

***A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID-1
(TRPV1) IONCSATORNA JELENTŐSÉGE A
SZTOMATOLÓGIAI GYAKORLATBAN***

Írta:
Dr. Marincsák Rita

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen
2009

Betétlap

***A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID-1
(TRPV1) IONCSATORNA JELENTŐSÉGE A
SZTOMATOLÓGIAI GYAKORLATBAN***

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

Írta: Dr. Marincsák Rita

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris orvostudomány doktori iskolája

(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bíró Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 200... ..

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	4
<i>A nociceptív neuronok.....</i>	<i>4</i>
<i>A kapszaicin (8-metil-N-vanillil-trans-6-nonenamid) celluláris hatásmechanizmusa</i>	<i>5</i>
<i>A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1).....</i>	<i>7</i>
<i>A TRPV1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában.....</i>	<i>9</i>
<i>A tramadol, mint a TRPV1 lehetséges aktivátora.....</i>	<i>10</i>
<i>TRPV1 kifejeződése nem-neuronális szöveteken</i>	<i>11</i>
<i>Szájüregi rákok epidemiológiája.....</i>	<i>13</i>
CÉLKITŰZÉSEK.....	15
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
<i>Sejtenyésztés.....</i>	<i>17</i>
<i>Intracelluláris kalciummérés egyedi sejten.....</i>	<i>18</i>
<i>[Ca²⁺]_i-ban bekövetkező változások mikrofluorimetriás mérése.....</i>	<i>19</i>
<i>Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia</i>	<i>19</i>
<i>Humán szövetek.....</i>	<i>20</i>
<i>A humán szöveti minták előkészítése</i>	<i>21</i>
<i>Immunhisztokémia.....</i>	<i>21</i>
<i>Az immunhisztokémiai képek elemzése.....</i>	<i>22</i>
<i>Western (immuno) blot analízis.....</i>	<i>23</i>
<i>Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)</i>	<i>24</i>
<i>Statistikai elemzések</i>	<i>25</i>
EREDMÉNYEK	26
I. A TRAMADOL HATÁSA A TRPV1-RE.....	26
<i>Indukálható TRPV1-CHO expressziós rendszerben a tramadol Ca²⁺ tranzienszt vált ki</i>	<i>26</i>
<i>A tramadol által indukált [Ca²⁺]_i tranziensek különböznek a kapszaicin által kiváltottaktól és, ismételt alkalmazás során kifejezett tachifilaxist mutatnak</i>	<i>28</i>
<i>A tramadol a TRPV1-t aktiválva növeli meg a [Ca²⁺]_i-t.....</i>	<i>29</i>
<i>A tramadol hatása koncentrációfüggő</i>	<i>31</i>
II. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE SZÁJÜREGI KÓRKÉPEKBEN	32
<i>A TRPV1 kifejeződik egészséges humán nyelv hámszövetében</i>	<i>32</i>
<i>A TRPV1 kifejeződése fokozódik a nyelv premalignus és malignus elváltozásaiban.....</i>	<i>33</i>
<i>A TRPV1 kifejeződése konfluenciafüggő módon nő humán nyelv laphámkarcinómájából származó CAL27 sejtvonalon</i>	<i>37</i>
MEGBESZÉLÉS	39
<i>A tramadol és a TRPV1</i>	<i>39</i>
<i>TRPV1 lehetséges szerepe humán nyelv laphámkarcinómában.....</i>	<i>42</i>
ÖSSZEFOGLALÁS.....	46
IRODALOMJEGYZÉK.....	47
KÖZLEMÉNYEK	56
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	57

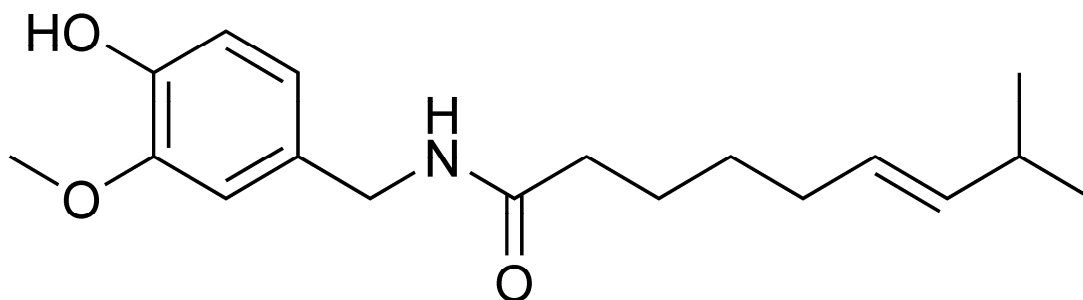
BEVEZETÉS

A nociceptív neuronok

A fájdalmas (azaz potenciális vagy valós szöveti károsítást kiváltó fizikai, kémiai és termális) ingerek érzékelése speciális primer afferens szenzoros neuronok (ún. nociceptorok) perifériás végződésein keresztül történik. Ezen afferensek sejtestjeinek elhelyezkedése három fő reprezentációs területet rajzol ki: 1) a hátsó gyöki ganglionok (DRG) nociceptorai a végtagok, a törzs és a peritoneum parietalis lemezének innervációját ellátva a gerincvelő hátsó szarvának interneuronjaihoz szállítanak érző információt; 2) a trigeminális ganglion nociceptorainak perifériás nyúlványai a fej és a szájüreg innervációját biztosítják és a centrális nyúlványaik az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini-be érkeznek; 3) ganglion nodosum perifériás nyúlványai a viscerális szövetek beidegzését biztosítják, míg centrális nyúlványai szintén az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini-be érkeznek (Millan, 1999; Snider és Macmahon, 1998).

A primer afferens neuronokon belül a nociceptorok két alcsoportja különíthető el: 1) a kis átmérőjű C-rosttal rendelkező idegsejtek ($<30\text{ }\mu\text{m}$), melyek velőshüvely nélküli lassú vezetésű axonnal rendelkeznek; 2) az A δ -roستtal rendelkező nociceptorok sejtestjei közepes átmérőjűek, axonjuk gyorsabb konduktanciájú, mérsékelten velőshüvelyes. A C-rosttal rendelkező neuron alcsoport tagjait polimodális nociceptoroknak is nevezik, mivel mindhárom fő fájdalom ingerre (mechanikai, kémiai és hő) képesek válaszolni, míg más primer érzősejtek csak ezek egy részére (Lang és mtsai, 1990; Lynn és Carpenter 1982). C-típusú idegrostokban gazdag a bőr (Szolcsányi, 1977), a cornea, a szájnyálkahártya (Szolcsányi és Jancsó, 1975), az izmok (Kaufman és mtsai, 1982), ízületek (He és mtsai, 1988), valamint a kardiovaszkuláris, respiratórikus és genitourinális rendszerek is (Maggi és mtsai, 1986; Szolcsányi, 1993). Már Jancsó (Jancsó, 1968) is felismerte, hogy ezen polimodális (C-típusú) nociceptorok igen jelentős és szelektív érzékenységet mutatnak a

csípős paprikából izolálható alkaloida, a kapszaicin (valamint számos egyéb rokon vanilloid vegyület, lásd alább) iránt (**1. ábra**), így ezen érzősejteket "kapszaicin-szenzitív neuronoknak" nevezték el (Bevan és Szolcsányi, 1990; Holzer, 1991; Szállási és Blumberg, 1999).



1. ábra A kapszaicin szerkezete (8-metil-N-vanillil-trans-6-nonenamid)

A kapszaicin (8-metil-N-vanillil-trans-6-nonenamid) celluláris hatásmechanizmusa

A kapszaicin és rokon vanilloid vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő, bár gyakran egymástól függetlenül is megjelenő, valamint az adott anyag hatását individuálisan is reprezentáló folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolása után azonnal kifejlődő excitáció. Ennek keretében a kapszaicin az érző idegsejtek membránját depolarizálva a sejtek Ca^{2+} és Na^{+} ionok iránti permeabilitását megnöveli, mely ionok sejtbe áramlása azok depolarizációjához vezet (Marsh és mtsai, 1987), valamint megváltoztatja a sejt feszültség-vezérelt K^{+} -, Na^{+} - (Petersen és mtsai, 1987), valamint Ca^{2+} -csatornáinak (Docherty és mtsai, 1991) aktivitását. A DRG neuronokon végzet teljes sejt feszültség-clamp kísérletek azt is megmutatták, hogy a kapszaicin elsősorban a divalens kationok beáramlását segíti elő (Bevan és Docherty, 1993; Liu és Simon, 1994). A kifejezett kationpermeabilitás növekedést számos egyéb módszerrel is demonstrálták, így

^{45}Ca -felvétellel (Wood és mtsai, 1988), valamint Ca^{2+} -szenzitív fluoreszcens festékek alkalmazásával is (Bleakman és mtsai, 1990).

A kapszaicin által kiváltott aktiváció (excitáció) során *in vivo* először nociceptív ingerekre észlelhető fokozott érzékenység (hiperalgéria vagy allodínia) alakul ki. Az aktivációt típusosan egy hosszabb refrakter periódus követi, melynek során *in vivo* relatív válaszképtelenség észlelhető kapszaicin és egyéb fájdalomingerek iránt. Ezen mechanizmust Jancsó nyomán mindmáig deszenzitizációnak nevezzük (Jancsó és mtsai, 1977), mely a kapszaicin hatására bekövetkező második celluláris válasz. A szenzoros neuronok kapszaicin által kiváltott deszenzitizációjának két formáját különítették el. Az ún. farmakológiai deszenzitizációt, ahol kapszaicin hosszantartó vagy ismételt adagolását követően a sejtek elvesztik kapszaicin iránti érzékenységüket (homológ deszenzitizáció) (Szolcsányi, 1977; Winter és mtsai, 1990); valamint az ún. funkcionális deszenzitizációt vagy defunkcionalizációt, amely során a sejtek nemcsak kapszaicin, hanem egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránt is érzéketlenné válnak (heterológ deszenzitizáció) (Holzer, 1991). Feltételezték, hogy míg a homológ deszenzitizációt a sejten belül megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), illetve az általa kiváltott folyamatok hozzák létre, addig a heterológ deszenzitizáció a neuropeptid raktárak kiürülésének, a depolarizáció következtében kialakuló megváltozott membrán sajátosságoknak, valamint a kalcium által kiváltott intracelluláris károsodásnak a következménye (Jancsó és mtsai, 1984; Docherty és mtsai, 1991).

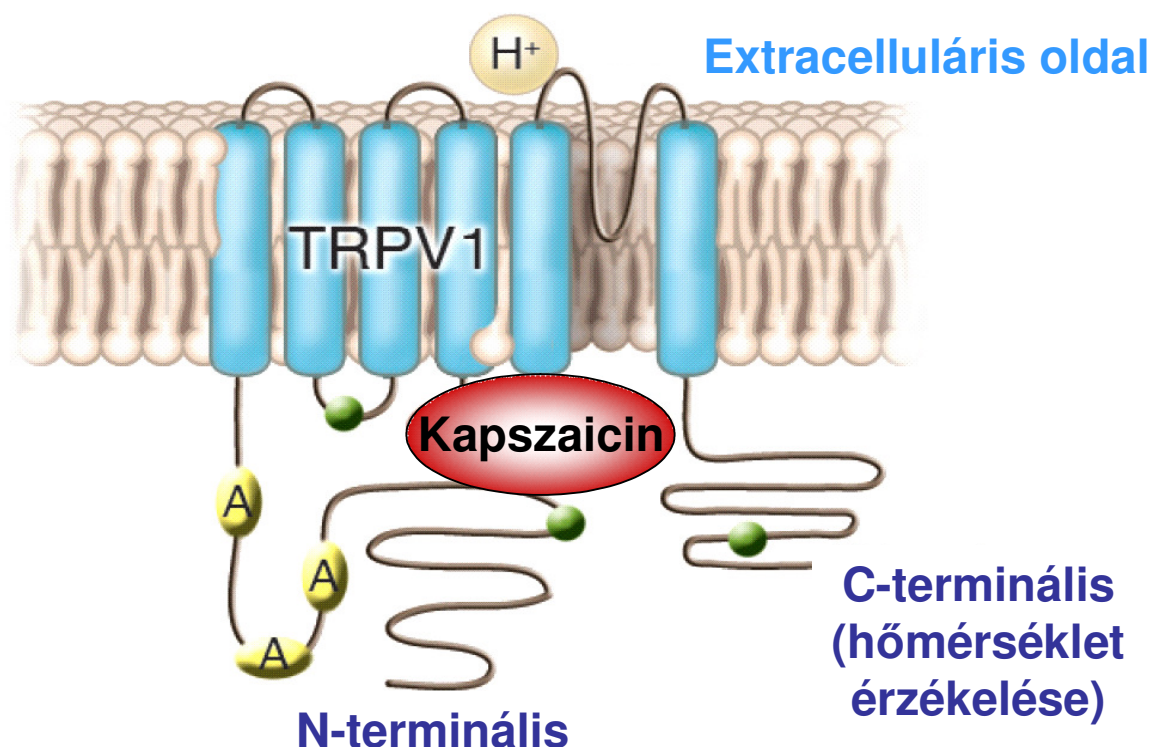
A kapszaicin celluláris hatását tanulmányozva végezetül megállapítható, hogy az alkaloida elég nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva a sejteken egy harmadik jellegzetes folyamatot, a neurotoxicitást váltja ki. Ezen folyamat leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, a mitokondriális kalciumakkumulációnak és a kalcium-függő

proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood és mtsai, 1988; Winter és mtsai, 1990; Holzer, 1991).

A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1)

Jancsó már 1968-ban felvetette egy ún. "fájdalom-receptor" meglétének szükségességét (Jancsó, 1968), melyet a szenzoros neuronok fent bemutatott populációjának szelektív kapszaicin-érzékenységevel magyarázott. A technikai eszköztár fejlődésével (patch-clamp technika, intracelluláris ionmérés) felismerték a kapszaicin funkcionális támadáspontját, amely egy nem-specifikus kationcsatornának bizonyult (Wood és mtsai, 1988; Winter és mtsai, 1990; Oh és mtsai, 1996). Kiderült továbbá az is, hogy a csatorna nagyfokú Ca^{2+} -permeabilitást mutat, így aktivációja következményeként jelentősen megemelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bleakman és mtsai, 1990; Cholewinski és mtsai, 1993).

A molekuláris biológiai technikák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően végül 1997-ben megtörtént az első kapszaicin-érzékeny specifikus molekula, a vanilloid (kapszaicin) receptor-1 (VR1) molekuláris karakterizálása (Caterina és mtsai, 1997), először patkány cDNS könyvtárát felhasználva. A patkány VR1 egy 2514 nukleotid által kódolt, azaz 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje, mely 6-transzmembrán doménnel rendelkezik (Caterina és mtsai, 1997) (**2. ábra**). Strukturális sajátosságai alapján a VR1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transient receptor potential) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető. Ezen receptorokat a non-szelektív kationcsatornák nagycsaládjába sorolják, melynek tagjai a TRPV (vanilloid), TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) csoportok (Montell és mtsai, 2002). Ezen besorolás alapján a szakirodalomban a VR1-t TRPV1-nek (transient receptor potential vanilloid-1) nevezik (Montell és mtsai, 2002; Gunthorpe és mtsai, 2002).



2. ábra A TRPV1 sematikus szerkezete (Paus és mtsai, 2006)

A TRPV1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy a csatorna 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkezik, és valószínűleg tetramer formában van jelen a sejtek külső membránjában (Kedei és mtsai, 2001; Kuzhikandhatil és mtsai, 2001). Kiderült az is, hogy a molekula számos kötő és szabályozó hellyel bír: ezek az intracelluláris N-terminális szakaszon megtalálható három egymást követő ankyrin-szerű domén (potenciális protein kináz A foszforilációs helyek) (Caterina és mtsai, 1997; Kwak és mtsai, 2000; Bhavé és mtsai, 2002 és 2003); az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a kapszaicint és ultrapotens analógját, a reziniferatoxint felismerő) kötőhely; valamint az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez és mtsai, 2000; Jordt és mtsai, 2000). Bár kezdetben csak a sejtek külső membránjában feltételezték a TRPV1 jelenlétét, mára már számos bizonyíték – a

TRPV1-mediált sejtválaszok kalciummentes közegben is kiválthatók (Ács és mtsai, 1997; Eun és mtsai, 2001; Lázár és mtsai, 2006), az intracellulárisan elhelyezkedő TRPV1 receptorok aktivációja befolyásolja a sejtek morfológiáját és életképességét (Han P és mtsai, 2007) – szól amellett, hogy a TRPV1 az intracelluláris membránokba is beépül és ott funkcionális formában van jelen. Kimutatták végül, hogy hasonlóan a szenzoros neuronokon megtalálható TRPV1-hez, a klónozott TRPV1 is funkcionális, nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis (relatív permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10) csatornaként működik (Caterina és mtsai, 1997).

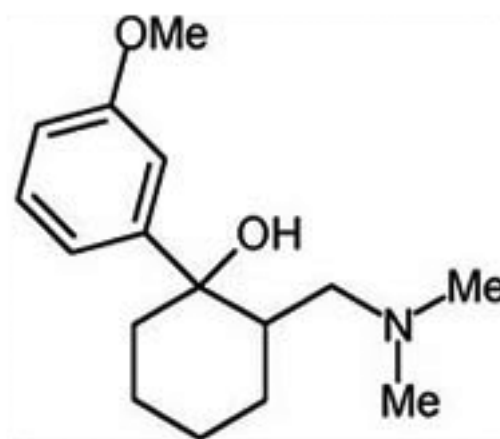
A TRPV1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában

A TRPV1 molekuláris biológiai leírását követően elvégzett nagyszámú kísérletnek köszönhetően kiderült az is, hogy ezen receptort nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő (azaz endogén), főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni. Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető az alacsony küszöbű ($\sim 43^\circ\text{C}$) hőmérsékletemelkedés, valamint a pH csökkenése (acidózis) (Caterina és mtsai, 1997; Tominaga és mtsai, 1998) (**2. ábra**). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy e hatások mellett számos, leginkább gyulladásos mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működését pozitívan befolyásolni (Hwang és mtsai, 2000; Tominaga és mtsai, 2001; Premkumar, 2001). Ezen ágensek egyrészt direkt módon (azaz a TRPV1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve, intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a TRPV1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezek az anyagok a TRPV1 hőérzékenységi

küszöbét (43 °C) lecsökkentik, azaz a receptor már fiziológiás hőmérsékleten (37 °C) is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hiperalgéria) (Tominaga és mtsai, 1998; Caterina és mtsai, 2000). A szenzitizáció mechanizmusának köszönhetően így lehetővé válik a fájdalom *in vivo* percepciója (azaz az egyed létét fenyegető “noxa” érzékelése), emellett pl. gyulladásos állapotokban az effektor sejtek mozgósítása is eredményesebb lehet. A TRPV1 szerepét bizonyítja a fenti folyamatokban a TRPV1 knock-out egerekkel végzett kísérletek eredménye is, miszerint ezen állatokban (a természetesen hiányzó vanilloid-érzékenység mellett) főként a termális-gyulladásos hiperalgéria jelensége hiányzik (Tominaga és mtsai, 1998; Caterina és mtsai, 2000). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a TRPV1 számos nociceptív stimulus egyfajta “központi integrátora”.

A tramadol, mint a TRPV1 lehetséges aktivátora

A tramadol egy szintetikus ópioid fájdalomcsillapító, amit széleskörben alkalmaznak krónikus és posztoperatív fájdalmak csillapítására (Gibson, 1996; Pyati és Gan, 2007) (**3. ábra**).



3. ábra A tramadol szerkezete

Kíváló hatékonyságát a μ -típusú ópioid receptorok aktiválása (Gibson, 1996; Dayer és mtsai, 1997; Raffa és mtsai, 1992) mellett a szinaptoszómák noradrenalin és szerotonin visszavételének gátlása (Berrocso és mtsai, 2006; Ogata és mtsai, 2004; Barkin, 2008) révén éri el. Egyre több tanulmány számol be ugyanakkor arról, hogy a tramadol ismert „fájdalomcsillapító mechanizmusai” mellett számos más ioncsatorna működését is képes befolyásolni. Kimutatták, hogy gátolja a feszültségfüggő Na^+ - (Haeseler és mtsai, 2006) és a késői egyenirányító K^+ -csatornákat (Tsai és mtsai, 2006), valamint a GABA és NMDA ionotróp receptorokat (Hara és mtsai, 2005). Ráadásul néhány *in vivo* tanulmány felvetette, hogy a tramadol, analgetikus képessége mellett, a lokális anesztetikumokéhoz hasonló, „helyi érzéstelenítő-szerű” hatással is rendelkezik (Pang és mtsai, 1998; Acalovschi és mtsai, 2001; Altunkaya és mtsai, 2003; Pang és mtsai, 1999).

Kézenfekvőnek tűnhet tehát a kérdés, hogy ha a tramadol hatásai ennyire széleskörűek és bizonyítottan ilyen sokféle ioncsatorna működését képes befolyásolni, vajon nem lehet-e hatással a fájdalom kialakulásában központi szereppel bíró TRPV1-re is. A tramadol esetlegesen TRPV1-en megvalósuló lokális hatása lehetőséget teremtené az eddigiektől egészen eltérő klinikai alkalmazásra, különösen egy olyan területen, mint a fogászat és a szájsebészet.

TRPV1 kifejeződése nem-neuronális szöveteken

A TRPV1-et vizsgáló kutatások egyik izgalmas eredménye volt az is, amikor kiderült, hogy a receptor elhelyezkedése és működése nem csupán neuronális szövetekre korlátozódik. Bíró és munkatársai például kapszaicin segítségével a hátsó gyöki ganglionokéhoz nagyon hasonló, TRPV1-specifikus kalcium-beáramlást idéztek elő hízósejteken és glioma sejteken (Bíró és mtsai, 1998a és 1998b). Emellett beszámoltak a kapszaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken (Partsch és Matucci-Cerinic, 1993),

timocitákon (Amantini és mtsai, 2004), bronchiális epitéliumon (Lundberg, 1993; Chitano és mtsai, 1994; Ellis és mtsai, 1997; Veronesi és mtsai, 1999) és humán limfocitákon (Lai és mtsai, 1998). Végezetül bebizonyosodott, hogy a receptor funkcionális formája expresszálódik epidermális keratinocitákon (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003; Ständer és mtsai, 2004), humán húgyhólyag epiteliális és intersticiális sejtjein (Birder és mtsai, 2001; Ost és mtsai, 2002; Lazzeri és mtsai, 2004), valamint a gasztrointesztinális traktus epiteliális elemein is (Ward és mtsai, 2003; Faussone-Pellegrini és mtsai, 2005).

Fontos megfigyelés volt továbbá, hogy a TRP család egyes tagjai (köztük a TRPV1) a normál nem neuronális szövetek mellett változó mértékben expresszálódnak tumoros sejteken is (Prevarskaya és mtsai, 2007). Jelentős TRPV1 expressziót mutattak ki prosztatata (Sanchez és mtsai, 2005), vastagbél (Dömötör és mtsai, 2005), hasnyálmirigy (Hartel és mtsai, 2006) és hólyag karcinómákban (Lazzeri és mtsai, 2005), illetve LNCaP and PC-3 humán prosztatata karcinómából származó sejtvonalakon (Sanchez és mtsai, 2005). Néhány tumor esetén pedig az is kiderült, hogy a TRPV1 protein expressziójának mértéke a tumor grádusának növekedésével párhuzamosan nő (prosztatata karcinóma – Sanchez és mtsai, 2005; Czifra és mtsai, 2009) vagy, éppen ellenkezőleg, csökken (hólyag karcinóma – Lazzari és mtsai, 2005; glioma – Amantini és mtsai, 2007).

Bár Tanaka és mtsai már 2002-ben beszámoltak arról, hogy kapszaicin etetése szignifikánsan gátolta a patkányokban 4-nitroquinolin 1-oxid-dal indukált nyelvtumorok növekedését (Tanaka és mtsai, 2002), mindezidáig senki sem vizsgálta azt, hogy a tápcsatorna kezdeti szakaszán, a csípőspaprika elsődleges „célpontjául” szolgáló szájüreget bélelő hámsejteken megtalálható-e ez a receptor, illetve a szájüreg leggyakoribb rosszindulatú elváltozását jelentő nyelvtumorokban változik-e annak expressziója.

Szájüregi rákok epidemiológiája

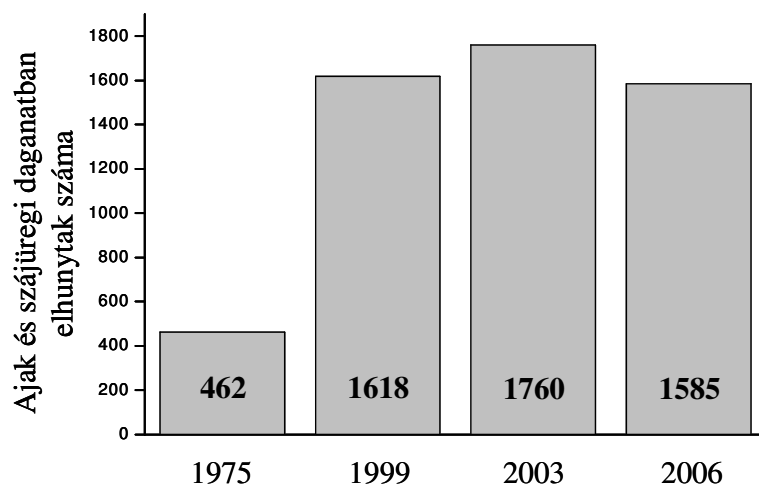
A nyelvtumorerok még napjainkban is jelentős egészségügyi problémát okoznak világszerte. A prekancerózus hám diszplázia (pl. leukoplakia) talaján kialakuló malignus elváltozás a szájüregi rosszindulatú daganatok 30-40 %-át (Chen és mtsai, 1990; Hindle és Nally, 1991; Mashberg és mtsai, 1989) képviseli, melynek 95 %-a laphámából kiinduló folyamat (Muir és Weiland, 1995; Ramirez-Amador és mtsai, 1995). Bár az előfordulási gyakorisága a világ egyes tájain igen különböző, az incidencia és mortalitási mutatók sajnos a legtöbb országban növekvő tendenciájúak (Moore és mtsai, 2000; Davies és Welch, 2006). Ezen adatok vonatkozásában az európai országok közül Magyarországon a legrosszabb a helyzet, ugyanis az ajak- és szájüregi rákok esetében mind a mortalitás, mind az incidencia listavezetői vagyunk (Szabolcs és Kásler, 2002; Döbrössy, 2001). A Központi Statisztikai Hivatal és a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján hazánkban az ajak- és szájüregi rákok (C00-C14) incidenciája a nagy halálozási gyakoriságú daganatos lokalizációk sorrendjében az ötödik helyen áll (**1. táblázat**).

1. táblázat A felfedezett és a Nemzeti Rákregiszternek bejelentett leggyakoribb új rosszindulatú daganatok száma mindkét nemben (Nemzeti Rákregiszter)

	Daganat típusa	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
1	Tüdő (C33-C34)	11620	11 079	10 571	10 042	10 161	10 481	10 431
2	Bőr egyéb (C44)	9 555	9 751	9 593	9 923	11 036	11 080	9 840
3	Kolorektális (C18-C21)	8 947	8 712	8 658	8 841	9 062	9 022	8 762
4	Emlő (C50)	7 448	8 551	8 400	7 744	7 788	7 585	6 990
5	Ajak és szájüreg (C00-C14)	3 894	3 771	3 628	3 815	3 890	3 686	3 539

A szájüregi karcinómák okozta halálozás a múlt század végén ijesztő növekedési dinamikát mutatva közel négyszeresére nőtt (**4. ábra**). Bár az ezredfordulóra a mortalitási

mutatók drámai emelkedése megszűnt, szignifikáns csökkenést ezen a téren az elmúlt 7 esztendőben sem sikerült elérnünk.



4. ábra A szájüregi karcinómák okozta halálozás növekedési dinamikája hazánkban 1975-től napjainkig (Központi Statisztikai Hivatal)

A szájüregi laphámrákok kedvezőtlen prognosztikájú daganatok. A későn, előrehaladott stádiumban felismert daganatok 5 éves túlélési aránya a műtét, a besugárzás és a kemoterápia módszereinek elmúlt évtizedekben elért javulása ellenére sem mozdult el jelentősen az 50-55%-os értékről (Neville és mtsai, 2002). Sajnos mind a mai napig viszonylag kevés jól alkalmazható prognosztikai tényező áll rendelkezésünkre a betegség lefolyásának, kórjóslatának becslésére. Így a szűrések és a megelőzést segítő programok mellett nagy hangsúlyt kell fektetni olyan diagnosztikus molekulák, prognosztikai faktorok, illetve kemopreventív ágensek felfedezésére, amelyek segíthetnek a daganat korai felismerésében, a kórfolyamat agresszivitásának megítélésében, valamint a sebészi terápiát kiegészítő szupportív kezelés megtervezésében és kivitelezésében.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink első részében a TRPV1 lehetséges szerepét vizsgáltuk a sztomatológiai gyakorlatban gyakran és jó hatékonysággal alkalmazott tramadol fájdalomcsillapító hatásának kifejlődésében. Kísérleteinket TRPV1-t overexpresszáló heterológ expressziós rendszerben (TRPV1-CHO sejtek) végeztük.

1. Kezdetben arra voltunk kíváncsiak, hogy a tramadol hatással van-e a sejtek intracelluláris kalciumhomeosztázisára.
2. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy ez a hatás a TRPV1-en keresztül valósul-e meg, és ha igen, akkor aktiváló vagy gátló jellegű.
3. Elemeztük emellett a specifikus TRPV1-mediált sejtválaszok kinetikai paramétereit, összehasonlítva a receptor legismertebb agonistája, a kapszaicin által kiváltott tranziensekkel.
4. Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a tramadol hatása koncentráció függő módon alakul-e ki.

Kísérleteink második részében a szájüreg leggyakoribb rosszindulatú elváltozását jelentő nyelvtumorokban, illetve annak prekancerózus elváltozásában (leukoplákia) vizsgáltuk a TRPV1 kifejeződését.

1. Képkalkító technikákat felhasználva először egészséges humán nyelv (dorzális és ventrális) hámjában vizsgáltuk a TRPV1 expresszióját.
2. Ezt követően azt elemeztük, hogy változik-e a receptor kifejeződésének mértéke prekancerózus elváltozásokban, illetve különböző malignitási fokú nyelv laphámkarzinómában.

3. Vizsgáltuk emellett azt is, hogy a TRPV1 expresszió változása a tumoros szövetekben mutat-e összefüggést a tumorok hisztopatológiai jellegzetességeivel.
4. Végezetül, modellt keresve későbbi funkcionális vizsgálatainkhoz, humán nyelv laphámkarcinómából származó sejtvonalon (CAL27) elemeztük a TRPV1 kifejeződését.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A tramadol TRPV1-re kifejtett hatását TRPV1-CHO sejteken vizsgáltuk. Az indukálható expressziós rendszert a már korábban leírtaknak megfelelően hozták létre kollaborációs partnereink (Szállási és mtsai, 1999). A patkány TRPV1 cDNS-ét pUHG102-3 plazmidba szubklónozták (Clontech, Palo Alto, CA, USA) és ezt követően pTet Off regulátor plazmiddal (Clontech) már stabilan transzfektált CHO sejtekbe vittük be (TRPV1-CHO sejtek). Ezekben a sejtekben tetraciklin jelenlétében a pUHG plazmid kódoló régiója nem íródik át mRNS-sé, tehát a TRPV1 termelődése gátolt. Ezért a TRPV1-CHO sejteket 10 % borjúsavót (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM glutamint, antibiotikumokat (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint 2 µg/ml tetraciklint (Teva, Debrecen, Magyarország) tartalmazó Ham F-12 médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük. A sejteket 48 órával a kísérletek kezdete előtt a tápoldat tetraciklin-mentes Ham F-12 médiumra változtatásával indukáltuk. Az így indukált sejteket egy éjszakán át 37 °C-on, majd azt követően 35 °C-on tenyésztettük. Az expresszió hatékonyságának ellenőrzését Western blot technikával végeztük el.

Kísérleteink egy másik részét humán nyelv laphámkarcinómából létrehozott CAL27 sejtvonalon (Gioanni és mtsai, 1988) végeztük (LGC Promochem, Wesel, Germany). A sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ atmoszférában 2 mM L-glutamint (Sigma-Aldrich) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich) tápoldatban tenyésztettük, melyet kiegészítettünk 10 % főtális borjú szérummal (Invitrogen), 50 U/ml penicillinnel, 50 µg/ml streptomocinnal és 1,25 µg/ml fungizonnal (Teva).

Intracelluláris kalciummérés egyedi sejten

A fedőlemezre szélesztett, előzetesen indukált sejteket 5 μM kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Invitrogen) 90 percig inkubáltuk 35 °C-on, tenyésztőoldatban. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket invertáló fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japan). Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk, 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva. Meghatároztuk a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadosokat ($R=F_{340}/F_{380}$).

Kísérleteink során a sejteket állandóan mostuk kalciumtartalmú Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g glükóz, (mind Sigma-Aldrich) pH 7,4), lassú perfúzióval. A vizsgált anyagokat [kapszaicin (Sigma-Aldrich), tramadol (Sigma-Aldrich), kapszazepin (Alexis, San Diego, Ca, USA)] a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. Kísérleteinket szobahőmérsékleten (22-23 °C) végeztük.

A tranziensek kinetikai paramétereit, azaz a kiváltott tranziens maximális amplitúdóját, az agonisták adagolásának kezdetétől az amplitúdó maximumáig eltelt időt és a felszállószárra illesztett egyenes meredekségét a DE OEC Élettani Intézetében kifejlesztett program segítségével határoztuk meg. Az így kapott adatok matematikai analízisét Origin (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) programmal végeztük. A tranzienseket bemutató ábrákon a fluoreszcencia hányadosokat tüntettük fel az idő függvényében.

[Ca²⁺]_i-ban bekövetkező változások mikrofluorimetriás mérése

A sejteket a fentebb leírtak szerint elkészített tetraciklin-mentes Ham F-12 mediumban (Sigma-Aldrich) 40000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekbe (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany), majd az edényeket 48 órán át 34,5 °C-on tartottuk. A mérés napján 2 µM kalciumérzékeny fluoreszcens fluo 4 (Invitrogen) festék acetoximetilészter formájával (fluo 4-AM) 40 percig inkubáltuk 34,5 °C-on, tenyésztőoldatban. Többszöri mosást követően a sejteket 1% borjú szérum albumint (BSA) (Sigma-Aldrich) és 2,5 mM Probenecidet (Sigma-Aldrich) tartalmazó Hank-oldatban (136,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,81 mM MgSO₄, 1,26 mM CaCl₂, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM NaHCO₃, pH 7,2, mind Sigma-Aldrich) inkubáltuk 30 percig 34,5 °C-on. A Fluo 4 -AM-rel feltöltött sejteken FlexStation II³⁸⁴ (FLIPR, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) fluoreszcens mikroplate reader segítségével mértük az [Ca²⁺]_i-ban bekövetkező változásokat 494 nm excitációs és 516 nm emissziós hullámhossz mellett. A dózis-hatás görbe meghatározásához Hill-egyenletet alkalmaztunk

$$B/B_{\max} = [X]^n / ([EC_{50}]^n + [X]^n)$$

ahol a B az aktuális fluoreszcens érték, B_{max} a B feltételezett maximális értéke, EC₅₀ a félhatásos koncentráció, az X a vizsgált ligand (tramadol), és az n a Hill koefficiens. A számításokhoz négy kísérletben mért eredmények átlagát használtuk, az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel.

Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia

A CAL27 sejtek TRPV1 expresszióját és szubcelluláris lokalizációját immunfestést követő konfokális mikroszkóp technikával vizsgáltuk. A sejtenyészeteket többszöri kalcium- és magnézium-mentes foszfátpufferrel (PBS) történő mosás után 5 percig 4 °C-os acetonnal fixáltuk, majd 30 percig blokkoltuk szobahőmérsékleten (1 % BSA és 0,6 % Triton X-100)

(mind Sigma-Aldrich). Ezt követően 37 °C-on, 60 percen keresztül TRPV1 ellen nyúlban termeltetett antitesttel (hígítás: 1:1000 blokkoló oldatban, Sigma-Aldrich) inkubáltuk. A másodlagos, kecskében termeltetett fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált nyúl ellenes antitestet szobahőmérsékleten, 60 percig hagytuk a sejteken (hígítás: 1:300 PBS-ben, Vector Burlingame, CA, USA). A sejtmagokat 4,6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) (Vector) jelöltük, majd a sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal (Oberkochen, Németország) felvételeket készítettünk. A negatív kontrollok primer antitestek felhasználása nélkül készültek.

Humán szövetek

Vizsgálataink a DE OEC Tudományos Bizottságának Regionális és Intézeti Kutatásetikai Bizottsága engedélyével és valamennyi érintett beteg írásos beleegyezésével történtek. Hét, korábbi anamnézisében minden pre- illetve malignus elváltozástól mentes felnőtt normál (egészséges) nyelvének kis darab hámszövege került eltávolításra rutin diagnózis céljából (kontroll minta), 4 esetben a nyelv dorzális, 3 esetben a ventális oldaláról. Kísérleteinkben – patológus által elvégzett gondos hisztopatológiai elemzést követően – humán nyelv nyolc leukoplakiás epitéliumát és tizennyolc laphámkarcinómáját használtuk fel, melyek adatait a 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat *A kísérletben felhasznált minták klinikai és hisztopatológiai jellemzői*

Hisztopatológiai diagnózis	Minta sorszáma	Kor (átlag)	Nem (férfi/nő)
Egészséges (kontroll)	1-7	56 év (51-60)	4/3
Leukoplakia	8-15	48 év (42-59)	5/3
Jól differenciált laphámkarcinóma (1. grádus)	16-22	53 év (42-60)	4/3
Közepesen differenciált laphámkarcinóma (2. grádus)	23-31	61 év (49-69)	6/3
Rosszul differenciált laphámkarcinóma (3. grádus)	32-33	58 év	2/0

A humán szöveti minták előkészítése

A kapott szöveti mintákat két részre osztottuk. Az egyik részt 4%-os paraformaldehidben (Sigma-Aldrich) történő fixálás és paraffinba ágyazást követően immunhisztokémiai eljárásokkal vizsgáltuk. A másik részt Q-PCR és Western blot analízishez használtuk fel. Első lépésként epitéliális szövetben gazdag mintákat állítottunk elő úgy, hogy mintáinkat a tumor felszínéről indulva mikrotómmal szeletelni kezdtük. Egyes szeletekről hematoxin-eozin (Sigma-Aldrich) festést készítettünk, így győződünk meg arról, hogy mintáink a lehető legkevesebb kötőszöveti és izom elemet tartalmazzák. Erre azért volt szükség, mert fibroblasztokon, sima- és harántcsíkolt izmon egyaránt kimutatták a TRPV1 receptor jelenlétét (Miyamoto és mtsai, 2005; Cavanaugh és mtsai, 2007), mely befolyásolhatta volna vizsgálataink eredményeit. Ezt követően mintáinkat folyékony nitrogénben lefagyasztva tároltuk, míg a kellő számú minta összegyűjtését követően Q-PCR és Western blot vizsgálatokat végeztünk. Tekintettel arra, hogy a leukoplakiás elváltozásokból eltávolított szövetből a patológiai feldolgozás után csak nagyon korlátozott mennyiség állt rendelkezésünkre, ezekben az esetekben csak immunhisztokémiai elemzésre volt lehetőségünk.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérleteket 5 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákon hajtottuk végre. Deparaffinálást követően antigénfeltárást végeztünk, melynek során a szöveti metszeteket 0,1 M citrát-pufferben (pH = 6) főztük (mikrohullámú sütő, 750 W, 10 perc). A TRPV1 kimutatására EnVision kitet (DAKO, Glostrup, Denmark) használtunk. Tíz perces szobahőmérsékleten történő endogén peroxidáz blokkot követően (EnVision kit, DAKO), az aspecifikus kötőhelyek lefedését 5% BSA-t (Sigma-Aldrich) és 0.6 % Triton X-100-at (Sigma-Aldrich) tartalmazó blokkoló oldattal

végeztük. Elsődleges antitestként nyúlban termeltetett TRPV1 ellenes antitestet alkalmaztunk [hígítás 1:1000 5 % BSA-t és 0.6 % Triton X-100-at tartalmazó oldatban (mind Sigma-Aldrich)] 37 °C-on, 90 percig. Ezt követően nyúl ellenes polimer-tormaperoxidáz (HRP) konjugált másodlagos antitesttel (EnVision kit, DAKO) inkubáltuk a metszeteket, szobahőmérsékleten. Harminc perc elteltével hozzáadtuk a metszetekhez a pufferben oldott diaminobenzidin (DAB) kromogént (EnVision kit, DAKO) (szobahőmérsékleten, 2 perc), majd a színreakció kifejlődését követően vizes bázisú beágyazó médiummal (DakoCytomation Faramount Aqueous Mounting Medium, DAKO) fedtük a metszeteket. Magfestésre hematoxilint (Sigma-Aldrich) használtunk. Az immunpozitivitás specificitásának igazolására a festési eljárást másik két TRPV1 ellenes elsődleges antitesttel (H-150, sc-20813, hígítás 1:50; és D-20, sc-12502, hígítás 1:50, mindkettő Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) is megismételtük, melyek az előbbiekkal teljesen azonos festési mintázatot mutattak. Negatív kontrollként az elsődleges antitestet szintetikus blokkoló peptiddel (Santa Cruz) inkubáltuk, illetve elhagytuk a TRPV1 ellenes antitestet. Humán bőrből (Bodó és mtsai, 2004 és 2005) és prosztatából (Sanchez és mtsai, 2005) készített metszeteken látható TRPV1 immunreaktivitás szolgált pozitív kontrollként.

Az immunhisztokémiai képek elemzése

A fent részletezett immunhisztokémiai eljárással megfestett metszetek vizsgálatához egy Nikon Eclipse 600W típusú konvencionális mikroszkópot (Nikon, Tokió, Japán) használtunk. A metszetekről a mikroszkóphoz csatolt CCD kamera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) és a Spot v3.5 program segítségével felvételeket készítettünk, melyeket a továbbiakban Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) képanalizáló szoftver segítségével elemeztünk (Bodó és mtsai, 2004 és 2005). A TRPV1 immunreaktivitás intenzitását 10 véletlenszerűen elhelyezett egyenlő nagyságú

területben mértük, majd meghatároztuk az immunpozitív pixelek átlagát és az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg (Bodó és mtsai, 2005).

Western (immuno) blot analízis

A Western blot technikát a laboratóriumunkban már korábban használt protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998a; Boczán és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2003) alkalmaztuk. A műtétek során kioperált nyelvtumorokból lemetezett szövetdarabokat a fent részletezett előkészítést követően -70 °C-on tároltuk a felhasználásig. Ekkor a mintákat folyékony nitrogénben porítottuk, lízis pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20 μ M leupeptin, pH 7,4, mind Sigma-Aldrich) homogenizáltuk, végül jégen ultrahangos sejtfeltárást végeztünk. Az így nyert lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A proteinkoncentráció meghatározása után elkészítettük a mintákat (5 % β -merkaptoetanol, 10 % glicerín, 2 % SDS, 0,062 M TRIS, 20 mM ditiotritol, 0,0025 g brómfenolkék, mind Sigma-Aldrich), majd 10 perces főzéssel 100 °C-on denaturáltuk a fehérjéket. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), mintánként 120 μ g proteint választottunk szét 8 %-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk (2 x 45 perc, 100 V konstans feszültség). A membrán szabad kötőhelyeit 5 % sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5 % tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5 %-os tej-PBS-ben hígított, nyúlban termeltetett TRPV1 ellenes antitesttel (1:1000, Sigma-Aldrich) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A membránok 30 perces mosását (PBST, 0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma-Aldrich) követően azokat másodlagos, nyúl-ellenes, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (EnVision kit, DAKO) inkubáltuk 30 percen keresztül, hígítatlan formában. Újabb, PBST-ben elvégzett mosást követően az

immunreakciók eredményét kemilumineszcens kit segítségével (ECL; Pierce) tettük láthatóvá, a jeleket Intelligent Dark Box (Fujifilm, Tokio, Japán) alkalmazásával detektáltuk. A Western blot analízis pozitív kontrolljaként TRPV1-et expresszáló humán prosztatata szövetet használtunk (Sanchez és mtsai, 2005). Ezt követően – a felvitt minták valóban egyenlő protein mennyiségének ellenőrzése érdekében – a membránokat 2 % SDS-t és 0,1 % β -merkaptoetanolt tartalmazó 200 ml 50 mM TRIS-HCl pufferben (pH 7,5) mostuk 65 °C-on 1 órán át, hogy a korábban bekötődött antitesteket eltávolítsuk (mind Sigma-Aldrich), majd a fent ismertetett protokoll szerint megismételtük az eljárást úgy, hogy ezúttal β -aktint felismerő elsődleges antitestet alkalmaztunk (1:100, Santa Cruz). Az expresszió kvantitatív meghatározásához szükséges denzitometriás analízist az Image Pro Plus 4.5.0 szoftver (Media Cybernetics) segítségével végeztük el. A denzitometriás elemzés folyamán az egyes minták immunjelét normáltuk több független kísérlet során alkalmazott kontroll minta immunjének átlagára, majd az értékeket az ábráinkon átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel (Varga és mtsai, 2004; Czifra és mtsai, 2006, 2009).

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A teljes RNS kivonására Trizolt (Invitrogen) használtunk. A teljes RNS 3 μ g-jából kiindulva 15 U AMV reverz-transzkriptázt (Promega, Madison, Wisconsin, USA) és 0,025 μ g/ μ l random primert (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt (Assay ID: Hs00218912_m1 a humán TRPV1 esetében, Applied Biosystems) a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystems) alapján. Belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz szolgált (GAPDH, Assay ID: Hs99999905_m1 a humán GAPDH esetében,

Applied Biosystems). Az eredmények kiértékelése során a TRPV1 transzkriptek mennyiségét a GAPDH-éra normáltuk a Δ CT módszer szerint (Bodó és mtsai, 2005).

Statisztikai elemzések

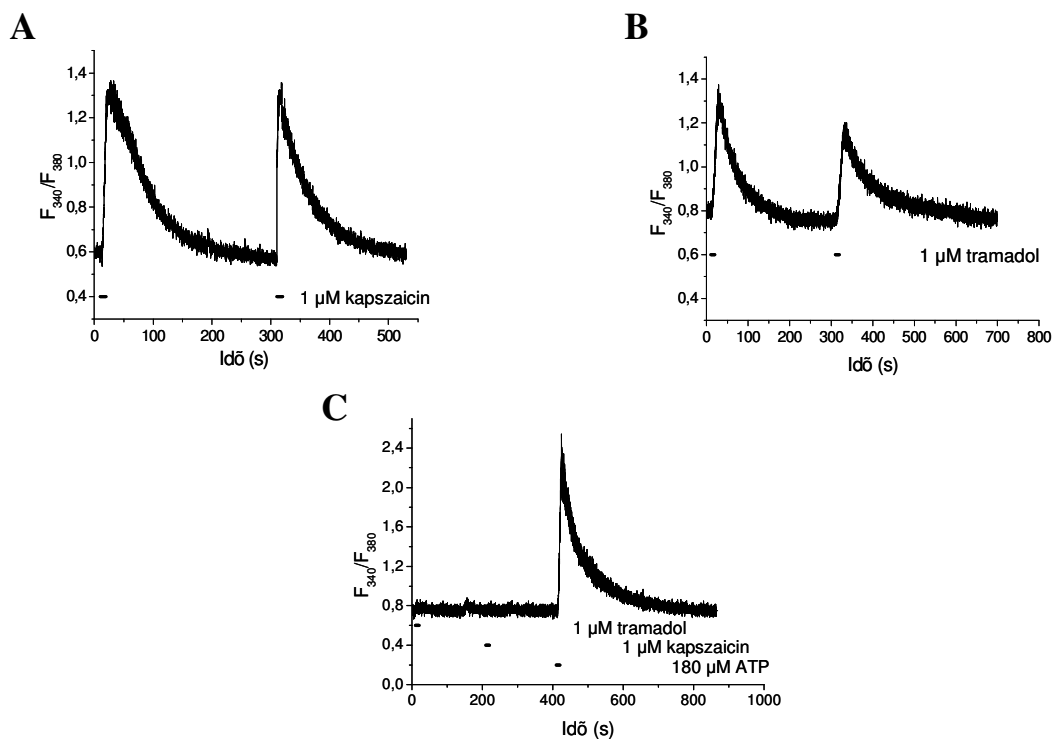
Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására, az SPSS 13.0 szoftvert (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) használva, a független mintás t -próbát alkalmaztuk, 5 %-os szignifikancia szinttel.

EREDMÉNYEK

I. A tramadol hatása a TRPV1-re

Indukálható TRPV1-CHO expressziós rendszerben a tramadol Ca^{2+} tranzienszt vált ki

Mindenekelőtt megvizsgáltuk, hogy az általunk használt TRPV1-CHO expressziós rendszerben a TRPV1 receptor valóban funkcionális csatornaként van jelen. Korábbi eredményeinkkel összhangban (Lázár és mtsai, 2003) megállapítottuk, hogy a receptort expresszáló CHO sejteken 1 μ M kapszaicin Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldatban $[Ca^{2+}]_i$ tranzienszt hozott létre. Azt is megfigyeltük, hogy ezen tranziensek kapszaicin ismételt adásakor (300 s-ként) nem mutattak tachifilaxist (**5. A ábra, 3. táblázat**).



5. ábra A kapszaicin és a tramadol hatása az $[Ca^{2+}]_i$ -ra TRPV1-CHO sejteken

Az üveg fedőlemezen tenyésztett TRPV1-CHO sejteket 2 μ M fura 2-AM-rel feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást, majd annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). (A) 1 μ M kapszaicin és (B) 1 μ M tramadol is megnövelte az $[Ca^{2+}]_i$ -t a TRPV1-CHO sejteken. A tranziensek kinetikai paramétereit a **3. táblázat**ban foglaltuk össze. (C) Az ATP-vel ellentétben (amit pozitív kontrollként alkalmaztunk) az üres vektort expresszáló CHO sejteken sem a kapszaicin, sem a tramadol nem okozott változást az $[Ca^{2+}]_i$ -ban.

Megállapítottuk továbbá, hogy ugyanezen sejteken a TRPV1 antagonistá kapszazepin (5 μM) jelenlétében a kapszaicin nem váltott ki $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranzienseket (ábrán nem mutatva). Mivel a kapszaicin a receptort nem expresszáló CHO sejtekben sem váltotta ki az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedését – bár a vizsgált sejtek 73 %-a tranzienssel válaszolt adenosin-trifoszfát (ATP) adásakor (n=11) (**5. C ábra**) – kimondhatjuk, hogy az általunk választott expressziós rendszerben a TRPV1 valóban funkcionálisan aktív formában van jelen, és a kapszaicin receptorspecifikus módon képes ezt aktiválni.

3. táblázat Kapszaicin és tramadol által kiváltott tranzienseket jellemző paraméterek

	Kapszaicin (1 μM)	Tramadol (1 μM)
Válaszoló sejtek (%)	76 (n = 54/71)	72 (n = 41/57)
Amplitúdó (ratio)	1,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1 *
A maximális válasz eléréséhez szükséges idő (s)	14,5 $\pm$ 1,1	20,9 $\pm$ 1,2 *
A felszálló szár meredeksége (ratio/s)	0,49 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,04 *
Tachifilaxis 1.→2. (%-ra változott)	105 $\pm$ 9 %	63,4 $\pm$ 5,4 % *
Tachifilaxis 2.→3. (%-ra változott)	98 $\pm$ 6 %	46,3 $\pm$ 3,8 % *

A bemutatott paramétereket az “Anyagok és módszerek” fejezetnek megfelelően határoztuk meg. Minden értéket átlag $\pm$ SEM alakban tüntettünk fel. * p < 0,05 a kapszaicin hatásához képest.

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a tramadol befolyásolhatja-e a kapszaicin által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranzienseket. Először a receptort nem expresszáló CHO sejteken vizsgáltuk a tramadol hatását kalciumtartalmú extracelluláris oldatban. 1 μM tramadol egyetlen esetben sem okozott változást az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban sem 10, sem 60, sem 600 s-ig tartó adást követően sem, míg 180 μM ATP-re ugyanezen sejtek 73 %-ka válaszolt tranzienssel (**5. C ábra**).

Legnagyobb meglepetésünkre az előzőekkel mindenben megegyező körülmények között a receptort nagy számban expresszáló, indukált TRPV1-CHO sejtek 72 %-nál

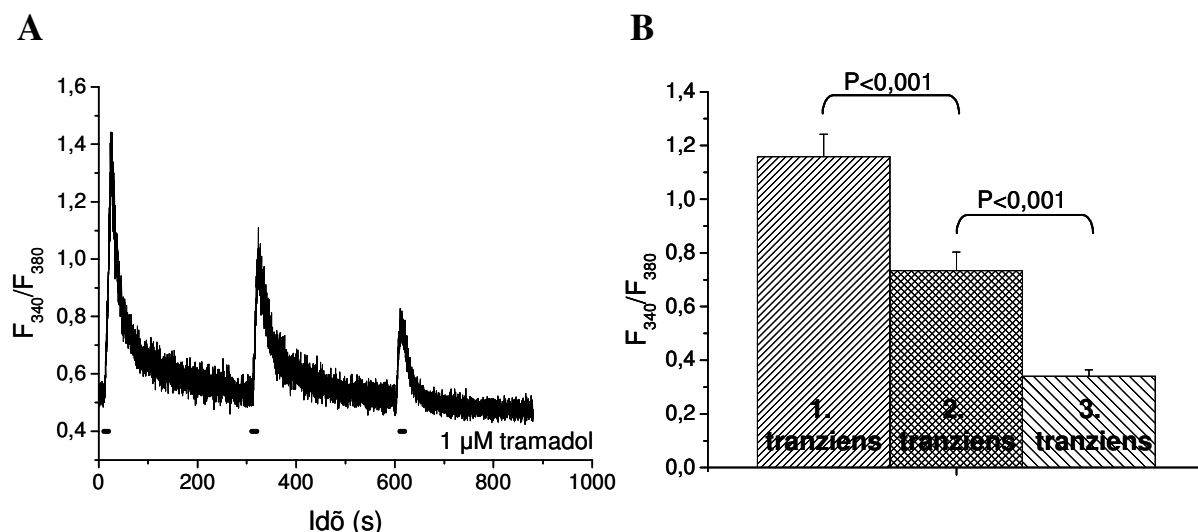
(n=41/57) 1 μ M tramadol önmagában is megnövelte az $[Ca^{2+}]_i$ -t (küszöbnek a fluoreszcens hányados, az adott anyag alkalmazásának kezdetétől számított 60 s belül létrejött, legalább 10 %-os növekedését tekintettük). Ez a jelenség tramadol ismételt alkalmazása esetén szintén kiváltható volt (**5. B ábra**). Mindezen eredményeink azt sugallták, hogy a tramadol az általunk alkalmazott expressziós rendszerben, meglepő módon, TRPV1 agonistaként viselkedik.

A tramadol által indukált $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek különböznek a kapszaicin által kiváltottaktól és, ismételt alkalmazás során kifejezett tachifilaxist mutatnak

Valamennyi általunk mért tramadol által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ tranziens gyors típusú tranziens volt (**3. táblázat**), azaz az amplitúdó maximumát $[1,2 \pm 0,1$ a fluoreszcencia értékek hányadosával (ratio) jellemezve] gyorsan elérték. Kinetikai paramétereit tekintve a maximumig eltelt idő $20,9 \pm 1,2$ s, a felszálló szár meredekségét pedig $0,27 \pm 0,04$ ratio/s volt (minden érték átlag $\pm$ SEM). Az általunk regisztrált tramadol tranziensek jól összevethetőek voltak a kapszaicin okozta $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokkal (**3. táblázat**). Összehasonlítva a kapszaicin, illetve a tramadol által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ változásokat ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy tramadol esetén a maximális amplitúdó és a meredekség szignifikánsan kisebbnek (rendre $p = 0,029$ és $0,001$), a maximális válasz kialakulásához szükséges idő pedig ezzel egyidejűleg szignifikánsan nagyobbak ($p = 0,0002$) adódott (**3. táblázat**). Az $[Ca^{2+}]_i$ a válaszok 76 % (kapszaicin) ill. 79 %-nál (tramadol) visszatért a kiinduláskor jellemző nyugalmi szintre.

Igen jelentős különbséget találtunk továbbá a két anyag hatása között ismételt adás esetén. Ismert, hogy a TRPV1-CHO expressziós rendszerben a második kapszaicin adagolás nem okozza a tranziensek maximális amplitudójának szignifikáns csökkenését (tachifilaxis); a korábbi publikációkkal jó összhangban (Lázár és mtsai, 2003) mi is kb. 5 %-kal nagyobb

választ regisztráltunk. Ezzel szemben a tramadol (1 μ M, 300 s-ként adagolva) hatására kialakult második tranziens amplitúdója csak $63,4 \pm 5,4$ %-a (átlag $\pm$ SEM, n = 41) volt az elsőnek (p = 0,0003), míg a harmadik tranziens amplitúdójának maximuma tovább csökkent a második tranziensének $46,3 \pm 3,8$ %-ra (p = 0,000004) (átlag $\pm$ SEM, n = 41) (6. A, B ábra, 3. táblázat).

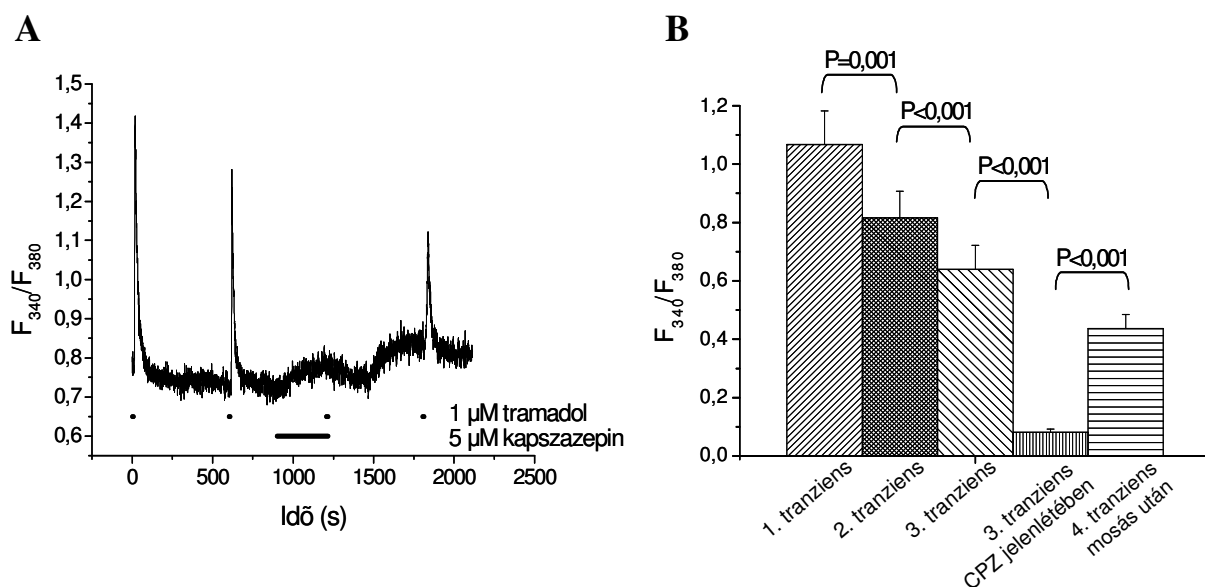


6. ábra Kapszaicin és tramadol ismételt alkalmazásának hatása az $[Ca^{2+}]_i$ -ra TRPV1-CHO sejteken. Az üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket 2 μ M fura 2-AM-rel feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást, majd annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). (A, B) 1 μ M tramadol ismételt alkalmazása során a kialakult tranziensek amplitúdója egyre kisebb lett.

A tramadol a TRPV1-t aktiválva növeli meg a $[Ca^{2+}]_i$ -t

A következő kísérletek arra irányultak, hogy megtudjuk, hogy a tramadol valóban receptorspecifikus módon fejt-e ki az $[Ca^{2+}]_i$ növelő hatását. Ezért azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 antagonistá kapszazepin hatással van-e a tramadol által kiváltott tranziensekre. Jelen kísérletben – a fent említett tachifilaxis jelensége miatt – a következő protokoll szerint jártunk el. Az indukált TRPV1-CHO sejtekhez egymás után háromszor adtunk 1 μ M tramadolt (10 s), ugyanakkor ezesetben 600 s-os időközönként. Erre a viszonylag hosszú időintervallumra azért volt szükség, mert ez pontosan megfelel egy tranziens kiváltása után szükséges mosás (300 s) (7. A ábra) és az általunk tervezett kapszazepin előkezelés (300 s) együttes idejének. Eredményeink statisztikai elemzését követően meghatároztuk az erre a kísérletes körülményre

jellemző tramadol-indukálta tachifilaxis mértékét. Azt találtuk, hogy a második tranziens maximális amplitúdója az első (kontroll) $76,6 \pm 7,8$ %-ra csökkent ($p = 0,001$), míg a harmadik tranziens amplitúdója a második $78,2 \pm 8,4$ %-a ($p = 0,000002$) volt (minden érték átlag $\pm$ SEM, $n = 10$) (**7. B ábra**). Ezt követően megismételtük a kísérletet a fenti protokoll szerint úgy, hogy a harmadik 10 s-os tramadol alkalmazását egy 300 s-os kapszazepin ($5 \mu\text{M}$) kezelés előzte meg. A kapszazepin kompetitív gátlószere, valamennyi esetben szinte teljes mértékben kivédte a tramadol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot növelő hatását (**7. B ábra**). A kapszazepin mellett adott tramadol esetén létrejött tranziens amplitúdója csupán a $12,7 \pm 2,8$ %-a (átlag $\pm$ SEM, $n = 10$) ($p = 0,00008$) volt annak, amelyet a TRPV1 antagonistája jelenléte nélkül mértünk (**7. B ábra**). Megállapítottuk azt is, hogy a kapszazepin gátló hatása a tramadol által kiváltott tranziensek esetében is reverzibilis, hiszen 600 s-os mosást követően alkalmazott $1 \mu\text{M}$ tramadol (negyedik tranziens) ismét képes volt – a kapszazepin jelenlétében mérthez képest – szignifikánsan megnövelni az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot ($p = 0,00003$) (**7. B ábra**).

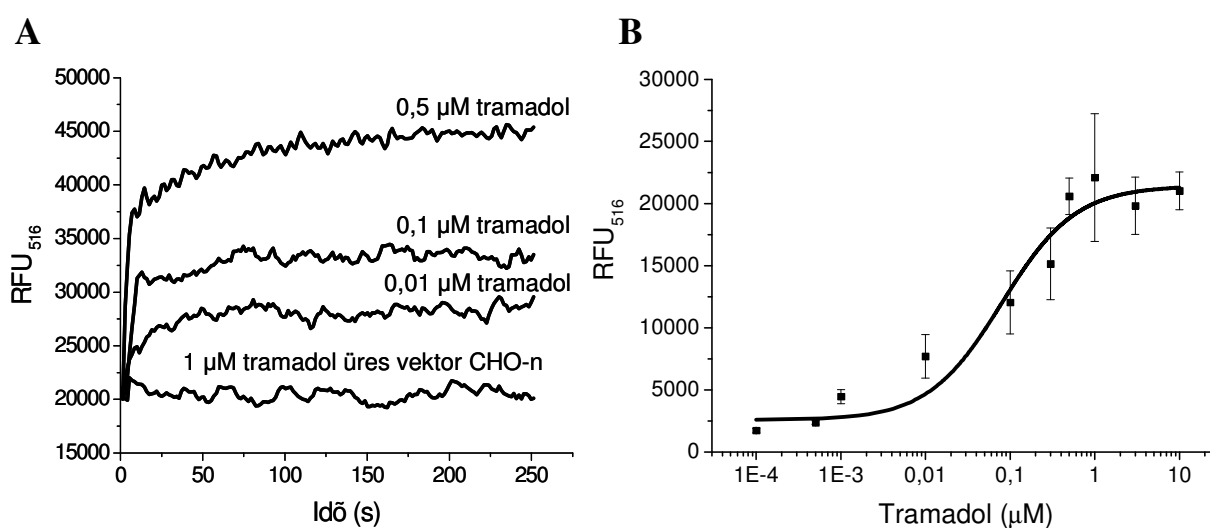


7. ábra A TRPV1 antagonistája kapszazepin hatása a tramadol által indukált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedésére TRPV1-CHO sejteken

Az üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket $2 \mu\text{M}$ fura 2-AM-rel feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást, majd annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). (**A**, **B**) $5 \mu\text{M}$ kapszazepin (CPZ) szignifikánsan, de reverzibilis módon függesztette fel a tramadol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelő hatását.

A tramadol hatása koncentrációfüggő

A továbbiakban a tramadol dózis-hatás görbét kívántuk meghatározni. Mivel az előzőekben bemutatott tachifilaxis jelensége miatt az egyedi sejten történő $[Ca^{2+}]_i$ meghatározás alkalmatlannak tűnt a különböző tramadol koncentrációk hatásának vizsgálatához, az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokat fluoreszcens mikroplate reader (FLIPR) segítségével mértük. Azt találtuk, hogy míg a tramadol (hasonlóan az egyedi sejten mért eredményeinkhez) a kontroll (üres vektort expresszáló) CHO sejteken nem befolyásolta, addig a TRPV1-CHO sejteken koncentráció függő módon megnövelte az $[Ca^{2+}]_i$ -t (**8. A, B ábra**). Eredményeink matematikai analízisét követően az EC_{50} érték tramadol esetében $0,08 \pm 0,03 \mu M$ (átlag $\pm$ SEM, $n = 4$), a kapszaicinnál pedig $0,04 \pm 0,01 \mu M$ volt (átlag $\pm$ SEM, $n = 5$).



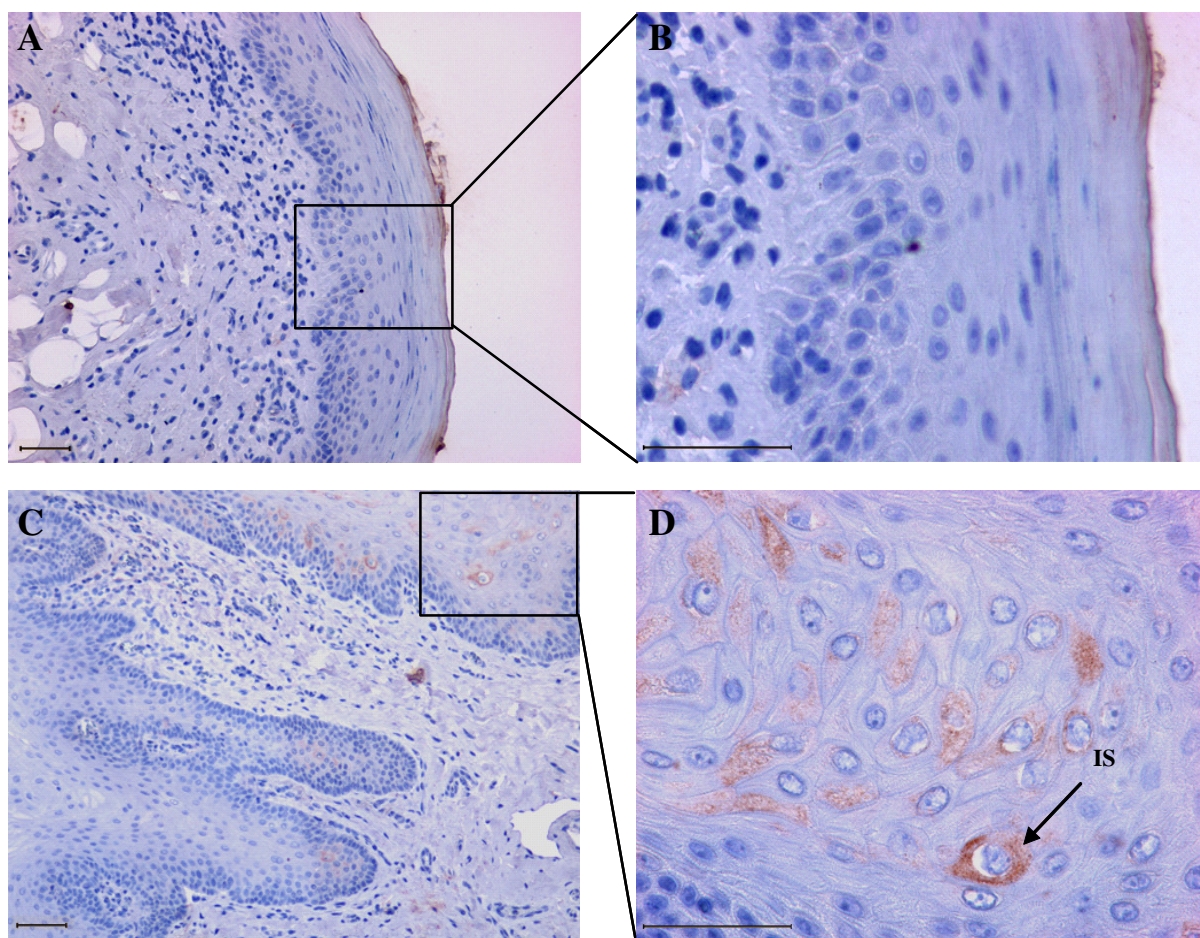
8. ábra A tramadol koncentráció függő módon növeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t TRPV1-CHO sejteken

A tramadol dózis-hatás görbéjének kiméréséhez FLIPR technikát alkalmaztunk. A sejteket az „Anyagok és módszerek”-ben leírtak szerint 40000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edénybe. **(A)** A mérés napján $2 \mu M$ Fluo-4 -AM-rel feltöltött sejteken FlexStation II³⁸⁴ fluoreszcens mikroplate reader segítségével mértük a különböző koncentrációjú tramadol hatására bekövetkező $[Ca^{2+}]_i$ változásokat, 494 nm excitációs és 516 nm emissziós hullámhossz mellett. **(B)** A pontok négy független mérés átlagát mutatják; átlag $\pm$ SEM. A Hill egyenlet segítségével illesztett dózis-hatás görbe kinetikai paraméterei pedig a következők: $B_{max} = 18860 \pm 1554$, $EC_{50} = 0.08 \pm 0.03 \mu M$.

II. A TRPV1 kifejeződése szájüregi kórképekben

A TRPV1 kifejeződik egészséges humán nyelv hámszövetében

Az egészséges (kontroll) humán nyelv hámjában, immunhisztokémiai eljárással, igen enyhe TRPV1-specifikus immunreaktivitást (ir) tapasztaltunk. A nyelv ventrális felszínét borító hámban fellelhető minimális TRPV1-ir pusztán a stratum (str.) superficiale legfelszínebb rétegére lokalizálódott (**9. A, B ábra**).



9. ábra A TRPV1 immunlokalizálója egészséges (kontroll) humán nyelv hámjában

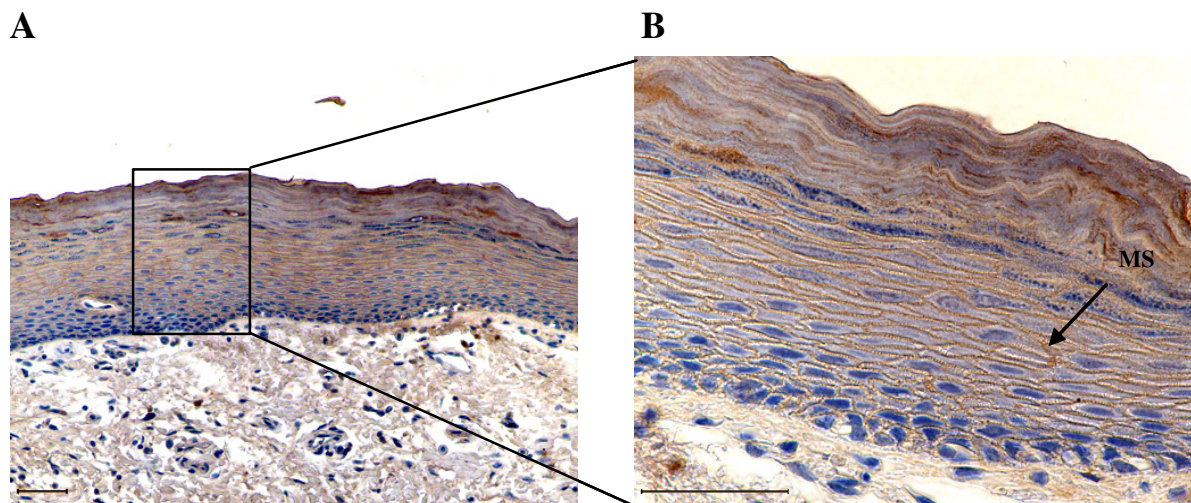
TRPV1-specifikus immunreaktivitás egészséges humán nyelv ventrális(**A, B**) és dorzális (**C, D**) hámjában. A kromogén DAB (barna festődés), a sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük. A képen feltüntetett lépték hossza 50 μ m. IS: intracelluláris festődés.

Ugyanakkor a nyelv dorzális oldalát fedő specializált hámban a str. spinosum bazálisan elhelyezkedő sejteiben találtunk intracelluláris és jellegzetes granuláris képet mutató TRPV1-ir-t (**9. C, D ábra**). Ezzel ellentétben sem a lamina propria-ban, sem a

szubmukózában nem láttunk immunreakciót. Az ábrán megfigyelhető immunpozitivitás specifikus reakciónak bizonyult, hiszen az elsődleges antitest elhagyásával készült kontroll vizsgálatok alkalmával sohasem jelent meg (lásd **11.ábra**).

A TRPV1 kifejeződése fokozódik a nyelv premalignus és malignus elváltozásaiban

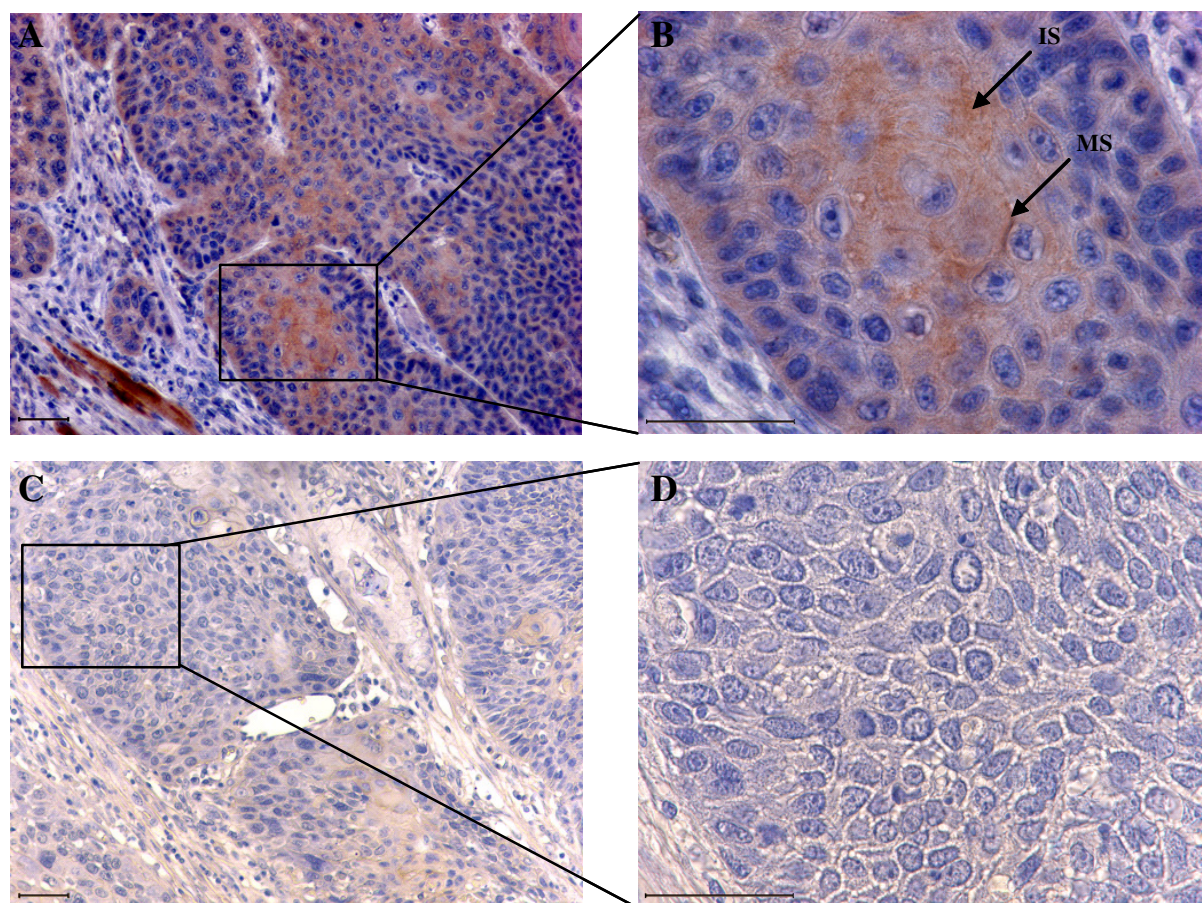
Meglepetésünkre a premalignus elváltozások közé sorolt leukoplakiából származó hám az egészségeshez képest igen intenzív és jellegzetes TRPV1 pozitivitást mutatott (**10. A, B ábra**). Valamennyi, a str. basaleban és a str. spinosumban található sejten egyértelmű membránfestődést figyeltünk meg. Ez az immunpozitivitás megtalálható volt a str. superficiale különböző mértékben degenerált sejtjeinek membránjában, illetve nyomokban fellelhető volt a hiperortokeratotikus felszínen is. Az elsődleges antitest elhagyásával készült metszeteken hasonló immunreakció egyetlen esetben sem volt megfigyelhető (lásd **11.ábra**).



10. ábra A TRPV1 immunlokalizálója nyelv leukoplakiás elváltozásából származó hámban (A, B) TRPV1 specifikus immunreaktivitás leukoplakiás humán nyelv hámjában. A kromogén DAB (barna festődés), a sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük. A képen feltüntetett lépték hossza 50 μ m. MS: membrán festődés.

Ezt követően nyelv laphámkarcinómából származó mintákon vizsgáltuk a TRPV1 expresszióját. A szubmukózát infiltráló tumoros epiteliális sejteken az egészséges kontrollnál tapasztaltakhoz képest drámai módon megnőtt a TRPV1-specifikus immunpozitivitás

intenzitása (**11. A, B ábra**). A gyenge membránlokalizáció mellett főként intracellulárisnak imponáló festődés – hasonlóan a kontroll hám str. spinosumában látottakhoz – szintén granulált, szemcsés képet mutatott. Az elsődleges antitest elhagyásával készült negatív kontrollon semmilyen immunreakció nem volt megfigyelhető (**11. C, D ábra**).

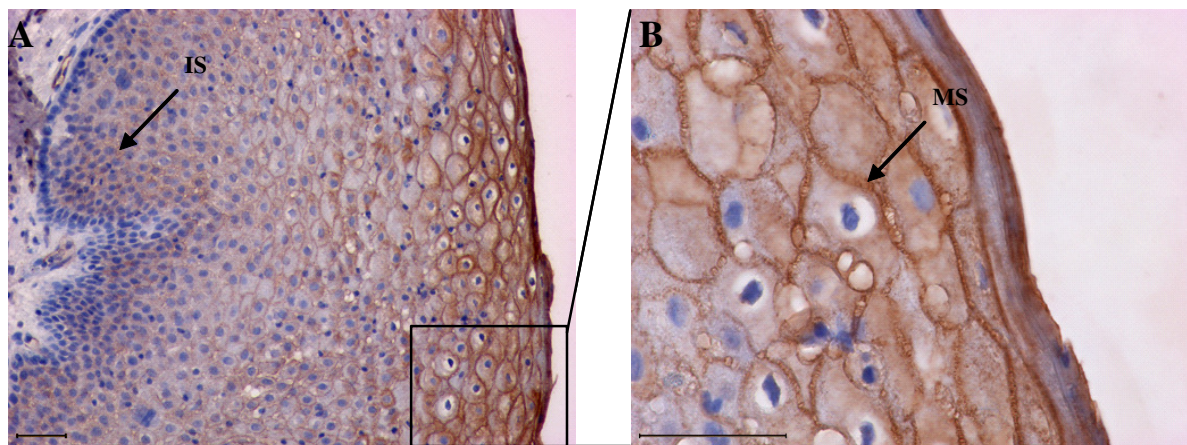


11. ábra A TRPV1 immunlokalizálója nyelv laphámkarcinómában

(**A, B**) TRPV1 specifikus immunreaktivitás humán nyelv laphámkarcinómán, a szubmukózát infiltrált tumorfészkeken. A kromogén DAB (barna festődés), a sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük. (**C, D**) Az elsődleges antitest elhagyásával készült negatív kontroll a tumorfészkekről készült metszeten. A sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük. A képen feltüntetett lépték hossza 50 μ m. IS: intracelluláris festődés, MS: membrán festődés.

Érdekes megfigyelésre jutottunk, amikor megvizsgáltuk a tumorinváziót határoló felszíni hámot. Azt találtuk, hogy a környező, kissé kiszélesedő, de szerkezetében még az egészséges hám jegyeit viselő epitéliumon eddig nem látott mértékben nőtt meg a TRPV1 szintje a hám teljes vastagságában (**12. A, B ábra**). A str. basale és a str. spinosum bazálisabban elhelyezkedő sejtei a fent leírtaknak megfelelően szemcsés intracelluláris festődést mutattak. Az apikálisabban fekvő sejteken az immunpozitivitás ugyanakkor

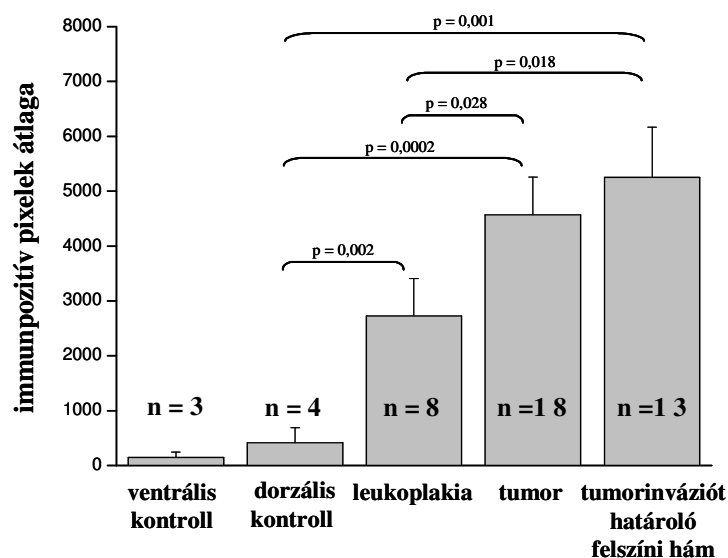
egyértelműen megjelent a sejtmembránban, melynek intenzitása a felszín felé haladva fokozódott és maximumát a str. superficiale-ban érte el.



12. ábra A TRPV1 immunlokalizálása nyelv laphámkarcinómában

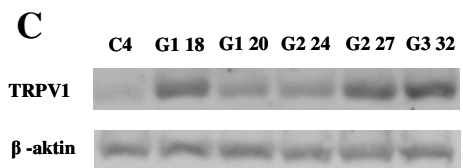
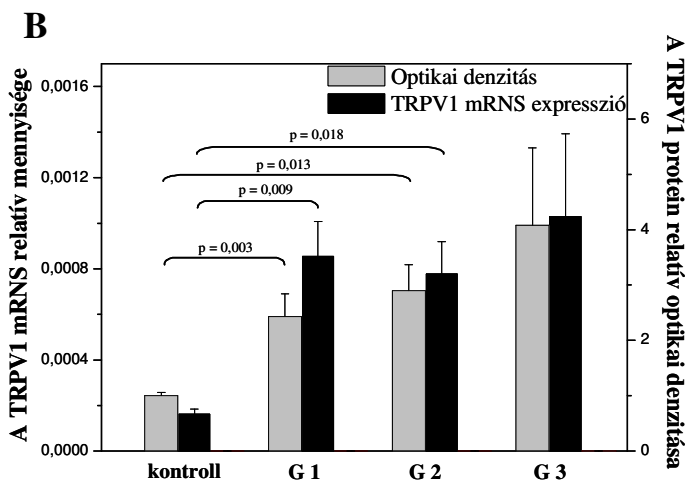
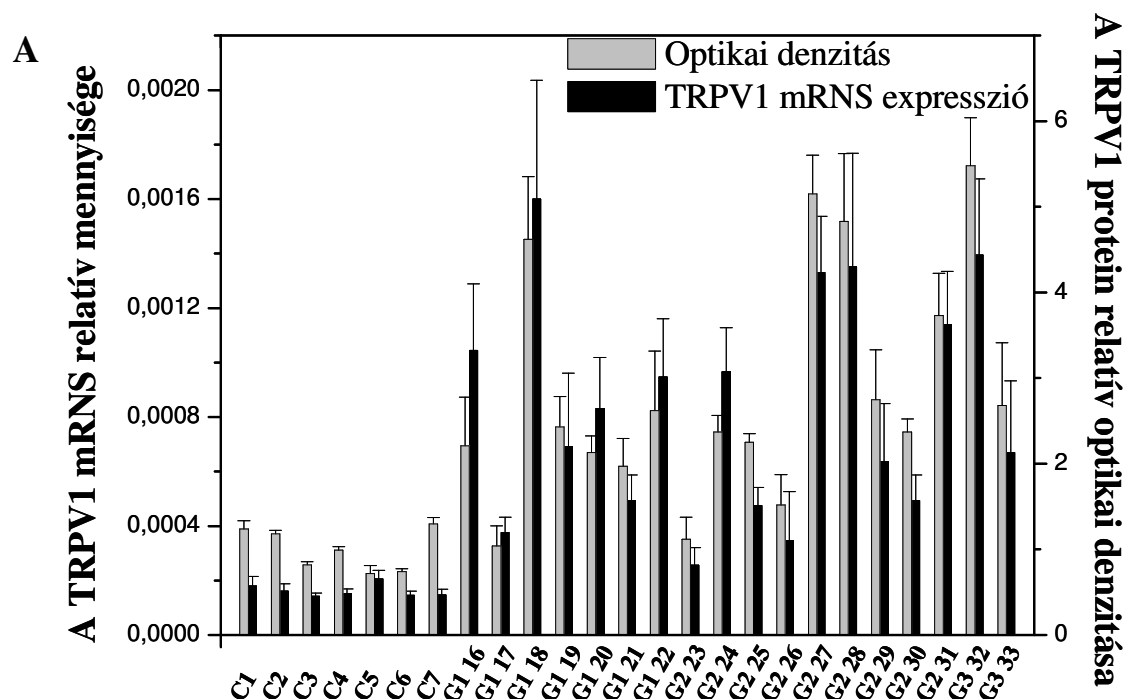
(A, B) TRPV1 specifikus immunreaktivitás humán nyelv laphámkarcinómán a tumorinváziót határoló felszíni hámon. A kromogén DAB (barna festődés), a sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük. A képen feltüntetett lépték hossza 50 µm. IS: intracelluláris festődés, MS: membrán festődés.

Image analízis szoftver segítségével (szemi-)kvantifikálva a képeket a dorzális kontrollhoz képest (mivel a kontroll minták közül itt tapasztaltunk jelentősebb TRPV1-ir-t, ezt választottuk az összehasonlítás alapjául) szignifikáns különbséget találtunk a leukoplákia ($p = 0,002$), a tumorfészek ($p = 0,0002$) és a tumor környezetében található felszíni hám ($p = 0,001$) esetében. Emellett ugyancsak szignifikáns volt a különbség a prekancerózus leukoplákia és a tumoros minták ($p = 0,028$), valamint a tumor környezetében található felszíni hám között ($p = 0,018$) (13. ábra).



13. ábra A TRPV1 immunpozitivitás normál, leukoplákiás és tumoros nyelv epitéliumában

Számos metszetről (n) készített felvételt analízáltunk az „Anyagok és módszerek”-ben leírtak szerint az Image Pro Plus 4.5 képanalizáló szoftver segítségével. A TRPV1 immunreaktivitás intenzitását 10 véletlenszerűen elhelyezett egyenlő nagyságú területben mértük, és mintánként meghatároztuk az immunpozitív pixelek átlagát (átlag $\pm$ SEM). A p értékek meghatározását független mintás t-próbával végeztük.



14. ábra A TRPV1 különböző mértékben expresszálódik normál, leukoplakiás és tumoros nyelv epitéliumában

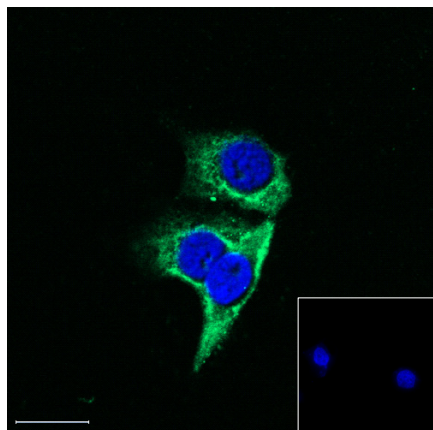
(A) Az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint gyűjtött és feldolgozott egészséges (kontroll) és különböző grádusú (G1-G3) laphámkarcinómás humán nyelvből

származó mintákon Western blot és Q-PCR technikák segítségével meghatároztuk a TRPV1 kifejeződésének mértékét. A Western blot kísérletben a mintákat triplikálva vittük fel, a denzitometriás analízis során ezek átlagát normáltuk ugyanazon minta β -aktin szintjére. A panel az optikai denzitás átlag $\pm$ SEM értékeket mutatja a kontroll minták (C1-C7) átlagához képest, amit 1-nek definiáltunk. A Q-PCR mérésekben a TRPV1 mRNS transzkript mennyiségét ugyanazon minta gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mennyiségére normáltuk. A mintákat triplikálva vittük fel és minden kísérletet háromszor ismételtünk. A panelen átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettünk fel. (B) Az A panelen szereplő Western blot és Q-PCR adatok statisztikai analízisének eredménye. A p értékek meghatározását független mintás t -próbával végeztük. (C) Reprezentatív Western blot adatok kontroll (4. minta; C4), laphámkarcinómából származó 1. grádusú (G1 18, G1 20 minta), 2. gádusú (G2 24, G2 27) és 3. grádus (G3 32) mintákon. Az egyenlő mennyiségek felvitelét a β -aktin expresszió feltüntetésével demonstráljuk.

Bár a nyelv laphámkarinómából származó mintákon az immunhisztokémiai eredményeink a TRPV1 kifejeződésének jelentős növekedésére utaltak – tekintettel e technika szemi-kvantitatív tulajdonságára – az expresszió-fokozódás mértékének pontos meghatározására Western blot és Q-PCR technikákat is alkalmaztunk. Amint a **14. ábrán** látható, a TRPV1-specifikus mRNS transzkript és protein szintje, habár jelentős fluktuációt mutatott az egyes minták szintjén, az összes tumoros mintában magasabb volt, mint a kontroll hámszövetekben (**14. A ábra**). Az összes laphámkarinómából származó minta statisztikai analízise azt mutatta, hogy a TRPV1 protein és specifikus mRNS transzkript mennyisége a kontrollhoz képest szignifikánsan megemelkedett a G1 ($p = 0,003$, $p = 0,009$) és a G2 ($p = 0,013$, $p = 0,018$) grádusú tumorokban (**14. B, C ábra**). Annak ellenére, hogy legalább ilyen mértékű különbség figyelhető meg a kontroll mintákban és a G3 grádusú tumorokban mért értékek között, a nagy malignitású csoport alacsony mintaszámára ($n = 2$) való tekintettel, a szignifikanciát statisztikailag itt nem tudtuk alátámasztani (**14. B ábra**). Fontos volt ugyanakkor azon megfigyelésünk, hogy sem protein, sem mRNS szinten nem találtunk szignifikáns különbséget akkor, amikor a TRPV1 expressziójának mértékét hasonlítottuk össze a különböző grádusú csoportok között (**14. B ábra**).

A TRPV1 kifejeződése konfluenciafüggő módon nő humán nyelv laphámkarinómájából származó CAL27 sejtvonalon

Azért, hogy a TRPV1 receptort az egyes sejtek szintjén tudjuk vizsgálni, humán nyelv laphámkarinómájából származó CAL27 sejtvonalon folytattuk kísérleteinket. Először immuncitokémiai eljárással mutattuk ki a TRPV1 protein jelenlétét ezeken a sejteken. A konfokális mikroszkóppal készült felvételen jól megfigyelhető az intracellulárisan és a sejtmembránban egyaránt megjelenő igen intenzív immunpozitivitás (**15. ábra**).

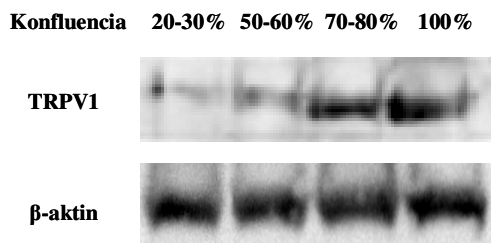


15. ábra TRPV1 immunpozitivitás CAL27 sejteken

TRPV1 immunreaktivitás (zöld fluoreszcencia) CAL27 sejteken, konfokális mikroszkópiával. A sejtmagok 4,6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festve (kék fluoreszcencia). A kis képen (jobb alul) az elsődleges antitest elhagyásával készült negatív kontroll festés eredménye látható. A kép bal alsó sarkában feltüntetett lépték 10 μ m.

A TRPV1 mRNS transzkriptek kvantitatív detektálása ebben az esetben is Q-PCR technikával történt, míg a protein expressziót Western blottal határoztuk meg. Különböző konfluenciájú mintákban vizsgálva a TRPV1 relatív mRNS és protein szintjét (kvantitatív denzitometriás analízist követően) azt tapasztaltuk, hogy a TRPV1 kifejeződése a sejtek növekedési ütemének, azaz a tenyészet konfluenciájának mértékében mind mRNS, mind protein szinten jelentősen fokozódott (16. A, B ábra).

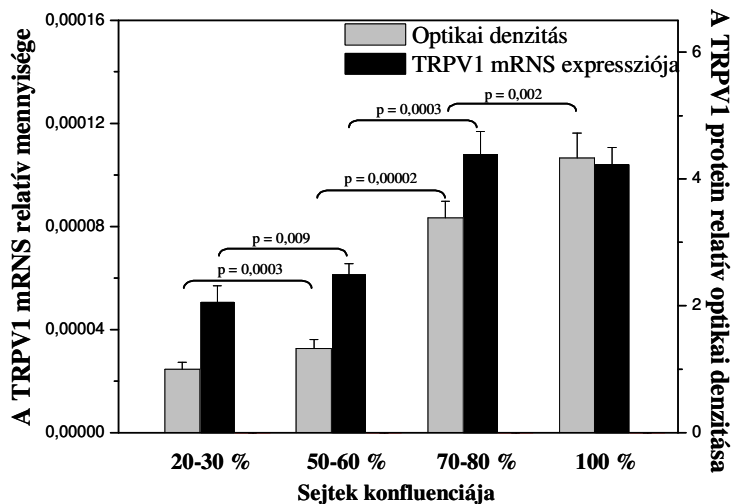
A



16. ábra A TRPV1 protein és mRNS szinten is kifejeződik humán nyelv laphámkarcinómából származó CAL 27 sejteken, az expresszió mértéke a sejtek proliferációjával arányosan fokozódik

(A) TRPV1 protein kifejeződése különböző konfluenciájú CAL27 sejtliátumon Western blottal. Az egyenlő mennyiségek felvitelét a β -aktin expresszió feltüntetésével demonstráljuk. (B) A különböző konfluenciájú CAL27 sejtenyészeten végzett Western blot és Q-PCR vizsgálatok eredményeinek statisztikai analízise. A Western blot kísérletben a mintákat triplikálva vittük fel, a denzitometriás analízis során ezek átlagát normáltuk ugyanazon minta β -aktin szintjére. A „20-30% konfluenciájú” minta optikai denzitásának értékét definiáltuk 1-nek. A Q-PCR mérésekben a TRPV1 mRNS transzkript mennyiségét ugyanazon minta gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mennyiségére normáltuk. A mintákat triplikálva vittük fel és minden kísérletet háromszor ismételtünk. A panelen átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettünk fel. A p értékek meghatározását független mintás t-próbával végeztük.

B



MEGBESZÉLÉS

A tramadol és a TRPV1

Az irodalmi adatok mellett a DE OEC Szájsebészeti Osztályán töltött gyakorlatom tapasztalatai is azt mutatják, hogy az állcsonttörések műtéti ellátása és a szájüregi daganatok gyakran radikális nyaki disszekcióval összekötött sebészi eltávolítása után, a posztoperatív szakban alkalmazott tramadol igen hatékonyan csillapítja még az ilyen nagy műtéti beavakozással járó fájdalmakat is. Ez a különösen eredményes fájdalomcsillapító képesség (a μ -opioid receptor aktiválása mellett) számos más, idegsejten lévő feszültség- és ligand-vezérelt ioncsatorna egyidejű gátlásával is magyarázható.

Kísérleteink első részében azt vizsgáltuk, hogy a klinikai gyakorlatban posztoperatív és krónikus fájdalmak csillapítására széles körben alkalmazott tramadol befolyásolja-e a fájdalom központi integrátor molekulájaként ismert TRPV1 működését. Legnagyobb meglepetésünkre (az előzetesen felállított hipotézisünkkel teljesen ellentétes módon) a TRPV1 heterológ expressziós rendszerben a (fájdalomcsillapító) tramadol, a kapszaicinhez hasonlóan, koncentráció függő módon megnövelte a TRPV1-CHO sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ját (míg a receptort nem expresszáló (üres vektor) CHO sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ban semmilyen változást sem okozott). Megfigyeltük azt is, hogy a TRPV1 antagonistá kapszazepin határozottan, de reverzibilis módon gátolta a tramadol által indukált $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokat. Mindezen eredményeink egyértelműen arra utaltak, hogy a tramadol képes a TRPV1 specifikus aktiválására.

Érdekes megfigyelésünk volt az is, hogy míg a kapszaicin ismételt alkalmazása nem eredményezett szignifikáns változást a $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek amplitúdójában és kinetikai paramétereiben, addig a tramadol jelentős tachifilaxist okozott. Korábbi vizsgálatok ugyanebben az expressziós rendszerben már kimutatták, hogy a különböző vanilloid

vegyületek – eltérő kémiai adottságaik (pl. lipofilicitás) és a TRPV1-hez való különböző affinitásuk miatt – más-más tulajdonsággal jellemezhető $[Ca^{2+}]_i$ tranzienseket eredményeztek (eltérések voltak megfigyelhetők a maximális válasz, a hatásereőség, a válasz latenciájának mértékében és a tachifilaxis jelenségében is) (Tóth és mtsai, 2005). Éppen ezért azt feltételezzük, hogy a kapszaicin és a tramadol tachifilaxis kiváltására gyakorolt különböző hatása mögött elsősorban a két anyag szerkezeti különbözősége állhat (**1. és 3. ábra**).

A klinikai gyakorlatban általában 50 mg egyszeri dózisban alkalmazott tramadol plazma szintje 0,1 – 0,3 $\mu\text{g/ml}$ -t ér el (intramuszkuláris vagy intravénás alkalmazás módjától függően), ami kb. 0,33 – 1 μM koncentrációnak felel meg. Ez az érték jól korrelál a kísérletes körülményeink során $0,08 \pm 0,03 \mu\text{M}$ -nak mért EC_{50} értékkel, ami eredményeink *in vivo* alkalmazhatóságának lehetőségét sugallja (lásd lentebb).

Mindezen információk tükrében kísérletes eredményeink azt a kérdést vetik fel, hogy a tramadol nem várt „fájdalom-receptor”-t (TRPV1) aktiváló hatása hogyan illeszthető be a tramadol fájdalomcsillapító hatásairól eddig alkotott képbe? Az egyik kézenfekvő magyarázat az lehetne, hogy a tramadol által kiváltott TRPV1 aktivációt azonnal követi a szenzoros afferensek deszenzitizációja. Ezen, a nociceptív neuronokon vanilloid vegyületek estén már jól ismert jelenség (Caterina és mtsai, 1997; Szállási és Blumberg, 1999; Holzer, 1991) felfüggeszti az akciós potenciálok tüzelését és így a fájdalomérzés megszűnéséhez vezet. Ezt a feltételezést erősíti az a tény is, hogy az általunk használt expressziós rendszerben a tramadol a kapszaicinhez képest igen jelentős tachifilaxist mutatott.

Ugyanakkor az is bizonyított, hogy a TRPV1 aktivációja során a szenzoros neuronok végkészülékeiből számos neuropeptid (pl. P-anyag, calcitonin gén-kapcsolt peptid) szabadul fel (Szállási és Blumberg, 1999; Holzer, 1988; Okajima és Harada, 2006), amelyek a környező szövetekre, sejtekre (pl. hízósejtek, keratinociták, érfalak simaizomsejtei és endotéliuma) hatva olyan lokális regulatórikus folyamatokat indukálnak, mint pl. a

vazodilatáció, immunmoduláció, citokinek felszabadulása, stb. (Szállási és Blumberg, 1999; Di Marzo és mtsai, 2002; Szolcsányi, 2004). Éppen ezért elképzelhető, hogy a tramadol, lokális alkalmazás esetén, a TRPV1-t expresszáló afferens neuronokat aktiválva kiváltja azok „efferens” válaszát, ami a végkészülékekből kiáramló neuropeptidok révén a fent vázolt lokális hatást eredményezi.

Ezen utóbbi feltételezésünk számos olyan, a tramadol klinikai alkalmazása során megfigyelt és közölt jelenséget magyarázna meg, amelyeknek okát ezidáig nem ismertük. Több publikáció jelent meg ugyanis arról, hogy a tramadol, intradermális alkalmazás esetén, a lidokainéhoz hasonló „helyi érzéstelenítő-szerű” hatás mellett olyan lokális reakciókat váltott ki, mint a bőrpír, duzzanat, viszketés (Pang és mtsai, 1998; Acalovschi és mtsai, 2001; Altunkaya és mtsai, 2003;), sőt néhány esetben még égő-csípő érzést és fájdalmat is (Aalovschi és mtsai, 2001; Altunkaya és mtsai, 2003). Egy munkacsoport az intravénásan adott tramadol lokális hatását úgy vizsgálta, hogy rövid ideig tartó (1 perc) vénás pangást hoztak létre az alkarban. Kimutatták, hogy a tramadol a kísérletben részt vevők 31 %-nál a lekötéstől disztálisan, a vénák mentén bőrpírt és égő, fájó érzést okozott (Pang és mtsai, 1999). Ezek az *in vivo* megfigyelések szintén alátámasztják a tramadol TRPV1-t aktiváló hatásának valószínűségét, valamint azt, hogy a TRPV1 által beindított neuropepid-felszabadulás lokális folyamatokat (és nem várt mellékhatásokat) eredményezhet.

Eredményeinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy – összhangban a korábbi *in vivo* és *in vitro* adatokkal – a tramadol az irodalomban leírt különböző ioncsatornákon kifejtett változatos hatása mellett a TRPV1 „klasszikus” agonistájaként (is) viselkedik. Kezdetben ugyanis (feltehetően kalciumbeáramlás révén) aktiválja a szenzoros neuronokat (*in vivo*: átmeneti égő, fájó érzés), majd neuropeptidok felszabadulását okozza (*in vivo*: bőrpír, duzzanat, viszketés), végül a neuronok deszenzitizációját (tachifilaxis) váltja ki (*in vivo*:

analgetikus hatás). Ez a „háromlépcsős” válasz így egyidejűleg ad magyarázatot a tramadol fájdalomcsillapító képességére, valamint a meglepő (és kellemetlen) lokális mellékhatásokra.

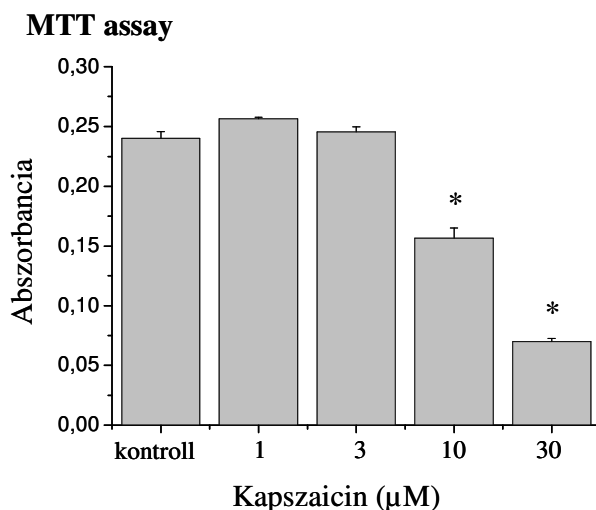
TRPV1 lehetséges szerepe humán nyelv laphámkarcinómában

Évtizedeken át vita tárgyát képezte az irodalomban, hogy a csípős paprika fogyasztása jótékony módon befolyásolja-e a gyomor-bélrendszer működését, avagy károsítja annak nyálkahártyáját. A korábbi hiedelmekkel szemben ma már bizonyítottan leírták a kapszaicin protektív hatását még olyan viszonylag szélsőséges esetben is, mint amilyen pl. a gyomorfekély (Kang JY és mtsai, 1996; Abdel-Salam és mtsai, 1997; Szolcsányi és Barthó, 2001). A „kapszaicin receptor” TRPV1 jelenlétét kimutatták emellett a humán gyomor antrumának egyes epitéliális elemein (Kechagias és mtsai, 2005), a parietális sejteken (Faussone-Pellegrini és mtsai, 2005) és a bélrendszer más epitéliális sejtjein is (Ward és mtsai, 2003; Geppetti és Trevisani, 2004; Dömötör és mtsai, 2005). Egyre többen vizsgálják továbbá különböző gasztrointesztinális daganatokból származó sejtvonalakon [nyelőcső epidermoid karcinómából létrehozott CE 81T/VGH sejteken (Wu és mtsai, 2006), vastagbél daganatból származó HT-29 sejteken (Kim és mtsai, 2004), gyomor adeno-karcinómából származó sejtvonalon (Lo és mtsai, 2005)] a kapszaicin tumorellenes hatását. Ugyanakkor mindezidáig senki sem elemezte a TRPV1 kifejeződését a csípőspaprika fogyasztás elsődleges „célpontján”, az emberi nyelv epitéliumán.

Immunhisztokémiai, Western blot és Q-PCR vizsgálataink egybehangzóan alátámasztották, hogy az egészséges nyelv epitéliumára jellemző viszonylag alacsony TRPV1 expresszió mértéke (amely elsősorban a nyelv epitéliumának bazális rétegeire lokalizálódott) nyelv laphámkarcinómában minden esetben, a tumor grádusától függetlenül jelentősen megemelkedett. Mindezen eredményeink azt a feltételezést vetítették elő, hogy a TRPV1 – hasonlóan más epitéliális sejtekhez, mint amilyenek az emberi bőr keratinocitái (Denda és

mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2004 és 2005), bronchiális epitélium (Veronesi és mtsai, 1999), illetve az uroepitélium (Birder és mtsai, 2001; Lazzeri és mtsai, 2004) – befolyásolhatja a nyelv epitéliumának proliferációs és differenciálódási folyamatait.

Tovább erősítheti ezen elképzelésünket az is, hogy humán nyelv laphámkarcinómából származó CAL27 sejtvonalon szintén kimutattuk a sejtek konfluenciájának növekedésével párhuzamosan fokozódó TRPV1 expressziót. Az értekezés alapjául szolgáló közlemény megírása óta folytatott (és jelenleg is zajló) kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a TRPV1 agonista kapszaicin valóban befolyásolja a CAL27 sejtek növekedését. MTT alapú kolorimetriás proliferációs assay segítségével megállapítottuk, hogy a kapszaicin dóziszfüggő módon csökkentette a sejtek proliferációját, illetve életképességét (**17. ábra**). Mivel az MTT assay az élő sejtek számának a mitokondriális dehidrogenáz aktivitásától függő meghatározásán alapul, feltételezhető, hogy a TRPV1 aktivációja a sejtek halálához vezetett.



17. ábra A kapszaicin csökkenti a CAL27 sejtek életképességét

A sejteket 5000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük 96-lyukú edénybe, majd két napon keresztül kezeltük a sejteket különböző koncentrációjú kapszaicinnal (1,3,10,30 µM). (A) Az élősejt-szám változásának meghatározásához MTT assay-t végeztünk. 10 és 30 µM kapszaicin szignifikánsan csökkentette az élő sejtek számát a kezeletlen kontrollhoz képest. Az ábrán átlag ± SEM értékeket tüntettünk fel; * $p < 0,05$, ahol p értékek meghatározását független mintás t-próbával végeztük.

Bár annak tisztázására, hogy hogyan befolyásolja a TRPV1 a sejtek növekedésének folyamatait további (*in vitro* és *in vivo*) vizsgálatok szükségesek, eredményeink – a

rendelkezésre álló irodalmi adatokkal együtt [Tanaka és mtsai patkányokon végzett kísérletben kapszaicin etetéssel sikeresen gátolták a nyelvtumorok kialakulását és csökkentették azok növekedési ütemét (Tanaka és mtsai, 2002)] – előrevetítik a TRPV1 receptor szerepét, mint a humán nyelv laphámkarcinómák szupportív kezelésének egyik lehetséges és ígéretes célmolekulája.

Erdményeinkből azonban az is kiolvasható, hogy a laphámkarcinómákban megemelkedett TRPV1 expresszió mértéke nem korrelál a tumorok malignitásának fokával. Úgy tűnik tehát, hogy ellentétben a prosztatata (Sanchez és mtsai, 2005; Czifra és mtsai, 2009) karcinómával és a gliómával (Amantini és mtsai, 2007), ahol határozott összefüggést írtak le a receptor kifejeződése és a tumor grádusa között, a nyelvtumor esetén a TRPV1 prognosztikai faktorként nem szerepel.

Ellenben, miután a TRPV1 expresszió már az alacsony malignitású tumorban, a tumorinváziót határoló, mikroszkópos szerkezetében még egészségesnek tűnő felszíni hámban és ami még fontosabb, a prekancerózus leukoplákiában is szignifikánsan megemelkedett, a TRPV1 a korai stádiumú nyelvtumor diagnosztikus molekulája lehet. Alátámasztja ezt az elképzelésünket azon előzetes eredményünk is, hogy a szájnyálkahártya egy másik – korábban prekancerózus léziónak, ma már inkább prekancerózus állapotnak tekintett – elváltozásában, az orális lichen planusban is fokozódik a TRPV1 expressziója (a kézirat előkészületben). Bár a leukoplákiával ellentétben a lichen malignizációra való hajlama az irodalomban jelenleg is vitatott, az eddig rendelkezésre álló adataink alapján azt gondoljuk, hogy a TRPV1 molekula kifejeződésének hirtelen növekedése a tumorgenezis egyik korai lépésének tekinthető, ezért a TRPV1 szintjének meghatározása ígéretes lehet a korai diagnózis felállításában.

Végezetül azt is megfigyeltük, hogy – hasonlóan más neuronális és nem-neuronális sejttípusokhoz, mint amilyenek a szenzoros neuronok (Eun és mtsai, 2001), hízósejtek

(Turner és mtsai, 2003), a bőr és bőrfüggelékek különböző sejtjei (Bodó és mtsai, 2004 és 2005), hepatoblasztómából származó sejtek (Vriens és mtsai, 2004; Waning és mtsai, 2007) – a TRPV1-ir nem korlátozódott csak a sejtek plazmamembránjára, hanem helyenként jellegzetes intracelluláris festődést is megfigyeltünk. Sőt azt is megállapítottuk, hogy az egészséges (kontroll), a prekancerózus és tumoros elváltozásokból származó mintákon a TRPV1 lokalizációját tekintve egészen eltérő festési mintázatot adott. A nyelv egészséges epitéliumában és a tumoros hám szubmukózájába betört tumorfészkek sejtjeiben főként intracelluláris TRPV1-ir dominál, míg leukoplákiában és laphámkarinómából származó minták tumort határoló, de szerkezetében még megtartott hámjának felszínes sejtrétegeiben egyértelműen a sejtmembrán festődött (9., 10., 11., 12. ábra). Bár annak tisztázására, hogy pontosan milyen szereppel bír az intracellulárisan elhelyezkedő TRPV1 a nyelvet borító laphámsejtek tumoros transzformációjának folyamataiban, még további vizsgálatok szükségesek, eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a TRPV1 tumorgenezisben betöltött szerepe aligha elhanyagolható. Irodalmi adatok ugyanis azt támasztják alá, hogy az intracellulárisan elhelyezkedő TRPV1 – feltételezhetően, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna – kulcsszereppel bír a sejtmorfológia, életképesség és sejtmigráció szabályozásában (Vriens és mtsai, 2004; Han és mtsai, 2007; Nilius és mtsai, 2007; Waning és mtsai, 2007).

Mindezen eredményeink alapján úgy tűnik tehát, hogy a TRPV1 egy új, ígéretes célmolekulája lehet a nyelv laphámkarinóma korai diagnózisának és szupportív kezelésének egyaránt.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) ioncsatorna jelentőségét vizsgáltuk a sztomatológiai gyakorlatban. Munkánk első részében a klinikumban jó hatékonysággal alkalmazott tramadol TRPV1 működésére kifejtett hatását elemeztük. Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott heterológ expressziós rendszerben (TRPV1-CHO sejtek) a tramadol – a kapszaicinhez hasonlóan – koncentrációfüggő módon megnövelte a sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jét, míg a receptort nem expresszáló (üres vektor) CHO sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jában semmilyen változást sem okozott. Kimutattuk azt is, hogy a tramadol, ellentétben a kapszaicin hatásával, jelentős tachifilaxist okozott. Bebizonyosodott emellett, hogy a TRPV1 antagonistá kapszazepin határozottan, de reverzibilis módon gátolta a tramadol által indukált $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokat. Mindezen eredményeink arra utalnak, hogy a fájdalomcsillapító tramadol képes a TRPV1 specifikus aktivációjára.

Munkánk második részében a TRPV1 kifejeződését vizsgáltuk egészséges, leukoplakiás és tumoros nyelv hámból származó mintákon. Kimutattuk, hogy a TRPV1 kifejeződik egészséges humán nyelv hámban. Megállapítottuk ugyanakkor azt is, hogy a receptor expressziójának mértéke szignifikánsan nőtt a nyelv prekancerózus elváltozásában és a különböző grádusú laphámkarinómákban. Bebizonyosodott továbbá, hogy a megemelkedett TRPV1 expresszió mértéke nem korrelált a tumorok malignitásának fokával. Humán nyelv laphámkarinómából származó CAL27 sejtvonalon kimutattuk, hogy a TRPV1 expressziója a sejtek konfluenciájának növekedésével párhuzamosan fokozódik. Mindezen adataink alapján feltételezhető, hogy a TRPV1 szerepet játszik a sejtek proliferációjának és túlélésének szabályozásában. Adataink emellett azt sugallják, hogy a TRPV1 egy új, ígéretes célmolekulája lehet a nyelv laphámkarinóma korai diagnózisának és szupportív kezelésének egyaránt.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Salam OM, Szolcsányi J, Mózsik G. Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data. *J Physiol Paris*. 1997; **91**:151-171
- Acalovschi I, Cristea T, Margarit S, Gavrus R. Tramadol added to lidocaine for intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg*. 2001; **92**:209-214
- Ács G, Bíró T, Acs P, Modarres S, Blumberg PM. Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. *J Neurosci*. 1997; **17**:5622-5628
- Altunkaya H, Ozer Y, Kargi E, Babuccu O. Comparison of local anaesthetic effects of tramadol with prilocaine for minor surgical procedures. *Br J Anaesth*. 2003; **90**:320-322
- Amantini C, Mosca M, Luccarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M, Santoni G. Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2004; **11**:1342-1356
- Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A, Giangaspero F, Santoni G. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem*. 2007; **102**:977-990
- Barkin RL. Extended-release Tramadol (ULTRAM ER): a pharmacotherapeutic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic focus on effectiveness and safety in patients with chronic/persistent pain. *Am J Ther*. 2008; **15**:157-166
- Berrocso E, Mico JA, Ugedo L. In vivo effect of tramadol on locus coeruleus neurons is mediated by alpha2-adrenoceptors and modulated by serotonin. *Neuropharmacology*. 2006; **51**:146-153
- Bevan SJ, Docherty RJ (1993): Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the study of pain*. Wood JN (ed), pp 27-44, Academic Press, London.
- Bevan SJ, Szolcsanyi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci*. 1990; **11**:330-333
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*. 2002; **35**:721-731
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci. USA* 2003; **100**:12480-12485
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2001; **98**:13396-13401

- Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Ács G, Ács P, Paus R, Blumberg PM. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*. 1998a; **91**:1332-1340
- Bíró T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Ács P, Blumberg PM. Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Mol Brain Res*. 1998b; **56**:89-98
- Bleakman D, Bronson JR, Miller RJ. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol*. 1990; **101**:423-431
- Boczán J, Boros S, Mechler F, Kovács L, Bíró T. Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol*. 2000; **99**:96-104
- Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. Vanilloid receptor-1 is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol*. 2004; **123**:410-413
- Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R. A “hot” new twist to hair biology: Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol*. 2005; **166**:985-998
- 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
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000; **288**:306-313
- Cavuto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovská A, Game P, Wittart GA. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; **364**:105-110
- Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer*. 1990; **66**:1288-1296
- Chitano P, Di Blasi P, Lucchini RE, Calabro F, Saetta M, Maestelli P, Fabbri LM, Mapp CE. The effects of toluene diisocyanate and of capsaicin on human bronchial smooth muscle in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1994; **270**:163-173
- Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S. The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1993; **55**:1015-1023
- Czifra G, Tóth IB, Marincsák R, Juhász I, Kovács I, Ács P, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T. Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta. *Cell Signal*. 2006; **18**:1461-1472

- Czifra G, Varga A, Nyeste K, Marincsák R, Tóth IB, Kovács I, Kovács L, Bíró T. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 (CB1) and vanilloid receptor-1 (TRPV1) in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; **135**:507-514
- Dayer P, Desmeules J, Collart L. Pharmacology of tramadol. *Drugs*. 1997; **53**:18-24
- Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; **135**:451-457
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; **12**:372-379
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga H. Immunoreactivity of TRPV1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; **285**:1250-1252
- Docherty RJ, Robertson B, Bevan S. Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult rat dorsal root ganglion neuron in culture. *Neuroscience*. 1991; **40**:513-521
- Döbrössy L. A szájüregi daganatok epidemiológiája: a probléma jelentősége. *Magy. Onk*. 2001; **45**:99-105
- Dömötör A, Peidl Z, Vincze A, Hunyady B, Szolcsanyi J, Kereskay L, Szekeres G, Mozsik G. Immunohistochemical distribution of vanilloid receptor, calcitonin-gene related peptide and substance P in gastrointestinal mucosa of patients with different gastrointestinal disorders. *Inflammopharmacology*. 2005; **13**:161-177
- Ellis JL, Sham JSK, Undem BJ. Tachikinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; **155**:751-755
- Eun SY, Jung SJ, Park YK, Kwak J, Kim SJ, Kim J. Effects of capsaicin on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; **285**:1114-1120
- 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
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem*. 2000; **275**:32552-32558
- Geppetti P, Trevisani M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol*. 2004; **141**:1313-1320
- Gibson TP. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of analgesia with a focus on tramadol HCl. *Am J Med*. 1996; **101**:47-53
- Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chauvel P, Lalanne CM, Courdi A. Two new human tumour cell lines derived from

- squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; **24**:1445-1455
- Griger Z, Páyer E, Kovács I, Tóth BI, Kovács L, Sipka S, Bíró T. Protein kinase C-beta and -delta isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med.* 2007; **85**:1031-1042
- 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
- Haeseler G, Foadi N, Ahrens J, Dengler R, Hecker H, Leuwer M. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltage-operated sodium channels. *Pain.* 2006; **126**:234-244
- Han P, McDonald HA, Bianchi BR, Kouhen RE, Vos MH, Jarvis MF, Faltynek CR, Moreland RB. Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochem Pharmacol.* 2007; **73**:1635-1645
- Hara K, Minami K, Sata T. The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg.* 2005; **100**:1400-1405
- Hartel M, di Mola FF, Selvaggi F, Mascetta G, Wente MN, Felix K, Giese NA, Hinz U, Di Sebastiano P, Buchler MW, Friess H. Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management. *Gut.* 2006; **55**:519-528
- He X, Schmidt FR, Schmittner H. Effects of capsaicin on articular afferents of the cat's knee joint. *Agents Actions.* 1988; **25**:222-224
- Hindle I, Nally F. Incidence of oral cancer. *Br Dent J.* 1991; **170**:432
- 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
- Holzer P. Capsaicin: Cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 1991; **43**:143-201
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; **97**:6155-6160
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **291**:124-129
- Jancsó N (1968): Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In *Pharmacology of pain* (Lin K, Armstrong D and Pardo ED eds) pp 33-55, Pergamon, Oxford, UK.

- Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 1977; **270**:741-743
- Jancsó G, Karcsú S, Király E, Szebeni A, Tóth L, Bácsy E, Joó F, Párducz A. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res*. 1984; **295**:211-216
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; **97**:8134-8139
- Kang JY, Teng CH, Chen FC. Effect of capsaicin and cimetidine on the healing of acetic acid induced gastric ulceration in the rat. *Gut*. 1996; **38**:832-836
- Kaufman MP, Iwamoto GA, Longhurst JC, Mitchell JH. Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with endings in skeletal muscle. *Circ Res*. 1982; **50**:133-139
- Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. 2001; **276**:28613-28619
- Kechagias S, Botella S, Petersson F, Borch K, Ericson AC. Expression of vanilloid receptor-1 in epithelial cells of human antral gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol*. 2005; **40**:775-782
- Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R. Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food*. 2004; **7**:267-273
- Kuzhikandathil EV, Wang H, Szabo T, Morozova N, Blumberg PM, Oxford GS. Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *J Neurosci*. 2001; **21**:8697-8706
- Kwak, J., Wang, M.H., Hwang, S.W., Kim, T.Y., Lee, S.Y., Oh, U. Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J. Neurosci*. 2000; **20**:8298-8304
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; **227**:680-685
- Lai J-P, Douglas SD, Ho W-Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol*. 1998; **86**:80-86
- Lang E, Novak A, Reeh PW, Handwerker HO. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J Neurophysiol*. 1990; **63**:887-901
- Lázár J, Szabó T, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T. Distinct feature of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol Life Sci*. 2003; **60**:2228-2240
- Lazar J, Braun DC, Tóth A, Wang Y, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Blumberg PM, Garfield SH, Wincovitch S, Choi HK, Lee J. Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1. *Mol Pharmacol*. 2006; **69**:1166-1173

- Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur Urol.* 2004; **46**:792-798
- Lazzeri M, Vannucchi MG, Spinelli M, Bizzoco E, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *Eur Urol.* 2005; **48**:691-698
- Liu L, Simon SA. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994; **91**:738-741
- Lo YC, Yang YC, Wu IC, Kuo FC, Liu CM, Wang HW, Kuo CH, Wu JY, Wu DC. Capsaicin-induced cell death in a human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol.* 2005; **11**:6254-6257
- Lundberg JM (1993): Capsaicin sensitive sensory nerves in the airways - implications for protective reflexes and disease. In Capsaicin in the study of pain, (Wood JN ed) pp 219-238, Academic press, San Diego, CA.
- Lynn B, Carpenter SE. Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain Res.* 1982; **238**:29-43
- Maggi CA, Santicioli P, Giuliani S, Furio M, Meli A. The capsaicin-sensitive innervation of the rat urinary bladder: further studies on mechanisms regulating micturition threshold. *J Urol.* 1986; **136**:696-700
- Marsh SJ, Stansfield CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience.* 1987; **23**: 275-289
- Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, Terracini B. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer.* 1989; **63**:2522-2527
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999; **57**:1-164
- Miyamoto R, Tokuda M, Sakuta T, Nagaoka S, Torii M. Expression and characterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures. *J Endod.* 2005; **31**:652-658
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell.* 2002; **9**:229-231
- Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000; **6**:75-84
- Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer.* 1995; **75**:147-153

- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; **52**:195-215
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol Rev.* 2007; **87**:165-217
- Ogata J, Minami K, Uezono Y, Okamoto T, Shiraishi M, Shigematsu A, Ueta Y. The inhibitory effects of tramadol on 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg.* 2004; **98**:1401-1406
- 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
- Okajima K, Harada N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. *Curr Med Chem.* 2006; **13**:2241-2251
- Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol.* 2002; **168**:293-297
- Pang WW, Mok MS, Chang DP, Huang MH. Local anesthetic effect of tramadol, metoclopramide, and lidocaine following intradermal injection. *Reg Anesth Pain Med.* 1998; **23**:580-583
- Pang WW, Huang PY, Chang DP, Huang MH. The peripheral analgesic effect of tramadol in reducing propofol injection pain: a comparison with lidocaine. *Reg Anesth Pain Med.* 1999; **24**:246-249
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Gönczi M, Csernoch L, Kovács L, Bíró T. Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2003; **12**:811-824
- Partsch G, Matucci-Cerinic M. Capsaicin stimulates the migration of human polymorphonuclear cells (PMN) in vitro. *Life Sci.* 1993; **53**:309-314
- Paus R., Schmelz M., Bíró T., and Steinhoff M. Scratching the brain for more effective “itch” therapy – Frontiers in pruritus research. *J Clin Invest.* 2006; **116**:1174-1186
- Petersen M, Pierau FK, Weyrich M. The influence of capsaicin on membrane currents in dorsal root ganglion neurones of guinea-pig and chicken. *Phlugers Arch.* 1987; **409**:403-410
- Premkumar LS. Interaction between vanilloid receptors and purinergic metabotropic receptors: pain perception and beyond. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2001; **98**:6537-6539
- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochem Biophys Acta.* 2007; **1772**:937-946
- Pyati S, Gan TJ. Perioperative pain management. *CNS Drugs.* 2007; **21**:185-211

- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; **260**:275-285
- Ramirez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ochoa-Carrillo FJ, Cuapio-Ortiz A, Frias-Mendivil M, Meneses-Garcia A, Sanchez-Mejorada G. Cancer of the mobile tongue in Mexico. A retrospective study of 170 patients. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995; **31**:37-40
- Sanchez MG, Sanchez AM, Collado B, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Carmena MJ, Prieto JC, Diaz-Laviada II. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol.* 2005; **515**:20-27
- Snider WD, MacMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron.* 1998; **20**:629-632
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; **30**:217-222
- Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch 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
- Szabolcs O, Kásler M. Rákmortalitás és – incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében *Magy Onk.* 2002; **46**:111-117
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999; **51**:159-212
- Szallasi A, Szabo T, Biro T, Modarres S, Blumberg PM, Krause JE, Cortright DN, Appendino G. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br J Pharmacol.* 1999; **128**:428-434
- Szolcsányi J és 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
- Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol Paris.* 1977; **73**:251-259
- Szolcsányi J (1993): Actions of capsaicin on sensory receptors, in *Capsaicin in the study of pain* (Wood JN ed) pp1-26, Academic Press, San Diego.
- Szolcsányi J, Barthó L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J Physiol Paris.* 2001; **95**:181-188
- Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides.* 2004; **38**:377-384

- Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S, Mori H. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2002; **23**:1361-1367
- 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
- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:6951-6956
- Tóth A, Wang Y, Kedei N, Tran R, Pearce LV, Kang SU, Jin MK, Choi HK, Lee J, Blumberg PM. Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci*. 2005; **76**:2921-2932
- Tsai TY, Tsai YC, Wu SN, Liu YC. Tramadol-induced blockade of delayed rectifier potassium current in NG108-15 neuronal cells. *Eur J Pain*. 2006; **10**:597-601
- Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R. Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J*. 2003; **371**:341-350
- Varga A, Czifra G, Tállai B, Németh T, Kovács I, Kovács L, Bíró T. Tumour grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *Eur Urol*. 2004; **46**:462-465
- Veronesi B, Oortgiesen M, Carter JD, Devlin RB. Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; **154**:106-115
- Vriens J, Janssens A, Prenen J, Nilius B, Wondergem R. TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium*. 2004; **36**:19-28
- Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B, Schwab A. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium*. 2007; **42**:17-25
- Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol*. 2003; **465**:121-135
- Winter J., Dray A., Wood J.N., Yeats J.C., Bevan, S. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res*. 1990; **520**:131-140
- Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci*. 1988; **8**:3208-3220
- Wu CC, Lin JP, Yang JS, Chou ST, Chen SC, Lin YT, Lin HL, Chung JG. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutat Res*. 2006; **601**:71-82

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó in extenso tudományos közlemények:

1. **Marincsák R.**, Tóth B.I., Czifra G., Szabó T., Kovács L., Bíró T. (2008): The analgesic drug, tramadol, acts as an agonist of the transient receptor potential vanilloid-1. *Anesth Analg.* 106(6):1890-1896. **IF: 2,214**
2. **Marincsák R.**, Tóth B.I., Czifra G., Márton I., Rédl P., Tar I., Tóth L., Kovács L., Bíró T. (2009): Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis.* [Epub ahead of print] **IF:1,945**

További in extenso tudományos közlemények:

1. Lázár J., Szabó T., **Marincsák R.**, Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2004): Sensitization of recombinant vanilloid receptor-1 by various neurotrophic factors. *Life Sci.* 75(2):153-163. **IF: 2,158**
2. Czifra G., Tóth I.B., **Marincsák R.**, Juhász I., Kovács I., Ács P., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2006): Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta. *Cell Signal.* 18(9):1461-1472. **IF:4,881**
3. Bíró T., Tóth B.I., **Marincsák R.**, Dobrosi N., Géczy T., Paus R. (2007): TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8):1004-1021. **IF:4,041**
4. Czifra G., Varga A., Nyeste K., **Marincsák R.**, Tóth B.I., Kovács I., Kovács L., Bíró T. (2009): Increased expressions of cannabinoid receptor-1 (CB1) and vanilloid receptor-1 (TRPV1) in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(4):507-514. **IF:2,366**

A közlemények összesített impakt faktora: **17,605**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A következő sorokban szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették az egyetemi doktori értekezést alátámasztó kísérletek sikeres kivitelezését mind anyagilag, mind gyakorlati és szakmai tanácsaikkal egyaránt.

Mindenekelőtt Dr. Kovács László és Dr. Csernoch László Professzor Uraknak, akik biztosították a munkámhoz szükséges feltételeket és Dr. Márton Ildikó Professzor Asszonynak, hogy lehetőséget teremtett ennek folytatására.

Köszönettel tartozom továbbá témavezetőmnek, Dr. Bíró Tamásnak a kutatási témámhoz nyújtott segítségéért, a hasznos ötleteiért, a szakmai és baráti tanácsaiért.

Hálával tartozom emellett a labor munkatársainak, különösen Dr. Czifra Gabriellának, Tóth István Balázsnak, Dr. Telek Andreának, Dr. Pocsai Krisztinának, Borbíró Istvánnak és Dr. Szöllősi Attilának a kísérletek elvégzéséhez adott gyakorlati tanácsaikért, önzetlen segítségükért, barátságukért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Vargáné Kiss Ibolya asszisztensnőnek és Kiss Gyulánének a technikai segítségért és mindenre kiterjedő, gondoskodó figyelmükért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm az Élettani Intézet és a Fogorvostudományi Kar valamennyi munkatársának munkám során nyújtott segítségét.