

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Bán Ágnes

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezetője: Dr. Barthó Loránd, egyetemi tanár

Neurofarmakológia Program
Program- és témavezető: Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet



Pécs
2010

BEVEZETÉS

A lichen és a lichenoid reakció

Az orális lichen planus (OLP) és a lichenoid reakciók a szájnyálkahártya krónikus gyulladással járó lezói. 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 [52]. 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-mediálta folyamatként írják le, főként a T_H1 citokinek (interferon gamma: $IFN\gamma$ és tumor nekrozis faktor alfa: $TNF-\alpha$) fokozott termelése állhat a háttérben [48], ami az epiteliális bazális sejtek apoptózisához vezethet. Az OLP kialakulása bizonyos antigének megjelenéséhez kötött, erre utal a T-limfociták $v\beta$ génjének csökkent expressziója, ami oligo- vagy monoklonális aktivációt jelez [78]. Ezek a mechanizmusok vezetnek a típusos klinikai kép megjelenéséhez az apoptózis és sejtproliferáció különféle arányban való megjelenésével [55]. Abban az esetben, ha az apoptózis üteme meghaladja a proliferáció ütemét, a klinikai képen atrófia, majd erózió jelenik meg. Amennyiben viszont a proliferáció sebessége haladja meg az apoptózist, a retikuláris, papuláris, plakk típusok alakulnak ki [10, 77].

Greenspan és munkatársai 1966-ban rámutattak a diabétesz és az OLP közötti összefüggésre [21], amit később több tanulmány is megerősített [29, 43]. A diabéteszes betegek között az OLP atrófiás és eróziós típusai gyakoriak [9]. Diabéteszben kimutatható a fagocita sejtek funkciózavara, valamint egyes citokinek (például a $TNF-\alpha$) fokozott termelődése. A kollagenáz fokozott aktivitása a gyulladással járó folyamatokat serkenti, a regenerációt gátolja [68].

Pszichés tényezők (neurózis) és hipertónia is hajlamosíthatnak a megbetegedésre. A korábban feltételezett bakteriális, vírusos eredetet nem sikerült egyértelműen igazolni, bár számos tanulmány utal arra, hogy a humán papillóma vírus (HPV), ami egy epiteliotrop DNS vírus, fertőzheti a bőr és a nyálkahártya laphámsejtjeit. A hepatitis C vírus számos extrahepatikus tünetet okoz, melyek között az OLP is előfordul [13]. Klinikailag a lichen planus a legtöbb esetben kétoldali [41], míg a lichenoid reakció egyoldali folyamat (bár ismert a lichen planus egyoldali és a lichenoid reakció kétoldali előfordulása is). Mindkettőre jellemző a vonalkázott, papulával borított atrofizáló vagy eróziós lezió. A két elváltozás klinikailag nem

különíthető el élesen. Lodi és munkatársai összefoglaló közleményükben orális lichenoid reakciónak azokat a léziókat tekintik, amik szövettanilag csak részlegesen felelnek meg az OLP kritériumainak [36]. Orális lichenoid reakció kialakulhat egyes gyógyszerek szedése esetén és különböző fogászati restaurációs anyagok miatt (amalgám, arany- és ezüst-palládium-ötvezetek, valamint kompozitok). A fogászati anyagok esetében kontakt allergiát feltételeznek. Csontvelő-transzplantáció következtében gyakran alakul ki graft-versus-host betegség, amely az orális lichenoid reakcióval járhat [47]. A rágógumikban, szájvizekben, fogkrémekben található ízesítő anyagok (fahéj, mentol, borsmenta) kontakt lézió útján szintén kiválhatnak orális lichenoid reakciót.

Az OLP-nek különböző klinikai manifesztációi léteznek, melyeket először Andreassen határozott meg 1968-ban [1]:

- Retikuláris (lichen oris reticularis)
- Annuláris (lichen oris annularis)
- Papulláris (lichen oris papulosus)
- Plakkforma (lichen oris plaqueforma)
- Atrófiás (lichen planus atrophicus)
- Eróziós vagy ulceratív (lichen planus ulcerosus)
- Bullózus forma (lichen planus bullosus)
- Pigmentált forma (lichen oris pigmentosus, nagyon ritka).

Klinikai morfológiai megjelenése rendkívül sokszínű, ezért határozottan el kell különíteni más, a szájnyálkahártyán hasonló tüneteket produkáló betegségektől.

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 szövettani képe szalagszerű, szubepiteliális limfocita infiltrációval jellemezhető. Az epitéliumban az orto- és parakeratózis jelenik meg, az akantózis pedig fokozódik. A lichen planusra jellemző a jól definiált, limfocitás beszűrődéssel járó szubepiteliális gyulladás, míg a lichenoid reakcióban kifejezettebb a mélyre terjedő diffúz gyulladás. A lichenoid reakció diagnosztikus kritériumai között szerepel a plazmasejtek és az eozinofil sejtek jelenléte. Mindkét lézióban fellelhető a bazális sejtréteg elfolyósodása és az epitel hiperkeratinizációja. A gyulladós sejtek és szöveti antigének jelenléte megfigyelhető mindkét elváltozásban. A neurogén faktorok szerepe egyelőre vitatott ezekben a betegségekben.

A krónikus gyulladás módosítja a neurotranszmitterek felszabadulását a perifériás érző idegvégződésekből, ami kapcsolatban áll a beidegzés hosszú távú változáival (idegrostok összehúzódása vagy destrukciója, illetve sarjadzása és formálódása). A perifériás beidegzés hiánya gátolja a nyálkahártya 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.

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. Ma már kísérletesen is alátámasztották, hogy egyes érző axonterminálisok afferens és efferens funkcióval is rendelkeznek, azaz inger hatására a vezikulákban raktározott neuropeptideket axonális vezetés nélkül is képesek felszabadítani [38, 65]. A gerincvelői érzőneuronok között vannak tisztán afferens, kettős funkciójú „szenzoros-efferens” neuronok, illetve feltételezik, hogy léteznek tisztán lokális effektor funkciójú neuronok is [28]. A szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidok 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, amely ezen érzőideg-végződések lokális efferens működésének következménye [40, 45]. Jelentős szerepet tulajdonítanak a neurogén gyulladásos komponensnek számos betegség (reumatoid artritisz, asztma bronchiale, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, gyulladásos bélbetegségek és gyulladásos szembetegségek) patomechanizmusában [37, 63]. Jelenleg nincs forgalomban egyetlen olyan gyógyszercsoport sem, ami hatékonyan gátolná egy gyulladással járó betegség neurogén komponensét [26].

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében működő kutatócsoport munkája során derült fény arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégződésekből az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végződések harmadik, szisztémás efferens funkciója [25, 27, 61, 62], amit az endokrin és parakrin hatás mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin hatásnak nevezett el [60].

A kapszaicin

Az erős paprika aktív összetevőjét Thresh izolálta először 1846-ban [70]. 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. A komplett szintézisre még 20 évet kellett várni.

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 hüvellyét helyezték az ínyükre, ha fájt a foguk.

A kapszaicin TRPV1 receptor

A kapszaicin receptor létezésének lehetőségét először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka vetették fel egy 1975-ös tanulmányban, 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 [66, 67]. A kapszaicin receptort expresszázó 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 kationcsatornát nyitja az érzőneuronok plazmamembránján [8]. 1997-ben Julius és munkacsoportja klónozte a kapszaicin receptort, amit a szintén vanilloid struktúrát tartalmazó reziniferatoxinnal való aktiválhatósága miatt vanilloid 1 receptornak (VR1) neveztek el [15]. Ezt az elnevezést később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklátúra 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 [23]. A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na^+ - és Ca^{2+} -ionok áramlanak be, melyet K^+ -ion sejtbeli kiáramlása követ. A Na^+ -ion főként az akciós potenciál generálásáért felelős, aminek következtében nocicepció, fájdalomérzet alakul ki. A Ca^{2+} -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 dózisú kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzitizációnak. Ilyenkor az axonterminálisok működése hónapokig károsodik [8, 26, 64]. 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 [69, 74], valamint pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható. Számos növényi eredetű vanilloid, például reziniferatoxin, piperin, zingeron képes nyitni az ioncsatornát. A kapszaicin, lipofil jellegéből adódóan, a sejtmembránon átjutva intracellulárisan kötődik a receptorhoz [42]. Ezen kívül léteznek a receptornak endogén ligandjai is, például az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (AEA), vagy más néven anandamid [15], 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 [44, 50]. Emellett a csatorna működését jelentős mértékben fokozzák a prosztaglandinok, például a gyulladásozó folyamatokban kulcsfontosságú prosztaglandin E₂, vagy a prosztaciklin néven ismert prosztaglandin I₂ [16, 58]. A receptor potens, valódi endogén ligandja azonban egyelőre nem ismert.

A kapszaicin-érzékeny idegvégződések akut gyulladásozó 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 [3, 4, 59]. A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével lehetőség nyílt génhányos egerek előállítására, ezek segítségével adott fehérje szerepe *in vivo* szelektíven vizsgálható.

TRPV1 receptor expressziót leírtak korábban már a perifériás és a központi idegrendszerben [14, 15], azonban csak nemrégiben azonosították immunhisztokémiai és PCR technikákkal frissen izolált normál humán keratinocitán [30, 53], humán epidermiszben [17], hízósejteken [54], dendritikus sejteken [5], epitheliális sejteken, vaszkuláris endotélsejteken, a nazális mukóza szubmukózos mirigyekben [49], valamint az urotéliumban [2], és a gasztrikus mukózában [20].

CÉLKITŰZÉSEK

- I. Munkánk során célul tűztük ki, hogy egészséges önkéntesek és orális lichen planusban szenvedő betegek szájnyálkahártya mintáiban 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

A kapszaicin-érzékeny érzőidegekből a TRPV1 receptor aktivációjával felszabaduló neuropeptidok kiváltják az általános bevezetőben részletesen ismertetett neurogén gyulladást. A TRPV1 receptorokat nem-neuronális sejteken, például keratinocitákon, gyulladásozó és immunsejteken, illetve érendotélien is kimutattak, de ezen receptorok élettani szerepét nem ismerjük.

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mintavétel

Az orális lichen planust klinikai jelek alapján diagnosztizáltuk, amit rutin szövettani vizsgálatok is alátámasztottak. A mintavétel előtt az száj nyálkahártyát 1 ml 2%-os lidokain-adrenalin injekcióval infiltráltuk. Az száj nyálkahártya biopsziáját 0,5x0,5 cm nagyságban 18 páciensen végeztük el, akiknek életkora 40 és 60 év között volt. A mintavételt 5 egészséges önkéntesnél is elvégeztük, akiknek életkora 30 és 40 év között volt.

A betegek többsége a lichen mellett egyéb szisztémás alapbetegségben is szenvedett: magas vérnyomás, alacsony szérum-vas koncentráció, diabétesz, krónikus bronchitisz, allergia, immunológiai háttérbetegség, mélyvénás trombózis, ízületi problémák, lichen ruber planus. E betegek jelentős részénél több alapbetegség is előfordult. Egy esetben pedig az orális lichen planus mellett a bőrtüneteket mutató lichen planus is kialakult. 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 paraffinos 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.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A metszeteket előbb nyúl poliklonális anti-TRPV1 antitesttel, majd másodlagos tormaperoxidázzal konjugált EnVision system anti-nyúl szekunder antitesttel inkubáltuk. A TRPV1 receptorok immunlokalizációját diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő, a 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.

Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív, valós idejű PCR mérést ABI Prism 7000 szekvenciadetektáló rendszeren 5' nukleáz esszé felhasználásával végeztük el. A PCR amplifikációt TaqMan primerekkel végeztük, TaqMan univerzális PCR mastermix protokoll alapján. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), illetve β -aktin mRNS szintek meghatározását használtuk.

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 nyálkahártya közepes TRPV1 receptor antitest pozitivitást mutatott intracitoplazmatikusan az epitelsejtekben, összehasonlítva a negatív kontrollal. Immunfestődést figyelhettünk meg minden epiteliális sejtrétegben, a bazálistól a szuperficiális rétegig. Minimális jelölődés volt az endotél sejteken, a limfociták és fibroblasztok negatívak voltak.

A lichenes mintákban intenzív immunpozitivitás volt kimutatható az epitélium teljes szélességében, és a szubepiteliális szövetekben. Kifejezett immunfestődés volt az epiteliális sejtekben, a bazális, a parabazális, az intermedier és szuperficiális sejtrétegekben. Detektálható volt az immunpozitivitás a citoplazmában, és néhány sejt intranukleáris pozitivitást mutatott. Jelentős mennyiségű immigráns limfocita és fibroblaszt is intranukleáris és intracitoplazmatikus immunpozitivitást mutatott a szubepiteliális régióban. Sokkal intenzívebb volt a festődés a kapilláris endotelsejtekben és a szubepiteliális régióban.

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.

A TRPV1 receptor mRNS tartalom a lichen oris biopsziás anyagaiban 2,5-szeres emelkedést mutatott az egészséges önkéntesek mintáihoz képest.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen munkában immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatottunk 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 endotelsejtekben, a limfocitákban, a fibroblasztokban, a szubepiteliális szövetben. A kvantitatív képanalízis emelkedett immunpozitív pixelarányt mutatott az OLP-ben szenvedő páciensek epitéliumában a normális kontrollokkal összehasonlítva, ami a TRPV1 receptor expressziójának fokozódását jelenti a gyulladásos folyamat során. Limfociták, fibroblasztok és vaszkuláris endotelsejtek 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 gyulladáshoz vezető terület a kötőszövetben túl kicsi a kötőszövet teljes kiterjedéséhez képest. Mivel a receptorok lokális expresszióját kvantitatív valós idejű RT-PCR módszer segítségével bizonyítottuk mRNA szinten, feltételezzük, hogy ezen receptorok extraneurális szintetizálódnak, az immunpozitív sejtek által.

Bár számos tanulmány szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a neurogén gyulladás közrejátszik gyulladáshoz vezető betegségek (Sjögren-szindróma, pszoriázis, dermatitisz, artritisz, asztma) patomechanizmusában, csak nagyon kevés munka említi a lehetséges neurogén faktorok szerepét orális lichen planusban [41]. Proinflammációs neuropeptidok, főként SP és CGRP szabadul fel a szenzoros idegvégződésekből a TRPV1 receptorok stimulációjakor. E mediátorok neurogén gyulladáshoz vezető változásokat okoznak, mint például lokális vazodilatációt, plazmaprotein extravazációt, gyulladáshoz vezető és immunsejtek akkumulációját [37]. A TRPV1 receptorok expressziója a nem-neurális sejtek széles skálájában kimutatható (epitélis sejteken: keratinocitákon [17, 30], gasztrikus epiteliális sejteken [20], enterocitákon és pneumocitákon [22]; vaszkuláris endotéliumban, immunsejtekben [46], simaizomsejtekben [22] és fibroblasztokban [32]). A kiterjedt kutatások és számos immunhisztokémiai bizonyíték ellenére a TRPV1 receptorok fiziológiai szerepe a nem-neurális szövetben a mai napig nem bizonyított [22].

A TRPV1 immunreaktivitás kimutatható humán bőrmintában, epidermiszben, szőrtüszőben, bőrfüggelékben, dermális véredényekben, Meissner korpuszokban, fibroblasztokban és hízósejtekben [30, 32]. Izolált humán keratinociták szintén expresszálnak TRPV1 receptort, és kimutatták, hogy a kapszaicin fokozza ezen sejtek Ca^{2+} -felvételét [30, 53]. 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 túlermelődik a gyulladáshoz vezető, amely az epidermális károsodás miatt jön létre [53]. 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 [22, 35, 53].

Vizsgálatainkban az első immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a TRPV1 receptorok jelen vannak a humán orális mukózáris szövetben, és fokozottan expresszálnak humán OLP-ben. Az immunpozitív sejtek száma megemelkedett a nem-neurális sejtek körében az epitélium teljes szélességében és szubepiteliális szövetekben is összehasonlítva az

ép mukózával. A TRPV1 receptor mRNS szintje a lichen planusból származó biopsziás mintákban szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges önkéntesekéiben. Ezért arra következtetünk, hogy a nem-neurális TRPV1 receptorok az orális mukózában valószínűleg gyulladással való változásokat szabályoznak az OLP kifejlődése során. Neurális és nem-neurális TRPV1 receptorok között interakciók jöhetnek létre a felszabaduló gyulladással való mediátorok, citokinek, prosztaglandinok, növekedési faktorok és neuropeptidek által.

Bár az OLP pontos patogenezeise a mai napig tisztázatlan, kijelenthetjük, hogy a gyulladással való mediátorok TRPV1 receptor-függő felszabadulása epitelialis, vaszkuláris endotélsejtekből, limfocitákból, fibroblasztokból 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 a szájüregben kialakuló lichenoid reakciókat higany tartalmú amalgámtömések mellett [18]. Felmerül, hogy a gyulladással való változásokat 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 [33, 34].

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a higany-klorid-ecsetelés hatását a szájnyálkahártya gyulladással való változásaiban, 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

Kísérleti állatok

Mivel az irodalmi adatok arra utaltak, hogy a rendelkezésre álló, kísérletesen használható patkánytörzsek közül a barna-norvég patkányok reagálnak legérzékenyebben a higany-klorid

kezelésre [18], ezt a törzset használtuk vizsgálatainkban. Újszülött (2-3 napos, 10-15 g) barnanorvég (Brown Norway) patkányokat tenyésztettünk a PTE-ÁOK Központi Állatházában klimatizált környezetben, hagyományos táplálékkal és vízzel *ad libitum* ellátva.

Neonatális, 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 dózisu adásával. 50 mg/kg dózisu kapszaicint adtunk a patkányoknak szubkután, a nyaki résznel. A kísérletbe hét hetes előkezelt és 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, HgCl₂-dal ecsetelt.
3. Kapszaicinnel előkezelt, HgCl₂-dal nem ecsetelt.
4. Kapszaicinnel előkezelt és HgCl₂-dal ecsetelt.

A kezelés befejeztével az állatokat intravénás pentobarbitallal túlaltattuk és kimetszettük a szájnyalkahártyát szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat céljára.

Szövettani vizsgálatok

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: hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, kapillarizáció, fibroblaszt proliferáció és fibrózis.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A metszeteket előbb nyúl poliklonális anti-TRPV1 antitesttel, majd másodlagos tormaperoxidázzal konjugált EnVision system anti-nyúl szekunder antitesttel inkubáltuk. A TRPV1 receptorok immunlokalizációját diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő, 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.

Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív, valós idejű PCR mérést ABI Prism 7000 szekvenciadetektáló rendszeren 5' nukleáz esszé felhasználásával végeztük el. A PCR amplifikációt TaqMan primerekkel végeztük, a TaqMan univerzális PCR mastermix protokoll alapján. Belső kontrollként eukarióta 18S RNS mRNS szintek meghatározását használtuk.

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. A statisztikai értékelésre ebben az esetben Kruskal-Wallis próbát, 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 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 pszeudo-papillomatózis 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 szubepitélialisan kapilláris proliferáció, fibroblaszt aktiváció és enyhe fibrózis igazolódott. A nyálkahártya lichenoid keratózisa kapszaicin deszenzibilizáció esetén és HgCl₂ egyedüli alkalmazásakor is kialakult, de ezek kombinációja súlyosbította a folyamatot. A lézióban limfoid reakció, illetve a bazális rétegben sejtes hidropikus degeneráció nem fejlődött ki.

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 gyulladást okozott, viszont tovább fokozta a HgCl₂-kiváltotta gyulladást.

Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a TRPV1 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 kapilláris endotélisejtek 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. Az összetett pontszám, ami a TRPV1 receptor immunpozitivitást jelzi a keratinocitákban, a kapilláris 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.

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 kapszaicinnal való előkezeléshez a TRPV1 receptor mRNS szint tekintetében, patkány nyálkahártya mintákban.

KÖVETKEZTETÉSEK

Barna norvég patkányokon végzett kísérleteink azt mutatják, hogy az irodalomban leírtakhoz hasonlóan [18], ebben az állattörzsben a szájnyálkahártya higany-kloridos 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 jelentkezett, ami enyhe fibrózishoz vezetett. A hematoxin-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 kezelésekre hatására fejlődött ki. Jól ismert, hogy szisztémás neonatális kapszaicin előkezelés neurotoxikus hatása deszenzibilizálja a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokat, ezek funkciója szelektíven kiesik. Kísérleti eredményeink alapján meglepő, hogy a neonatális kapszaicin előkezelés jelentősen fokozta a TRPV1 receptor immunpozitivitást a patkány szájnyálkahártya sejtjein (keratinocitákon, fibroblasztokon és kapilláris endotélsejteken).

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 gyulladásos 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 hasonlítva. A szemikvantitatív szövettani analízis alapján fokozott specifikus immunpozitivitás volt kimutatható az epitélium teljes szélességében, a vaszkuláris endotélisejtekben, 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 endotélisejtek 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 extraneurálisan szintetizálódnak az immunpozitív sejtekben.

2. Mivel a kapszaicin-érzékeny érzőidegek deszenzitizációja neonatális, szisztémás kapszaicin előkezelés által fokozta a gyulladásszerű 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

- [1] Andreassen JO: Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 36-42.
- [2] Avelino A, Cruz F: TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 287-299.
- [3] 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.
- [4] Ács G, Palkovits M, Blumberg PM: [³H]Resiniferatoxin binding by the human vanilloid (capsaicin) receptor. *Mol Brain Res* 1994; 23: 185-190.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Bevan S, Docherty RJ: *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, San Diego, 1993; 27-44.
- [8] Bevan S, Szolcsányi J: Sensory neuron-specific actions of capsaicin: Mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 330-333.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Carrozzo M, Gandolfo S: Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit Oral Biol Med* 2003; 14: 115-127.
- [14] Caterina MJ, Julius D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 487-517.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Fausson-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.
- [21] 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.
- [22] Gunthorpe MJ, Szállási Á: Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 32-41.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.

- [26] Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J: Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Curr Med Chem* 2003; 2: 191-218.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Howell FV, Rick GM: Oral lichen planus and diabetes, a potential syndrome. *J Calif Dent Assoc* 1973; 1: 58-59.
- [30] 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.
- [31] Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloborg K: Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 273-277.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Lodi G, Scully C, Carozzo M, Griffith M, Sugeran 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.
- [37] 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.
- [38] Maggi CA, Meli A: The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 1988; 19: 1-43.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Niissalo S, Hietanen J, Malmström M, Hukkanen M, Polak J, Konttinen YT: Disorder-specific changes in innervation in oral lichen planus and lichenoid reactions. *J Oral Pathol Med* 1999; 29: 361-369.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez DF: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 218-224.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] Scully C, Carozzo M: Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46: 15-21.
- [48] Scully C, Eisen D, Carozzo: Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 287-306.
- [49] 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.
- [50] 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-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2002; 99: 10150-10155.
- [51] Shiohara T, Kano Y: Lichen planus and lichenoid dermatoses. In: *Dermatology*. (Bologna J et al.) Mosby Verlag, London New York Toronto, 2003; S.188.
- [52] Sonkodi I: *Orális medicina*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 1996; 160-162.

- [53] 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.
- [54] Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpackovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metz 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.
- [55] Sugerman PB, Savage NW: Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Aust Dent* 2002; 47: 290-297.
- [56] Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M: Autocytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142: 449-456.
- [57] 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 Radiol Endod* 2003; 95: 594-600.
- [58] Szállási Á, Blumberg PM: Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 159-212.
- [59] 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.
- [60] Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs: Somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. In: *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications*. (editors: Handwerker HO, Brune K.) IASP Press, Seattle, 2004; 113-128.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] Szolcsányi J: Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin in the study of pain*. (editor: Wood JN) Academic Press, London, 1993; 1-26.
- [65] Szolcsányi J: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1984; 2-25.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] Tar I, Márton I: Az orális lichen planus: bizonyosságok és kétségek. *Fogorvosi Szemle* 2009; 102: 103-109.
- [69] 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.
- [70] Thresh LT: Isolation of capsaicin. *Pharm J* 1846; 6: 941.
- [71] Tyldesley WR: Oral lichen planus. *Br J Oral Surg* 1974; 11: 187-206.
- [73] 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.
- [74] Wang H, Woolf CJ: Pain TRPs. *Neuron* 2005; 46: 9-12.
- [75] WHO International histological classification of tumours. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa (2nd edition). Springer, Berlin, 1997; 30.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] Zhou XJ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ, Aldred MJ, Seymour GJ: TCR β gene expression in lesional T lymphocyte cell line in oral lichen planus. *Oral Dis* 1996; 2: 295-298.
- [79] 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 oralpilocarpine (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 szájbájlítóval 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.