

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A TRP CSATORNÁK ÉS A SENZOROS NEUROPEPTIDEK
SZEREPE AZ ORRNYÁLKAHÁRTYA GYULLADÁSOS
MEGBETEGEDÉSEIBEN**



DR. TÓTH ESZTER

**Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia Program**

**Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika
Témavezető: Prof. Dr. Pintér Erika és Prof. Dr. Gerlinger Imre**

2018

BEVEZETÉS

A krónikus orrmelléküreg gyulladás (CRS) patofiziológiája

A krónikus rhinosinusitis egy multifaktoriális, az orrüreg és orrmelléküregeket érintő gyulladásos megbetegedés, melynek pontos etiológiája még máig tisztázatlan. A korábbi feltételezések korlátai, miszerint a CRS az akut rhinosinuszitisek (ARS) inkomplett vagy terápiaerezisztens végállapota, mára számos alternatív hipotézis kialakulásához vezettek, de máig sem alakult ki egységes konszenzus.

Az 1980-as évek klasszikus teóriája szerint a betegség kialakulása az ún. ostiomeatalis complex (OMC) lezáródásával kezdődik, az így létrejövő ventilációs és elfolyási akadályozottság miatt gyulladás alakul ki a nyálkahártyán. Ezt követte az epithél ruptura elmélet, miszerint az orrnyálkahártya (mucosa) gyulladásos infiltrációja és ödémája során az epithélen kis sérülések, szakadások jönnek létre, melyet neovascularizáció majd polipképződés követ [1].

Az újabb próbálkozást a 1990-es évek végén napvilágot látó gomba elmélet jelentette, melynek lényege, hogy minden CRS alapja az *Alternaria* gombafajra adott erőteljes gyulladásos reakció. A Ponikau [2] nevéhez fűződő „eosinophil fungal rhinosinusitis” (eozinofil gombás rhinosinusitis) definíció és a gomba CRS-ben betöltött oki szerepe rá egy évtizedre megdőlt. A gomba, mint befolyásoló tényező bizonyos CRS fajtákban a betegség lefolyását, jellegét módosítja [3,4].

A 21. század elején megjelent tudományos vizsgálatok a *Staphylococcus* szuperantigén elméletre fókuszálnak. Bachert és mtsai szerint a károsodott epithélen keresztül bejutott *Staphylococcus enterotoxin* (SE) többféle immunmediált útvonalat indít be egyszerre, melynek következtében a gyulladásos mechanizmus a Th2 típusú útvonal felé terelődik. Az erőteljes immunválasz hatására poliklonális IgE termelődést, eozinofil és hízósejt beáramlást figyeltek meg. A nagy mennyiségben termelődő IgE ezután a szérumban is megjelenik, következésképpen gyulladásos tüneteket okozhat a felső és alsó légutakban is, intrinszik asztmát eredményezve. Ami azonban kétségeket vet fel, hogy orrpolipózisban szenvedő betegeknek csak közel felében mutatható ki a szuperantigénekre adott kóros válasz [5].

Egy ideig az aszpirin intolerancia irányába tolódott a figyelem, mely a ciklooxygenáz enzim gátlása miatt kialakuló foszfolipid metabolizmus zavara. A folyamat révén a proinflammatorikus leukotriének (LTR) szintézise nő, az antiinflammatorikus prosztaglandinok (PG) mennyisége pedig csökken. Elsősorban aszpirin által kiváltott felsőlégúti betegségben (aszpirin exacerbated respiratory disease: AERD) valószínű a szerepe, azonban úgy tűnik, hogy az aszpirin toleráns orrpolipos betegekben is szerepe lehet a foszfolipid metabolizmus zavarának [6].

Újabban az immun barrier károsodása emelhető ki. Eszerint a melléküregi nyálkahártya mechanikai barrierjének és/vagy a veleszületett immunválaszának hiányossága CRS kialakulásához vezet. A sérült hámon megtapadó kórokozók akár szuperantigén reakció vagy gomba által kiváltott immunválasz, vagy a biofilm károsító hatásának következtében vezethet krónikus gyulladás kialakulásához.

Összességében azt feltételezzük, hogy a betegség kialakulásának oka a betegnek a környezet káros hatásaira adott immunpatológiai reakciójában rejlik, melyet további faktorok, komorbid állapotok, mint pl. asztma, allergia, dysbiosis befolyásolnak.

A krónikus orrmelléküreg gyulladás fenotípusai és endotípusai

A krónikus rhinosinusitis két releváns fenotípusa klinikai megjelenése alapján a polipos és a polip nélküli CRS (az angol szakirodalmi kifejezés szerint chronic rhinosinusitis with nasal polyps: CRSwNP és chronic rhinosinusitis sine polyps: CRSsNP). A CRS súlyossága alapján recidív és „recalcitrant” fenotípusokról beszélhetünk, előbbinél gyakori, visszatérő tünetek, utóbbi esetén makacs, terápiareszisztens esetekről van szó. Külön csoportot képeznek a komplikációval járó formák (mucocele, osteitis, optikus neuropátia). A CRS-t fenotipizálhatjuk továbbá a szérum specifikus IgE pozitivitás, valamint a kiváltó események, (pl. aszpirin), bakteriális mikrokörnyezet alapján. A CRS heterogenitásának felismerése vezetett oda, hogy további számos biológiai szubtypust tudunk megkülönböztetni pusztán a patofiziológiai mechanizmusok alapján, melyeket endotípusnak hívunk. A patofiziológia és az ennek megfelelő biomarker jellemzők megismerésével megérthetjük a betegség lefolyását, megjósolható a későbbi recidívák esélye, valamint pontosabb, egyénre szabott terápiát választhatunk. Az Th2 domináns, főként Európában jellemző orrpolipózis endotípusát az anti-IL-5 biológiai terápiára adott pozitív válasszal is jellemezhetjük. A biofilmképző *Staphylococcus aureus* szuperantigén enterotoxinja (SE), a mérhető SE IgE, poliklonális IgE

jelenléte az IgE domináns, anti-IgE terápiára jól reagáló endotípusra jellemző [15]. A hisztopatológiai eltérések alapján döntően kétféle típust különböztethetünk meg: remodelling-neutrofil illetve az eozinofil túlsúlyos orrpolip.

A TRPV1 receptor

Az 1950-60-as években először Magyarországon tanulmányozták és mutatták ki sikeresen a kapszaicin fájdalomérzékelő idegrostokra kifejtett, szelektíven izgató hatását. Majd ezt követően magyar kutatók hipotetikusán is rámutattak arra, hogy a kapszaicin feltehetően specifikus receptoron keresztül fejt ki hatását [7]. A receptort az ún. „kapszaicin érzékeny idegsejteken”, a spinális hátsó gyöki (DRG) és trigeminus, vagus ganglionjainak primer szenzoros neuronjaira lokalizálták [8]. Az 1997-es évben sikerült klónozni a receptort, melyet a vanilloid struktúrát tartalmazó vegyületek aktiválhatósága miatt vanilloid 1 (VR1) receptornak nevezték el [9]. Az elnevezést később nemzetközi nomenklatura alapján tranziens potencál vanilloid 1-re (TRPV1) változtatták. A receptor pontos szerkezetét a klónozást követően írták le; a receptor alegység 95 kDa nagyságú fehérje, 6 transzmembrán doménre és egy pórus részre osztható. Négy alegység tetramer és/vagy heteromer formában alkot nem szelektív kation (főleg kalcium) csatornát a membránban, melynek N- és C – terminális vége intracellulárisan helyezkedik el. A fehérjemolekula aminosav régióinak pontosításával a receptor speciális funkciói kerültek felismerésre. A TRPV1-t a kapszaicinen kívül káros hőhatás (> 43 °C), savas pH (<6), gyulladá- és fájdalomkeltő vegyületek, bradykinin peptid, endogén lipid természetű vegyületek pl. endocannaboidok, lipooxygenáz termékek, mint a prosztaglandin E2, prosztaciklinek és exogén vanilloidok aktiválnak.

Az TRPV1 aktiválódásával Na⁺ és Ca²⁺-ion beáramlás, majd ezt követően kiáramlás történik a sejtben. A depolarizáció által generált akciós potenciál hatására az idegben érzőműködés és nocicepció keletkezik, következésképpen szenzoros hatásokat, mint a hőérzet, viszketés, fájdalom közvetít (afferentáció). Ezen kívül az kapszaicin érzékeny idegvégződésekből lokálisan főleg gyulladáskeltő, szenzoros neuropeptidek (neurokinin A, neurokinin B, P- anyag, kalcitonin-gén rokon peptid: CGRP) szabadulnak fel, az általuk közvetített gyulladáskeltő hatást lokális efferens funkciónak nevezzük. A perifériás végződésekből kiszabaduló molekulák vazodilatációt, permabilitás fokozódást, ennek következtében plazma kilépést és ödémát okoznak, továbbá serkentik a gyulladáscél sejtek bevándorlását. A TRPV1

receptor által közvetített neurogén gyulladás számos betegség kialakulásának kutatási tárgyát képezi. Szerepét kimutatták asztma bronchialisban, allergiás és idiopathiás rhinitisben, anafilaxiában, migrénben, gyulladásos bőr-és bélbetegségekben. Figyelemre méltó az is, hogy a TRPV1 receptor aktiválódása során a gyulladásos mediátorok mellett antiinflammatorikus hatású anyagok is felszabadulnak. A szenzoros idegvégződésekből kikerülő endomorfinek és szomatosztatin gyulladásgátló hatással bírnak, melyek bekerülnek a szisztémás keringésbe is (szenzokrin hatás).[11].

A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) a primer szenzoros neuronokon expresszálódik, mint az orrnyálkahártyát beidegző rostokon. Újabban TRPV1 receptorokat azonosítottak nem neuronális sejteken, epidermiszben, immunsejteken és számos szerv epithéliumán, ahol a gyulladás kialakulásában és a termoszenzációban gondolják szerepét. A receptorok aktivációja humán immunsejteken például hízósejtek degranulációját serkenti, aktiválja a makrofágokat és a fagocitózist, a dendritikus sejtek védekező mechanizmusait, valamint a CD4+ T-limfocitákat. Emberi nyálkahártyában nem-neuronális TRPV1-t találtak normál nazális mucosa epithéliumon [12] és submucosus mirigyeken [13]. Itt a fokozott nyákszekréció kialakulásában és a gyulladásos betegségek patomechanizmusában feltételezik a receptor szerepét [10,14,15].

A TRPA1 receptor

A TRPV1-hez szerkezetileg és funkcionálisan is hasonló tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) karakterisztikus jellemzője a N-terminusban előforduló magas számú ankyrin ismétlődés, amelynek feltételezett funkciója az ún. *gating*: csatorna nyitva és/vagy zárva tartása. A nem szelektív, de főként Ca²⁺-ionra permeábilis csatorna aktiválódásával a neurogén gyulladás és fájdalomérzet kiváltásában és számos patofiziológia mechanizmusban van fontos szerepe.

A TRPA1 gyakran expresszálódik TRPV1 pozitív A δ és C-típusú rostok egy alpopulációján (nervus vagus ganglion, trigeminális ganglion rostjai). Egyre inkább világos, hogy a két receptor funkciói egymással több területen is kapcsolódnak.

Elsőnek tüdő fibroblast sejtvonalból izolálták, mégis sokáig csak bizonyos szenzoros rostokra korlátozták expresszióját és ennek megfelelően elsődleges funkcióját is. Nem-neuronális sejteken való előfordulása újabb vizsgálatoknak nyitott lehetőséget. Megfigyelték, hogy nem

neuronális sejteken is általában együtt fordul elő a két receptor pl. keratinocitákon, makrofágokon, hízósejteken, monocitákon. A receptor károsító hideg és környezeti irritánsok, oxidatív stressz hatására aktiválódik, melynek következtében neurogén gyulladás jön létre [16,17]. Továbbá élelmiszerekben előforduló anyagok, fűszernövényekben és zöldségekben megtalálható illóolajok pl. mustár, wasabi, oregano, fokhagyma, fahéj hatóanyagai is izgató hatással vannak a receptorra [18]. A TRPA1-nek fontos érzékelő szerepe van a légúti irritáció esetén, köhögésben és feltehetően a hideg levegő provokálta nem-allergiás-idiopathiás rhinitisben is [19–21]. Normál emberi orr epitheliumon funkcionális extraneuronális TRPA1 receptorok is jelen vannak [12]. Újabban kimutatták, hogy orális lichen planusban a nem-neuronális TRPV1 és TRPA1 receptorkifejeződés megnövekedik [22,23].

Az orrnyálkahártya szenzoros neuronok TRPV1 és TRPA1 receptorainak kulcsfontosságú szerepét írták le a neurogén gyulladás, hiperreaktivitás és hisztamin-indukált viszketés közvetítésében. Azonban a nem-neuronális TRP funkciók még mindig nem teljesen tisztázottak.

Kapszaicin deszenzibilizáció-denerváció

A TRPV1 receptor agonista kapszaicin szelektíven izgatja, ismételt magas dózisban deszenzitiválja sőt reverzibilisen károsíthatja (denerváció) a szenzoros rostvégzódések egy csoportját [8]. A deszenzibilizációval a teljes idegvégződés hosszú távú, reverzibilis funkcióvesztése, működéskiesése - denerváció - érhető el [24,25]. Ennek hátterében az ismételt nagymennyiségű Ca^{2+} -ion beáramlás és a következményes intracelluláris koncentrációemelkedés bénító hatása, valamint a neuropeptid raktárak kiürülése áll.

A 2000-es évek elején számtalan tanulmány látott napvilágot, amivel azt próbálták igazolni, hogy az orrnyálkahártya krónikus gyulladásainak kezelésében a lokális deszenzibilizáció sikeres lehet. A kapszaicin kezeléssel próbálkoztak CRS-ben, allergiás és idiopathiás rhinitisben, valamint CRS posztoperatív kezelése során. Az eredmények nem egyértelműek és meggyőzőek. Orrpolipózisban alkalmazott kezelés csökkentette a tüneteket és a polipok méretét, azonban a hatása nem közelítette meg az evidencia alapú kezelések hatékonyságát, mint pl. az orális szteroid kezelést vagy FESS-t [26]. Posztoperatív polip recidívában szenvedő betegeken végzett placebo kontrollált vizsgálatban szignifikánsan csökkent a polipok mérete

kapszaicin deszenzibilizáció hatására [27]. Allergiás rhinitisben nem sikerült bizonyítani az intranazális kapszaicin terápia hatékonyságát [28].

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetőben részletezett, CRS körüli etiopatológiai bizonytalanságok és munkacsoportunk korábbi gyulladásos betegségekben elért nemzetközi eredményei arra ösztönöztek, hogy humán betegmintákon megvizsgáljuk, vajon a szenzoros neuronokon neurogén gyulladást közvetítő TRP receptorok jelen vannak-e nem neuronális sejteken, változik-e a receptor kifejeződése, ami utalhat arra, hogy hozzájárulnak a betegség pathogeneziséhez. Célkitűzéseimet az alábbiak szerint összegzem:

1. Munkánk célja volt, hogy orrpolipózisban kimutassuk az extraneuronális TRPV1 és TRPA1 csatornák génexpresszió változását egészséges orrnyálkahártyával összehasonlítva.
2. Immunhisztokémiai festés segítségével meghatározzuk a TRPV1 és TRPA1 receptorok helyét orrpolipózisban.
3. Az orrpolipos betegek citokin-mintázatának elemzése és a TRP receptorok expressziójával való összevetése.
4. A fenti eredményeink alapján asztmás, allergiás orrpolipos beteg alcsoport részletesebb tanulmányozása.

VIZSGÁLATOK (beteganyag, módszer)

Beteg

A vizsgálatba orrpolipos (CRSwNP) betegeket és az egészséges alanyokat válogattunk be 2010-2012 közti periódusban. A diagnózist a klinikai tünetek, endoszkópos lelet és a CT felvételek alapján állítottuk fel az európai szakmai ajánlás (EPOS2012) által definiált, szigorú CRS kritériumrendszer alapján. Minden beteg hosszú távú INCS kezelésben részesült, mely hatástalannak bizonyult, ezért műtétre került sor. Az első csoportban 33 CRSwNP betegből vettünk polipmintát rutin endoszkópos melléküreg műtét (FESS) során. 18-70 év közötti betegeket választottunk be, közülük 17 nő és 16 férfi volt, majd alcsoportokba soroltuk őket a klinikai komorbiditás alapján: allergiás rhinitis és/vagy asztma. Az allergiás rhinitist a pozitív Prick-teszt és a klinikai tünetek, az asztmát a pulmonológiai szakvélemény igazolta. 10 kontrollmintát vettünk olyan egészséges egyénekből, akiknél nem volt igazolható felsőlégúti gyulladás vagy melléküreg betegség, ezekből 4 nő és 6 férfi beteg volt. A mintákat az alsó

kagylóból vettük rutin orrsövény műtét vagy alsó kagyló műtét során. A második csoportba 9 új beteget választottunk be asztmával kísért, krónikus orrpolipózissal, valamint 6 kontroll beteget.

Mintavétel

A kimetszett szövetmintát 3 darabba vágtuk. Az egyik részt RNA laterbe (RNS bomlást gátló folyadékba) (kat.sz.: R0901, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) helyeztük, a másodikat friss fagyasztott mintának készítettük el és -80°C-on tároltuk. A harmadik részt 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk az immunhisztokémiai feldolgozáshoz.

Immunhisztokémia

Metilált Giemsa (M&G) festés segítségével elemeztük a szövetmintákban lévő hízósejteket (MC), polimorfonukleáris sejteket (PMN), eozinofil sejteket (EO) és plazma sejteket. A Giemsa oldatban (20 ml Giemsa festék, 80 ml dH₂O) 20 percig szobahőmérsékleten, majd a metilálóoldatban (99 ml metanol, 1 ml 36% hidroklorid) 20 percig 56°C-on inkubáltuk a deparaffinált és rehidrált szövetmintákat. A differenciáló folyadék (200 µl cc. ecetsav 100 ml dH₂O-ben) után 96%-os etanollal öblítettük, majd xilollal mostuk a mintákat 3x5 percig. A metszeteket Pertex fedőanyaggal fedtük (Histolab Products AB, Västra Frölunda, Sweden). Ezután Panoramic eszköz segítségével (3D Histech Ltd., Budapest, Magyarország) segítségével szkenneltük be a számítógépre. Ezt követően a fedőlemezeket újra eltávolítottuk (xilol 56 °C-on elválásig majd 5 percig mosás 96% etanolban), majd Leica Bond Max automata festékkel (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) végeztük az immunhisztokémiai festést a következő fő lépések szerint. A szövetmintákat pH 6-on citrát-pufferben inkubáltuk 20 percig antigénfeltárás céljából. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 3%-os hidrogén-peroxidban (H₂O₂) való inkubációval gátoltuk. Az immunfestés vagy anti-TRPV1 (1:300; kat. sz.: GP14100, Neuromics, Edina, MN, USA) vagy anti-TRPA1 (1:250; kat. sz.: ARP35205-P050; Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA) poliklonális nyúl elsődleges antitesttel történt 15 percig. A metszeteket 37°C-on 20 percig inkubáltuk (Bond Polimer Detection Kit) másodlagos anti-nyúl poli-HRP-IgG-nal (HRP: tormaperoxidáz). Végül a TRPV1 receptorok immunlokalizációját diamino-benzidinnel (DAB) hívtuk elő 10 percig, magfestést hematoxilinnal végeztünk. A metszeteket újra befedtük fedőlemezzel, és újból beszkeneltük a Panoramic eszköz segítségével. Az így kapott

digitális felvételeket a Panoramic Viewer 1.15 virtuális mikroszkóp szoftver segítségével elemeztük. A szövettani vizsgálatok elemzését, a sejtek morfológiáját és az immunpozitív sejtek azonosítását tapasztalt patológus végezte.

Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A teljes RNS tisztítását egészen a vizes fázisig a TRI reagens gyártó (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) protokollja szerint végeztük. A kinyert totál RNS tisztaságát és mennyiségét Nanodrop ND-1000 spektrofotométer V3.5 (Nano-Drop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) segítségével állapítottuk meg. 500 ng RNS átírása Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (kat. sz. K1642, ThermoScientific, Santa Clara, CA, USA) segítségével a gyártó utasítása szerint történt. A PCR amplifikációt a Stratagene Mx3000P qPCR készülékkel (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), SensiFast Probe/SYBR Lo-ROX Kit (kat. sz. BIO-84020/BIO-94020) segítségével végeztük. Négy referenciagén tesztelését követően a [29,30] gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz /GAPDH/, hipoxantin foszforiboziltranszferáz 1 /HPRT1/, béta-aktin /ACTB/ és béta-gükuronidáz /GUSB/) közül a HPRT1 és a GAPDH bizonyult a legmegbízhatóbbak, ezek C_t értékeinek mértani közepét alkalmaztuk.

Luminex Multiplex Immunassay

A kimetszett és -80°C -on tárolt polipos szövetmintákat a mérés megkezdése előtt kiolvastottuk, lemértük a tömegüket, és azonnal $450\ \mu\text{l}$ proteáz inhibitor tartalmazó Procarta Cell Lysis Buffer oldatba helyeztük (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), majd homogenizáltuk (TissueLyser II bead mill system, kat. sz. 85300, Qiagen, Hilden, Germany). A mintákat $2000\times g$, 20 perc, $+4\ ^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk a sejtörmelék eltávolításához, a felülúszót a további elemzéshez összegyűjtöttük. A Procarta Immunoassayt (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) Luminex technológia szerint hajtottuk végre. Az alábbi citokineket/kemokineket határoztuk meg: interferon gamma (IFN γ) interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5) and interleukin 8 (IL-8, CXCL8). A mérést a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el. Az adatokat MasterPlex szoftver segítségével elemeztük.

Statisztikai módszerek

Az mRNS eredmények kiértékelése páratlan t-teszt, vagy egyutas variancia analízis (ANOVA) és Tukey-féle többszörös összehasonlító teszt segítségével történt. A citokin fehérje adatokat Mann–Whitney teszt vagy Kruskal-Wallis és Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel elemeztük. Valószínűség értékek: $P < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. Az eredményeket átlag \pm átlag standard hibája (SEM) formában fejeztük ki és ábrázoltuk hibavonalakkal (*error bar*). Az mRNS változás (*fold change*) értékek kettes alapú logaritmusát vettük és tovább elemeztük hierarchikus klaszteranalízissel, amelynek eredményét hőtérképen vizualizáltuk. A \log_2 transzformált mRNS változások közötti korrelációt is vizsgáltuk (biweight mid-correlation algoritmus, R programozási nyelv 3.2.3 verzió, *bicor* function, WGCNA R csomag). A korrelációs koefficiens (r) értékeket hőtérképen vizualizáltuk (Morpheus).

EREDMÉNYEK

Az extraneuronális TRPV1 és TRPA1 csatornák génexpresszió változása orrpolipózisban egészséges orrnyálkahártyával összehasonlítva.

- a. Kvantitatív RT-PCR technikával mind a TRPV1 és a TRPA1 mRNS megfigyelhető volt orrpolipban és normál orrnyálkahártyában is.
- b. Az első betegcsoportban a beteg mintákban mért TRPV1 és TRPA1 mRNS szintek szignifikánsan, 0,35 és 0,43 szorosával csökkentek a kontroll, normál nyálkahártyában mértékekhez képest.
- c. a TRP mRNS mennyiséget az orrpolipos betegek komorbiditások szerint felosztott alcsoportjaival vetettük össze, akkor szignifikáns TRPV1 emelkedést észleltünk az allergiás (1,9x) és az allergiás, asztmás (3,9x) betegcsoportban komorbiditással nem rendelkező orrpolipos betegekhez képest, mely utóbbi csoport a viszonyítási alapot képezte.
- d. A TRPA1 értékei nem változtak szignifikáns mértékben az alcsoportokhoz képest.

e. A második, asztmás orrpolipos betegcsoportban a TRPV1 és TRPA1 mRNS szintek, hasonlóan az első betegcsoporthoz, jelentősen csökkentek a kontrollhoz képest.

TRPV1 és TRPA1 receptorok immunhisztokémiai lokalizációja orrpolipózisban

a. Metilált Giemsa festéssel normál orrnyálkahártyán néhány plazmasejt, kis számban hízósejt és limfocita volt látható a sztrómában. TRPV1 pozitív plazmasejtek és TRPA1 pozitív makrofág sejtek elszórtan voltak jelen a mintákban.

b. Orrpolipózisban intenzív TRPV1 immunpozitivitás igazolódott periglandularisan és a mirigyek közti sejteken, valamint a seromucosus mirigyek körül, melyek túlnyomó részt plazma sejteknek, hízósejteknek és kisebb számban limfocitáknak, makrofágoknak feleltek meg. A legszembetűnőbb TRPV1 jelölődést a plazmasejteken detektáltuk, azonban ezeknek is csak egy alcsoportja festődött pozitívan minden mintában.

c. A makrofágok és hízósejtek egy csoportja TRPA1 immunpozitív reakciót adott, de az eozinofil sejtek nem festődtek. Nem tudtuk kimutatni a TRPA1 jelenlétét plazmasejten és limfocitákon.

Az orrpolipos betegek citokin-mintázatának elemzése és a TRP receptorok expressziójával való összevetése.

a. Orrpolipózisban az egészséges kontrollcsoporthoz képest az IFN γ és az IL-4 fehérje szintje nem változott, IL-5 fehérjét nem találtunk a kontrollmintákban, szemben a polipos mintákkal. Az IL-8 fehérje mennyisége szignifikánsan megemelkedett 2,2-szeresére.

b. A betegeken belül a komorbiditás szerint felosztott alcsoportok értékeit egymással összevetve azt találtuk, hogy csak az IL-4 szintje változott szignifikánsan: 2,3 szorosára (0,070 pg/mg) emelkedett az asztmás, allergiás betegcsoportban azon orrpolipos betegekhez képest, akiknél nem volt komorbiditás.

c. A gyulladásoos markergének és a TRPV1/TRPA1 korrelációjának vizsgálata során 15 gyulladásoos marker génexpresszióját vizsgáltuk a második betegcsoportban. Az asztmával társuló orrpolipos betegek és a kontrollcsoport részletes transzkriptomikai eredményeit hőterkép ábrázolással összegeztük. Kilenc olyan gén (triptáz, karboxipeptidáz, EMR1, IL-4, IL-5, IL-13, IgE, CD3 és CD79a), mely a Th2 mediálta gyulladásoos útvonalban játszik szerepet egy csoportba sorolódott (azaz hasonlóan fejeződött ki a mintákban) és az asztmás, orrpolipos mintákban kifejezetten emelkedett volt az értékük. A TRPV1 mRNS expresszió mintázata hasonló volt a hízósejtekre is jellemző markerekkel az alábbi sorrendben: TAC4 > CD117 > CHM-1 (kimáz). A TRPA1 kifejeződés mintázata különbözött a többi gyulladásoos markertől, egyedül az IL-8 transzkriptummal látszott hasonlóan expresszálni.

d. Egy-egy gén kifejeződésének változását a korrelációs koefficiens értékekkel adtuk meg. A TRPV1 mRNS mennyisége pozitívan korrelált a TAC4 (hemokinin-1 peptid) > CD117 (hízósejt) > CD79a (plazma B-sejt receptor) értékeivel, míg a TRPA1 mRNS negatív korrelációt mutatott az eozinofil granulocita sejtfelszíni marker [31] EMR1 (ADGER1) termékkel.

KÖVETKEZTETÉSEK

a. Vizsgálatunkkal immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltatunk, hogy a nem-neuronális TRPV1 és TRPA1 receptorok jelen vannak az orrpolipos mintákban. TRPV1 immunfestődést figyeltünk meg plazmasejteken és hízósejteken, főként a mirigyek közti térségben, míg a TRPA1 nagy mennyiségben a sztrómális makrofágokon volt detektálható. Azonban TRPA1 pozitívítást nem tudtunk kimutatni plazmasejteken.

b. A nyálkahártya luminális felszínével történő, közvetlen környezettel való érintkezése magyarázhatja a TRPV1, TRPA1 pozitív sejtek mirigyek körüli akkumulációját, miután ezek a receptorok a környezeti káros hatások mint pl. szennyeződések, porrészecskék, számos egyéb kémiai anyag kemoszenzorai [19,32]. A környezeti irritáns vegyületek hatására a hízósejteken és makrofágokon található TRPA1 csatorna aktiválódhat és proinflammatorikus irányú folyamatokat indukálhat [33].

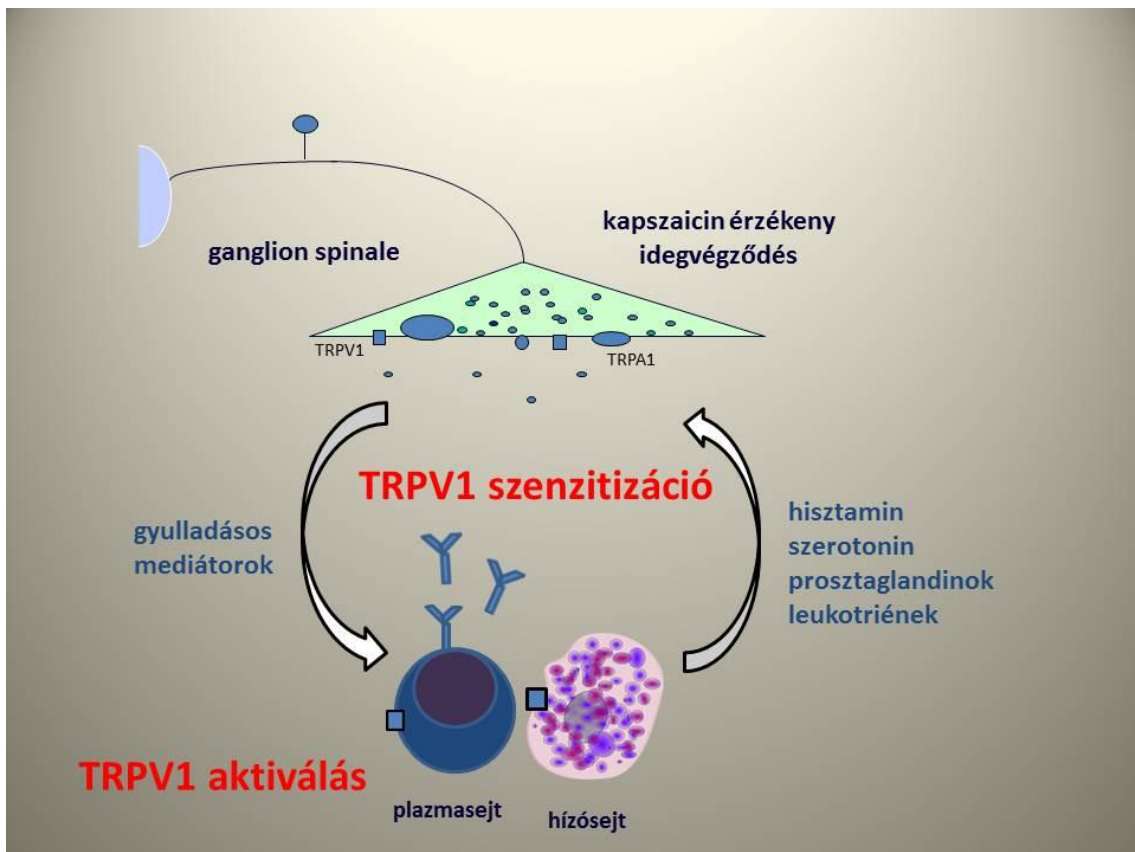
c. Elsőként mutattuk ki orrpolipban humán plazmasejteken a TRPV1, valamint az extraneurális TRPA1 jelenlétét. Miután a plazmasejteken következetesen csak TRPV1

expressziót találtunk, TRPA1-t nem, ez magyarázhatja a TRP mintázatban észlelt különbségeket. A TRPV1 jelenléte emberi plazma B-sejteken új és ígéretes eredmény, azonban ennek jelentőségét még nem tudjuk.

d. A TAC4 és más hízósejt markerek (chimáz, CD117) ko-expresszálódtak a TRPV1 transzkriptumaival. A TAC4 gén terméke, a hemokinin-1 peptid növeli a TRPV1 - de nem a TRPA1 - választ [34], továbbá a B-sejt ellenanyag termelést, valamint az IgE által mediált hízósejtes gyulladási választ [35]. Feltételezhető, hogy a TRPV1-pozitív plazmasejtek és hízósejtek aktivációja a asztmás orrpolipos betegekben hozzájárul az emelkedett IgE szint és a fokozott gyulladás kialakulásához és ezáltal a súlyosabb tünetek megjelenéséhez.

A DOLGOZAT LEGFONTOSABB EREDMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Komorbid asztma és allergia esetén az emelkedett TRPV1 szintnek szerepe lehet az orrpolipózisban. A TRPV1-pozitív plazma és hízósejt szubpopulációk jelenléte, továbbá a TRPV1 és az immunfolyamatokat szabályozó TAC4 mRNS koexpressziója arra utalhat, hogy a receptor szerepet játszik a gyulladásos sejtek aktiválásában és a proinflammatorikus mediátorok felszabadulásában. A plazmasejt TRPV1 gyulladási mediátorok felszabadításán keresztül „mintegy párbeszéd”-ben lehet a neuronális receptorokkal, ezt érdemes lenne tovább vizsgálni.



Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Pintér Erikának, témavezetőmnek a kezdetektől belém vetett, kitartó hitét, szakmai támogatását és azt, hogy egy életre szóló szakmai- és tudományos igényességre tanított. Az általa nyert *OTKA NN-114458 pályázati díj és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 kutatási pályázatok* keretében végezhettem vizsgálataimat, hálásan köszönöm a lehetőséget. Szintén nagy hálával tartozom Prof. Dr. Gerlinger Imrének, második témavezetőmnek, aki rámutatott a rhinológia fontosságára, és ezt az irányvonalat kijelölte számomra. Mindig a szakmai és tudományos előmenetel fontosságára inspirált, ebben példát mutatott. Köszönet minden korábbi kollégámnak is, akik nélkül nem valósulhatott volna meg a humán betegekből végzett mintagyűjtés, mely a dolgozat alapjául szolgált.

Nagyon köszönöm Dr. Kun Józsefnek a farmakológia intézet kutatójának a vizsgálataink során végzett lelkiismeretes munkáját, tanácsait és azt, hogy minden esetben számíthattam rá. Hálával tartozom Hírné Perkecz Anikónak, aki az immunhisztológiai vizsgálatokat nagy precizitással végezte el. Köszönöm Dr. Tornóczky Tamásnak színvonalas pathológiai szupervizori munkáját. Továbbá hálával tartozom minden Farmakológiai, Pathológiai és Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Intézetben dolgozó munkatársnak, aki részt vett a kutatás megvalósításában, elvégzésében.

Köszönöm Dr. Helfferich Frigyesnek, jelenlegi főnökömnek azt, hogy támogató hozzáállásával biztosította a PhD munkám befejezését.

Külön hálával tartozom családomnak, akik a támogató légkör megteremtésével lehetővé tették, hogy a dolgozat megszülethessen.

Irodalomjegyzék

1. Tos M, Mogensen C. Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology*. 1977; 15: 87–95.
2. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. *Mayo Clin Proc*. 1999; 74: 877–884.
3. Chandra RK, Pearlman A, Conley DB, et al. Significance of osteomeatal complex obstruction. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 39: 171–4.
4. Fokkens WJ, van Drunen C, Georgalas C, et al. Role of fungi in pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 20: 19–23.
5. Bachert C, Gevaert P, Zhang N, et al. Role of Staphylococcal Superantigens in Airway Disease. In: *Superantigens and Superallergens*. 2007, pp. 214–236.
6. Ying S, Corrigan CJ, Lee TH. Mechanisms of aspirin-sensitive asthma. *Allergol Int*. 2004; 53: 111–119.
7. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967; 31: 138–51.
8. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 2004; 38: 377–84.
9. Caterina MJ, Schumacher M a, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389: 816–24.
10. Smith PK, Nilius B. Transient Receptor Potentials (TRPs) and Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13: 93–100.
11. Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther*. 2006; 112: 440–456.
12. Alenmyr L, Herrmann A, Högestätt ED, et al. TRPV1 and TRPA1 stimulation induces MUC5B secretion in the human nasal airway in vivo. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2011; 31: 435–444.
13. Seki N, Shirasaki H, Watanabe K, et al. Expression and localization of TRPV1 in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*. 2009; 124: 958–963.
14. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells. *Nat Immunol*.
15. Abdel-Salam OME (Editor). *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*. Springer, 2014.
16. Geppetti P, Holzer P. *Neurogenic inflammation*. CRC Press, 1996.
17. Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, et al. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int Suppl*. 2008; 101: 2–6.
18. Pereira I, Mendes SJF, Pereira DMS, et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 1–9.
19. Geppetti P, Patacchini R, Nassini R, et al. Cough: The emerging role of the trpa1 channel. *Lung*. 2010; 188: S63–S68.

20. Lee L-Y. TRPA1 ion channels: a gateway to airway irritation and reflex responses induced by inhaled oxidants. *J Physiol*. 2010; 588: 747–8.
21. Lieberman PL, Smith P, Baroody FM. Nonallergic Rhinitis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2012; 20: 21–30.
22. Bán Á, Marincsák R, Bíró T, et al. Upregulation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Receptor Expression in Oral Lichen Planus. *Neuroimmunomodulation*. 2010; 17: 103–108.
23. Kun J, Perkecz A, Knie L, et al. TRPA1 receptor is upregulated in human oral lichen planus. *Oral Dis*. 2016; 23: 189–198.
24. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999; 51: 159–211.
25. Acs G, Palkovits M, Blumberg PM. Comparison of [3H]resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic and vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci*. 1994; 55: 1017–26.
26. Baudoin T, Kalogjera L, Hat J. Capsaicin significantly reduces sinonasal polyps. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120: 307–11.
27. Zheng C, Wang Z, Lacroix JS. Effect of intranasal treatment with capsaicin on the recurrence of polyps after polypectomy and ethmoidectomy. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120: 62–6.
28. Cheng J, Yang XN, Liu X, et al. Capsaicin for allergic rhinitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; CD004460.
29. RefFinder<http://150.216.56.64/referencegene.php>.
30. Xie F, Sun G, Stiller JW, et al. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS One*. 2011; 6: e26980.
31. Hamann J, Koning N, Pouwels W, et al. EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 2797–2802.
32. Kim D, Baraniuk JN. Sensing the Air Around Us: The Voltage-Gated-Like Ion Channel Family. *Rhinitis*. 2007; 85–92.
33. Parenti A, De Logu F, Geppetti P, et al. What does evidence indicate about the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Br J Pharmacol*. 2015; 173: 953–69.
34. Naono-Nakayama R, Sunakawa N, Ikeda T, et al. Differential effects of substance P or hemokinin-1 on transient receptor potential channels, TRPV1, TRPA1 and TRPM8, in the rat. *Neuropeptides*. 2010; 44: 57–61.
35. Sumpter TL, Ho CH, Pleet AR, et al. Autocrine hemokinin-1 functions as an endogenous adjuvant for IgE-mediated mast cell inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135: 1019–1030.e8.

Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemény

Toth E, Tornoczky T, Kneif J, Perkecz A, Katona K, Piski Z, Kemeny A, Gerlinger I, Szolcsanyi J, Kun J, Pinter E

Upregulation of extraneuronal TRPV1 expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyps.

RHINOLOGY 56:(3) pp. 245-254. (2018)

IF: 2,93 Q1

Egyéb teljes közlemények

Molnár Dávid, **Tóth Eszter**

Az allergiás rhinitis felismerése és kezelése

GYÓGYSZERÉSZ TOVÁBBKÉPZÉS 10:(3) pp. 75-78. (2016)

Tóth Eszter

Az obstruktív alvási apnoe és hypopnoe szindróma mögött meghúzódó fül-orr-gégészeti megbetegedése; az okok feltárásának modern módszere: az alvás alatti endoszkópia

FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 62:(3) pp. 132-133. (2016)

Rath G, Katona G, Bako P, Torok L, Revesz P, **Toth E**, Gerlinger I

Application of ionomer cement onto the stapedial footplate: Impact on the perilymphatic aluminum level.

LARYNGOSCOPE 124:(2) pp. 541-544. (2014)

IF: 2.14

Gerlinger Imre, **Tóth Eszter**, Török László, Réti Judit, Kett Antónia, Vóna Ida

Aszpirin intolerancia és orrpolipózis: deszenzibilizációs kezeléssel szerzett első hazai tapasztalatok

FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 56:(4) pp. 242-250. (2010)

Patzkó Ágnes, **Tóth Eszter**, Somogyvári Krisztina, Gerlinger Imre

A comparative clinical study of mucotomy and KTP laser treatment of the inferior turbinate in allergic and non-allergic subjects

HEALTH (IRVINE) 2:(11) pp. 1287-1293. (2010)

IF:0.5

Tóth Eszter

Az orrlégzési nehezítettség

MAGYAR CSALÁDORVOSOK LAPJA 7: pp. 15-21. (2010)

Gerlinger I, Gobel G, **Toth E**, Szanyi I, Weninger C

Primary carcinoma of the frontal sinus: a case report and a review of literature

EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 265:(5) pp. 593-597. (2008)

IF: 0,5

Független idéző: 10

Patzkó Ágnes, Gerlinger Imre, Ablonczy Réka, Kett Antónia, **Tóth Eszter**, Török László, Pytel József.

Az alsó orrkagyló mucotomiája és KTP lézeres kezelése: összehasonlító klinikai vizsgálat allergiás rhinitisben szenvedő és nem allergiás betegekben

FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 54:(4) pp. 165-174. (2008)

Tóth Eszter, Gerlinger Imre, Szanyi István, Göbel Gyula, Weninger Csaba, Pytel József: *Sinus frontalis carcinoma: esetismertetés*

FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 54:(2) pp. 67-72. (2008)

Piski Z, Gerlinger I, **Tóth E**, Háromi I, Nepp N, Lujber L. *Evaluation of chitosan based nasal dressing in animal model*. Orv. Hetil. 2018; 159(47): 1981-1987.

IF: 0.322

Az értekezés alapját képező prezentációk

E. Tóth, J. Kun, A. Perkecz, Z. Piski, I. Gerlinger, J. Szolcsányi, E. Pintér

Nem-neurális tranziens receptor potenciál VANILLOID 1 (TRPV1) - azaz kapszaicin receptor - és ANKYRIN 1 (TRPA1) receptorok jelenléte orrpolipózisban, asztmás betegcsoporton

A MAGYAR FÜL-, ORR-, GÉGE ÉS FEJ-, NYAKSEBÉSZ ORVOSOK EGYESÜLETE 43.

KONGRESSZUSA, TAPOLCA, 2014. OKTÓBER 15-18. (előadás)

E. Toth, J. Kun, A. Perkecz, T. Tornoczky, I. Gerlinger, J. Szolcsanyi, E. Pinter

Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (trpv1) and ankyrin 1 (trpa1) receptors in chronic rhinosinusitis

25TH CONGRESS OF THE EUROPEAN RHINOLOGIC SOCIETY IN CONJUNCTION WITH 32ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF INFECTION & ALLERGY OF THE NOSE; AMSZTERDAM, HOLLANDIA, 2014. JÚNIUS 22-26. (előadás)

E. Tóth, J. Kun, A. Perkecz, T. Tornóczky, I. Gerlinger, J. Szolcsányi, E. Pintér
Nem-neurális tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (trpv1)-azaz kapszaicin receptor- és ankyrin 1 (trpa1) receptorok jelenléte krónikus rhinosinusitisben
MAGYAR FÜL-, ORR-, GÉGE ÉS FEJ-, NYAKSEBÉSZ ORVOSOK EGYESÜLETE 42. KONGRESSZUSA, PÉCS, 2012. OKT. 17-20. (előadás)

J. Kun, **E. Tóth**, A. Perkecz, T. Tornoczky, I. Gerlinger, J. Szolcsanyi, E. Pinter
Nem-neurális tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (trpv1) és ankyrin 1 (trpa1) receptorok jelenléte rhinosinusitisben
MAGYAR FARMAKOLÓGIAI, ANATÓMUS, MIKROCIRKULÁCIÓS, ÉLETTANI TÁRSASÁGOK KÖZÖS TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁJA (FAMÉ), PTE ÁOK, PÉCS, 2011. JÚNIUS 8-11 (poszter)

J. Kun, **E. Toth**, A. Perkecz, T. Tornoczky, I. Gerlinger, J. Szolcsanyi, E. Pinter
Expression of transient receptor potential receptors vanilloid 1 (trpv1) and ankyrin 1 (trpa1) in nasal polyposis
THE 8TH JOINT MEETING OF THE EUROPEAN NEUROPEPTIDE CLUB AND THE AMERICAN SUMMER NEUROPEPTIDE CONFERENCE, BOSTON, 2011. MÁJUS 22-25. (poszter)

Idézhető kivonatok (absztraktok)

E. Tóth, J. Kun, A. Perkecz, T. Tornoczky, I. Gerlinger, J. Szolcsányi, E. Pinter
Expression of transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1) and Ankyrin 1 (TRPA1) receptors in chronic rhinosinusitis
RHINOLOGY (2014) 52:S25:625
IF: 2,8

J. Kun, **E. Toth**, A. Perkecz, T. Tornoczky, I. Gerlinger, J. Szolcsanyi, E. Pinter
Expression of transient receptor potential receptors vanilloid 1 (TRPV1) and ankyrin 1 (TRPA1) in nasal polyposis
JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 48:(1) pp. S197-S198. (2012);
IF: 2,504

Kun J, **Toth E**, Perkecz A, Tornoczky T, Gerlinger I, Szolcsanyi J, Pinter E
The presence of non-neural transient receptor potential receptors vanilloid 1 (trpv1) and ankyrin 1 (trpa1) in rhinosinusitis
ACTA PHYSIOLOGICA 202:(S683) pp. 64-65. (2011)
IF: 0,453

Tóth Eszter, Török László, Kett Antónia, Réti Judit, Gerlinger Imre
Az aszpirin deszenzibilizáció tapasztalatai klinikánkon
FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 56:(3) p. 187. (2010)

Török László, Bakó Péter, **Tóth Eszter**, Szabadi Éva, Szanyi István, Lujber László, Gerlinger Imre
Távoli áttétek laphám eredetű malignus fej-nyaki daganatokban: esetismertetések
FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 56:(3) p. 188. (2010)

Az összes publikáció (teljes közlemények) kumulatív impakt faktora

IF: 6,392