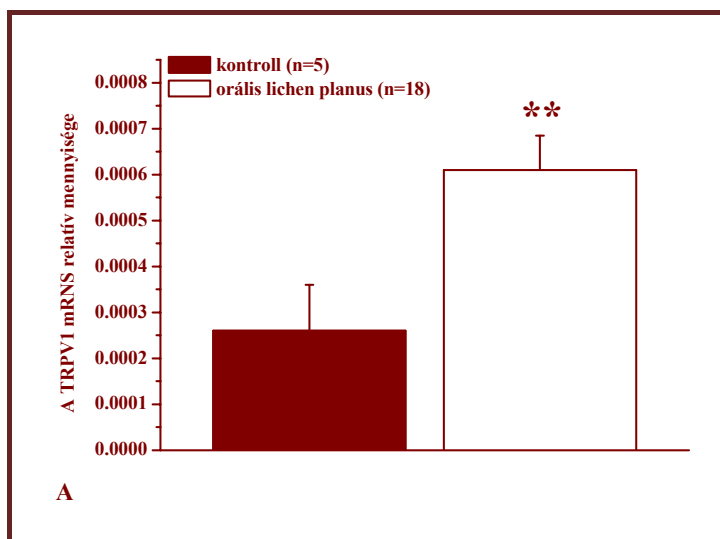
4. táblázat: TRPV1 receptor immunpozitivitás szemikvantitatív szövettani pontozása

A kvantitatív képanalízis szerint az immunpozitív pixelek százalékos aránya $21,2 \pm 8,2\%$ volt a kiválasztott régióban a kontroll epitéliumban. Ez $61,4 \pm 4,7\%$ -ra emelkedett a lichenes mintákban. Annak ellenére, hogy számos immunpozitív sejtet, limfocitát, fibroblasztot és vaszkuláris endotelsejtet láttunk jelölődni a szubepiteliális kötőszövetben lichenes mintákban, kvantitatív különbség nem volt kimutatható. Az immunpozitív pixelek százalékos aránya $14,8 \pm 4,9\%$ volt a kontroll mintákban, és $13,9 \pm 3,8\%$ a lichenes mintákban. (8. ábra).



8. ábra: A kvantitatív képanalízis azt mutatja, hogy az immunpozitív pixelek százalékos aránya szignifikánsan nagyobb volt az epitélium vizsgált területein orális lichen planusban, összehasonlítva a normál humán mintákkal. Bár számos immunpozitív sejt (limfociták, fibroblasztok és vaszkuláris endotélsejtek) szintén jelölődik a lichenes mintákban a szubepiteliális kötőszövetben, kvantitatív különbség nem mutatható ki a normál humán mukózához viszonyítva. Az eredményeket átlag±átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki. **P<0,01 vs. normál epitélium, n=4-9/csoport.

A TRPV1 receptor mRNS tartalom, kvantitatív RT-PCR-al mérve, a lichen oris biopsziás anyagaiban 2,5-szeres emelkedést mutatott az egészséges önkéntesek mintáihoz képest. Belső kontrollként gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), illetve β -aktin mRNS szintek meghatározását használtuk (**9. ábra**).



9. ábra: A TRPV1 receptor mRNS tartalom a lichen oris biopsziás mintákban kvantitatív RT-PCR szerint. Az ábra a humán TRPV1 receptor mRNS relatív expresszióját mutatja kontroll (fekete oszlopok) és lichenes (fehér oszlopok) mintákban. Belső kontrollként GAPDH (A), illetve β -aktin (B) mRNS szintek meghatározását használtuk. Az eredményeket átlag \pm átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki. **P<0,01 vs. normál mukóza, n=5-18/csoport.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen munkában immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a TRPV1 receptor expressziója megnövekszik orális lichen planusban a normális mukózához hasonlítva.

A szemikvantitatív szövettani analízis alapján fokozott specifikus immunpozitivitás volt kimutatható az epitélium teljes szélességében, a vaszkuláris endotélsejtekben, a limfocitákban, a fibroblasztokban, a szubepiteliális szövetben. A kvantitatív képanalízis megemelkedett immunpozitív pixelarányt mutatott az OLP-ben szenvedő páciensek epitéliumában, összehasonlítva a normális kontrollokkal, ami a TRPV1 receptor expressziójának fokozódását jelenti a gyulladásos folyamat során. Limfociták, fibroblasztok és vaszkuláris endotélsejtek szintén festődtek a kötőszövetben, de szignifikáns különbség az immunpozitív pixeleken a lichenes és a kontroll minták között nem volt kimutatható. Ez a látszólagos különbség a szemikvantitatív eredmények és a kvantitatív képanalízis között azzal magyarázható, hogy a gyulladásos terület a kötőszövetben túl kicsi a kötőszövet teljes kiterjedéséhez képest. Mivel a receptorok lokális expresszióját kvantitatív valós idejű RT-PCR módszer segítségével bizonyítottuk mRNS szinten, feltételezzük, hogy ezen receptorok extraneurálisan szintetizálódnak, az immunpozitív sejtek által.

Bár számos tanulmány szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a neurogén gyulladás közrejátszik gyulladásos betegségek, például a Sjögren-szindróma, a pszoriázis, a dermatitisz, az arthritisz, az asztma patomechanizmusában, csak nagyon kevés munka említi a lehetséges neurogén faktorok szerepét orális lichen planusban (Niissalo és mtsai 1999). Proinflammációs neuropeptidek, főként SP és CGRP szabadul fel a szenzoros idegvégződésekből a TRPV1 receptorok stimulációjakor. E mediátorok neurogén gyulladásos változásokat okoznak, mint például lokális vazodilatációt, plazmaprotein extravazációt, gyulladásos és immunsejtek

akkumulációját (Maggi 1995). A TRPV1 receptorok expressziója a nem-neurális sejtek széles skálájában kimutatható, például az epitélisejteken: keratinocitákon (Denda és mtsai 2001; Inoue és mtsai 2002), gasztrikus epiteliális sejteken (Faussone-Pellegrini és mtsai 2005), enterocitákon és pneumocitákon (Gunthorpe és Szállási 2008). A vaszkuláris endotéliumban, immunsejtekben (Saunders és mtsai 2007), simaizomsejtekben (Gunthorpe és Szállási 2008) és fibroblasztokban (Kim és mtsai 2006) is kimutatták TRPV1 immunpozitivitást. A kiterjedt kutatások és számos immunhisztokémiai bizonyíték ellenére a TRPV1 receptorok fiziológiai szerepe a nem-neurális szövetben a mai napig nem bizonyított (Gunthorpe és Szállási 2008).

A TRPV1 immunreaktivitás kimutatható humán bőrmintában, epidermiszben, szőrtüszőben, bőrfüggelékben, dermális véredényekben, Meissner korpuzkulákban, fibroblasztokban és hízósejtekben (Inoue és mtsai 2002; Kim és mtsai 2006). Izolált humán keratinociták szintén expresszálják TRPV1 receptort, és kimutatták, hogy a kapszaicin fokozza ezen sejtek Ca^{2+} -felvételét (Inoue és mtsai 2002; Southall és mtsai 2003). Ezen kívül ezekben a sejtekben a kapszaicin-indukálta intracelluláris Ca^{2+} -növekedés blokkolható volt TRPV1 antagonistákkal. Van néhány bizonyíték, ami alátámasztja a TRPV1 receptor funkcionális szerepét. Southall és munkatársai arra a megállapításra jutottak, hogy a TRPV1 receptor a fájdalmas stimuláció szenzora keratinocitákon, és túltermelődik a gyulladás során, amely az epidermális károsodás miatt jön létre (Southall és mtsai 2003). Kimutatták, hogy a TRPV1 receptorok aktivációja a keratinocitákon prosztaglandin E_2 , illetve interleukin-8 (IL-8) felszabadulást indukál, továbbá fokozza a ciklooxygenáz enzim, illetve a mátrix-metalloproteináz expressziót (Southall és mtsai 2003; Li és mtsai 2007; Gunthorpe és Szállási 2008).

Vizsgálatainkban az első immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a TRPV1 receptorok jelen vannak a humán orális mukózális szövetben, és fokozottan expresszálódnak humán OLP-ben. Az immunpozitív sejtek számának megemelkedése a nem-neurális sejtekben

kimutatható volt az epitélium teljes szélességében és szubepiteliális szövetekben is, orális lichen planusban, összehasonlítva az ép mukózával. A TRPV1 receptor mRNS szintje a lichen planusból származó biopsziás mintákban szignifikánsan emelkedettebb volt kvantitatív RT-PCR-al megmérve, mint az egészséges önkéntesek mintáiban. Ezért arra következtetünk, hogy a nem-neurális TRPV1 receptorok az orális mukózában valószínűleg gyulladáso változásokat szabályoznak az OLP kifejlődése során. Neurális és nem-neurális TRPV1 receptorok között interakciók jöhetnek létre a felszabaduló gyulladáso mediátorok, citokinek, prosztaglandinok, növekedési faktorok és neuropeptidek által.

Bár az OLP pontos patogenezise a mai napig tisztázatlan, kijelenthetjük, hogy a gyulladáso mediátorok TRPV1 receptor-függő felszabadulása epiteliális, vaszkuláris endotélsejtekből, illetve limfocita fibroblasztból, befolyásolhatja a betegség progresszióját.

II. FEJEZET:
A NEONATÁLIS KAPSAICIN DESZENZIBILIZÁCIÓ HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA HIGANY-KLORIDDAL (HgCl₂) KIVÁLTOTT LICHENOID
REAKCIÓRA PATKÁNY ORÁLIS MUKÓZÁBAN

BEVEZETÉS

A fogászati szakirodalomban gyakran írnak le szájüregben kialakuló lichenoid reakciókat higany-tartalmú amalgámtömések mellett (Dunsche és mtsai 2003). Felmerült a kérdés, hogy a gyulladással elváltozásokat az amalgám higany komponense okozza. A folyamat patomechanizmusának pontosabb megismeréséhez állatkísérletes modellt fejlesztettünk ki. A lichen planus tünetei nem reprodukálhatók állatokban, viszont korábbi közlemények arról számoltak be, hogy lichenoid reakció kiváltható higany-kloriddal történő ecseteléssel (Kinby és mtsai 1988; Larsson és mtsai 1990).

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a higany-klorid-ecsetelés hatását a szájnyálkahártya gyulladással elváltozásában, továbbá a HgCl₂-dal kiváltott lichenoid reakcióban analizáljuk a TRPV1 receptorok immunpozitivitását és a minták mRNS koncentrációját. Célunk volt továbbá megvizsgálni, hogy a neonatális szisztémás kapszaicin előkezelés, ami bizonyítottan deszenzibilizálja a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseket és ezzel a neuronális TRPV1 receptorokat, milyen hatást fejt ki a nem-neurális TRPV1 receptorok expressziójára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. HgCl₂-dal kiváltott lichen oris patkányban

Mivel az irodalmi adatok arra utaltak, hogy a rendelkezésre álló, kísérletesen használható patkánytörzsek közül a barna-norvég patkányok reagálnak legérzékenyebben a higany-klorid kezelésre (Dunsche és mtsai 2003), ezt a törzset használtuk vizsgálatainkban. Újszülött (2-3 napos, 10-15 g) barna-norvég (Brown Norway) patkányokat tenyésztettünk a PTE-ÁOK Központi Állatházában klimatizált környezetben, hagyományos táplálékkal és vízzel *ad libitum* ellátva.

Neonatalis, szisztémás kapszaicin előkezelés

A kísérlet elején szisztémás kapszaicin előkezelést végeztünk az állatokon, a kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok működését ugyanis szelektíven lehet blokkolni a kapszaicin nagy dózisú adásával: az 1%-os kapszaicin törzsoldatot, ami 1% etanolt és 1% Tween-80-at tartalmazó fiziológiás sóoldat, dimetil-szulfoxiddal (DMSO-val) továbbhígítva 50 mg/kg dózisú kapszaicint adtunk a patkányoknak szubkután, a nyaki résznél. A kezelések alkalmával az állatok az akut hatásból adódó szövődmények kivédésére 0,1 ml/10 g dózisban injekciókóktélt kaptak intraperitoneálisan, aminek 1 millilitere 40 µl Bricanyl-t (0,5 mg/ml terbutalin-szulfát), 40 µl Diaphyllint (4,8%-os teofillin-etilén-diamin), 20 µl atropint (0,1%-os atropinum sulfuricum) és hígítószerként fiziológiás NaCl-ot tartalmaz. A kísérletbe hét hetes előkezelt és kezeletlen (kontroll) állatokat vontunk be.

Higany-kloriddal (HgCl₂) történő kezelés

A patkányok egy csoportjának bukkális nyálkahártyát gliceriben oldott 0,5%-os HgCl₂-oldattal másnaponta ecseteltük 8 héten át. Az állatokból négy csoportot képeztünk: 1) kapszaicinnel nem kezelt és HgCl₂-dal nem ecsetelt, 2) kapszaicinnel nem kezelt, de HgCl₂-dal ecsetelt, 3) kapszaicinnel előkezelt de HgCl₂-dal nem ecsetelt, valamint 4) kapszaicinnel előkezelt és HgCl₂-dal is ecsetelt csoportokat.

A kezelés befejeztével az állatokat intravénás pentobarbitallal (Nembutal) túlaltattuk és kimetszettük a szájnyálkahártyát szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat céljára.

Kísérleteink minden esetben megfelelnek az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak, és igazodnak a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslataihoz (Zimmermann 1983). A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-16-2006).

2. Minták feldolgozása szövettani vizsgálatokra

A hisztopatológiai változásokat hematoxin-eozinnal festett metszeteken, szemikvantitatív pontozással egy kísérletektől független patológus vizsgálta. Az összetett szövettani pontszámokat az alábbi lichenoid szövettani elváltozások alapján számoltuk, amelyek a hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, kapillarizáció, fibroblaszt proliferáció és fibrózis voltak.

A minták előkészítése: A patkány szájnyálkahártya szövettani mintákat a tökéletes struktúra megőrzése céljából 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk 24 órán keresztül, és alapos csapvizetes lemosás után víztelenítettük az anyagunkat, hogy fénymikroszkópos vizsgálatra alkalmas metszeteket kapjunk.

Víztelenítő sor: Emelkedő koncentrációjú alkoholba (50%, 70%, 96% abszolút alkohol) raktuk az anyagokat 1-1 órára. Az alkoholos víztelenítő anyag kis mértékben oldódik a hidrofób beágyazó médiumokban, ezért derítő anyagokkal kell kezelni a továbbiakban.

Derítés: Kétszer, váltott edényben xilollal történt, mely egy jól diffundáló vegyület és a beágyazó médiummal is jól keveredik.

Beágyazó médium: 56-58°C-on olvadó parafaszt. Derítés után alaposan átittattuk az anyagunkat beágyazó médiummal, kétszer külön edényben, majd másnap kis csónakokba kiöntöttük őket.

Metszés: Szánkás mikrotómmal, egyszerhasználatos pengével történt. A tárgylemezeket előkezeltük 3-aminopropil-trietoxiszilánnal (APES 2%-os, acetonnal hígított oldatával).

A paraffinos metszetek festés előtti kezelése: Mivel a festéskor használt vegyület vízdékony, ezért a paraffinos metszetekből előzetes kezelésekkkel el kell távolítani az apoláros tulajdonságú beágyazó anyagot, festésre alkalmas (vizes) fázisba kell hozni. Ez a deparaffinálás lépése, mely xilollal 2x5 percig tart. Ezután az apoláros anyag eltávolítása, a metszet fokozatos vízzel telítése a rehidráció, melyhez csökkenő töménységű alkoholsorozatot használunk (abszolút alkohol, 96%-os, 70%-os). A metszeteket ezután desztillált vízben áztattuk.

Hematoxilin-eozin festés: Ez a módszer elsősorban a sejtmagok kiemelését, a citoplazmás és a rostos szövetalkotórészekről való elkülönítését szolgálja. Nukleinsav-tartalmuk révén a

bazofil sejtmagokat és az egyéb bazofil szövetalkotórészeket kékre festi, míg az egyéb fehérjetermészetű, acidofil szövetalkotórészeket rózsaszínűre.

3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A deparaffinizált és rehidrált szöveti mintákat pH 6-on citrát pufferben inkubáltuk mikrohullámú sütőben, 3x5 percig, 750 W-on, antigénfeltárás céljából. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 3%-os hidrogén-peroxidban (H₂O₂) való inkubációval gátoltuk. A másodlagos antitest nem specifikus kötődését megakadályozandó, a mintákat normál kecske szérumban inkubáltuk 20 percig. Ezután a metszeteket előbb 1:1000-es hígításban nyúl poliklonális anti-TRPV1 antitesttel (Chemicon, cat. Nr. AB5889) inkubáltuk 1 órán keresztül, majd másodlagos torma-peroxidázzal konjugált EnVision system anti-nyúl szekunder antitesttel (Dako-Cytomation) 30 percig. Végül a TRPV1 receptorok immunlokalizációját diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő 10 percig, magfestést hematoxin-eozinnal végeztünk.

A TRPV1 receptorok immunpozitivitását szemikvantitatív pontozással határoztuk meg egy független patológus segítségével. Vizsgáltuk a keratinociták, vaszkuláris endotélsejtek, limfociták és fibroblasztok festődését.

4. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív, valós idejű PCR mérést ABI Prism 7000 szekvenciadetektáló rendszeren (Applied Biosystems), 5' nukleáz esszé felhasználásával végeztük el. A teljes RNS tartalom 3 µg-jából 15 egység AMV reverz transzkriptáz (Promega) és 0,025 µg/ml random primer (Promega) segítségével komplementer DNS-t készítettünk. A PCR amplifikációt TaqMan primerekkel végeztük (esszé azonosító: Rn00583117_m1 a patkány TRPV1-re) a TaqMan

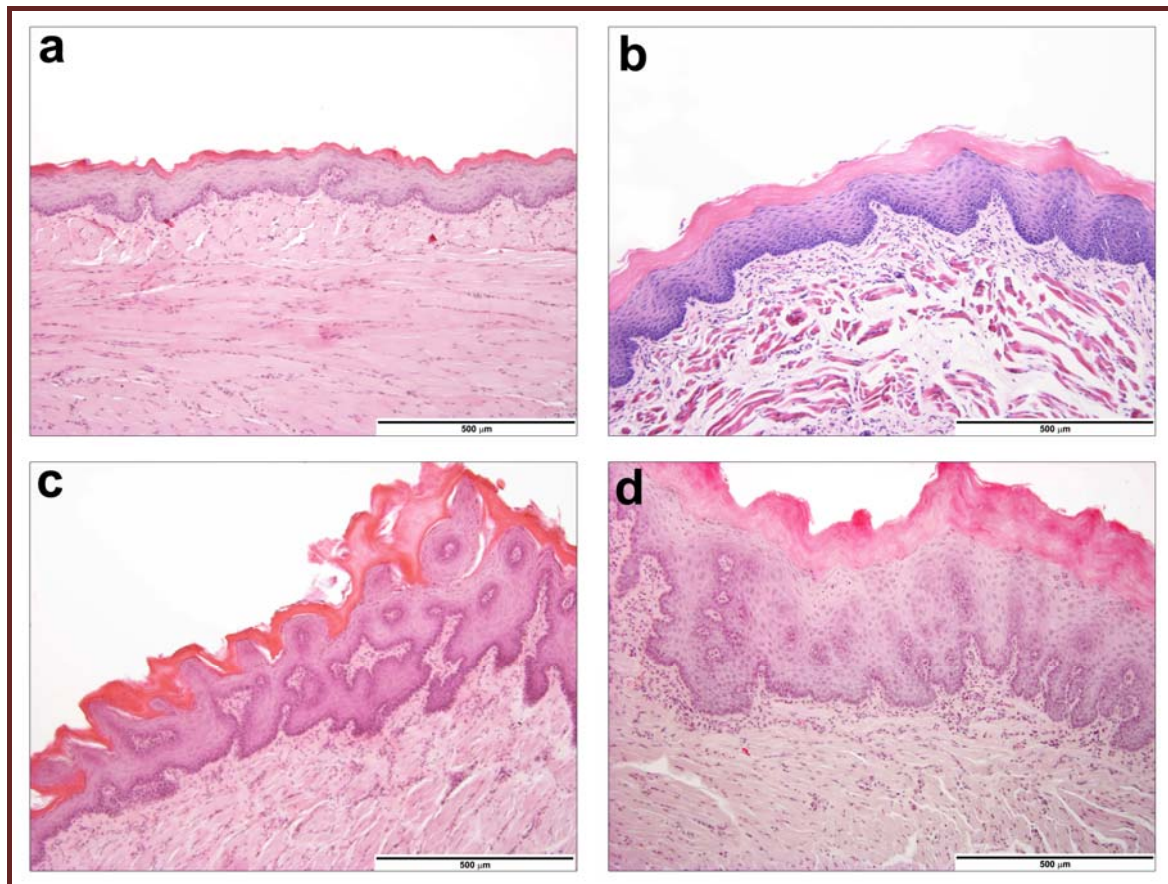
univerzális PCR mastermix protokoll alapján. Belső kontrollként eukarióta 18S RNS (esszé azonosító: Hs_99999901_s1 a 18S RNS-re) mRNS szintek meghatározását használtuk.

5. Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag±átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki. A statisztikai eltérések értékeléséhez egyutas variancia analízist (ANOVA), majd Bonferroni-féle módosított t- tesztet használtunk. A szemikvantitatív szövettani értékeléssel meghatározott pontszámokat boxplot módszerrel ábráztuk, ahol az egyes oszlopok a csoportok statisztikai középértékét (median±25-75), percentilértéket mutatják, a függőleges vonalak pedig a minimum-maximum értékekre vonatkoznak. A statisztikai értékelésre ebben az esetben Kruskal-Wallis próbát (nem-parametrikus ANOVA-t), majd Dunn-féle poszt-tesztet alkalmaztunk.

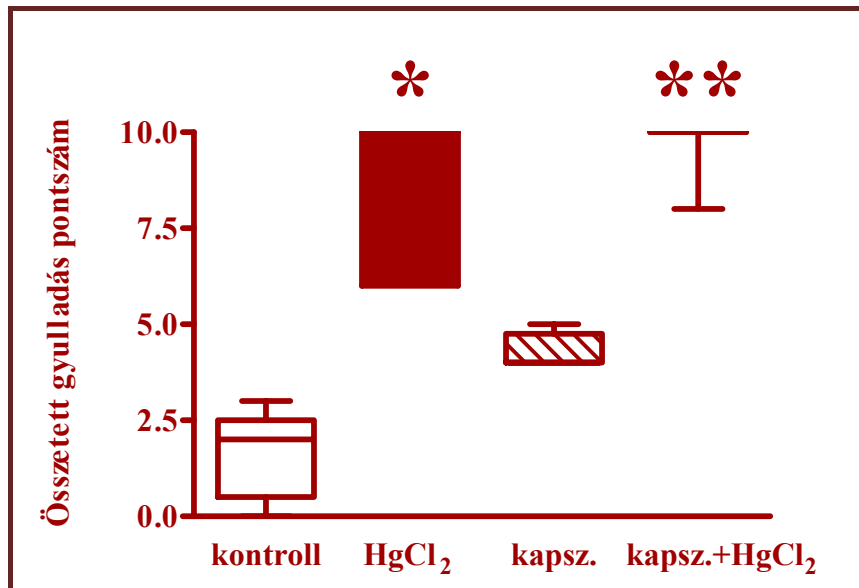
EREDMÉNYEK

A kezelések hatására különböző mértékű lichenoid szöveti reakció alakult ki. Az eredetileg is keratotikus patkány szájnyálkahártya hiperkeratotikussá vált a kezelések hatására, a stratum corneum rétege megvastagodott. A HgCl₂ alkalmazása önmagában elegendőnek bizonyult a lichenoid keratózis kialakulásához. Ehhez hasonlóan alakult az akantózis kifejlődése is, a hám kiszélesedett, a stratum basale rétege aktiválttá vált. Egyes egyedekben pszeudopapillomatózus hámphiperplázia volt látható. A hámot ért kontakt hatás eredményeképpen szubepitélialis fibroblaszt aktiváció is kialakult, de csak a higany-kloriddal és kapszaicinnel egyaránt kezelt állatokban. Ezekben az egyedekben szubepitélialis kapilláris proliferáció és fibroblaszt aktiváció igazolódott, mely enyhe fibrózis kifejlődéséhez vezetett ebben a rétegben. A nyálkahártyai lichenoid keratózis kapszaicinnel való deszenzibilizáció, illetve HgCl₂ egyedüli alkalmazásakor is kialakult, de ezek kombinációja súlyosbította a folyamatot. A lézióban limfoid reakció nem látszott, továbbá a bazális rétegben sejtes hidropikus degeneráció sem fejlődött ki (**10. ábra**).



10. ábra: Kontroll patkány bukkális nyálkahártyájából készült fénymikroszkópos metszetek hematoxin-eozinnal festve (a), szisztémás kapszaicin előkezelés után (b), HgCl₂ kezelés hatására (c), HgCl₂ kezelés hatására, kapszaicinnel előkezelt állatban (d) (100-szoros nagyítás).

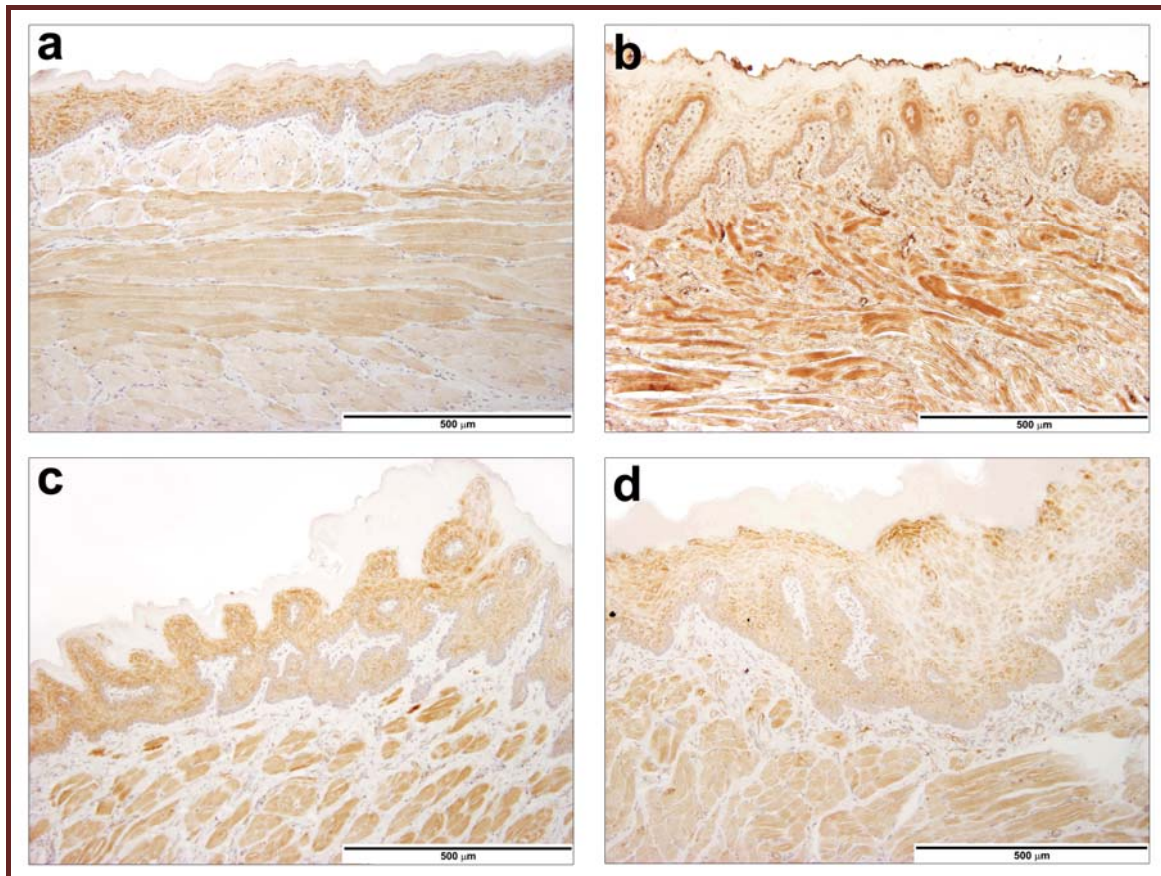
Az összetett szövettani pontszám, amelybe a hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, kapillarizáció, fibroblaszt proliferáció és fibrózis mértéke tartozik, azt mutatja, hogy a higany-klorid kezelés jelentős lichenoid reakciót váltott ki patkány szájnyálkahártyában. Önmagában a kapszaicin minimális gyulladáshoz vezetett, viszont tovább fokozta a HgCl₂-kiváltotta gyulladáshoz vezető tüneteket (**11. ábra**).



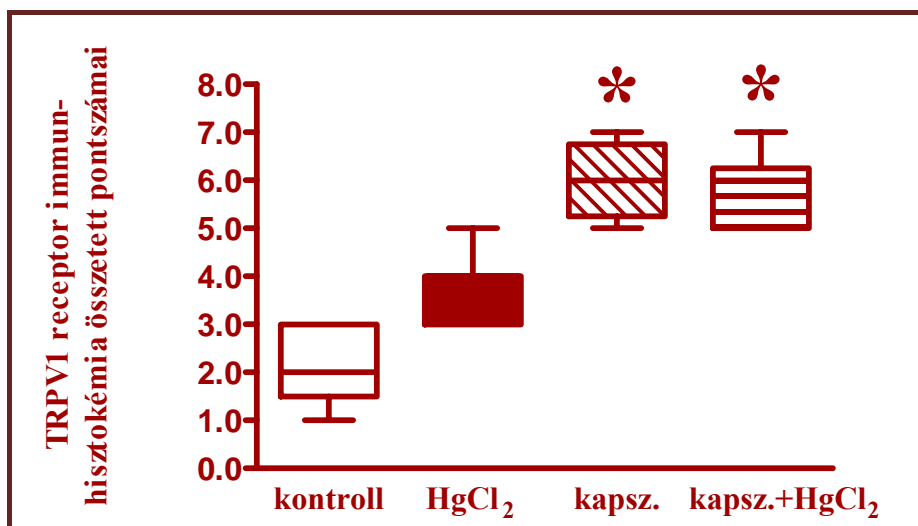
11. ábra: Az összetett szövettani pontszám (hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, kapillarizáció, fibroblaszt proliferáció és fibrózis mértéke) azt mutatja, hogy a higany-klorid kezelés jelentős lichenoid reakciót váltott ki patkány szájnyálkahártyájában. Önmagában a kapszaicin minimális gyulladási elváltozást okozott, viszont tovább fokozta a HgCl₂-kiváltotta gyulladási tüneteket. *P<0,05; **P<0,01, n=8/csoport.

A TRPV1 receptor immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a receptorfehérje fokozottan volt kimutatható a hám rétegeiben kapszaicin előkezelés hatására. A HgCl₂ csak minimális mértékű TRPV1 immunpozitivitást hozott létre. A kettős kezelés már nem fokozta tovább az immunpozitivitást a keratinocitákban. A kapillaris endotélsejtek a csak HgCl₂-dal kezelt patkányoknál jól detektálható immunpozitivitást mutattak, ami a kapszaicinnal előkezelt csoportokban még intenzívebbnek bizonyult. A nem kezelt, kontroll állatokban a fibroblasztok negatívak voltak. A csak higany-klorid expozíció hatására a fibroblasztokban a kontroll csoporthoz képest enyhe festődést láttunk, ami a kapszaicinnal és higany-kloriddal is kezelt állatoknál tovább fokozódott. Az akkumulálódott limfociták egyik csoportban sem mutattak TRPV1 receptor immunpozitivitást (**12. ábra**). Az összetett pontszám, ami a TRPV1 receptor immunpozitivitást jelzi a keratinocitákban, a kapillaris endotélsejtekben, a limfocitákban és a fibroblasztokban, arra utal, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés

nagymértékben, a HgCl₂ ecsetelés minimálisan növelte az immunpozitív sejtek számát a nyálkahártyában. Meglepetés, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés önmagában is fokozta az immunpozitív sejtek számát. A kettős kezelés az összetett pontszámot tekintve hasonló mértékű reakciót váltott ki, mint a kapszaicin egymagában (13. ábra).

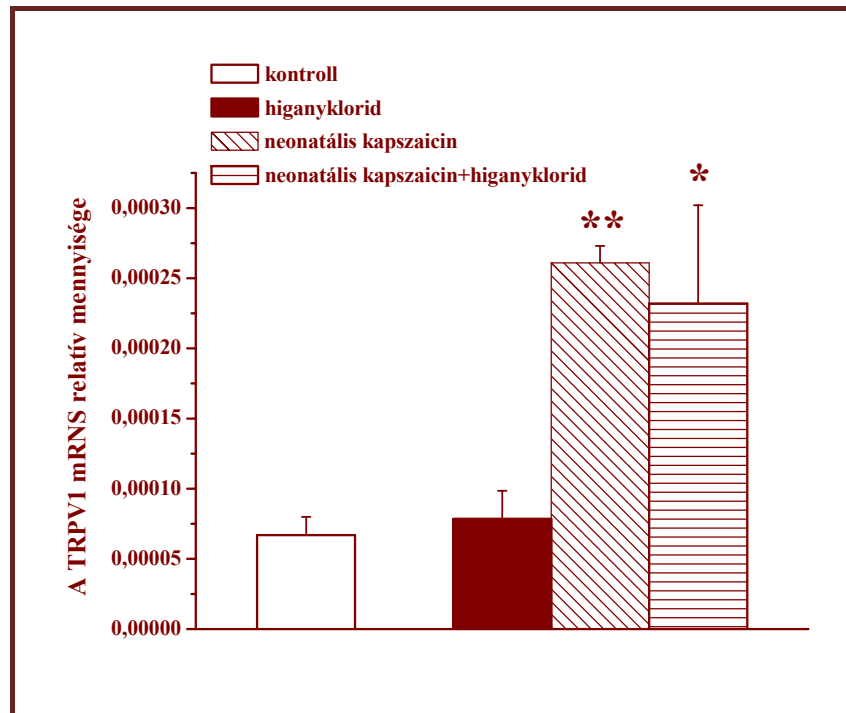


12. ábra: TRPV1 receptor immunhisztokémia a patkány bukkális mukózában. Az a) kép mutatja a kontrollt, a b) a szisztémás kapszaicin kezelés hatását, a c) ábra a higany-kloriddal kezelt mukózát, a d) ábra pedig a higany-klorid kezelés hatását kapszaicin előkezelés után (100-szoros nagyítás).



13. ábra: Az összetett pontszám, ami a TRPV1 receptor immunopozitivitást mutatja a keratinocitákban, a kapillaris endotelsejtekben, a limfocitákban és a fibroblasztokban, arra utal, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés nagymértékben, a higany-kloriddal történt ecsetelés minimálisan, a kettős kezelés a kapszaicin kezeléshez hasonló mértékben fokozta az immunpozitív sejtek számát a nyálkahártyában. *P<0,05, n=8/csoport.

Kvantitatív, valós idejű PCR méréseken alapuló vizsgálataink azt bizonyították, hogy a TRPV1 receptor mRNS-ének relatív expressziója mintegy ötszörös növekedést mutatott a kapszaicinnal kezelt mintákban a kontrollhoz képest a barna-norvég patkányokban. Önmagában a HgCl₂ ecsetelés nem okozott változást a minták mRNS tartalmában. A kettős kezelés hatása szinte teljesen azonosnak bizonyult a neonatális kapszicinnal való előkezeléshez, a TRPV1 receptor mRNS szint tekintetében, patkány nyálkahártya mintákban (14. ábra).



14. ábra: a TRPV1 mRNS relatív mennyisége barna-norvég patkányban. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt használtunk. Az eredményeket átlag±átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki, *P<0,05, **P<0,01 vs. kontroll, n=5-8/csoport.

KÖVETKEZTETÉSEK

Barna-norvég patkányokon végzett kísérleteink azt mutatják, hogy az irodalomban leírtakhoz hasonlóan (Dunsche és mtsai 2003), ebben az állattörzsben a szájnyalvóhártya higanykloridos ecsetelésével ki lehet váltani szövettanilag jól jellemezhető lichenoid reakciót. Kifejlődött a hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, sőt egyes egyedekben a pszeudopapillomatózis hámphiperplázia is. A szubepiteliális szövetben kapilláris proliferáció és fibroblaszt aktiváció is igazolható volt, ami enyhe fibrózishoz vezetett. A hematoxilín-eozinnal festett mintákon végzett szövettani analízis alapján, a szisztémás kapszaicin előkezelés súlyosbította a HgCl₂ okozta lichenoid reakcióra jellemző elváltozásokat, a szubepiteliális fibroblaszt aktiváció csak a kombinált kezelések hatására fejlődött ki. Jól ismert, hogy szisztémás neonatális kapszaicin előkezelés neurotoxikus hatása deszenzibilizálja a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokat, ezért ezek funkciója szelektíven kiesik, így szisztémás kapszaicin előkezelés után a neurális TRPV1 receptorok jelenléte kizárható. Kísérleti eredményeink alapján meglepő, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés jelentősen fokozta a TRPV1 receptor immunpozitivitást a patkány szájnyalvóhártya sejtjein, például a keratinocitákon, fibroblasztokon és a kapilláris endotélsejteken is. Kvantitatív PCR adataink szerint a TRPV1 receptor mRNS tartalom jelentősen megnőtt kapszaicin kezelés hatására a nyálkahártya mintákban. Adatainkból nyilvánvaló, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés a neurális TRPV1 receptorokat deszenzibilizálja, azonban szignifikánsan növeli a nem-neurális receptorok expresszióját. Lehetséges, hogy a jelenség a denervációhoz társuló következményes adaptációs mechanizmus, ezért megfigyelésünk fontos mérföldkő lehet a nem-neurális TRPV1 receptorok élettani funkciójának felderítése során. Az a tény, hogy a szisztémás kapszaicin

előkezelés, mely a kapszaicin-érzékeny neuronok szelektív deszenzibilizációját okozza, fokozza a HgCl₂ által kiváltott gyulladáshoz vezető reakciókat, egyértelműen arra utal, hogy ezekből az idegsejtekből származó neuromediátorok protektív hatást gyakorolnak a lichenoid elváltozások kialakulására.

A csak higany-kloriddal történt ecsetelés hatására minimálisan nőtt a TRPV1 receptor immunpozitivitás a mintákban, az mRNS koncentráció pedig nem változott. Megállapítható, hogy a HgCl₂-dal kiváltott gyulladásban, ellentétben humán lichen planusban kimutatott szerepével, a nem-neurális TRPV1 receptorok expressziója nem fokozódik szignifikáns mértékben.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Orális lichen planusban szenvedő betegek nyálkahártya mintáin végzett vizsgálataink során immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a TRPV1 receptor expressziója megnövekszik orális lichen planusban a normális mukózához hasonlóan. A szemikvantitatív szövettani analízis alapján fokozott specifikus immunpozitivitás volt kimutatható az epitélium teljes szélességében, a vaszkuláris endotélsejtekben, limfocitákban, fibroblasztokban, a szubepiteliális szövetben. A kvantitatív képanalízis megemelkedett immunpozitív pixelarányt mutatott az OLP-ben szenvedő páciensek epitéliumában, összehasonlítva a normális kontrollokkal, ami a TRPV1 receptor expressziójának fokozódását jelenti a gyulladásos folyamat során. Limfociták, fibroblasztok és vaszkuláris endotélsejtek szintén festődtek a kötőszövetben, de szignifikáns különbség az immunpozitív pixelekből a lichenes és a kontroll minták között nem volt kimutatható. Ez a látszólagos különbség a szemikvantitatív eredmények és a kvantitatív képanalízis között azzal magyarázható, hogy a gyulladásos terület a kötőszövetben túl kicsi a kötőszövet teljes kiterjedéséhez képest. Mivel a receptorok lokális expresszióját kvantitatív valós idejű RT-PCR módszer segítségével bizonyítottuk mRNS szinten, feltételezzük, hogy ezen receptorok extraneurálisan szintetizálódnak, az immunpozitív sejtek által.
2. Mivel a kapszaicin-érzékeny érzőidegek deszenzitizációja neonatális, szisztémás kapszaicin előkezelés által fokozta a gyulladásos tüneteket a HgCl₂-dal kiváltott lichenoid reakcióban patkány orális mukózában, arra következtetünk, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok protektív hatást gyakorolnak a lichenoid

reakció kifejlődésében. Meglepő vizsgálati eredmény, hogy a nem-neurális TRPV1 receptorok expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten jelentős mértékben megnő neonatális kapszaicin előkezelés után patkány szájnyálkahártyában.

IRODALOMJEGYZÉK

Andreasen JO: Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 36-42.

Avelino A, Cruz F: TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 287-299.

Ács G, Bíró T, Ács P, Modarres S, Blumberg PM: Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. *J Neurosci* 1997; 17: 5622-5628.

Ács G, Palkovits M, Blumberg PM: [³H]Resiniferatoxin binding by the human vanilloid (capsaicin) receptor. *Mol Brain Res* 1994; 23: 185-190.

Basu S, Srivastava P: Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5120-5125.

Bayliss WM: On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hindlimb, and on the nature of these fibres. *J Physiol (London)* 1901; 26: 173-209.

Bevan S, Docherty RJ: *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, San Diego, 1993; 27-44.

Bevan S, Szolcsányi J: Sensory neuron-specific actions of capsaicin: Mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 330-333.

Borghelli RF, Pettianari IL, Chuchurru JA, Stirparo MA: Oral lichen planus in patients with diabetes. An epidemiologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 498-500.

- Brant JMC**, Vasconielos AC, Rodrigues LV: Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Braz Dent J* 2008; 19: 179-185.
- Campisi G**, Giovannelli L, Arico P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, D'Angelo M: HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 705-711.
- Carrozzo M**, Brancatello F, Dametto E, Arduino P, Pentenero M, Rendine S, Porter SR, Lodi G, Scully C, Gandolfo S: Hepatitis C virus-associated oral lichen planus: is the geographical heterogeneity related to HLA-DR6? *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 204-208.
- Carrozzo M**, Gandolfo S: Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit Oral Biol Med* 2003; 14: 115-127.
- Caterina MJ**, Julius D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 487-517.
- Caterina MJ**, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-824.
- Chuang HH**, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D: Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001; 411: 957-962.
- Denda M**, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K: Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 1250-1252.
- Dunsche A**, Frank MP, Luttges J, Acil Y, Brasch J, Christophers E, Springer IN: Lichenoid reactions on murine mucosa associated with amalgam. *Br J Dermatol* 2003, 148: 741-748.

- Eisen D:** The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 207-214.
- Faussone-Pellegrini MS, Taddei A, Bizzoco E, Lazzeri M, Vannucchi MG, Bechi P:** Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. *Histochem Cell Biol.* 2005; 124: 61-68.
- Grinspan D, Diaz J, Villapol LO, Schneiderman J, Berdichesky R, Palése D, Faerman J:** Lichen ruber planus de la muqueuse buccale. Son association a un diabete. *Bull Soc Francaise de Dermatologie et de Syphiligraphie* 1966; 73: 898-899.
- Gunthorpe MJ, Szállási Á:** Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 32-41.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB:** The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 183-191.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MH, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB:** Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 2000; 88: 205-215.
- Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Kéri Gy, Szolcsányi J:** Anti-inflammatory and analgesic effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1677-1685.

- Helyes Zs**, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J: Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Curr Med Chem* 2003; 2: 191-218.
- Helyes Zs**, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Szolcsányi J: Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci Lett* 2000; 278: 185-188.
- Holzer P**: Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24: 739-768.
- Howell FV**, Rick GM: Oral lichen planus and diabetes, a potential syndrome. *J Calif Dent Assoc* 1973; 1: 58-59.
- Inoue K**, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda D: Functional vanilloid receptor in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 124-129.
- Jontell M**, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K: Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 273-277.
- Kim SJ**, Lee SA, Yun SJ, Kim JK, Park JS, Jeong HS, Lee JH, Moon SJ, Won YH: Expression of vanilloid receptor 1 in cultured fibroblast. *Exp Dermatol* 2006; 15: 362-367.
- Kinnby B**, Konsberg R, Larsson A: Immunogenic potential of some mercury compounds in experimental contact allergy of the rat oral mucosa. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 60-68.
- Larsson A**, Kinnby B, Konsberg R, Peszkowski MJ, Warfvinge G: Irritant and sensitizing potential of copper, mercury and tin salts in experimental contact stomatitis of rat oral mucosa. *Contact Dermatitis* 1990; 23: 146-153.

- Li WH, Lee YM, Kim JY, Kang S, Kim S, Kim KH, Park CH, Chung JH:** Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heatshock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2328-2335.
- Lodi G, Scully C, Carozzo M, Griffith M, Sugerman PB, Thongprasom K:** Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 164-178.
- Maggi CA:** Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 1995; 45: 1-98.
- Maggi CA, Meli A:** The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 1988; 19: 1-43.
- McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, Toms C, Peacock M, Shah K, Winter J, Weerasakera N, Webb M, Rang HP, Bevan S, James IF:** Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1084-1094.
- Németh J, Helyes Zs, Oroszi G, Thán M, Pintér E, Szolcsányi J:** Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 347: 101-104.
- Niissalo S, Hietanen J, Malmström M, Hukkanen M, Polak J, Kontinen YT:** Disorder-specific changes in innervation in oral lichen planus and lichenoid reactions. *J Oral Pathol Med* 1999; 29: 361-369.

- Oh U, Hwang SW, Kim D:** Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 1996; 16: 1659-1667.
- Petrou-Amerikanou C, Markopolous AK, Belazi M, Karamitsos D, Papanayotou P:** Prevalence of oral lichen planus in diabetes mellitus according to the type of diabetes. *Oral Dis* 1998; 4: 37-40.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez DF:** The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 218-224.
- Pintér E, Szolcsányi J:** Plasma extravasation in the skin and pelvic organs evoked by antidromic stimulation of the lumbosacral dorsal roots of the rat. *Neuroscience* 1995; 68: 603-614.
- Saunders CI, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP:** Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* 2007; 44(12): 3271.
- Scully C, Carrozzo M:** Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46: 15-21.
- Scully C, Eisen D, Carrozzo:** Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 287-306.
- Seki N, Shirasaki H, Kikuchi M, Sakamoto T, Watanabe N, Himi T:** Expression and localization of TRPV1 in human nasal mucosa. *Rhinology* 2006; 44: 128-134.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung JY, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002).** Bradykinin-12-

- lipxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2002; 99: 10150-10155.
- Shiohara T**, Kano Y: Lichen planus and lichenoid dermatoses. In: *Dermatology*. (Bologna J et al.) Mosby Verlag, London New York Toronto, 2003; S.188.
- Sonkodi I**: *Orális medicina*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 1996; 160-162.
- Southall MD**, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB: Activation of epidermal vanilloid receptor 1 induced release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 217-222.
- Stander S**, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpackovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M: Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 2004; 13: 129-139.
- Sugerman PB**, Savage NW: Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Aust Dent* 2002; 47: 290-297.
- Sugerman PB**, Satterwhite K, Bigby M: Autocytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142: 449-456.
- Sugiyama M**, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T: Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 594-600.
- Szállási Á**, Blumberg PM: Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 159-212.

Szállási Á, Blumberg PM: [³H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: Species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: 84-91.

Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs: Somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia mediated by somatostatin. In: *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications*. (editors: Handwerker HO, Brune K.) IASP Press, Seattle, 2004; 113-128.

Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E: Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 1998a; 123: 936-942.

Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J: Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 1998b; 125: 916-922.

Szolcsányi J: Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res* 1996; 113: 343-359.

Szolcsányi J: Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin in the study of pain*. (editor: Wood JN) Academic Press, London, 1993; 1-26.

Szolcsányi J: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1984; 2-25.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A: Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* 1976; 26: 33-37.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A: Sensory effects of capsaicin congeners I: Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* 1975; 25: 1877-1881.

Tar I, Márton I: Az orális lichen planus: bizonyosságok és kétségek. *Fogorvosi Szemle* 2009; 102: 103-109.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21: 531-543.

Thresh LT: Isolation of capsaicin. *Pharm J* 1846; 6: 941.

Tyldesley WR: Oral lichen planus. *Br J Oral Surg* 1974; 11: 187-206.

Vesper M, Riethdorf S, Christoph E, Ruthke A, Schmelzle R, Löning T: Nachweis humaner Papillomavirus (HPV)-DNA bei oraler Manifestation von Lichen planus. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1997; 1: 146-149.

Wang H, Woolf CJ: Pain TRPs. *Neuron* 2005; 46: 9-12.

WHO International histological classification of tumours. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa (2nd edition). Springer, Berlin, 1997; 30.

WHO Collaborating centre for oral precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 518-539.

Zhao ZZ, Sugerman PB, Walsh LJ, Savage NW: Expression of RANTES and CCR1 in oral lichen planus and association with mast cell migration. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 158-162.

Zhou XJ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ, Aldred MJ, Seymour GJ: TCR α gene expression in lesional T lymphocyte cell line in oral lichen planus. *Oral Dis* 1996; 2: 295-298.

Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-110.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom program- és témavezetőmnek, Prof. Dr. Pintér Erikának, aki szakmai munkám irányítása során mindvégig barátként állt mellettem, töretlen hite, szakmai professzionizmusa és következetes kitartása példaként fog előttem állni a jövőben is.

Köszönöm Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak és Prof. Dr. Barthó Lorándnak, valamint a neurofarmakológiai munkacsoport valamennyi munkatársának, dr. Helyes Zsuzsannának, dr. Kemény Ágnesnek, Perkecz Anikónak, dr. Sándor Katalinnak, dr. Pozsgai Gábornak, hogy szeretettel és segítőkészen fogadtak, és hogy szakmailag összeszokott csapatuk munkámat minden szempontból, saját szabadidejét sem kímélve, támogatta.

Köszönöm a szövettani munkákban nyújtott segítséget dr. Gömöri Évának és a rendkívül szép metszeteket Perkecz Anikónak.

Köszönöm a debreceni élettani intézet munkatársainak, Bíró Tamásnak, Marincsák Ritának a PCR vizsgálatokban nyújtott segítséget.

Köszönöm Olaszné Csillának és Góglné Katinak az állatkísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítséget és a lelkiismeretes munkát.

Köszönöm a Fogászati és Szájsebészeti Klinikán dolgozó asszisztensnőimnek, Stiksz Zsuzsának és Bakos Tamásnének a türelmet és a gondos szervezői munkát, amivel hozzájárultak eredményeimhez.

A segítő biztatásért hálával tartozom Prof. Dr. Szabó Gyulának és Trombitás Károlynak.

Köszönettel tartozom családomnak, a szeretetteljes légkörért, amiben dolgozhattam.

Az értekezést édesapám emlékének ajánlom.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

1. **Bán Á.**, Marincsák R., Bíró T., Perkecz A., Gömöri É., Sándor K., Tóth I.B., Bánvölgyi Á., Szolcsányi J., Pintér E: Up-regulation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) receptor expression in oral lichen planus. *Neuroimmunomodulation* 2009 (IF: 1,21)
2. **Bán Á.**, Perkecz A., Gömöri É., Szolcsányi J., Pintér E: Investigation of the role of neonatal capsaicin-desensitization in the mercury chloride (HgCl₂)-induced lichenoid reaction of rat oral mucosa (poszter). Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Ausztria, 2009. július 20-23.
3. **Bán Á.**, Marincsák R., Bíró T., Perkecz A., Gömöri É., Pozsgai G., Pintér E: Up-regulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) receptor expression in oral lichen planus (poszter). European Opioid Conference – European Neuropeptide Club Joint Meeting, Ferrara, Olaszország, 2008. április 8-11.
4. **Bán Á.**, Perkecz A., Marincsák R., Bíró T., Gömöri É., Szolcsányi J., Pintér E: A TRPV1 receptor szerepe az orális lichen és lichenoid reakció kialakulásában (előadás). Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése Debrecen, 2008 (absztrakt: *Acta Physiologica Hungarica* 96(1), 2009)
5. **Bán Á.**, Bíró T., Gömöri É., Perkecz A., Pintér E, Szolcsányi J: A TRPV1 receptor szerepe az orális lichen és lichenoid reakció kialakulásában. MFE Fogpótlástani Társaság XVII., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága VII., Magyar Parodontológiai Társaság XV. kongresszusa, Szeged, 2007. október 13-15.
6. **Bán Á.**, Gömöri É., Perkecz A, Pintér E: A kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok modulátor hatása a szájnyálkahártya lichenoid elváltozásának kialakulásában. MFE Fogpótlástani Társaság XVI., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága VI., Magyar Parodontológiai Társaság XIV. kongresszusa, Sopron, 2005. október 13-15.

7. **Bán Á**, Olasz L, Szentirmai M, Mukics A, Tóth V: Típusos lichen oris tüneteivel kezdődő buccalis planocellularis carcinoma esete (poszter). Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2003. október 16-18.

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Mukics A, Nyéárády J, Ember I, Olasz L: Effectiveness of orally administered pilocarpine during and after radiotherapy of head-and-neck cancer patients. *Anticancer Research* 2006, 26(2): 1557-1562. (IF: 1,479).
2. Mukics A, **Bán Á**, Szabó Gy, Tóth V: Benzidamin tartalmú szájöblítővel szerzett klinikai tapasztalatok a sztomato- glossopyrosis kezelésében. *Fogorvosi Szemle* 2005, 98(1): 15-19.
3. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Ember I, Olasz L: Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head-and-neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005, 34: 149. (IF: 0,75).
4. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Mukics A, Szentirmai M, Ember I, Olasz L: Short term results with pilocarpine (Salagen) during irradiation in oropharyngeal cancer revealing symptoms of xerostomia. *Hungarian Epidemiology* 2005, 1(2): S68.
5. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Ember I, Olasz L: Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head-and-neck cancer. *J Craniomaxillofac Surg* 2004, 32. (IF: 0,75).
6. Mukics A, **Bán Á**, Tóth V: Management of stomato-glossopyrosis – effectiveness of benzydamine rinse. *Fogorvosi Szemle* 2003, 96(5): 244.

7. **Bán Á**, Olasz L, Szentirmai M, Mukics A, Tóth V: Buccal squamous cell carcinoma preceded by typical oral lichen planus. A case report. *Fogorvosi Szemle* 2003, 96(5): 243.
8. Tóth V, **Bán Á**, Mukics A: Estimation of the effectiveness of aggressive periodontitis treatment. *Fogorvosi Szemle* 2003, 96(5): 233.

HAZAI ÉS NEMZETKÖZI KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. Nyárády Z, Németh Á, Mukics A, Szentirmai M, **Bán Á**, Rónai A, Olasz L: Minimizing symptoms of oral dryness (xerostomia) with pilocarpine containing drug. 9th national Congress of the Association of Hungarian Oral and Maxillofacial Surgeons, Pécs, 2005. október 20-22.
2. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Ember I, Olasz L: Relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation of the head and the neck (poszter). 17th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Vienna, 2005. augusztus 29-szeptember 2.
3. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Mukics A, Szentirmai M, Ember I, Olasz L: Short term results with pilocarpine (Salagen) during irradiation in oro-pharyngeal cancer relieving symptoms of xerostomia (poszter). 2nd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. április 1-2.
4. Nyárády Z, Németh Á, **Bán Á**, Ember I, Olasz L: Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation on head-and-neck cancer (poszter). 17th European Congress for Cranio-Maxillofacial Surgery, Tours, 2004. szeptember 14-18.
5. Nyárády Z, Szentirmai M, **Bán Á**, Rónai A, Gelencsér G, Olasz L: Revealing symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation.

Preliminary results. 7th National Congress of the Association of Hungarian Oral and Maxillofacial Surgeons, Pécs, 2003. november 16-18.

6. **Bán Á**, Olasz L, Szentirmai M, Tóth V, Mukics A: Típusos lichen oris tüneteivel kezdődő buccalis planocellularis carcinoma esete. MFE Fogpótlástani Társaság XV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága V., Magyar Parodontológiai Társaság XIII. kongresszusa, Budapest, 2003. augusztus 28-30.
7. Tóth V, **Bán Á**, Mukics A: Az előrehaladott, agresszív parodontitises betegek ellátásának értékelése. MFE Fogpótlástani Társaság XV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága V., Magyar Parodontológiai Társaság XIII. kongresszusa, Budapest, 2003. augusztus 28-30.
8. Mukics A, **Bán Á**, Tóth V: A stomato-glossopyrosis kezelése – benzydamin-tartalmú szájöblítővel szerzett klinikai tapasztalataink. MFE Fogpótlástani Társaság XV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága V., Magyar Parodontológiai Társaság XIII. kongresszusa, Budapest, 2003. augusztus 28-30.
9. Mukics A, Szántó I, Szentirmai M, **Bán Á**: Kivehető fogpótlást viselő Sjögren-szindrómás betegek panaszai és terápiája. Magyar Fogorvostanhallgatók Kongresszusa, Pécs, 2002. október 11-13.
10. Szántó I, Szentirmai M, **Bán Á**, Mukics A: Kivehető fogpótlást viselő Sjögren-szindrómás betegek panaszai és terápiája. MFE Fogpótlástani Társaság XIV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága IV., Magyar Parodontológiai Társaság XII. kongresszusa, Debrecen, 2001. augusztus 23-26.
11. **Bán Á**, Szentirmai M, Szántó I, Mukics A: Az instruálás szerepe a Sjögren-szindrómás betegek gondozásában. MFE Fogpótlástani Társaság XIV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága IV., Magyar Parodontológiai Társaság XII. kongresszusa, Debrecen, 2001. augusztus 23-26.