

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***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

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

TÉMAVEZETŐ

Dr. Bíró Tamás

DOKTORI ISKOLA

Molekuláris Orvostudomány

DOKTORI PROGRAM

Élettan és Neurobiológia

A SZIGORLATI BIZOTTSÁG TAGJAI

A bizottság elnöke: Dr. Gergely Pál, akadémikus

Bizottsági tagok: Dr. Szentmiklósi József, MTA doktora
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

A VÉDÉSI BIZOTTSÁG TAGJAI

A bizottság elnöke: Dr. Gergely Pál, akadémikus

Opponensek: Dr. Matesz Klára, MTA doktora
Dr. Varga Gábor, MTA doktora

Bizottsági tagok: Dr. Szentmiklósi József, MTA doktora
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2009. június 25., DE OEC I. Belgyógyászati Klinika

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 sejttestjeinek 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 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.

A primer afferens neuronokon belül a nociceptorok két alcsoportja különíthető el: 1) a kis átmérőjű C-rosttal rendelkező idegsejtek ($<30\ \mu\text{m}$), melyek velőshüvely nélküli lassú vezetésű axonnal rendelkeznek; 2) az A δ -rosttal rendelkező nociceptorok sejttestjei 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. C-típusú idegrostokban gazdag a bőr, a cornea, a szájnyálkahártya, az izmok, ízületek, valamint a kardiovaszkuláris, respiratórikus és genitourinális rendszerek is. Ezen polimodális (C-típusú) nociceptorok igen jelentős és szelektív érzékenységet mutatnak a csípős paprikából izolálható alkaloida, a kapszaicin (valamint számos egyéb rokon vanilloid vegyület) iránt, így ezen érzősejteket "kapszaicin-szenzitív neuronoknak" nevezték el.

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, valamint megváltoztatja a sejt feszültség-vezérelt K^+ -, Na^+ -, valamint Ca^{2+} -csatornáinak aktivitását.

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 alakul ki kapszaicin és egyéb fájdalomingerek iránt. Ezt a mechanizmust deszenzitizációnak nevezzük, 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); 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). 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.

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 kalcium-akkumulációnak és a kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható.

A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1)

A kapszaicin funkcionális támadáspontja egy nem-specifikus kationcsatornának bizonyult. Kiderült továbbá az is, hogy a csatorna nagyfokú Ca^{2+} -permeabilitást mutat, így aktivációja következményeként jelentősen megemelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

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, 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. 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, ezért a szakirodalomban a VR1-t TRPV1-nek (transient receptor potential vanilloid-1) nevezik.

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. 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); az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a

kapszaicint és ultrapotens analógját, a reziniferatoxint felismerő) kötőhely; valamint az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek. Bár kezdetben csak a sejtek külső membránjában feltételezték a TRPV1 jelenlétét, mára már számos bizonyíték 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.

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). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy e hatások mellett számos, leginkább gyulladáshoz kapcsolódó mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működését pozitívan befolyásolni. 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). A szenzitizáció mechanizmusának

köszönhetően így lehetővé válik a fájdalom *in vivo* percepciója (azaz az egyed létét fenyegető “noxa” érzékelése), emellett pl. gyulladási 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-gyulladási hiperalgéria jelensége hiányzik. 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. Kíváló hatékonyságát a μ -típusú ópioid receptorok aktiválása mellett a szinaptoszómák noradrenalin és szerotonin visszavételének gátlása 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^+ - és a késői egyenirányító K^+ -csatornákat, valamint a GABA és NMDA ionotróp receptorokat. Ráadásul néhány *in vivo* tanulmány felvetette, hogy a tramadol analgetikus képessége mellett, a lokális anesztetikumokéhoz hasonló, „helyi érzéstelenítő-szerű” hatással is rendelkezik.

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 teremtene 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. Emellett beszámoltak a kapszaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken, timocitákon, bronchiális epitéliumon és humán limfocitákon. Végezetül bebizonyosodott, hogy a receptor funkcionális formája expresszálódik epidermális keratinocitákon, humán húgyhólyag epiteliális és intersticiális sejtjein, valamint a gasztrointesztinális traktus epiteliális elemein is.

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. Jelentős TRPV1 expressziót mutattak ki prosztatata, vastagbél, hasnyálmirigy és hólyag karcinómákban, illetve LNCaP and PC-3 humán prosztatata karcinómából származó sejtvonalakon. Néhány tumor esetén pedig az is kiderült, hogy a TRPV1 protein expressziójának mértéke a tumor grádusának növekedésével párhuzamosan nő (prosztatata karcinóma) vagy, éppen ellenkezőleg, csökken (hólyag karcinóma; glioma).

Bár Tanaka és mtsai már 2002-ben beszámoltak arról, hogy kapszaicin etetése szignifikánsan gátolta a patkányokban 4-nitroquinolin 1-oxid-dal indukált nyelvtumorok növekedését, mindezidáig senki sem vizsgálta azt, hogy a tápcsatorna kezdeti szakaszán, a csípőspaprika elsődleges „célpontjával” 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 nyelvtumorok 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 képviseli, melynek 95 %-a laphámból kiinduló folyamat. Bár az előfordulási gyakorisága a világ egyes tájain igen különböző, az incidencia és mortalitási mutatók sajnos a legtöbb országban növekvő tendenciájúak. 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. 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. A szájüregi karcinómák okozta halálozás a múlt század végén ijesztő növekedési dinamikát mutatva közel négyszeresére nőtt. Bár az ezredfordulóra a mortalitási mutatók drámai emelkedése megszűnt, szignifikáns csökkenést ezen a téren az elmúlt 7 esztendőben sem sikerült elérnünk.

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. 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.

1. Kezdetben arra voltunk kíváncsiak, hogy a tramadol hatással van-e a sejtek intracelluláris kalcium-homeosztázisára TRPV1-t overexpresszáló heterológ expressziós rendszerben (TRPV1-CHO sejtek).
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. Képpalkotó 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 laphámkarcinómában.
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

Sejttenyésztés

A tramadol TRPV1-re kifejtett hatását TRPV1-CHO sejteken vizsgáltuk. PUGH102-3 plazmidba szubklónozott patkány TRPV1 cDNS-t vittünk be pTet Off regulátor plazmiddal már stabilan transzfektált CHO sejtekbe (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, glutamint, antibiotikumokat, valamint tetraciklint tartalmazó Ham F-12 médiumban 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 végeztük. A sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ atmoszférában L-glutamint tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's Medium tápoldatban tenyésztettük, melyet kiegészítettünk 10 % főtális borjú szérummal, antibiotikummal és fungizonnal.

Intracelluláris kalciummérés egyedi sejten

A fedőlemezre szélesztett, előzetesen indukált sejteket 5 µM kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM) 90 percig inkubáltuk 35 °C-on, tenyésztőoldatban. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket invertáló fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. 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, lassú perfúzióval. A vizsgált anyagokat (kapszaicin, tramadol, kapszazepin) a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk.

A tranziensek kinetikai paramétereit, azaz a kiváltott tranziens maximális amplitúdóját, az agonisták adagolásának kezdetétől az amplitúdó maximumáig eltelt időt és a felszálló szára illesztett egyenes meredekségét a DE OEC Élettani Intézetében kifejlesztett program segítségével határoztuk meg.

[Ca²⁺]_i-ban bekövetkező változások mikrofluorimetriás mérése

A sejteket a fentebb leírtak szerint elkészített tetraciklin-mentes Ham F-12 mediumban 40000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekbe, majd az edényeket 48 órán át 34,5 °C-on tartottuk. A mérés napján kalciumérzékeny fluoreszcens fluo 4 festék acetoximetilészter formájával (fluo 4-AM) 40 percig inkubáltuk 34,5 °C-on, tenyésztőoldatban. Többszöri mosást követően a sejteket 1% borjú szérum albumint (BSA) és Probenecidet tartalmazó Hank-oldatban inkubáltuk 30 percig 34,5 °C-on. A Fluo 4-AM-rel feltöltött sejteken FlexStation II³⁸⁴ (FLIPR) 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.

Immunitokémia és konfokális mikroszkópia

A CAL27 sejtek TRPV1 expresszióját és szubcelluláris lokalizációját immunfestést követő konfokális mikroszkóp technikával vizsgáltuk. A sejtenyészeteket acetonnal fixáltuk, majd blokkoló oldattal történő kezelést követően TRPV1 ellen termeltetett antitesttel inkubáltuk. Ezt követően

fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált antitesttel történő jelölést hajtottunk végre. A sejtmagokat 4,6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) jelöltük, majd a sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk. A negatív kontrollok primer antitestek felhasználása nélkül készültek.

Humán szövetek

Vizsgálataink a DE OEC Tudományos Bizottságának Regionális és Intézeti Kutatásügyi 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). Kísérleteinkben – patológus által elvégzett gondos hisztopatológiai elemzést követően – humán nyelv nyolc leukoplákiás epitéliumát és tizennyolc laphámkarcinómáját használtuk fel.

A humán szöveti minták előkészítése

A kapott szöveti mintákat két részre osztottuk. Az egyik részt paraformaldehidben 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. Ezt követően mintáinkat folyékony nitrogénben lefagyasztva tároltuk, míg a kellő számú minta összegyűjtését követően Q-PCR és Western blot vizsgálatokat végeztünk.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérleteket 5 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákon hajtottuk végre. Deparaffinálást követően antigénfeltárást végeztünk. Az endogén peroxidáz blokkot és az aspecifikus

kötőhelyek lefedését követően a metszeteket TRPV1 ellen termeltetett antitesttel inkubáltuk, majd polimer-tormaperoxidáz (HRP) konjugált másodlagos antitesttel történő jelölés után adtuk hozzá a metszetekhez a diaminobenzidin (DAB) kromogént. Negatív kontrollként az elsődleges antitestet szintetikus blokkoló peptiddel inkubáltuk, illetve elhagytuk a TRPV1 ellenes antitestet. Humán bőrből és prosztatából készített metszeteken látható TRPV1 immunreaktivitás szolgált pozitív kontrollként.

Az immunhisztokémiai képek elemzése

A fent részletezett immunhisztokémiai eljárással megfestett metszetekről felvételeket készítettünk, melyeket a továbbiakban Image Pro Plus 4.5 képanalizáló szoftver segítségével elemeztünk. A TRPV1 immunreaktivitás intenzitását 10 véletlenszerűen elhelyezett egyenlő nagyságú területben mértük, majd meghatároztuk az immunpozitív pixelek átlagát.

Western (immuno) blot analízis

A szöveti mintákat folyékony nitrogénben történő porítás után, lízis pufferben homogenizáltuk, ultrahangos szonikálóval feltárást végeztünk, majd meghatároztuk a lizátumok proteintartalmát. Ezután SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) követően a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, és TRPV1 ellenes elsődleges illetve torna-peroxidázzal kapcsolt másodlagos antitestek felhasználásával immunfestést végeztünk. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemilumineszcens kit és Intelligent Dark Box alkalmazásával történt. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver segítségével hajtottuk végre.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A teljes RNS kivonására Trizolt használtunk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva AMV reverz-transzkriptázt és random primert felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol alapján. Belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz szolgált. Az eredmények kiértékelése során a TRPV1 transzkriptek mennyiségét a GAPDH-éra normáltuk a Δ CT módszer szerint.

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-e jelen. Korábbi eredményeinkkel összhangban 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.

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

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a tramadol befolyásolhatja-e a kapszaicin által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ tranzienseket. Először a receptort nem expresszáló CHO sejteken vizsgáltuk a tramadol hatását kalciumtartalmú extracelluláris oldatban. 1 μ M tramadol egyetlen esetben sem okozott változást az $[Ca^{2+}]_i$ -ban sem 10, sem 60, sem 600 s-ig tartó adagolást követően sem, míg 180 μ M ATP-re ugyanezen sejtek 73 %-ka válaszolt tranzienssel. 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 (különbnek 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. 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, 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. Az általunk regisztrált tramadol tranziensek jól összevethetőek voltak a kapszaicin okozta $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változásokkal. 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, a maximális válasz kialakulásához szükséges idő pedig ezzel egyidejűleg szignifikánsan nagyobbak adódtak. 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 amplitúdójának szignifikáns csökkenését (tachifilaxis). Ezzel szemben a tramadol (1 μ M, 300 s-ként adagolva) hatására kialakult második tranziens amplitúdója csak $63,4 \pm 5,4$ %-a ($n = 41$) volt az elsőnek, míg a harmadik tranziens amplitúdójának maximuma tovább csökkent a második tranziensének $46,3 \pm 3,8$ %-ra ($n = 41$).

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 fejti-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 ez esetben 600 s-os időközönként. Erre a viszonylag hosszú időintervallumra azért volt szükség, mert ez pontosan megfelel egy tranziens kiváltása után szükséges mosás (300 s) 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, míg a harmadik tranziens amplitúdója a második $78,2 \pm 8,4$ %-a volt ($n = 10$). Ezt követően megismételtük a kísérletet a fenti protokoll szerint úgy, hogy a harmadik 10 s-os tramadol alkalmazását egy 300 s-os kapszazepin (5 μ M) kezelés előzte meg. A kapszaicin kompetitív gátlószere, valamennyi esetben szinte teljes mértékben kivédte a tramadol $[Ca^{2+}]_i$ -ot növelő hatását. A kapszazepin mellett adott tramadol esetén létrejött tranziens amplitúdója csupán a $12,7 \pm 2,8$ %-a ($n = 10$) volt annak, amelyet a TRPV1 antagonistá jelenléte nélkül mértünk. Megállapítottuk azt is, hogy a kapszazepin gátló hatása a tramadol által kiváltott tranziensek esetében is reverzibilis, hiszen 600 s-os mosást követően alkalmazott 1 μ M tramadol (negyedik tranziens) ismét képes volt – a kapszazepin jelenlétében mérthez képest – szignifikánsan megnövelni az $[Ca^{2+}]_i$ -ot.

A tramadol hatása koncentrációfüggő

A továbbiakban a tramadol dózis-hatás görbáját 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. Eredményeink matematikai analízisét követően az EC_{50} érték tramadol esetében $0,08 \pm 0,03 \mu M$ ($n = 4$), a kapszaicinnál pedig $0,04 \pm 0,01 \mu M$ volt ($n = 5$).

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 legfelszínesebb rétegére lokalizálódott.

Ugyanakkor a nyelv dorzális oldalát fedő specializált hámban a str. spinosum bazálisan elhelyezkedő sejtjeiben találtunk intracelluláris és jellegzetes granuláris képet mutató TRPV1-ir-t. Ezzel ellentétben sem a lamina propria-ban, sem a szubmukózában nem láttunk immunreakciót. Az immunpozitivitás specifikus reakciónak bizonyult, hiszen az elsődleges antitest elhagyásával készült kontroll vizsgálatok alkalmával sohasem jelent meg.

A TRPV1 kifejeződése fokozódik a nyelv premalignus és malignus elváltozásaiban

Meglepetésünkre a premalignus elváltozások közé sorolt leukoplákiából származó hám az egészségeshez képest igen intenzív és jellegzetes TRPV1 pozitivitást mutatott. 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.

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

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. A str. basale és a str. spinosum bazálisabban elhelyezkedő sejtjei 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.

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, a tumorfészek és a tumor környezetében található felszíni hám esetében. Emellett ugyancsak szignifikáns volt a különbség a prekancerózus leukoplákia és a tumoros minták, valamint a tumor környezetében található felszíni hám között.

Bár a nyelv laphámkarcinómából 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. 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. Az összes laphámkarcinómából származó minta statisztikai analízise azt mutatta, hogy a TRPV1 protein és specifikus mRNS transzkript mennyisége a kontrollhoz képest szignifikánsan megemelkedett a G1 és a G2 grádusú tumorokban. 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. 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.

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

Azért, hogy a TRPV1 receptort az egyes sejtek szintjén tudjuk vizsgálni, humán nyelv laphámkarcinómájából 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.

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.

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 $[Ca^{2+}]_i$ -jét (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 hatáserősség, a válasz látenciájának mértékében és a tachifilaxis jelenségében is). Éppen ezért azt feltételezzük, hogy a kapszaicin és a tramadol tachifilaxis kiváltására gyakorolt különböző hatása mögött elsősorban a két anyag szerkezeti különbözősége állhat.

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.

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 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, kalcitonin gén-kapcsolt peptid) szabadul fel, 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. Éppen ezért elképzelhető, hogy a tramadol, lokális alkalmazás esetén, a TRPV1-t

expresszáló afferens neuronokat aktiválva kiváltja azok „efferens” válaszát, ami a végkészülékekből kiáramló neuropeptidek 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, sőt néhány esetben még égő-csípő érzést és fájdalmat is. 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. 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 neuropeptidek 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. A „kapszaicin receptor” TRPV1 jelenlétét kimutatták emellett a humán gyomor antrumának egyes epiteliális elemein, a parietális sejteken és a bélrendszer más epiteliális sejtein is. Egyre többen vizsgálják továbbá különböző gasztrointesztinális daganatokból származó sejtvonalakon (nyelőcső epidermoid karcinómából létrehozott CE 81T/VGH sejteken, vastagbél daganatból származó HT-29 sejteken, gyomor adeno-karcinómából származó sejtvonalon) a kapszaicin tumorelles 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 epiteliális sejtekhez, mint amilyenek az emberi bőr keratinocitái, bronchiális epitélium, illetve az uroepitélium – 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. Mivel az MTT assay az élő sejtek számának a mitokondriális dehidrogenáz aktivitásától függő meghatározásán alapul, feltételezhető, hogy a TRPV1 aktivációja a sejtek halálához vezetett.

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 nyelv-tumorok kialakulását és csökkentették azok növekedési ütemét) – 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 prosztata karcinómával és a gliómával, ahol határozott összefüggést írtak le a receptor kifejeződése és a tumor grádusa között, a nyelv-tumor 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 nyelv-tumor diagnosztikus molekulája lehet. Alátámasztja ezt az elképzelésünket azon előzetes eredményünk is, hogy a szájnyálkahártya egy másik – korábban prekancerózus lézióknak, 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 sejtípusokhoz, mint amilyenek a szenzoros neuronok, hízósejtek, a bőr és bőrfüggelékek különböző sejtjei, hepatoblasztómából származó sejtek – 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 laphámkarcinómából származó minták tumort határoló, de szerkezetében még megtartott hámjának felszínes sejtrétegeiben egyértelműen a sejtmembrán festődött. 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 sejt-morfológia, életképesség és sejt-migráció szabályozásában.

Mindezen eredményeink alapján úgy tűnik tehát, hogy a TRPV1 egy új, ígéretes célmolekulája lehet a nyelv laphámkarcinóma 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 hámjából származó mintákon. Kimutattuk, hogy a TRPV1 kifejeződik egészséges humán nyelv hámjában. 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.

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**