

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) szerepe a
humán szebociták és dendritikus sejtek biológiai folyamatainak
szabályozásában**

Tóth István Balázs

Témavezető: Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Témavezető:

Dr. Bíró Tamás, Ph.D.

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Damjanovich Sándor, akadémikus

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Benyó Zoltán, Ph.D.

Dr. Bakó Éva, Ph.D.

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Damjanovich Sándor, akadémikus

Opponensek:

Dr. Helyes Zsuzsanna, Ph.D.

Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:

Dr. Bakó Éva, Ph.D.

Dr. Benyó Zoltán, Ph.D.

A védés helye és ideje:

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, I. Belgyógyászati
Klinika tanterme

2009. december 16., 14 óra

BEVEZETÉS

Kapszaicin szenzitív neuronok – a kapszaicin celluláris hatásai

A kapszaicin a világszerte széles körben fogyasztott erős paprika (*Capsaicum annum*) csípős ízéért felelős vegyület. Terápiás felhasználási lehetőségei széleskörűek, jótékony hatásáról számoltak be különböző fájdalom szindrómák mellett pruritusz, pszoriázis, klaszter-fejfájás, detruzor hiperreflexia, valamint rinopátia eseteiben is. Különböző *in vitro* kísérletes rendszerekben a kapszaicin képes volt gátolni az indukált karcino- és mutagenézist is.

A kapszaicin egy alkaloida, ami a fenol származék vanillil csoportot is tartalmazza. Később más vanilloid vegyületről is kimutatták, hogy képes a kapszaicin hatásait utánozni, ilyen pl. a kutyatejfélék közzé tartozó *Euphorbia resiniferából* izolált reziniferatoxin (RTX), amelyet a kapszaicin ultrapotens analógjának tartanak.

A kapszaicin hatásmechanizmusát elsősorban szenzoros neuronokon tárták fel. Az 1960-as évektől ismert, hogy a primer szenzoros neuronok efferens funkcióval is bírnak, ami kapszaicin előkezeléssel gátolható. A spinális hátsó gyöki (DRG) és trigeminális szenzoros ganglionokban elhelyezkedő primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportja szelektív érzékenységet mutat a kapszaicinnal szemben. Ezek a „kapszaicin-szenzitív neuronok” főleg kis méretű sejttesttel és vékony (C-típusú) axonnal jellemezhető polimodális nociceptorok.

A kapszaicin és a rokon vanilloid vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három jól elkülöníthető fázissal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolását követő excitáció: a kapszaicin megnöveli a sejtmembrán Ca^{2+} és Na^{+} -permeabilitását, ami depolarizációhoz vezet. Ezután mind homológ, mind heterológ deszenzitizáció lép fel, vagyis a sejtek a vanilloidok és egyéb fájdalomkeltő anyagok iránt is érzéketlenné válnak. Végül a kapszaicint nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva citotoxicitás váltható ki, mely

leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek és a kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható.

A kapszaicin támadáspontja: a vanilloid receptor-1 (TRPV1)

A kapszaicin funkcionális támadáspontja egy nem-specifikus, főleg Ca^{2+} -ra permeábilis kationcsatornának bizonyult. Az 1990-es évek végére kiderült, hogy ez a kapszaicin receptor vagy vanilloid receptor-1 a tranziens receptor potenciál (TRP) család vanilloid (TRPV) alcsaládjába tartozik; ma ennek megfelelően tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) néven említi a szakirodalom. A TRPV alcsalád tagjai különböző vanilloid csoportot tartalmazó, főleg növényi eredetű anyagokkal aktiválhatók, de mindmáig a TRPV1 az egyetlen ismert kapszaicin érzékeny receptor.

Az 1997-ben elsőként karakterizált patkány TRPV1 egy 838 aminosavból felépülő 95 kDa tömegű fehérje, amit egy 2514 nukleotidból álló DNS szakasz kódol. A klónozott receptor funkcionálisan nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis kationcsatornaként működik ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10). A receptor 6 transzmembrán doménből épül fel, mind az N-, mind a C-terminális intracellulárisan helyezkedik el, az ötödik és hatodik domén között található „hurok” hozza létre a csatorna pórusát. A receptor feltehetően tetramer formában alkot funkcionális csatornát, a vanilloid kötőhely az intracelluláris oldalon található. A TRPV1 számos egyéb kötő- és szabályozó hellyel rendelkezik, ilyen például az intracelluláris N-terminális szakaszon található hat darab ismétlődő ankirin domén, melyek potenciális protein kináz A foszforilációs helyek, vagy az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek. Mindezek lehetőséget teremtenek arra, hogy a csatorna működését számos különböző ágens befolyásolja.

A TRPV1 endogén aktivációja

A TRPV1-et az exogén vanilloid vegyületeken kívül számos, a szervezetben képződő, főként a fájdalom kialakításában szerepet játszó ágens is képes aktiválni (endovanilloidok). Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátora („ligandja”) a hőmérséklet emelkedése (~43°C) és a pH csökkenése (acidózis, pH 5,5). Az acidotikus pH nem képes a TRPV alcsalád többi tagjának aktiválására, de a TRPV1 mellett a TRPV2-4 csatornák is hőérzékenységet mutatnak.

Ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladásos mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, intra- és extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működésének pozitív befolyásolására. Ezek a mediátorok részben saját (főként metabotróp) receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén a receptor szabályozó helyein kifejtett hatásokon keresztül csökkentik a TRPV1 aktivációs küszöbét, vagyis szenzitizálják a csatornát. A szenzitizáció folyamatában szerepet játszhat a TRPV1-et körülvevő lipidaftok átrendeződése is, például a TRPV1 aktivitását gátló foszfinozitol-bisz-foszfát (PIP₂) foszfolipáz-C (PLC) általi bontása.

A közvetett szenzitizáció mellett a lipidmediátorok egy része közvetlenül is képes a TRPV1-et aktiválni. Ilyen pl. az eredetileg endogén kannabinoidként leírt anandamid, az N-arachidonil-dopamin vagy a különböző lipoxigenáz termékek.

A neurális TRPV1 szerepe

A szenzoros neuronokon expresszáldó TRPV1-et szenzitizáló anyagok a receptor hőérzékenységi küszöbét csökkenthetik, így a TRPV1 már fiziológiás hőmérsékleten is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hiperalgéria). Mindezek alapján a TRPV1-et a különféle (pl. kémiai és termális) nociceptív

ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekintik.

A primer szenzoros neuronok az érző funkció mellett efferens működésekkel is bírnak. Aktiválódásukat követően neuropeptideket (pl. P-anyagot (SP), kalcitonin gén-kapcsolt peptidet (CGRP)) szabadítanak fel lokálisan. Ezek az innervált szervek nem-neuronális sejtjein (hízósejteken, makrofágokon, limfocitákon, stb.) hatva résztvesznek a lokális trofikus, vazoregulatorikus és immunmodulatorikus folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet. Amellett, hogy a TRPV1 aktiválása neurogén gyulladást indukálhat, a TRPV1 agonisták többszöri alkalmazása a sejtek neuropeptid raktárait kiürítve és deszenzitizációt okozva gátolhatja is a gyulladásos folyamatokat. A neuropeptidek kóros mennyiségű felszabadulása hozzájárulhat bizonyos, a gyulladásos adaptáció kisiklásaival jellemezhető kórképek (asthma bronchiale, colitis ulcerosa, interstitiális cystitis, arthritis stb.) kialakulásához is, így ezek kezelésében a TRPV1 farmakológiai befolyásolása is szerepet kaphat.

A TRPV1 aktiváció hatására a szenzoros efferens terminálisokból szomatosztatin is felszabadul, ami viszont a keringésbe kerülve szisztémásan antiinflammatorikus és analgesztikus hatású a szenzoros végződések efferens működésének blokkolása révén. A TRPV1 aktiváció hatására az anterior hepaticus plexusból felszabaduló szomatosztatinnak feltételezhetően inzulinszenzitizáló hatása is van, a pancreas ellátó TRPV1 pozitív szenzoros rostok eliminálása viszont javítja a glükóztoleranciát.

A TRPV1 a termoregulációban is szerepet játszhat. A kapszaicin akut szisztémás alkalmazása hipotermiát vált ki, a TRPV1 antagonisták viszont megemelik a testhőmérsékletet. A hatás támadáspontja még nem tisztázott. A perifériás szenzoros neuronokon expresszáldó TRPV1 befolyásolja a hőszabályozást, de a célzottan hipotalamuszba adagolt kapszaicin is képes hipotermiát okozni.

A központi idegrendszer különböző területeire adott kapszaicin biológiai választ eredményez és jellegzetes morfológiai változásokat okoz. [³H]RTX alkalmazásával nagy affinitású specifikus kötődést sikerült detektálni különböző agyi struktúrákon. A TRPV1 jelenlétét kimutatták a gerincvelő hátsó szarvában, a hídban, a cerebellumban, limbikus területeken, a cortexben és a striatumban, valamint a talamusz és a hipotalamusz egyes régióiban.

A TRPV1 expressziója és szerepe nem-neurális sejteken

Már a receptor klónozásával egyidejűleg TRPV1-specifikus mRNS szakaszokat mutattak ki a vesében, azóta pedig egyre több nem-neurális szövet- és sejtfeleségen igazolták a TRPV1 expresszióját és funkcióját, pl. a humán húgyhólyag simaizmán, epiteliális és intersticiális sejtjein.

Szintén kimutatták a TRPV1 jelenlétét a gyomor mucosa epiteliális sejtjein, miközben azt találták, hogy a molekula előzetes aktivációja kivédheti az alkohol és a savas közeg okozta sejtpusztulást. A TRPV1 expresszálódik a légutakban is, a kapszaicin a bronchiális simaizomzat kontrakcióját, az epitélsejteken pedig Ca^{2+} beáramlást indukál és proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$) felszabadulását, majd a sejtek apoptózisát váltja ki.

A TRPV1 aktivációja C6 glióma sejteken és timocitákon is növeli a sejtek Ca^{2+} szintjét és apoptózist indukálhat. A TRPV1-et megtalálták mikrogliasejteken is, aktivációja sejtpusztulást indukált, amit az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése és a következményes mitokondriális károsodás váltott ki.

A kapszaicin tumorosan transzformált sejtek apoptózisát is képes kiváltani. Ezt demonstrálták agydaganatból származó glioblasztóma sejtvonalon, C6 glióma sejteken, humán méhnyakrákból származó HeLa sejteken, májrákból létrehozott SK-Hep-1 sejtvonalon, emlő karcinómából származó MCF-7 sejteken, de a fenti esetek egyikében sem igazolódott a TRPV1 szerepe a folyamatban. Habár a prosztatarákból származó LNCaP és PC-3 sejtvonalak

funkcionális formában expresszálják a TRPV1-et, és a kapszaicin képes kiváltani ezen sejtek apoptózisát, az apoptózis feltehetően a TRPV1-től független útvonalon valósul meg. Úgy tűnik, a vanilloid vegyületek a TRPV1-től független úton is okozhatnak apoptózist.

Számos kutatás számolt be a kapszaicin hatásáról immunkompetens sejteken is. A kapszaicin a humán monocitákon, makrofágokon, és limfocitákon is kiváltotta a SP felszabadulását, és fokozta a humán polimorfonukleáris sejtek migrációját. Funkcionális TRPV1 jelenlétét igazolták hízósejteken, ahol a kapszaicin interleukin-4 (IL-4) felszabadulást váltott ki. A TRPV1 jelenlétét neutrofil granulocitákban és humán perifériás vér limfocitákban gazdag mononukleáris sejtjein is leírták. Bakteriális lipopoliszacharid (LPS) indukált egér makrofágokon a kapszaicin gátolta a PGE₂ szintézisét és az indukálható nitrogénmonoxid-szintáz (iNOS-t), valamint az NF-κB transzkripció faktor inaktivációját eredményezte.

A faggyúmirigy és a szebociták

A faggyúmirigy (glandula sebacea) a bőr dermiszében lokalizálódó holokrin elválasztású mirigy, elsősorban szőrtüszőhöz kapcsolódik. Sejtjei a szebociták, legismertebb funkciójuk a faggyú (szébum) termelése. A faggyú elsősorban neutrális lipidekből tevődik össze; nagyobb mennyiségben tartalmaz triglicerideket, szabad zsírsavakat, viasz-észtereket, koleszterint és szkvalént. Állatokban szerepet játszik a bunda impregnációjában és a hőszigetelésben, egyes fajok esetén pedig ferromonok kiválasztására specializálódtak faggyúmirigyek. Mivel emberben ezek a funkciók jórészt felismerhetetlenek, sokáig úgy gondolták, hogy az emberi faggyúmirigy csupán egy evolúciós reliktum. Az utóbbi idők kutatásai azonban igazolták, hogy a szebociták szerepe nem merül ki a bőr passzív, barrier funkciójának kialakításában. Számos parakrin, endokrin és immunológiai funkciójukkal döntően hozzájárulnak a bőr normál homeosztatikus működésének kialakításához.

A faggyúmirigy funkcióinak felderítéséhez nagyban hozzájárultak az *in vitro* is vizsgálható szebocita modellek. A primer tenyészetek limitált fenntarthatósága miatt a kutatások számára igen hasznosnak bizonyultak a humán faggyúmirigyből létrehozott sejtvonalak, mint pl. az SZ95. Az *in vitro* modellek egyre mélyebb bepillantást engednek a szebociták molekuláris szintű regulációjába is.

Régóta ismert, hogy az androgének serkentik a szébum termelését. A szebociták azonban maguk is rendelkeznek a szteroid hormonok produkciójához szükséges enzimaparátussal, valamint képesek az androgének metabolizálására is. Az androgének hatásának kifejlődéséhez a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR-ok) aktivitása is szükséges. A PPAR-ok központi szerepet játszanak a lipidanyagcsere szabályozásában számos szövet sejtjeiben, így a szebociták működésében is kulcsszerepet játszanak, fokozzák a sejtek terminális differenciálódását és az ezt kísérő lipidszintézist. A szebociták differenciálódása arachidonsavval is indukálható; fokozódik a lipidek felhalmozódása és a sejtek apoptózisa. A szebociták differenciálódásának és proliferációjának szabályozásában a növekedési hormon, az inzulin és az inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I) is szerepet játszik, de a hipotalamusz-hipofízis rendszer mediátorai közül a kortikotropin releasing hormonról (CRH), az α -melanocitastimuláló hormonról (α MSH) és a β -endorfinról is leírták, hogy receptoraikon keresztül fokozzák a sejtek lipidszintézisét.

A szebociták résztvesznek a bőr immunológiai funkcióiban és a gyulladásos folyamatok szabályozásában is. Képesek különböző citokinek (IL-6, IL-1 β , TNF α), valamint lipid természetű gyulladásos mediátorok (LTB₄, PGE₂) termelésére, amely folyamatok szabályozásában a PPAR-ok szintén szerepet játszhatnak. Bakteriális induktorok hatására antimikrobiális peptideket is termelnek, valamint fokozódik a proinflammatórikus TNF α és az IL-8/CXCL8 termelésük is. A SP is fokozza a gyulladásos mediátorok szintjét, valamint a faggyúmirigyek differenciálódását és proliferációját.

A dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek csontvelői őssejtekből származó, hivatásos antigénprezentáló sejtek, melyek elsősorban a specifikus immunválasz beindításában játszanak fontos szerepet. Jelen vannak a legtöbb szerv kötőszöveti állományában, valamint a nyirokcsomók és a lép T-sejteiben gazdag területein. Monocitászzerű, éretlen előalakjaik igen kis hányadban megtalálhatóak a keringésben, nagyobb sűrűségben a nyálkahártyák felszínén és Langerhans-sejtekként a bőrben. Ebben a differenciáltsági állapotban pinocitózással vagy fagocitózissal kórokozókat, membrán fragmentumokat, oldott fehérjéket képesek felvenni. Ezt követően aktiválódnak, majd a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol T- és B-limfocitákkal kerülnek kölcsönhatásba. Eközben érési folyamaton mennek át, antigénfelvevő képességüket elvesztik, azonban fokozottan expresszálják a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláit.

Az éretlen dendritikus sejtek számos patogénekre jellemző molekuláris mintázatot felismerni képes ún. Pattern Recognition Receptorral (PRR) rendelkeznek, ilyenek pl. a Toll-like receptorok (TLR). Aktiválódásuk indukálja a dendritikus sejtek érését és antigénspecifikus immunválaszok kialakulásához vezet. Szintén a PRR-ok közé tartoznak a dendritikus sejtekre jórészt specifikus C típusú lektinek (pl. CD205, CD206/mannóz receptor, CD207/langerin vagy a CD209/DC-SIGN - dendritikus sejt-specifikus ICAM-3-kötő nonintegrin), melyeknek a receptor-mediált endocitózis kiváltásában van szerepük.

Az antigének felvételét követően a dendritikus sejtek a nyirokcsomókba migrálnak, amiben különböző kemokin hatások fontos szerepet játszanak. A migrációt indukálják pl. a CCL19/CCL21 (kemokin C-C motívum ligand 19 és 21) kemokinek az aktivált sejteken megjelenő CCR7 (kemokin C-C motívum receptor 7) kemokinreceptorokon keresztül. A sejtek közben érési folyamatokon mennek át, fokozódik az MHC-II molekulák expressziója, de egyéb érési

markerek (pl. CD83) expressziója is indukálódik. A dendritikus sejtek aktiválhatják a citotoxikus (T_c) és a helper (T_h) T-sejteket, valamint a B sejteket is. Az immunológiai szinapszis kialakításában az antigénprezentáló sejtek az MHC komplexek mellett expresszálódó ún. kostimulációs molekulákkal (pl. CD40, CD80, CD86) is résztvesznek. A dendritikus sejtek a direkt sejt-sejt interakció mellett pro- és antiinflammatorikus citokinek széles skálájának (pl. IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , stb.) szekréciójával is szabályozzák a kialakuló immunválaszt.

Eredetük alapján a dendritikus sejteknek két fő populációja különíthető el: a mieloid dendritikus sejtek és a limfoid markerekkel bíró plazmocitoid dendritikus sejtek. Jelen munkánk során mieloid dendritikus sejteken vizsgáltuk a TRPV1 funkcióját.

A mieloid dendritikus sejtek CD34 pozitív előalakokból származnak, mieloid markereket is expresszálnak (pl. CD11b, CD11c, CD13, CD33, mannóz receptorok). Ezek közé tartoznak az epidermális Langerhans-sejtek és a velük szoros rokonságot mutató intersticiális dendritikus sejtek is. A mieloid dendritikus sejtek nagyfokú heterogenitást mutatnak, amit a különböző aktiváló szignálok is befolyásolhatnak. A bakteriális (LPS) vagy a T sejt szignálok által aktivált dendritikus sejtek a limfociták T helper-1 (T_h1) irányú indukcióját, ezen keresztül a celluláris immunválasz kialakítást serkentik, míg egyes antiinflammatorikus molekulák (pl. TGF β , IL-10, PGE $_2$, szteroidok) gátolják a T_h1 irányú indukciót és a T_h2 sejtek (humorális immunválasz) kialakulását segítik elő.

A perifériás vérből izolált monocitákból granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor GM-CSF és IL-4 jelenlétében *in vitro* differenciáltatott éretlen dendritikus sejtek a humán mieloid dendritikus sejt vizsgálatok egyik leggyakrabban használt modelljei. A monocita eredetű dendritikus sejtek is eltérően reagálnak a különböző aktivációs szignálokra. Interferon- γ (IFN γ) hatására olyan érett dendritikus sejtekké alakulnak, melyek IL-12-t termelnek, és

a T sejteket T_H1 irányba differenciáltatják, PGE_2 -vel történő aktivációjuk viszont a T_H2 irányú differenciációnak kedvez. A PGE_2 szerepet játszik a CCR7 expressziójának és a sejtek migrációjának szabályozásában is.

A TRPV1 szerepe a bőr biológiájában – a korábbi kutatások eredményei

A különböző bőr és bőr alatti fájdalmak enyhítésére világszerte használatosak kapszaicin tartalmú krémek. Ezek kedvező hatását klasszikusan a C-rostok akut excitációjával, majd az ezt követő deszenzitizációjával és az efferens végződésekből történő neuropeptid felszabadulás változásával magyarázzák. A topikálisan alkalmazott kapszaicint számos neuropátiás fájdalommal járó állapotban kipróbálták, de klinikai kísérletek igazolták hatékonyságát viszketéssel járó megbetegedésekben is.

Míg a viszketés és a fájdalom terápiájában alkalmazott kapszaicin hatását klasszikusan a vegyület idegi elemeken kifejtett hatásával szokták magyarázni, a legújabb modellek felhívják a figyelmet a bőr nem-neurális sejtjeinek szerepére. Ca^{2+} -csatornaként működő TRPV1 jelenlétét mutatták ki epidermális keratinocitákon, ahol a kapszaicin fokozta a ciklooxygenáz-2 (COX-2) expresszióját, valamint az IL-8 és a PGE_2 felszabadulását. A TRPV1-et *in situ* kimutatták humán bőr hajfollikulusaiban, annak külső és belső gyökérhüvely, valamint mátrix keratinocitáin, verejtékmirigyen, erek endotéliumán, Langerhans-sejteken, valamint a faggyúmirigy sebocitáin. A receptor aktivációja humán szőrtüszőkön gátolta a sejtek proliferációját, apoptózist indukált, valamint a hajciklus katagén irányú eltolódását okozta.

Habár egyre több információval rendelkezünk a TRPV1 szerepéről a bőr működésének szabályozásában, számos sejttípussal kapcsolatban meglehetősen hiányosak az ismereteink. Korábbi kutatásaink ugyan bizonyították a receptor jelentőségét a szőrtüsző biológiájában, a pilosebaceus egység másik tagján, a faggyúmirigyen eddig csupán a TRPV1 *in situ* expresszióját írtuk le, és nem

rendelkezünk funkcionális adatokkal a szebociták működésében betöltött szerepéről.

Szintén kevés és ellentmondásos adattal rendelkezünk a TRPV1-ről a bőrben is megtalálható dendritikus sejteken. Egér dendritikus sejteken leírták a TRPV1 expresszióját, és kimutatták, hogy a kapszaicin indukálja a sejtek érését és migrációját, ami TRPV1 knock-out egereken nem tapasztalható. Egy másik tanulmányban viszont nem találtak bizonyítékot a TRPV1 expressziójára a fenti sejteken. Még kevesebbet tudunk a téma humán vonatkozásairól. Laboratóriumunk korábbi munkája során *in situ* kimutattuk a TRPV1 expresszióját a Langerhans-sejteken, de nincs információnk a receptor szerepéről a humán dendritikus sejteken.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során a TRPV1 expressziójának és funkcionális szerepének *in vitro* vizsgálatát tűztük ki célul humán faggyúmirigy és dendritikus sejt modelleken.

A szebociták vizsgálatához a humán faggyúmirigy eredetű immortalizált SZ95 szebocita sejt vonalat választottuk, és az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A humán *in situ* faggyúmirigyekhez hasonlóan kifejeződik-e a TRPV1 az SZ95 szebocitákon is?
2. A TRPV1 farmakológiai aktiválása kapszaicinnal befolyásolja-e az SZ95 szebociták olyan alapvető életműködéseit, mint a sejtek differenciálódása (lipidtermelése), életképessége és proliferációja?
3. Hatással van-e a TRPV1 aktivációja a szebociták immunológiai szerepére, mediátor-termelésére?
4. A kapszaicin hatásait a szebocitákon valóban a TRPV1-en keresztül fejti-e ki?

5. Milyen jelátviteli útvonalak/génexpressziós változások közvetíthetik a TRPV1 aktiváció hatásait?

A humán dendritikus sejtek vizsgálatához a perifériás vérből izolált monocitákból GM-CSF és IL-4 segítségével *in vitro* differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket használtunk. Kísérleteink során az alábbiakra voltunk kíváncsiak:

1. Expresszálódik-e a TRPV1 a humán monocitákon és a belőlük differenciálódó éretlen dendritikus sejteken? Változik-e a receptor expressziója a differenciálódási folyamat során? Képes-e a TRPV1 a humán monocita eredetű dendritikus sejteken Ca^{2+} csatornaként működni?
2. Szerepet játszhat-e a TRPV1 a humán monociták dendritikus sejté történő differenciálódásában, illetve aktivációja befolyásolja-e a folyamatot?
3. Milyen hatással van a TRPV1 aktivációja a sejtek életképességére?
4. Befolyásolja-e a TRPV1 aktivációja a már differenciálódott éretlen dendritikus sejtek működését? Indukálja-e a sejtek érését, kiváltja-e aktivációjukat?
5. Befolyásolja-e a TRPV1 aktivációja a dendritikus sejtek proinflammatorikus citokinekkal indukált érését és aktivációját?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt kapszaicinből, kapszazepinből, jodo-reziniferatoxinból (I-RTX) és arachidonsavból a kezelések végkoncentrációjához képest 1000-szeres koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a

szükséges koncentrációkat 1000-szeres hígítást alkalmazva, így az oldószer koncentrációja a kezelések folyamán maximum 0,1% volt.

SZ95 szebociták tenyésztése

A humán faggyúmirigyből származó SZ95 szebocitákat főtális borjú savóval, 1 mM CaCl_2 -dal, humán rekombináns epidermális növekedési faktorról és antibiotikumokkal kiegészített Sebomed Basal Medium tápoldatban tenyésztettük. Az oldat Ca^{2+} koncentrációja kb. 1,25 mM volt (normál vagy magas Ca^{2+} tartalmú oldat), míg alacsony Ca^{2+} tartalmú oldat esetén CaCl_2 -ot nem tettünk a tenyésztőmédiumba, így a Ca^{2+} koncentrációt 0,25 mM-ra állítottuk be.

Monocita szeparálás humán perifériás vérből

A trombocitamentes humán perifériás vérkészítményt Ficoll grádiensen centrifugáltuk, majd a monomorfonukleáris sejteket tartalmazó rétegből monocitákat szeparáltunk. A monocitákat CD14 specifikus paramágnesezett antitestek felhasználásával mágneses sejtszeparátor segítségével izoláltuk.

A dendritikus sejtek differenciálódása monocitákból

Az izolált monocitákat szérummentes A-IMV tápoldatban tenyésztettük 2×10^6 sejt/ml denzitásban. A tenyésztő médiát IL-4-gyel és GM-CSF-rel egészítettük ki, amit az izolálást követő második napon megismételtünk. Az IL-4 és a GM-CSF jelenlétében a monociták az ötödik napon éretlen dendritikus sejtekké differenciálódtak, amit sejtspecifikus markerek áramlásos citometriával történt kimutatásával igazoltunk. Kísérleteinkben a differenciálódás során a monocitákat/dendritikus sejteket naponta kezeltük különböző koncentrációkban alkalmazott kapszaicinnel, kapszazepinnel vagy a két anyag kombinációjával.

A dendritikus sejtek érése és aktivációja

Az éretlen dendritikus sejtek érését és aktivációját egy többkomponensű proinflammatorikus citokinkoktéllal indukáltuk 24 órán keresztül. Ez A-IMV médiumban az alábbi citokineket tartalmazta: 80 ng/ml GM-CSF, 5 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF α és 1 μ g/ml PGE₂.

Morfológiai vizsgálatok áramlásos citometriával

A sejtek fenotípusos karakterizálása áramlásos citometriával meghatározott forward, illetve side scatter alapján történt. Előbbi a sejtek méretével, míg utóbbi azok granuláltságával korrelál pozitívan, így ezen paraméterek segítségével (is) vizsgáltuk az SZ95 szebociták, valamint a dendritikus sejtek differenciálódását.

A sejtfelszíni markerek vizsgálata áramlásos citometriával

A monocitákat és a dendritikus sejteket áramlásos citometriás mérésekhez FACS pufferben gyűjtöttük össze 10⁶ sejt/ml denzitásban. A sejtfelszíni markerek jelöléséhez felhasznált egér monoklonális antitestek a következők voltak: anti-CD14-PE (fikoeritrin-konjugált CD14 ellenes antitest), anti-CD83–FITC (fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált CD83 ellenes antitest); anti-DC-SIGN/CD209-FITC, anti-CCR7-PE, valamint az immunglobulin izotípusnak megfelelő kontrollok. A fluoreszcenciát FACSCalibur áramlásos citométer segítségével állapítottuk meg, majd az adatokat a WinMDI szoftverrel analizáltuk.

Az apoptózis vizsgálata áramlásos citometriával

Az SZ95 szebociták apoptózisának vizsgálata szintén áramlásos citometriával történt előzetes FITC konjugált Annexin-V és propidium-jodid jelölés után. Kétnapos kezelést követően a sejteket learattuk és Annexin-V-

FITC/Propidium Iodide Apoptosis Kittel jelöltük. A fluoreszcencia intenzitást Coulter Epics XL áramlásos citométer segítségével detektáltuk.

RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk AMV reverz transzkriptázt és random primert felhasználva. A cDNS-ből kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (Q-PCR) segítségével mutattuk ki a vizsgált specifikus transzkripteket TaqMan primerek és próbák alkalmazásával a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol alapján. A génexpresszió relatív mennyiségét a Δ CT módszer segítségével határoztuk meg.

Immuncitokémia

Az SZ95 sejteket steril fedőlemezre szélesztettük és 60%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük. A monocitákat is steril fedőlemezre szélesztettük, és a fentebb leírtak szerint 5 nap után nyertük a fedőlemezen kitapadó éretlen dendritikus sejteket. A sejteket fixálást követően permeabilizáltuk, majd mosás és blokkolás után anti-TRPV1 primer antitesttel inkubáltuk. Fluoreszcens mikroszkópiához a metszeteket Texas-Reddel vagy FITC-tal konjugált másodlagos antitesttel jelöltük. Fénymikroszkópos immunhisztokémia során a TRPV1 kimutatása tormaperoxidáz polimer konjugált másodlagos antitesttel történt, az előhívást pedig diamino-benzidinel végeztük.

Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat plasztikai műtétek során nyert normál humán bőrmintákból készített, paraffinba ágyazott metszeteken végeztük. A TRPV1 kimutatására a streptavidin-biotin-komplex eljárást alkalmaztuk. A

szövetben előforduló endogén peroxidázok gátlására és a nonspecifikus kötőhelyek blokkolása után a metszeteket TRPV1 ellenes elsődleges, majd biotinilált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az streptavidin-konjugált torna-peroxidáz biotinhoz való kötődése után a peroxidáz-aktivitás kimutatására DAB kromogént alkalmaztunk.

Western blot

A sejteket lízispufferben learattuk, majd jégen ultrahangos feltárást végeztünk. A lizátumokból β -merkaptoetanol és SDS hozzáadásával mintát készítettünk majd a fehérjéket főzéssel denaturáltuk. A mintákból azonos protein tartalmú mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. A proteint nitrocellulóz membránra transzferáltuk, a membrán szabad kötőhelyeit blokkoltuk, majd TRPV1, illetve citokróm-C ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk. Mosást követően az elsődleges antitestet másodlagos, torna peroxidázzal-konjugált antitesttel jelöltük. Az immunreakciók eredményét kemilumineszcens szubsztrát kit segítségével tettük láthatóvá, a jeleket Intelligent Dark Box alkalmazásával detektáltuk, majd Image Pro Plus szoftver segítségével meghatároztuk az optikai denzitást.

RNS interferencia (RNSi)

Az SZ95 sebecitákat 50-70%-os konfluencia elérésekor 40 nM humán TRPV1 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) Stealth RNAi oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamin 2000 transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával nem mutat homológiát (scrambled siRNS). A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően naponta ellenőriztük Western blot és kvantitatív PCR

segítségével. Kísérleteinket a TRPV1 expresszió minimális szintje mellett végeztük.

Az intracelluláris lipidek detektálása

A szebaceus lipidek szemikvantitatív detektálásához a sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük. A sejtek paraformaldehiddel történő fixálása után a lipid cseppeket Oil Red O lipid festékkel festettük, a sejtmagokat Mayer-féle haematoxilinnal tettük láthatóvá. A színreakció kifejlődését követően a sejteket lefedtük és mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

A kvantitatív mérésekhez a szebocitákat fekete falú, átlátszó aljú, 96-lyukú lemezekben tenyésztettük. A felülúszók leszívása után a sejteket mostuk, majd PBS-ben oldott Nile Red-del 20 percig inkubáltuk. A lipidekben oldódó Nile Red fluoreszcenciáját fluoreszcens microplate reader-rel (FLIPR) detektáltuk. A neutrális lipidek detektálásához 485 nm-es excitációs és 565 nm-es emissziós hullámhosszat, a poláros lipidek esetében 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmaztunk.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) vizsgálata

Az előzetesen fedőlemezre szélesztett dendritikus sejteket kalcium érzékeny fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM) feltöltöttük, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor segítségével, majd a fluoreszcens emissziót fotoelektron-sokszorozóval 510 nm-en detektáltuk (PTI Deltascan). A mérés során a Tyrode-oldatban oldott kapszaicint a vizsgált sejt közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. A $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadossal (F_{340}/F_{380}) jellemeztük.

Az élő sejtek számának meghatározása

A sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük és számukat MTT alapú kolorimetriás assay segítségével határoztuk meg. A sejtekről a tápoldatot eltávolítottuk, és MTT oldattal inkubáltuk. Ezután a képződött formazán kristályokat izopropanolban oldott sósavban feloldottuk, majd a koncentrációt kolorimetriás úton 550 nm-en mértük. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával.

A mitokondriális membránpotenciál meghatározása

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legelső markere. A sejtek mitokondriális membránpotenciálját MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit segítségével vizsgáltuk. Az apoptotikus folyamatok esetén a sejtek mitokondriális membránpotenciálja csökken, így kevesebb festék halmozódik fel bennük. A vizsgálathoz a sejteket fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekben tenyésztettük. A mitokondriális membránpotenciál csökkenését pozitív kontrollként alkalmazott karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazonnal (CCCP-vel) váltottuk ki. A felülúszók leszívása után a sejteket DiIC₁(5) munkareagenssel inkubáltuk, majd 630 nm-es excitációs és 670 nm-es emissziós hullámhosszon mértük a DiIC₁(5) fluoreszcenciát.

A citotoxicitás vizsgálata

Az akut (24 h) kapszaicin kezelés citotoxikus hatásának vizsgálata a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) felszabadulás mérésével történt. Az enzimaktivitást egy kétlépéses enzimatis folyamat segítségével határoztuk meg, mely a resazurin redukcióján keresztül narancs-fluoreszcens resorufin képződéséhez vezet. A keletkező resorufin mennyiségét 545 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk.

A hosszútávú kezelések esetleges citotoxikus hatását SYTOX Green jelöléssel vizsgáltuk. A SYTOX Green nagyméretű fluoreszcens festék, amely a sejtmagban a duplaszálú DNS-hez kötődik. Az ép sejtek membránján nem permeál, így csak a ruptúrált membránú, nekrotikus sejtekbe jut be, ahol zölden fluoreszkál. A SYTOX Green jelölést követően 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett mértük a fluoreszcenciát.

A fagocitózis vizsgálata

A dendritikus sejteket 96 lyukú fekete falú, átlátszó aljú lemezekben differenciáltattuk. A megfelelő kezeléseket követően fluoreszceinnel konjugált *Escherichia coli* biopartikulumokat tartalmazó oldattal inkubáltuk a sejteket. 2 óra inkubációt követően az oldatot eltávolítottuk és a sejteket tripánkék oldattal mostuk, majd 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszon mértük a fagocitált baktériumok fluoreszcenciáját.

A citokinfelszabadulás vizsgálata

A sejtek által kiválasztott citokinek meghatározásához a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, majd a felszabadult IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és TNF α mennyiségét specifikus OptEIA kiteket (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) felhasználva határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

A humán faggyúmirigy in situ és a humán SZ95 szebociták in vitro egyaránt expresszálják a TRPV1-et

Immunhisztokémia segítségével kimutattuk, hogy a humán faggyúmirigyek *in situ* expresszálják a TRPV1-et. A TRPV1 expressziója kifejezettebb volt a faggyúmirigy centrális, differenciált szebocitáin, míg a mirigy perifériáján elhelyezkedő differenciálatlan sejtek kevésbé intenzíven jelölődtek.

A receptor protein és az azt kódoló mRNS kifejeződik a humán faggyúmirigy eredetű SZ95 sejtvonalon is. Az immuncitokémia során a receptor expresszióját inhomogénnek találtuk, ami feltehetően összefügg a sejtek differenciáltsági állapotával. Western blot és kvantitatív PCR során azt tapasztaltuk, hogy a TRPV1 expressziója mind protein, mind pedig mRNS szinten fokozódik a konfluencia növekedésével, vagyis a differenciálódás fokozódásával.

A kapszaicin szelektíven csökkenti az SZ95 szebociták bazális és arachidonsav által indukált lipidszintézisét, de nem befolyásolja életképességüket

A továbbiakban megvizsgáltuk a TRPV1 specifikus aktivátor kapszaicin hatását az SZ95 sejtek lipidszintézisére és terminális differenciálódására.

Áramlásos citometriás vizsgálataink során 10 μ M-ban alkalmazott kapszaicin 48 órás kezelést követően sem növelte a sejtek granulációját vagy méretét. Ezzel ellentétben, mint azt Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás méréseinkkel kimutattuk, már 24 óra elteltével dóziszfüggő módon csökkentette a poláris és neutrális lipidek bazális szintézisét.

A kapszaicin nem volt hatással az SZ95 sejtek életképességére. A 48 órás 10 μ M koncentrációban alkalmazott kapszaicin kezelés nem változtatta meg sem az apoptotikus (Annexin-V+/propidium-jodid–), sem pedig a nekrotikus

(propidium-jodid+) sejtek arányát a tenyészetekben. A 24 órán keresztül alkalmazott kapszaicin a vizsgált 0,1 nM – 10 μ M koncentráció-tartományban nem változtatta meg az élő sejtek számát, továbbá nem változott a sejtek mitokondriális membránpotenciálja és G6PD felszabadulása sem; vagyis a kapszaicin nem indukált sem apoptotikus, sem pedig nekrotikus változásokat.

Pozitív kontrollként arachidonsavat alkalmaztunk, melyről már korábban is kimutatták, hogy serkenti az SZ95 szebociták terminális differenciálódását. Kísérleteinkben az arachidonsav fokozta a szebociták differenciálódását, 48 óra elteltével a sejtek granulációja és mérete is megnőtt. Oil Red O és Nile Red jelölés segítségével kimutattuk emellett, hogy 50 μ M arachidonsav már 24 óra elteltével fokozta a differenciálódásra jellemző neutrális lipidek felhalmozódását. Ezzel párhuzamosan arachidonsav hatására a sejtek mitokondriális membránpotenciálja jelentősen csökkent (apoptózis), de nem nőtt a G6PD felszabadulás; azaz az arachidonsav nem volt citotoxikus hatású. 100 μ M arachidonsav alkalmazását követően 48 órával késői apoptotikus/nekrotikus változásokat is megfigyelhettünk; a tenyészetekben megnőtt az Annexin-V és a propidium-jodid pozitív sejtek aránya.

A bazális lipidszintézis gátlásán túl a kapszaicin dóziszfüggően gátolta az arachidonsav lipidszintézist fokozó hatását is, viszont nem befolyásolta az arachidonsav indukálta apoptotikus folyamatokat (a két anyag együttes alkalmazása nem váltott ki nekrozist).

A kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatását a TRPV1 közvetíti

Mivel a TRPV1 Ca^{2+} -csatorna, megvizsgáltuk a Ca^{2+} szerepét a kapszaicin hatásának kifejlődésében. Ha a kapszaicin kezelést csökkentett Ca^{2+} -tartalmú médiumban is megismételtük, a kapszaicin gátló hatása elmaradt, mind a bazális, mind az arachidonsav által indukált lipidszintézis esetében. Ez felvetette a TRPV1 Ca^{2+} -csatorna szerepét a kapszaicin hatásában.

Ezt a feltevést farmakológiai vizsgálatokkal is alátámasztottuk. A TRPV1 specifikus antagonistá I-RTX jelenlétében a kapszaicin nem fejtette ki hatását; sem a bazális, sem az arachidonsav által indukált lipidszintézist nem volt képes csökkenteni. Érdekes megfigyelésnek adódott, hogy az I-RTX jelenlétében az arachidonsav hatása, kismértékben ugyan, de fokozódott, ami a TRPV1 endogén aktivitására utalhat.

Végezetül RNS interferencia technikát alkalmazva is vizsgáltuk a TRPV1 szerepét a kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatásában. Az SZ95 sebocitákat a TRPV1 mRNS-ére specifikus siRNS-ekkel transzfektáltuk, majd Western blot, valamint Q-PCR alkalmazásával kimutattuk, hogy mindkét alkalmazott siRNS hatékonyan csökkentette a TRPV1 expresszióját. A transzfekciót követő második napon, mikor a géncsendesítés a leghatékonyabbnak mutatkozott, a sejteket a korábbiakhoz hasonlóan kapszaicin és arachidonsav kombinációjával kezeltük, majd vizsgáltuk a lipidszintézisüket. A TRPV1 transzláció gátlása esetén a kapszaicin gyakorlatilag hatástalannak bizonyult; sem a bazális, sem az arachidonsav indukált lipidszintézist nem volt képes gátolni. Az arachidonsav viszont kis mértékben bár, de hatásosabbnak mutatkozott a TRPV1 csendesített sejtekben, ami ismét csak arra utal, hogy a TRPV1 endogén aktivitása konstitutíven gátolhatja a lipidszintézist. Eredményeink összhangban állnak az I-RTX kezelés esetén tapasztaltakkal, ezért kijelenthetjük, hogy a kapszaicin lipidszintézist gátló hatását a TRPV1-en keresztül fejteti ki.

A kapszaicin megváltoztatja a lipidszintézist szabályzó gének expresszióját és befolyásolja egyes citokinek felszabadulását

A kapszaicinról már korábban leírták, hogy képes a génexpressziót, valamint egyes citokinek felszabadulását is megváltoztatni. Ezért kvantitatív PCR segítségével megvizsgáltuk a lipidszintézis szabályozásában központi szerepet játszó PPAR-ok és az azokkal heterodimert alkotó retinoid-X receptorok (RXR) expresszióját és annak változását a kapszaicin hatására. 1

μM -ban alkalmazott kapszaicin 24 óra elteltével (mely időn belül hatékonyan gátolta a sejtek lipidszintézisét is) valamennyi vizsgált gén expresszióját csökkentette a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Ez arra utal, hogy a TRPV1-hez kapcsolódó jelátviteli útvonalak gátolják a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expresszióját.

Specifikus ELISA technikák alkalmazásával megvizsgáltuk a felszabaduló IL-1 β , IL-6 és TNF α mennyiségét is, mely proinflammatorikus citokinek termelődését SZ95 szebocitákon már korábban is igazolták. A kapszaicin csökkentette az IL-1 β felszabadulását, de nem változtatta meg az IL-6 és a TNF α mennyiségét.

A hosszútávú kapszaicin kezelés dózisfüggően eltérő hatású az SZ95 szebociták proliferációjára

Korábbi munkáink során azt állapítottuk meg, hogy a hosszútávú (>3-5 nap) kapszaicin kezelés izolált szőrtüsző és keratinocita tenyészetekben csökkentette a proliferációt és apoptózist indukált. Ezért kíváncsiak voltunk arra is, a szebociták életképességét/proliferációját hogyan változtatja meg a hosszútávon alkalmazott kapszaicin kezelés.

A szebocitákat nagy denzitásban szélesztettük, a tápoldat szérum tartalmát pedig 3%-ra csökkentettük. Ilyen körülmények között a sejtek életképessége 6 nap alatt sem csökkent, ugyanakkor proliferációt sem tapasztaltunk. Kimutattuk, hogy a kis koncentrációban (0,1-100 nM) naponta alkalmazott kapszaicin serkentette a sejtek proliferációját, míg nagy koncentráció (>1 μM) gátolta azt és csökkentette a sejtek életképességét. A kis koncentrációban alkalmazott kapszaicin hosszútávú proliferációt fokozó hatása TRPV1 specifikusnak bizonyult, hiszen az I-RTX jelenléte vagy az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ csökkentése hatékonyan gátolta. Ezzel szemben sem az I-RTX, sem pedig az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ csökkentése nem volt képes kivédeni a nagy koncentrációban alkalmazott kapszaicin élő sejtszámot csökkentő hatását; tehát ez a hatás független a TRPV1-től. A nagy

koncentrációban (10-30 μ M) alkalmazott kapszaicin 6 nap után a sejtmembrán integritását is károsította (SYTOX Green jelölés intenzitása megnőtt), vagyis toxikusnak bizonyult a sejtekre.

A humán monocita eredetű dendritikus sejtek expresszálják a TRPV1-et

Kísérleteink során megvizsgáltuk a TRPV1 expresszióját a humán monocita eredetű dendritikus sejteken. Az éretlen dendritikus sejteket humán perifériás vérből izolált monocitákból 5 nap alatt differenciáltattuk IL-4 és GM-CSF jelenlétében. A differenciálódás során a dendritikus sejtek felszínéről eltűnik a monocitákra specifikus CD14 marker és megjelenik a monociták felszínén nem expresszálódó dendritikus sejtekre specifikus DC-SIGN.

A TRPV1 a monocitákon és az éretlen dendritikus sejteken egyaránt kifejeződik mind protein, mind pedig mRNS szinten. A TRPV1 expressziója az éretlen dendritikus sejtek differenciálódása során, a monocitákhoz képest, jelentősen fokozódott. Bebizonyosodott az is, hogy a protein szint változása kb. egy nap késéssel követi az mRNS szintben tapasztalt változásokat, ami a TRPV1 protein megnövekedett turn overére utal a differenciálódási folyamat során. Ez alapján felvetődött a TRPV1 szerepe a dendritikus sejtek differenciálódásában.

A dendritikus sejteken kifejeződő TRPV1 funkcionális Ca^{2+} csatornaként működik. Az akutan alkalmazott kapszaicin rövid időn belül megnövelte az érett és éretlen dendritikus sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját, mely hatás kimoshatónak bizonyult; a kapszaicin elvételét követően hamarosan visszaállt a normál Ca^{2+} -szint. A sejtek reaktivitását pozitív kontrollként ATP-t alkalmazva ellenőriztük.

A TRPV1 aktivációja gátolja a humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódását

Megvizsgáltuk azt is, hogy milyen hatással van a TRPV1 aktivációja a dendritikus sejtek differenciálódására. Ennek során a sejteket kapszaicinnal és/vagy IL-4 és GM-CSF kombinációjával kezeltük és vizsgáltuk a sejtek felszínén a DC-SIGN kifejeződését. Ha a perifériás vérből izolált monocitákat öt napon keresztül naponta kezeltük kapszaicinnal (IL-4 és GM-CSF hiányában), a sejteken nem tapasztaltunk DC-SIGN expressziót, vagyis nem differenciálódtak dendritikus sejtekké. Ezzel szemben az önmagában alkalmazott IL-4 és GM-CSF hatékonyan indukálta a sejtek DC-SIGN expresszióját, vagyis a monociták dendritikus sejtekké differenciálódtak. Ha azonban a két kezelést kombináltuk – vagyis miközben a dendritikus sejtek differenciálódását IL-4 és GM-CSF segítségével indukáltuk öt napon keresztül –, a 0. naptól naponta alkalmazott kapszaicin kezelés csökkentette a DC-SIGN expresszió mértékét, vagyis gátolta a dendritikus sejtek differenciálódását. A kapszaicin csökkentette emellett a dendritikus sejtmarker CD11c és az MHC-II osztályba tartozó HLA-DR kifejeződését is.

A kísérletek 5. napján vizsgáltuk a kapszaicin hatását a sejtek életképességére is. A dendritikus sejtek differenciálódása során a 0. naptól naponta alkalmazott kapszaicin kezelés nem befolyásolta az élő sejtek számát. Emellett a kapszaicin nem volt hatással sem a mitokondriális membránpotenciálra, sem pedig a sejtmembrán integritására, vagyis sem az apoptotikus, sem pedig a nekrotikus folyamatokat nem befolyásolta (miközben gátolta a dendritikus sejtek differenciálódását).

A továbbiakban megvizsgáltuk a TRPV1 szerepét a kapszaicin hatásában. A kapszaicin mellett a receptor-specifikus antagonistá kapszazepinnel is kezeltük a sejteinket, szintén a differenciálódás 0. napjától, naponta alkalmazva. A kapszaicin dóziszfüggő módon gátolta a DC-SIGN expresszióját, amely hatás

kapszazepin egyidejű adagolásával kivédhetőnek bizonyult. Ezek az eredmények egyértelműen arra utaltak, hogy a monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódása során a kapszaicin hatását a TRPV1 közvetíti.

Ha a kapszaicint csak a differenciálódás 3. napjától alkalmaztuk, hatása teljes mértékben elmaradt. Eszerint a kapszaicin a monocita – dendritikus sejt differenciálódási folyamat valamilyen korai lépését gátolhatta.

A TRPV1 aktivációja gátolja a humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek fagocitózist

Az IL-4 és GM-CSF kombinációjával differenciáltatott éretlen dendritikus sejtek fagocitózist FITC konjugált *Escherichia coli* biopartikulumok segítségével vizsgáltuk. A 0. naptól naponta kapszaicinnal kezelt sejtek fagocitotikus aktivitása jelentős mértékben csökkent a kontrollhoz képest. Ez a hatás szintén TRPV1 specifikus, hiszen kapszazepinnel hatékonyan gátolni lehetett. A kapszaicin tehát a sejtfelszíni differenciálódási markerek expressziója mellett az éretlen dendritikus sejtek funkcióját/fagocitózist is TRPV1 specifikusan gátolta.

Megvizsgáltuk azt is, hogy milyen hatással van a TRPV1 aktivációja a már differenciálódott éretlen dendritikus sejtek funkcióira. Az IL-4 és GM-CSF jelenlétében 5 nap alatt differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket csak a kísérlet 5. napján kezeltük kapszaicinnal, majd vizsgáltuk a FITC-konjugált *E. coli* biopartikulumok fagocitózist. A fagocitotikus aktivitás csupán két órás kapszaicin kezelést követően is szignifikánsan csökkent, ami kapszazepinnel gátolhatónak bizonyult, vagyis a hatást a TRPV1 közvetítette. A kapszaicin Ca^{2+} -mentes Hank oldatban sem volt képes gátolni a fagocitózist, ami szintén alátámasztja a TRPV1, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna szerepét.

A kapszaicin nem indukálja a humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek érését, de gátolja a proinflammatorikus citokinek által indukált érést és aktivációt

Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 aktivációja befolyásolja-e az éretlen dendritikus sejtek érését és aktivációját. Ha a monocitákból differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket 24 órán keresztül kezeltük kapszaicinnal, nem tapasztaltuk az érett dendritikus sejteket jellemző érési (CD83) és migrációs (CCR7) felszíni markerek indukcióját. Eszerint a kapszaicin nem váltotta ki a dendritikus sejtek érését.

Ezzel szemben 24 órán át alkalmazott proinflammatorikus citokinkoktól a CD83 és a CCR7 expresszióját is indukálta, vagyis a dendritikus sejtek érését és aktivációját váltotta ki. A citokinkoktéllal együtt alkalmazott kapszaicin viszont csökkentette az érett dendritikus sejteken mért CD83 és a CCR7 expressziót, vagyis gátolta a proinflammatorikus citokinkoktól érést indukáló hatását. A proinflammatorikus citokin koktél hatására a CD40, a CD80, a CD86 és a HLA-DR expressziója is fokozódott az éretlen dendritikus sejteken tapasztaltakhoz képest, amely expresszió fokozódást a kapszaicin, bár különböző mértékben, de minden esetben képes volt gátolni.

Az alkalmazott proinflammatorikus citokinkoktól egyes citokinek (IL-6, IL-8, IL-10 és IL-12) mRNS szintű expresszióját is indukálta, míg más citokinek (TNF α , IL-1 β) expresszióját nem változtatta meg. Az aktivációval egyidejűleg alkalmazott kapszaicin szelektíven csökkentette a proinflammatorikus IL-6 és IL-12B transzkriptek mennyiségének a növekedését, de nem befolyásolta az IL-8 kifejeződését. Fokozta viszont az antiinflammatorikus IL-10 expresszióját.

ELISA technikával megvizsgáltuk a felülúszóba kiválasztott IL-6, IL-8, IL-10 és IL-12 protein mennyiségét is. Az mRNS expresszióhoz hasonlóan a kapszaicin gátolta az aktiváció során fokozódó IL-6 és IL-12 felszabadulást. Ugyanakkor ezzel egyidejűleg növelte az IL-10 szintjét, de az IL-8 felszabadulását nem befolyásolta. A kapszazepin jelenléte ebben az esetben is

gátolta a kapszaicin hatásait, ami arra utal, hogy a hatás a TRPV1-en keresztül valósult meg.

DISZKUSSZIÓ

A TRPV1 gátolja a humán szebociták differenciálódását és csökkenti azok lipidszintézisét

Korábban a szenzoros neuronok mellett a bőr számos nem-neurális sejtfeleségén is kimutatták a TRPV1 jelenlétét, többek között az epidermisz és a szőrtüsző keratinocitáin, a verejtékmirigyekben, az erek endotél és simaizom sejtjein, hízósejteken, valamint a faggyúmirigyeken és az epidermisz dendritikus sejtjein, a Langerhans sejteken. A receptor funkcionalitását normál humán epidermális keratinocitákon és HaCaT keratinocita sejtvonalon egyaránt igazolták, valamint kimutattuk a szerepét a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában is. Jelen munkánkban a TRPV1 funkcióját vizsgáltuk humán szebocitákon és monocita eredetű dendritikus sejteken.

A TRPV1 kifejeződését sikeresen mutattuk ki humán faggyúmirigyeken és SZ95 szebocitákon is. A TRPV1 expressziója inhomogén volt és feltehetően fokozódott a sejtek differenciálódása során. Ezt támasztja alá, hogy (1) a TRPV1 expressziója *in situ* erőteljesebb a differenciált szebocitákon, mint a differenciálatlan sejteken; valamint, hogy (2) *in vitro* a nagyobb konfluenciájú SZ95 tenyészeteken magasabb TRPV1 expressziót tapasztaltunk. Korábban a szőrtüszőben szintén a TRPV1 expresszió fokozódását tapasztaltuk az anagén-katagén átmenet során, a szőrtüszők kezelése kapszaicinnal pedig elősegítette a katagén fázis kialakulását.

A szebocitákat 24 órán keresztül kapszaicinnal kezelve nem tapasztaltuk a sejtek terminális differenciálódását; sem a sejtek lipidszintézise, sem pedig az apoptotikus folyamatok intenzitása nem fokozódott. Nem tapasztaltunk változást

a sejtek morfológiájában és életképességében sem, viszont a kapszaicin gátolta a szebociták bazális lipid szintézisét.

A szebociták terminális differenciálódását arachidonsavval tudtuk indukálni, ami a sejtek lipidszintézisét és apoptózisát egyaránt fokozta. Az arachidonsav hatásai közül a kapszaicin szelektíven gátolta a lipidszintézis fokozódását, azonban az apoptózis indukcióját nem védte ki. A kapszaicin hatását a TRPV1 farmakológiai (I-RTX) és molekuláris biológiai (RNAi) gátlása egyaránt kivédte.

Korábban a normál humán epidermális keratinocitákon, HaCaT sejtvonalon és a szőrtüsző külső gyökérhüvely (outer root sheath – ORS) keratinocitáin is leírták a kapszaicin TRPV1-specifikus hatásait: a kapszaicin a sejtek differenciálódását, apoptózisát, IL-8 és PGE₂ termelését indukálta, TRPV1-Ca²⁺ mediált útvonalon keresztül. Jelen vizsgálatainkban a külső kalcium-koncentráció csökkentése gátolta a kapszaicin kiváltotta válaszokat, ami szintén alátámasztja a TRPV1 Ca²⁺-csatorna szerepét a fenti folyamatban.

A TRPV1-mediálta [Ca²⁺]_{IC} fokozódás a neuronok mellett gliómasejteken, timocitákon vagy keratinocitákon is gátolta a sejtek proliferációját és apoptózisukat indukálta. Ezzel szemben az SZ95 szebocitákon a 24 órán keresztül alkalmazott kapszaicin nem befolyásolta a sejtek életképességét; nem indukálta sem apoptotikus, sem nekrotikus pusztulásukat; és nem védte ki az arachidonsav apoptózist indukáló hatását sem. A hosszútávú kapszaicin kezelés kis koncentrációk alkalmazása esetén TRPV1 specifikusan fokozta az SZ95 szebociták proliferációját. Ezek szerint a TRPV1 aktiváció hatása jelentős sejtspecifitást mutathat, akár egyetlen szervben belül is, mint pl. a bőrben a keratinociták és a szebociták esetében. Ennek magyarázata lehet, hogy a két sejtféleség funkcióit a Ca²⁺-koncentráció változása eltérő módon befolyásolja. A magas Ca²⁺-koncentráció a keratinociták differenciálódását váltja ki; ezzel szemben a szebociták differenciálódását a környezet alacsony Ca²⁺-tartalma

fokozza, míg a nagyobb Ca^{2+} -koncentráció a proliferációjukat serkenti, és gátolja a differenciálódásukat.

A kapszaicinnal ellentétben az arachidonsav fokozta az SZ95 sebociták differenciálódását, megnövelte lipidtermelésüket és apoptózist indukált. Habár az arachidonsav származékai (eikozanoidok, endokannabinoidok) fokozhatják a TRPV1 működését, úgy tűnik, a sebocitákon a TRPV1 nem vesz részt az arachidonsav hatásának mediálásában. Más vizsgálatainkban az endokannabinoidok célpontjaként a CB2 kannabinoid receptort azonosítottuk az SZ95 sebocitákon, melynek aktiválása serkentette a sejtek differenciálódását.

Az arachidonsav és lipoxigenáz termékei, valamint az endokannabinoidok egyaránt lehetnek a PPAR-ok aktivátorai. A PPAR-ok a lipidmetabolizmus fontos regulátorai, szerepet játszanak a sebociták lipidtermelésének szabályozásában is. Kísérleteinkben a kapszaicin a PPAR-ok és az azokkal heterodimert alkotó RXR-ok expresszióját is csökkentette.

A sebociták képesek gyulladásos mediátorok (IL-1 β , IL-6, IL8/CXCL8, TNF α , LTB $_4$, PGE $_2$) termelésére, ami különböző gyulladásinduktorok hatására fokozódhat. Mindezen mediátorok központi szerepet játszhatnak gyulladásos kórképek kialakulásában, pl. aknéban. Az akné egy komplex etiológiájú gyulladásos kórkép; patogenezisében egyaránt szerepet játszik a keratinociták hiperproliferációja, a sebociták fokozott és megváltozott lipidtermelése, valamint patogén mikroorganizmusok elszaporodása. A folyamat során fokozódhat a keratinociták és sebociták gyulladásos mediátor termelése, aminek hatására az érintett follikulusokat leukociták infiltrálják. Akné kórokozó mikroorganizmusok nélkül is kifejlődhet, ha a gyulladásos mediátorok termelődése pl. PPAR aktiváció vagy fokozott androgén hatás miatt megnő. *In vitro* az arachidonsav indukálja a sebocitákon aknéban tapasztalható változások egy részét; fokozza a sejtek lipidszintézisét, valamint a gyulladásos mediátorok termelését. Mivel a TRPV1 aktivációja gátolta az arachidonsav indukálta lipidtermelést, a PPAR gének expresszióját és a proinflammatorikus IL-1 β

felszabadulását, felvetődik a receptor farmakológiai aktivációjának lehetősége az akné terápiájában.

A TRPV1 gátolja a humán dendritikus sejtek differenciálódását, érését és aktivációját

A Langerhans sejtekhez hasonlóan a humán perifériás vérből izolált monocitákból származó éretlen és az aktivált, érett dendritikus sejteken is igazoltuk funkcionális TRPV1 kifejeződését. A TRPV1 expressziója a monociták dendritikus sejtté történő differenciálódása során jelentősen fokozódott, ami felveti a receptor szerepét a folyamatban

A naponta alkalmazott kapszaicin önmagában nem indukálta a monociták dendritikus irányú differenciálódást, viszont gátolta az IL-4 és GM-CSF indukálta dendritikus sejt differenciálódást; csökkentette a DC-SIGN és CD11c dendritikus sejtmarkerek, valamint a HLA-DR kifejeződését. A kapszaicin folyamatos jelenléte a fagocitózist is gátolta, viszont nem befolyásolta a sejtek életképességét. A kapszaicin hatása feltehetően a TRPV1-en keresztül valósult meg, hiszen kapszazepinnel gátolhatónak bizonyult.

A humán monocita eredetű dendritikus sejteket 24 órán keresztül kapszaicinnal kezelve nem tapasztaltuk a sejtek érését, de már két órás kapszaicin kezelés is TRPV1 specifikusan, Ca^{2+} -mediált útvonalon keresztül gátolta a sejtek fagocitózist. Eszerint a TRPV1 aktivációja nemcsak a dendritikus sejtek differenciálódását, hanem a már differenciálódott dendritikus sejtek működését is gátolta.

Az éretlen dendritikus sejteket citokinek kombinációjával indukálva megnőtt a migrációs marker CCR7, a HLA-DR, valamint számos kostimulációs molekula (CD40, CD80, CD83, CD86) expressziója és egyes citokinek transzkripciója (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12). A citokinekkel indukált érés során alkalmazott kapszaicin TRPV1 specifikusan gátolta a migrációs és érési

markerek expresszió fokozódását, valamint a proinflammatorikus IL-6 és IL-12 termelődését, viszont fokozta az antiinflammatorikus IL-10 szintézisét.

A monocita eredetű dendritikus sejtek a mieloid dendritikus sejtek jó modelljei; egér modellen igazolták, hogy a Langerhans sejtek *in vivo* is differenciálódhatnak monocitákból. A monocita-dendritikus sejt átalakulásban – a szebociták regulációjához hasonlóan – fontos szerepet játszik a PPAR γ , a folyamat során fokozódik expressziója és aktivitása. Az LPS-indukált érés során a PPAR γ aktiválása csökkenti egyes érési markerek expresszióját, valamint gátolja a dendritikus sejtek citokintermelését.

A PPAR ligandokhoz hasonlóan a kapszaicin is gátolta a dendritikus sejtek differenciálódását, csökkentette az érési markerek expresszióját és egyes interleukinok termelődését. A TRPV1 aktiváció a monocita-dendritikus sejt átalakulás korai eseményeit gátolta, amikor a PPAR γ aktivációja is a legkifejezettebb. Így elképzelhető, hogy a kapszaicin indukált TRPV1 szignalizációban – a szebocitákon tapasztaltakhoz hasonlóan – a dendritikus sejteken is szerepet játszhat a PPAR γ . A legfrissebb kutatások igazolták, hogy a TRPV1 szignalizáció képes lehet a PPAR γ expresszióját és funkcióját gátolni: az adipocitákon expresszálandó TRPV1 aktivációja Ca²⁺ beáramlást váltott ki, ami csökkentette a PPAR γ expresszióját és gátolta az adipociták differenciálódását és triglicerid szintézisét.

A humán monocita eredetű dendritikus sejteken a kapszaicin és a pozitív kontrollként alkalmazott ATP egyaránt megnövelte az [Ca²⁺]_{IC}-t. Ezeken a sejteken már korábban kimutatták számos ionotróp és metabotróp purinoreceptor jelenlétét és úgy találták, hogy ATP-vel történő aktiválásuk növeli az [Ca²⁺]_{IC}-t és fokozza a sejtek érését. Más kutatások szerint az ATP ionotróp purinoreceptorokon keresztül gátolhatja is egyes proinflammatorikus citokinek termelődését és a T_H1 immunválasz kialakulását. Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy a Ca²⁺-hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak sokrétűen befolyásolhatják a dendritikus sejtek működését, függően a szignalizációt

elindító receptortól, a Ca^{2+} -koncentráció változás jellegétől, vagy a különböző egyéb (aktivációs) szignálok jelenlététől.

A ciklikus nukleotidok szintjének emelése gátolja a CD1a+ és CD14-dendritikus sejtek kialakulását és a sejtek későbbi LPS indukált érését, de nem befolyásolja a DC-SIGN kifejeződését, és fokozza az MHC-II molekulák expresszióját. Eszerint a cAMP/cGMP – a TRPV1 mediált jelátviteli folyamatokkal szemben – nem a monocita-dendritikus sejt átalakulás korai lépéseit gátolja.

Eredményeink alapján a TRPV1 aktivációja a monocita eredetű dendritikus sejteken antiinflammatorikus hatású, mind a dendritikus sejtek differenciálódását (DC-SIGN expresszió), fagocitózist, antigénprezentációját (HLA-DR expresszió), migrációját (CCR7 expresszió), indukált érését (kostimulációs molekulák expressziója) és egyes proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-12) termelését gátolja, miközben fokozza az antiinflammatorikus IL-10 szintézisét és felszabadulását.

A TRPV1 aktivátor kapszaicin gyulladáscsökkentő hatásáról már számos munkában beszámoltak. Ebben a hatásban több mechanizmus is szerepet játszhat: a kapszaicin (1) a TRPV1-et expresszáló szenzoros neuronokat tartósan aktiválva csökkentheti a neurogén gyulladást közvetítő neuropeptidek mennyiségét vagy serkentheti antiinflammatorikus mediátorok (pl. szomatosztatin) felszabadulását; (2) gátolhatja a makrofágok működését, az NF- κ B útvonal és az indukálható nitrogémonoxid-szintáz, valamint a ciklooxygenáz gátlásán keresztül; (3) jelen vizsgálataink szerint a dendritikus sejteken TRPV1-en keresztül egyaránt gátolta a sejtek differenciálódását és érését.

Jelen eredményeinkkel szemben egér csontvelő eredetű dendritikus sejteken azt találták, hogy a TRPV1 aktivációja serkenti a dendritikus sejtek érését és aktivációját, és inkább proinflammatorikus szignálokat közvetíthet. Az eltérő eredmények háttérében jelentős módszertani különbségek is lehetnek pl. a faji különbségek (egér vs. humán), a dendritikus sejt tenyésztési modellek

különbségei (csontvelő vs. monocita eredetű dendritikus sejtek) vagy az alkalmazott kísérleti elrendezés (részben *in vivo*, KO egerek vs. *in vitro*) tekintetében. Az *in vivo* kezelések esetén a TRPV1 aktiváció hatására a szenzoros neuronokból felszabaduló peptidek is befolyásolhatják a dendritikus sejtek aktivációját. Jelen munkánkban *in vitro* kezeléseket végeztünk az előzetesen izolált sejteken, így ilyen módosító hatásokkal nem kell számolnunk.

Más vizsgálatok egér csontvelői eredetű dendritikus sejteken nem tudták kimutatni a TRPV1 jelenlétét, de kimutatták a vele szoros rokonságban álló TRPV2-t. Korábbi kutatások kimutatták a TRPV1 és TRPV2 heteromerizációjának lehetőségét, de a dendritikus sejtek esetében erről egyelőre nincs információ.

A TRPV1 sokoldalú szerepet játszik a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában

Jelen eredményeink a humán faggyúmirigy sebocitáin és a humán dendritikus sejteken írták le a TRPV1 funkcionális szerepét, tovább bővítve ismereteinket a TRPV1 lehetséges működéséről a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában.

A TRPV1 a bőr számos sejtfeleségén expresszálódik, aktivációja változatos hatásokkal járhat, ráadásul a receptor aktivációja az egyes sejteken, pl. mediátorok felszabadításán keresztül, befolyásolhatja a más sejteken expresszálódó TRPV1 működését is. A szenzoros neuronokon expresszálódó TRPV1 szerepet játszik a fájdalmas ingerek transzmissziójában és a termális hiperalgémia kialakulásában, így a neuronok TRPV1-en keresztül történő deszenzitizációja szerepet játszhat különböző fájdalmas kórképek terápiájában. A TRPV1 aktivációja ugyanakkor neuropeptidek felszabadulásával is jár, ami neurogén gyulladás kialakulásához vezethet. Egyes neuropeptidek gátolhatják a bőr dendritikus sejtjeinek immunfunkcióit, de a SP inkább proinflammatorikus hatású; aktiválja az immunsejteket és fokozza a sebociták terminális

differentiálódását, így hozzájárulhat pl. az akné kialakulásához. Ilyen módon a neurális (proinflammatorikus) és a szebocitákon (antiinflammatorikus) expresszáldó TRPV1 ellentétes hatásokat közvetíthet.

A TRPV1-et expresszáldó szenzoros neuronok meghatározott alcsoportjai viszketést kiváltó, pruritogén ingereket is közvetíthetnek, így a neurális TRPV1 aktivációja/deszzenzitizációja befolyásolhatja a viszketés kialakulását. A TRPV1 azonban a bőr nem-neurális elemein keresztül is kiválthatja pruritogén mediátorok felszabadulását, de a deszenzitizáció révén hozzájárulhat a kapszaicin fenti kórképekben mutatkozó jótékony hatásához is. A TRPV1-et aktiváló lipid mediátorok egy része (pl. anandamid) a kannabinoid receptorokat is képes aktiválni, ami szintén antipruritogén hatásúnak tűnik. Anandamid a TRPV1 aktiváció hatására is felszabadulhat, így valószínűnek tűnik, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszer a viszketés modulációja során (is) funkcionális kölcsönhatásban áll egymással.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a szőrtüszőben és a keratinocitákon, valamint a szebocitákon expresszáldó TRPV1 aktivációja a bőr biológiai folyamatainak szempontjából ellentétes hatásokat közvetít. A szőrtüszőben és a keratinocitákon differenciálódást és apoptózist vált ki, csökkenti a proliferációt, katagén regressziót indukál, míg a szebocitákon gátolja a lipidek szintézisét és a sejtek differenciálódását, valamint serkenti proliferációjukat. A keratinocitákon fokozza a gyulladásos mediátorok szintézisét, míg szebocitákon csökkenti az IL-1 β felszabadulását. Ilyen módon a TRPV1 aktivációja a keratinocitákon és a szebocitákon keresztül ellentétesen is befolyásolhatja a bőr szenzoros és immunológiai folyamatait. Tovább árnyalja a képet, hogy ezek a sejtek számos olyan mediátor (PG-ok, LT-ek, IL-ok, stb.) termelésére képesek, amelyek parakrin vagy autokrin módon befolyásolhatják a TRPV1 működését a bőr számos sejtfeleségén.

A TRPV1 immunológiai hatása közvetlenül a bőr immunsejtjein (pl. hízó- és Langerhans sejteken) keresztül is megvalósulhat. A hízósejteken a kapszaicin

kalciumbeáramlást és IL-4 felszabadulást vált ki, jelen vizsgálatainkban pedig humán dendritikus sejteken igazoltuk a TRPV1 funkcionalitását.

A bőr mieloid dendritikus sejtjei heterogének, két fő populációjukat az epidermális Langerhans sejtek és a dermális dendritikus sejtek alkotják. A dermális dendritikus sejtek további alcsoportokba sorolhatók, talán a legfontosabb a nyugvó (resident) és inflammatórikus dendritikus sejtek elkülönítése. A bőr dendritikus sejtjei funkcionálisan is különbözőek: a Langerhans sejtek inkább az immuntolerancia kialakításában játszanak szerepet, míg az inflammatórikus dendritikus sejtek száma egyes gyulladásos kórképekben emelkedik meg, és specifikus szerepet játszhatnak az adott kórfolyamatban.

A dendritikus sejtek farmakológiai befolyásolása a TRPV1-en keresztül számos bőrgyógyászati/immunológiai kórkép esetében felmerülhet. Eredményeink szerint az *in vitro* monocita eredetű dendritikus sejteken expresszáldó TRPV1 aktivációja a sejtek immunológiai működését gátolva antiinflammatórikus hatású. Nem tudjuk azonban, hogy a bőrben előforduló különböző dendritikus sejtpopulációk vajon egyformán reagálnak-e a TRPV1 aktivációjára, és pontosan milyen szerepet játszhatnak a kapszaicin antiinflammatórikus hatásában. Ezért még számos további vizsgálat szükségeltetik a dendritikus sejteken expresszáldó TRPV1 szerepének pontos feltárására a bőr komplex immunológiai folyamatainak szabályozásában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánk során *in vitro* vizsgáltuk a TRPV1 szerepét humán faggyúmirigy eredetű SZ95 szebocita sejtvonalon és monocita eredetű dendritikus sejteken. A humán faggyúmirigyhez hasonlóan az SZ95 szebocitákon is igazoltuk a TRPV1 jelenlétét. A TRPV1 agonista kapszaicin gátolta a szebociták bazális és arachidonsav indukálta lipidtermelését, de nem befolyásolta a sejtek életképességét. A TRPV1 specifikus gátlószer I-RTX és RNSi technika segítségével bizonyítottuk, hogy a kapszaicin hatását a TRPV1 mediálta. A Ca^{2+} -koncentráció csökkentése mellett végzett kísérleteink szerint a TRPV1 funkcionális Ca^{2+} -csatornaként vett részt a folyamatban. Ezen túl a TRPV1 aktivációja megváltoztatta a lipidanyagcsere szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok expresszióját és egyes citokinek termelését. A hosszútávú kezelés esetén a kis koncentrációban alkalmazott kapszaicin TRPV1-specifikusan fokozta az SZ95 sejtek proliferációját, míg nagy koncentrációban TRPV1-től függetlenül toxikusnak bizonyult. Humán monocitákon és a belőlük differenciálódó dendritikus sejteken szintén kimutattuk a TRPV1-et, és megállapítottuk, hogy Ca^{2+} -csatornaként működhet. A sejtek differenciálódása során a 0. naptól alkalmazott kapszaicin a TRPV1-en keresztül gátolta a dendritikus irányú differenciálódást, az éretlen dendritikus sejtekre jellemző markerek kifejeződését és a sejtek fagocitózist. A TRPV1 aktivációja nem indukálta dendritikus sejtek érését, de gátolta a fagocitózist és a proinflammatorikus citokinekkel indukált érést; csökkentette az érési markerek expresszióját és egyes gyulladásos citokinek termelését; miközben fokozta az antiinflammatorikus IL-10 szintjét. Vizsgálataink szerint a TRPV1 aktiválása gátolja a szebociták lipidszintézisét/differenciálódását és antiinflammatorikus hatású a dendritikus sejteken. Ezen eredményeink felvetik a TRPV1 szerepét a bőr immunológiai folyamatainak, valamint a bőr lipidhomeosztázisának megváltozásával járó kórképek (pl. akné) befolyásolásában.

TÓTH ISTVÁN BALÁZS *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények:

Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltmann H, Kovács L, Nagy L, Zouboulis C C, Paus R, Bíró T. (2009): Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol.* 129(2), 329-339. **IF:5,251***

Tóth BI, Benkő Sz, Szöllősi AG, Kovács L, Rajnavölgyi É, Bíró T. (2009): Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS Lett.* 583(10), 1619-1624. **IF: 3,264***

További in extenso közlemények:

Marincsák R, **Tóth BI**, 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.* 15(5), 328-335. **IF: 2,087***

Bíró T, **Tóth BI**, Haskó G, Paus R, Pacher P. (2009): The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 30(8), 411-420. **IF:9,340***

Szegedi A, Páyer E, Czifra G, **Tóth BI**, Schmidt E, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T. (2009): Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of adhesion molecules in human epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol.* 18(2), 122-129. **IF:3,259***

Czifra G, Varga A, Nyeste K, Marincsák R, **Tóth BI**, Kovács I, Kovács L, Bíró T. (2008): Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(4), 507-514. **IF:2,217**

Marincsák R, **Tóth BI**, 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:2,590**

Kiss B, Bíró T, Czifra G, **Tóth BI**, Kertész Zs, Szikszai Z, Kiss AZ, Juhász I, Zouboulis CC, Hunyadi J. (2008): Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol.* 17(8), 659-667. **IF:3,259**

Hegedűs Cs, Lakatos P, Oláh G, **Tóth BI**, Gergely S, Szabó E, Bíró T, Szabó Cs, Virág L. (2008): Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *FEBS Lett.* 582(12), 1672-1678. **IF:3,264**

Dobrosi N, **Tóth BI**, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovács L, Bíró T. (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 22(10), 3685-3695. **IF:7,049**

Telek A, Bíró T, Bodó E, **Tóth BI**, Borbíró I, Kunos G, Paus R. (2007): Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 21(13), 3534-3541. **IF:6,791**

Griger Z, Páyer E, Kovács I, **Tóth BI**, Kovács L, Sipka S, Bíró T. (2007): Protein kinase C-beta and -delta isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med.* 85(9), 1031-1042. **IF:4,820**

Bíró T, **Tóth BI**, 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**

Fülöp L, Bányász T, Szabó G, **Tóth BI**, Bíró T, Lőrincz I, Balogh A, Pető K, Mikó I, Nánási PP. (2006): Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Oxf).* 188(3-4), 163-171. **IF:2,230**

Deli T, **Tóth BI**, Czifra G, Szappanos H, Bíró T, Csernoch L (2006): Differences in purinergic and voltage-dependent signalling during protein kinase Calpha overexpression- and culturing-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *J Muscle Res Cell Motil.* 27(8), 617-630. **IF:0,944**

Czifra G, **Tóth BI**, Marincsák R, Juhász I, Kovács I, Ács P, Kovács L, Blumberg PM, 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 C delta. *Cell Signal.* 18(9), 1461-1472. **IF:4,881**

Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, Szabó G, **Tóth BI**, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP. (2005): Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res.* 65(4), 851-860. **IF:5,283**

Szabó G, Szentandrassy N, Bíró T, **Tóth BI**, Czifra G, Magyar J, Bányász T,

Varró A, Kovács L, Nánási PP. (2005): Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch.* 450(5), 307-316. **IF:3,564**

Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, **Tóth BI**, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R. (2005): A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol.* 166(4), 985-998. **IF:5,796**

Kummulatív IF: 79,930

***IF a 2008. évi JCR alapján**