

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Tóth István Balázs

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



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2009

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	6
A vanilloid receptor 1: A kapszaicin receptortól a TRPV1-ig	6
Kapszaicin szenzitív neuronok – a kapszaicin celluláris hatásai	6
A kapszaicin támadáspontja: a vanilloid receptor-1 (TRPV1)	7
A TRPV1 a tranziens receptor potenciál (TRP) család tagja	9
A TRPV1 funkciója	10
A TRPV1 endogén aktivációja	10
A neurális TRPV1 szerepe	11
A TRPV1 expressziója és szerepe nem neurális sejteken	13
A faggyúmirigy és a szebociták	14
A dendritikus sejtek	16
A TRPV1 szerepe a bőr biológiájában – a korábbi kutatások eredményei	20
CÉLKITŰZÉSEK	22
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
Felhasznált anyagok	24
SZ95 szebociták tenyésztése	24
Monocita szeparálás humán perifériás vérből	24
A dendritikus sejtek differenciálódása monocitákból	25
A dendritikus sejtek érése és aktivációja	25
Morfológiai vizsgálatok áramlásos citometriával	26
A sejtfelszíni markerek vizsgálata áramlásos citometriával	26
Az apoptózis vizsgálata áramlásos citometriával	26
RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció	27
Immuncitokémia	27
Immunhisztokémia	28
Western blot	29
RNS interferencia (RNSi)	30
Az intracelluláris lipidek detektálása	30
Az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) vizsgálata	31
Az élő sejtek számának meghatározása	32
A mitokondriális membránpotenciál meghatározása	32
A citotoxicitás vizsgálata	33
A fagocitózis vizsgálata	34
A citokinfelszabadulás vizsgálata	35
Statisztikai analízis	35
EREDMÉNYEK	36
A humán faggyúmirigy in situ és a humán SZ95 szebociták in vitro egyaránt expresszálják a TRPV1-et	36
A kapszaicin szelektíven csökkenti az SZ95 szebociták bazális és arachidonsav által indukált lipidszintézist, de nem befolyásolja életképességüket	38
A kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatását a TRPV1 közvetíti	41
A kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatását a TRPV1 közvetíti	42
A kapszaicin megváltoztatja a lipidszintézist szabályzó gének expresszióját és befolyásolja egyes citokinek felszabadulását	45
A hosszútávú kapszaicin kezelés dózisfüggően eltérő hatását az SZ95 szebociták proliferációjára	46
A humán monocita eredetű dendritikus sejtek expresszálják a TRPV1-et	48
A TRPV1 aktivációja gátolja a humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódását	50
A TRPV1 aktivációja gátolja a humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek fagocitózisát	53
A kapszaicin nem indukálja a humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek érését, de gátolja a proinflammatorikus citokinek által indukált érést és aktivációt	55
DISZKUZZIÓ	59

A TRPV1 gátolja a humán szebociták differenciálódását és csökkenti azok lipidszintézisét_	59
A TRPV1 gátolja a humán dendritikus sejtek differenciálódását, érését és aktivációját_____	62
A TRPV1 sokoldalú szerepet játszik a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában _____	67
ÖSSZEFOGLALÁS _____	72
SUMMARY _____	73
IRODALOMJEGYZÉK _____	74
TÓTH ISTVÁN BALÁZS IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE _____	88
TÁRGYSZAVAK _____	90
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS _____	91
FÜGGELÉK _____	92

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADP – Adenozin-difoszfát
AM – acetoximetilészter
ANKTM1 = TRPA1
ANOVA – Varianciaanalízis
ATP – Adenozin-trifoszfát
BCA – Bicinchoninsav
BSA – Borjú szérum albumin
[Ca²⁺]_{EC} – Extracelluláris szabad Ca²⁺ koncentráció
[Ca²⁺]_{IC} – Intracelluláris szabad Ca²⁺ koncentráció
cAMP – Ciklikus adenozin-monofoszfát
CB1 – Kannabinoid receptor-1
CCCP – karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazon
CCL17-22 – Kemokin (C-C motívum) ligand-17-22
CCR7 – Kemokin (C-C motívum) receptor-7
CD1-209 – Differenciációs klaszter 1-209
CD40L – CD40 ligand
CD45RA – CD45 nagy molekulásúlyú izoformája
cDNS – Komplementer dezoxiribonukleinsav
cGMP – Ciklikus guanozin-monofoszfát
CGRP – Kalcitonin gén kapcsolt peptid (Calcitonin gene-related peptide)
CMF-PBS – Kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer
COX-2 – ciklooxygenáz-2
CRH – kortikotropin releasing hormon
CXCL8 – Kemokin (C-X-C motívum) ligand 8 / interleukin-8 (IL-8)
CXCL10 – Kemokin (C-X-C motívum) ligand 10 / 10 kDa interferon- γ -indukált protein (IP-10)
DAB – diamino-benzidin
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DC-SIGN – Dendritikus sejt specifikus ICAM-3-kötő nonintegrin / CD209
DiIC₁(5) – 1,1',3,3',3'-hexametilindodicarbocianin-jodid
DNS – Dezoxiribonukleinsav
DRG – Hátsó gyöki ganglion (Dorsal root ganglion)
EGTA – etilén-glikol-tetraecetsav
ELISA – Enzim-kapcsolt immunosorbent assay
Fc receptor – Fc (fragment crystallizable) régiót kötő receptor
Fc ϵ RI – Nagy affinitású immunglobulin E Fc (fragment crystallizable) régiót kötő receptor
FITC – fluoreszcein-izotiocianát
G6PD – Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GAPDH – Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GM-CSF – granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
HBSS – Hank-féle pufferoldat
HEPES – 4-(2-hidroxi-1-piperazin-1-yl) piperazin-4-szulfonsav
HLA-DR – Humán leukocita antigén-DR
[³H]RTX – trícíált reziniferatoxin
IFN γ – Interferon- γ
IgE – Immunglobulin E
IGF-1 – Inzulinszerű növekedési faktor

IgG – Immunglobulin G
 IL-1-12 – Interleukin 1-12
 iNOS – indukálható nitrogénmonoxid-szintáz
 I-RTX – Jodo-reziniferatoxin
 LPS – Lipopoliszacharid
 LTB₄ – Leukotrién-B₄
 MHC – Fő hisztokompatibilitási komplex
 mRNS – Messenger ribonukleinsav
 αMSH – α-melanocitastimuláló hormon
 MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
 NF-κB – Aktivált B sejtek kappa-könnyűlánc-enhancerhez kötődő nukleáris faktora (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
 ORS – Külső gyökérhüvely (Outer root sheath)
 OX40 – Tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád 4. tagja / TNFRSF4 / CD134
 Q-PCR – kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció
 PBS – Foszfát puffer
 PBST – 1% Tween-20-at tartalmazó PBS
 PCR – Polimeráz láncreakció
 PE – Fikoeritrin
 PGE₂ – Prostaglandin-E₂
 PIP₂ – foszfoinozitol-bisz-foszfát
 PLC – foszfolipáz-C
 PPAR – Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
 PRR – Molekuláris mintázatot felismerő receptor (Pattern Recognition Receptor)
 RFU – Relatív fluoreszcencia egység
 RNS – Ribonukleinsav
 RNSi – RNS interferencia
 RTX – Reziniferatoxin
 RXR – Retinoid X receptor
 SABC – sterptavidin-biotin-komplex
 SDS – Nátrium-dodecyl-szulfát
 siRNS – kis interferáló RNS
 SP – P-anyag (Substance P)
 T_c – Citotoxikus T limfocita
 TGFβ – Transzformáló növekedési faktor-β
 T_{h1} – 1. típusú helper T limfocita
 T_{h2} – 2. típusú helper T limfocita
 T_{h17} – Interleukin-17-et termelő helper T limfocita
 TLR – Toll-like receptor
 TNFα – Tumor nekrozis faktor-α
 TRIS – Tris(hidroximetil)aminometán
 TRP – Tranziens receptor potenciál
 TRPA – Tranziens receptor potenciál ankirin transzmembrán protein alcsalád
 TRPA1 – Tranziens receptor potenciál ankirin transzmembrán protein 1
 TRPC – Tranziens receptor potenciál klasszikus / kanonikus alcsalád
 TRPM – Tranziens receptor potenciál melasztatin alcsalád
 TRPM8 – Tranziens receptor potenciál melasztatin-8
 TRPML – Tranziens receptor potenciál mukolipin 5 alcsalád
 TRPN – Tranziens receptor potenciál nem mechanoreceptor potenciál C alcsalád
 TRPP – Tranziens receptor potenciál policisztin alcsalád

TRPV – Tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád

TRPV1 – Tranziens receptor potenciál vanilloid-1 / vanilloid receptor-1 / kapszaicin receptor

TRPV2-6 – Tranziens receptor potenciál vanilloid-2-6

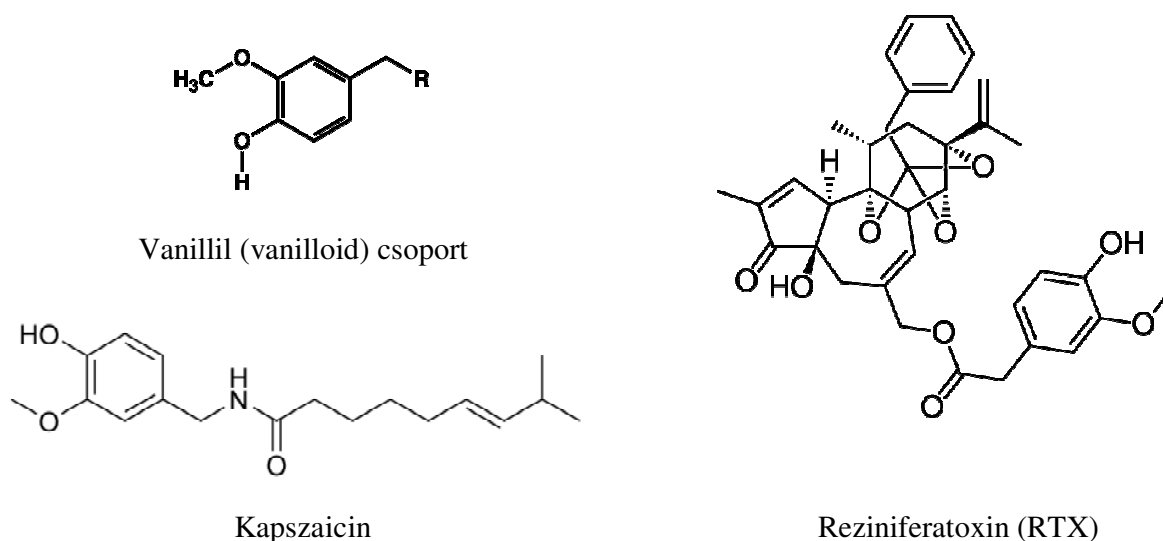
VR1 = TRPV1

BEVEZETÉS

A vanilloid receptor 1: A kapszaicin receptortól a TRPV1-ig

Kapszaicin szenzitív neuronok – a kapszaicin celluláris hatásai

A kapszaicin (8-metil-N-vanillil-6-nonenamid) (1. ábra) a világszerte széles körben fogyasztott erős paprika (*Capsaicum annum*) csípős ízéért felelős vegyület. Izolálását már a XIX. században leírták (Tresh, 1846; Szállási és Blumberg, 1999), hatásmechanizmusának tanulmányozása azonban napjainkban is számos kutatást inspirál. Az érdeklődés oka többek között a kapszaicin széleskörű terápiás felhasználási lehetőségei, hiszen jótékony hatásáról számoltak be pl. különböző fájdalom szindrómák mellett pruritusz, pszoriázis, klaszterfejfájás, detruzor hiperreflexia, valamint rhinopátia eseteiben (Hautkappe és mtsai, 1998). Különböző *in vitro* kísérletes rendszerekben azt is kimutatták, hogy a kapszaicin képes gátolni az indukált karcino- és mutagenezist (Surh, 1999).



1. ábra: A prototípusos TRPV1 aktivátor vanilloid vegyületek szerkezeti képlete

A kapszaicin hatásmechanizmusát elsősorban szenzoros neuronokon végzett kísérleteknek köszönhetően sikerült feltárni (Szolcsányi, 2004). Jancsó Miklós és munkatársai már az 1960-as években rámutattak arra, hogy a primer szenzoros neuronok efferens funkcióval is bírnak, ami kapszaicin előkezeléssel gátolható (Jancsó és mtsai, 1967; 1968). A

spinális hátsó gyöki (DRG) és trigeminális szenzoros ganglionokban elhelyezkedő primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportja, melynek sejtjei főleg a kis méretű sejttesttel és vékony (C-típusú) axonnal jellemezhető polimodális nociceptorok közül kerülnek ki, szelektív érzékenységet mutat a kapszaicinnal szemben (Jancsó és mtsai, 1977; Holzer 1991; Szállási és Blumberg, 1999), így ezeket az idegsejteket a „kapszaicin szenzitív neuron” elnevezéssel illették (Szolcsányi és Barthó, 1982).

A kapszaicin kémiai szerkezetét 1919-ben írták le (Nelson, 1919; Szállási és Blumberg, 1999), és igazolták, hogy a vegyület egy alkaloida, ami a fenol származék vanillil csoportot is tartalmazza. Később más vanilloid vegyületről is kimutatták, hogy képes a kapszaicin hatásait utánozni, ilyen például a kutyatejfélék közzé tartozó *Euphorbia resinifer*ából izolált reziniferatoxin (RTX), amelyet a kapszaicin ultrapotens analógjának tartanak (1. ábra) (Szállási és Blumberg, 1989; Winter és mtsai, 1990).

A kapszaicin és a rokon vanilloid vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három jól elkülöníthető fázissal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolását követő excitáció, melynek során a kapszaicin megnöveli a sejtmembrán Ca^{2+} és Na^{+} -permeabilitását, ami depolarizációhoz vezet (Marsh és mtsai, 1987; Wood és mtsai, 1988; Bevan és mtsai, 1993). Ezután mind homológ, mind heterológ deszenzitizáció fellép, vagyis a sejtek mind a vanilloidok (Szolcsányi, 1977; Winter és mtsai, 1990), mind egyéb fájdalomkeltő anyagok (Jancsó, 1949, Szállási és Blumberg, 1999; Jancsó, 1967; Holzer, 1991; Szállási és mtsai, 1989) iránt is érzéketlenné válnak. Végül a kapszaicint nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva a sejteken a harmadik jellegzetes folyamat, a citotoxicitás váltható ki (Jancsó és mtsai, 1977; 1985), mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, valamint ennek következtében a kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood és mtsai, 1988; Winter és mtsai, 1990; Holzer, 1991; Chard 1995; Szállási és Blumberg, 1999).

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

A kapszaicin nociceptív neuronokon való hatásait tanulmányozva már egész korán arra a következtetésre jutottak, hogy léteznie kell egy olyan specifikus receptornak, ami a vegyület hatásait közvetíti (Jancsó és mtsai, 1967). Fluoreszcens kapszaicin analógok és radioaktívan jelölt RTX kötődését vizsgálva DRG neuronok membránjában specifikus RTX kötő helyeket írtak le (Szállási és Blumberg, 1990; Winter és mtsai, 1993), valamint sikerrel mutattak ki kapszaicin analógokat kötő fehérjéket is (James és mtsai, 1988; Wood és mtsai, 1990). Az

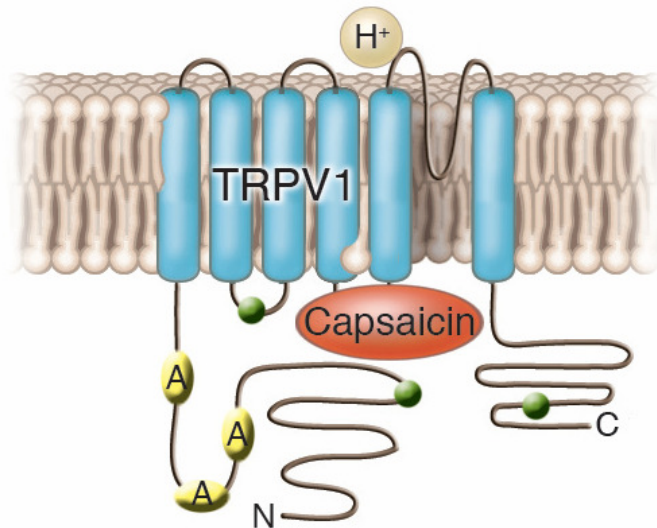
1990-es évek során kiderült, hogy kapszaicin receptor vagy vanilloid receptor-1 (akkori terminológia szerint VR-1, ma már TRPV1), a tranziens receptor potenciál (TRP) család vanilloid alcsaládjának tagja, egy nem-specifikus kationcsatorna.

A TRPV1 pontos szerkezetét a receptor klónozását követően Caterina és munkatársai határozták meg 1997-ben patkány cDNS könyvtár felhasználásával. Eredményeik szerint a patkány TRPV1 egy 838 aminosavból

felépülő 95 kDa tömegű fehérje, amit egy 2514 nukleotidból álló DNS szakasz kódol. A klónozott receptor vizsgálata során egyértelműen kimutatták, hogy funkcionálisan nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis kationcsatornaként működik (relatív permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10)

(Caterina és mtsai, 1997). A receptor 6 transzmembrán doménből épül fel, így

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 (Kedei és mtsai, 2001; Benham és mtsai, 2002). A vanilloid kötőhely az intracelluláris oldalon található (Welch és mtsai, 2000), az eddigi vizsgálatok szerint kialakításában résztvesznek az N és a C terminális valamint a 3. 4. és 6. transzmembrándomén, illetve a 2-3. transzmembrándomén közötti intracelluláris hurok egyes aminosav maradékai (Jordt és Julius, 2002; Kuzhikandathil és mtsai, 2001; Chou és mtsai, 2004; Johnson és mtsai, 2006). A vanilloid kötőhelyen kívül a TRPV1 számos egyéb kötő- és szabályozó hellyel rendelkezik, ilyen például az intracelluláris N-terminális szakaszon található három darab ismétlődő ankirin domén, melyek potenciális protein kináz A foszforilációs helyek (Caterina és mtsai, 1997; Kedei és mtsai, 2001), vagy az extracelluláris oldalon található allostérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez és mtsai, 2000; Jordt és mtsai, 2000; Welch és mtsai, 2000). Mindezek lehetőséget teremtenek arra, hogy a csatorna működését számos különböző ágens befolyásolja.



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

A TRPV1 a tranziens receptor potenciál (TRP) család tagja

Századunk elejére kiderült, hogy a TRPV1 a TRP családba tartozó molekula (Benham és mtsai, 2002). A TRP család tagjai nagyfokú homológiát mutatnak a család névadó tagjával, a TRP (tranziens receptor potenciál) proteinnel (Pedersen és mtsai, 2005), melyet a *Drosophila melanogaster* retinájában írtak le (Cosens és Manning, 1969). A TRP klónozását (Montell és Rubin, 1989) követően hamarosan első emlős homológja (TRPC1) is ismerté vált (Wes és mtsai, 1995; Petersen és mtsai, 1995). Ma már számos molekulát ismerünk, amik szekvencia és szerkezeti homológia alapján a TRP családba sorolhatók, ezeket további 7 alcsaládba osztályozzák (Pedersen és mtsai, 2005). Emlősökben ebből eddig 6 alcsaládot írtak le, amelyek összesen legalább 28 tagot számlálnak (Nilius és mtsai, 2007): a klasszikus (TRPC), a vanilloid (TRPV), a melasztatin (TRPM), a mukolipin 5 (TRPML), a policisztin (TRPP) tranziens receptor potenciál proteinek, valamint az ankirin transzmembrán protein 1 (ANKTM1 vagy TRPA1), amely jelenleg a TRPA család egyetlen ismert emlős tagja. (A TRPN alcsalád tagjait eddig csak alacsonyabb rendű állatokban írták le.) A TRP család általános jellemzője, hogy tagjai, a TRPV1-hez hasonlóan, 6 transzmembrán doménből felépülő nem-specifikus kationcsatornák, melyek jó része Ca^{2+} ionokra is permeábilis (Moran és mtsai, 2004; Pedersen és mtsai, 2005; Nilius és mtsai, 2007).

A TRPV1 a TRPV alcsalád első ismert tagja, napjainkig azonban még további 5 csatornát soroltak ebbe a családba (TRPV2-6). A TRPV alcsalád tagjai szekvencia homológia alapján négy csoportra oszthatók: az elsőbe a TRPV1 és a hozzá leginkább hasonlító TRPV2 tartozik. Ezzel a csoporttal közelebbi rokonságot mutató két csoportot a TRPV3 és a TRPV4 képviselik, míg a TRPV1-től mind strukturálisan, mind aktivációs mechanizmusában leginkább különböző csoportot a TRPV5/6 alkotják (Gunthorpe és mtsai, 2002; Pedersen és mtsai, 2005). A TRPV alcsalád tagjai különböző vanilloid csoportot tartalmazó, főleg növényi eredetű anyagokkal aktiválhatók, de mindmáig a TRPV1 az egyetlen ismert kapszaicin érzékeny receptor (Calixto és mtsai, 2005; Lee és Caterina, 2005). Az acidotikus pH szintén nem képes az alcsalád többi tagjának aktiválására, de TRPV1 mellett meleg iránti hőérzékenységet mutat még a TRPV2 ($>52\text{ }^{\circ}\text{C}$), a TRPV3 ($>32\text{-}39\text{ }^{\circ}\text{C}$) és a TRPV4 ($>24\text{-}32\text{ }^{\circ}\text{C}$) is (Lee és Caterina, 2005). (Megjegyzendő, hogy a TRP családban található hideg érzékeny csatornák is, mint a TRPA1 ($<17\text{ }^{\circ}\text{C}$) és a TRPM8 ($<25\text{ }^{\circ}\text{C}$) – Patapoutian és mtsai, 2003.)

A TRPV1 funkciója

A TRPV1 endogén aktivációja

A TRPV1 molekuláris biológiai karakterizálását követően elvégzett nagyszámú kísérlet során bebizonyosodott, hogy a receptort az exogén vanilloid vegyületeken kívül számos, a szervezetben képződő (úgynevezett endovanilloidok), főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni. Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető a hőmérséklet emelkedése (~43°C), valamint a pH csökkenése (acidózis, pH 5,5) (Caterina és mtsai, 1997; Tominaga és mtsai, 1998). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladáshoz közeli mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, intra- és extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működésének pozitív befolyásolására (Hwang és mtsai, 2000; Kwak és mtsai, 2000; Piomelli, 2001; Premkumar, 2001; Sugiura és mtsai, 2002; Shin és mtsai, 2002). Ezek a mediátorok részben (főként metabotróp) saját 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 (Premkumar és Ahern, 2000; Vellani és mtsai, 2001; Shin és mtsai, 2002; Tang és mtsai, 2004). A szenzitizáció folyamatában szerepet játszhat a TRPV1-et körülvevő lipidaftok átrendeződése is, például a TRPV1 aktivitását gátló foszfoinozitol-bisz-foszfát (PIP₂) foszfolipáz-C (PLC) általi bontása (Chuang és mtsai, 2001). A legújabb eredmények szerint ugyanakkor a PIP₂ bizonyos körülmények között serkentheti is a TRPV1 működését (Lukács és mtsai, 2007; Rohács és mtsai, 2008).

A közvetett szenzitizáció mellett a lipidmediátorok egy része közvetlenül is képes a TRPV1-et aktiválni. Ilyen például az eredetileg endogén kannabinoidként (Devane és mtsai, 1992) leírt anandamid (Zygmunt és mtsai, 1999; Dinis és mtsai, 2004), az N-arachidonil-dopamin (Huang és mtsai, 2002) vagy a különböző lipoxigenáz termékek (Hwang és mtsai, 2000; Shin és mtsai, 2002). Az anandamid és a TRPV1 kapcsolata különösen összetettnek tűnik. Az anandamid ugyanis a TRPV1 mellett képes a szenzoros neuronokon szintén megtalálható, gátló hatású kannabinoid receptor-1-et (CB1) is aktiválni, így, különösen alacsonyabb koncentrációban, fájdalmas ingerületek transzmisszióját gátolni (Ahluwalia és mtsai, 2003a). Az anandamid szabályozó szerepét tovább árnyalja, hogy a TRPV1 aktivációja

(pl. kapszaicinnel) anandamid felszabadulását váltja ki ezeken a sejteken (Ahluwalia és mtsai, 2003b).

A neurális TRPV1 szerepe

A szenzoros neuronokon expresszáldó TRPV1-et szenzitizáló anyagok a receptor hőérzékenységi küszöbét csökkenthetik, így a TRPV1 már fiziológias 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 (Tominaga és mtsai, 1998; Caterina és Julius 2001). Ezt a koncepciót TRPV1 knock-out egerekkel végzett kísérletek is alátámasztották, ezeken az egereken ugyanis nemcsak a vanilloidok hatására kialakuló fájdalmas válaszreakciók hiányoztak, hanem csökkent a gyulladás hatására kialakuló termális hiperalgéria is (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Caterina és Julius 2001).

A primer szenzoros neuronok a jól ismert afferens, érző funkció mellett efferens működésekkel is bírnak. Ennek során az aktiválódásukat követően perifériás nyúlványaikban raktározott neuropeptideket (pl. P-anyagot (SP), calcitonin génkapcsolt peptidet (CGRP) és egyéb neuroaktív peptideket (Holzer, 1988)) szabadítanak fel lokálisan. A felszabadult anyagok az innervált szervek nem-neuronális sejtjein – pl. hízósejteken, makrofágokon, limfocitákon – hatva résztvesznek a lokális trófikus, vazoregulatórikus és immunmodulatórikus folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet (Geppeti és Holzer, 1996; Black, 2002). Ezen az úton a TRPV1 aktiválása neurogén gyulladást is indukálhat, de a TRPV1 agonisták (kapszaicin, reziniferatoxin) többszöri alkalmazása a sejtek neuropeptid raktárait kiürítve és a sejtek deszenzitizációját okozva gátolhatja is a gyulladásos folyamatokat (Bíró és mtsai, 1997). Patológias körülmények között a fent említett neuropeptid kóros mennyiségű felszabadulása hozzájárulhat bizonyos, a gyulladásos adaptáció kisiklásaival jellemezhető kórképek (asthma bronchiale, colitis ulcerosa, interstitiális cystitis, arthritis stb.) kialakulásához, vagy súlyosbodásához is (Campbell és mtsai, 1993; Lundberg, 1993; Yiangou és mtsai, 2001a, 2001b), így ezen kórképek kezelésében a TRPV1 működésének farmakológiai befolyásolása is szerepet kaphat. A húgyhólyagműködés szabályozásában is felvetették a kapszaicin szenzitív neuronok szerepét (Maggi és mtsai, 1989), míg a vanilloid vegyületeket hatékonynak találták a detruzor hiperreflexia kezelésében is (Lazzeri és mtsai, 1997; Cruz és mtsai, 1997a, 1997b).

Fontos hangsúlyozni, hogy a TRPV1 aktiváció hatására a szenzoros efferens terminálisokból a proinflammatorikus neuropeptidok mellett szomatosztatin is felszabadul, ami viszont antiinflammatorikus és analgesztikus hatású (Helyes és mtsai, 2004). Az antiinflammatorikus hatást a keringésbe kerülve szisztémásan fejti ki, mely hatásban a szenzoros végződések efferens működésének blokkolása, és a proinflammatorikus neuropeptidok felszabadulásának gátlása is szerepet játszik (Pintér és mtsai, 2006). A TRPV1 aktiváció hatására az anterior hepatikus plexusból felszabaduló szomatosztatinnak feltételezhetően inzulinszenzitizáló hatása is van (Pórszász és mtsai, 2003). A TRPV1 pozitív szenzoros rostok azonban más módon is résztvehetnek a glükózhomeosztázis szabályozásában; kimutatták például, hogy a pancreas ellátó TRPV1 pozitív szenzoros rostok eliminálása javítja a glükóztoleranciát különböző diabetes modellekben (Suri és Szállási, 2008).

A szenzoros végződések izgatásán túl a kapszaicin akut szisztémás alkalmazása hipotermiát is kivált (Jancsó-Gábor és mtsai, 1970a; Szolcsányi, 2004). Ezzel ellentétben a TRPV1 antagonisták több fajban is képesek megemelni a testhőmérsékletet (Gavva és mtsai, 2007, 2008). Mindez arra utal, hogy a TRPV1 a fájdalom ingerek mediálásán és a neuropeptidok felszabadításán túl a termoregulációban is központi szerepet játszhat (Montel és Caterina, 2007; Gavva, 2008). A vanilloidok termoregulációs hatásának támadáspontja azonban mind a mai napig nem tisztázott. Általánosan elfogadott nézet, hogy a perifériás szenzoros neuronokon expresszálandó TRPV1 (esetleg más TRPV csatornákkal együtt) befolyásolja a hőszabályozást, de a célzottan hypothalamusba adagolt kapszaicin is képes hipotermiát okozni (Jancsó-Gábor, 1970b); így a centrális TRPV1 hatás mellett is szólnak bizonyítékok (Caterina, 2007).

A TRPV1 jelenléte ugyanis az idegrendszerben nem csupán a primer szenzoros neuronokra korlátozódik. Régóta ismert, hogy a központi idegrendszer különböző területeire adott kapszaicin biológiai választ eredményez és jellegzetes morfológiai változásokat okoz (Hajós és mtsai, 1987a, 1987b, 1988). [³H]RTX alkalmazásával nagy affinitású specifikus kötődést sikerült detektálni különböző, a primer szenzoros afferenciától távol eső agyi struktúrákon is (Ács és mtsai, 1996). A TRPV1 jelenlétét kimutatták majom agyában a locus ceruleus, a preoptikus area és a mediális bazális hypothalamus területén (Szabó és mtsai, 2002). A receptor klónozását követően kifejeződését mRNS és protein szinten is igazolták a központi idegrendszer számos részén, így a gerincvelő hátsó szarvában, a hídban, a cerebellumban, különböző limbikus területeken (bulbus olfactorius, hippocampus), a

cortexben és a striatumban, valamint a thalamus és a hypothalamus területén (Sasamura és mtsai, 1998; Guo és mtsai, 1999; Mezey és mtsai, 2000).

A TRPV1 expressziója és szerepe nem neurális sejteken

Már a receptor klónozásával egyidejűleg TRPV-specifikus mRNS szakaszokat mutattak ki a vesében is (Caterina és mtsai, 1997), az azóta eltelt időben pedig egyre több nem-neurális szövet- és sejtfeleségen igazolták, hogy a TRPV1 az idegrendszeren kívül is széles körben expresszálódik és jelentős funkciókkal bír. Az újabb kutatások például – a neuronok mellett – a humán húgyhólyag simaizmában, epiteliális és intersticiális sejtjeiben is kimutatták a TRPV1 jelenlétét (Birder és mtsai, 2001; Ost és mtsai, 2002; Lazzeri és mtsai, 2004; Stein és mtsai, 2004).

Szintén kimutatták a TRPV1 jelenlétét a gyomor mucosa epiteliális sejtjein, humán és állati mintákon egyaránt (Kato és mtsai, 2003; Kechagias és mtsai, 2005), miközben azt találták, hogy a molekula előzetes aktivációja kivédheti az alkohol és a savas (pH 4,0) közeg okozta sejtpusztulást (Kato és mtsai, 2003). A TRPV1 expresszióját a légutakban is leírták. A kapszaicin képes a bronchiális simaizomzat kontrakcióját kiváltani (Ellis és mtsai, 1997), a bronchiális epitelsejteken pedig a proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, TNF α) termelését és felszabadulását, majd a sejtek apoptózist indukálja. Ez utóbbi sejteken a TRPV1 aktivációja specifikus Ca²⁺ beáramlást indukál, de a sejtek cAMP szintje is fokozódik (Veronesi és mtsai, 1999a, 1999b; Agopyan és mtsai, 2003a, 2003b).

A TRPV1 timocitákon is expresszálódik, aktivációja ebben az esetben is növeli a sejtek Ca²⁺ szintjét és apoptózist indukál (Amantini és mtsai, 2004). Bíró és mtsai (1998a) kapszaicin hatására specifikus intracelluláris Ca²⁺ koncentráció ([Ca²⁺]_{IC}) növekedést tapasztaltak C6 glióma sejteken is. Mikroglia sejteken is kimutatták a TRPV1 jelenlétét, és kapszaicin, valamint RTX által indukált sejtpusztulást is leírtak, amit az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció megemelkedése és a következményes mitokondriális károsodás váltott ki. A hatás mind TRPV1 antagonistákkal, mind az intracelluláris Ca²⁺ megkötésével kivédhetőnek bizonyult, ami meggyőzően támasztja alá a TRPV1 szerepét a fenti folyamatokban (Kim és mtsai, 2006).

A kapszaicinról kimutatták, hogy tumorosan transzformált sejtek apoptózist is képes kiváltani. Ezt demonstrálták, többek között, agydaganatból származó glioblasztóma sejtvonalon (Lee és mtsai, 2000), C6 glióma sejteken (Qiao és mtsai, 2005), humán méhnyakrákból származó HeLa sejteken (Takahata és mtsai, 1999), májrákból létrehozott SK-

Hep-1 sejtvonalon (Jung és mtsai, 2001), emlő karcinómából származó MCF-7 sejteken (Tuoya és mtsai, 2006), de a fenti esetek egyikében sem igazolódott a TRPV1 szerepe a folyamatban. Habár a prosztatárákból 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, mert a receptor specifikus antagonistái nem voltak képesek kivédeni a kapszaicin apoptózist okozó hatását (Sanchez és mtsai, 2005, 2006; Mori és mtsai, 2006). Úgy tűnik tehát, a vanilloid vegyületek számos, a TRPV1-től független úton is képesek lehetnek apoptózis kiváltására (Hail, 2003).

Számos kutatás beszámol a kapszaicin hatásáról immunkompetens sejteken is. Kimutatták, hogy a kapszaicin – a szenzoros neuronokhoz hasonlóan – a humán monocitákon és makrofágokon, valamint limfocitákon is kiváltja a SP felszabadulását (Ho és mtsai, 1997; Lai és mtsai, 1998), valamint fokozza a humán polimorfonukleáris sejtek migrációját (Partsch és Matucci-Cerinic, 1993). Emellett Ca^{2+} -csatornaként működő TRPV1 jelenlétét igazolták hízósejteken, ahol a kapszaicin interleukin-4 (IL-4) felszabadulást váltott ki (Bíró és mtsai, 1998b). A TRPV1 mRNS jelenlétét neutrofil granulocitákban is leírták (Heiner és mtsai, 2003), míg humán perifériás vér limfocitákban gazdag mononukleáris sejteik mRNS és protein szinten egyaránt kimutatták a receptor expresszióját (Saunders és mtsai, 2007). Bakteriális lipopoliszacharid (LPS) indukált egér peritoneális makrofágokon kimutatták, hogy a kapszaicin képes gátolni a PGE_2 szintézisét és az indukálható nitrogénmonoxid-szintáz (iNOS-t), valamint az NF- κ B transzkripció faktor inaktivációját eredményezi. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a kapszaicin ezen hatásaiban a TRPV1 nem játszik szerepet (Kim és mtsai, 2003; Chen és mtsai, 2003).

A faggyúmirigy és a szebociták

A faggyúmirigy (glandula sebacea) a bőr dermiszében lokalizálódó holokrin elválasztású mirigy, ami az esetek döntő többségében szőrtüszőhöz kapcsolódik. A faggyúmirigy sejtjei a szebociták, melyek legismertebb funkciója a változatos lipidösszetételű faggyú (szébum) termelése (Thody és Shuster, 1989). A faggyú számos, elsősorban neutrális lipidből tevődik össze; nagyobb mennyiségben tartalmaz többek között triglicerideket, szabad zsírsavakat, viasz-észtereket, koleszterint és származékait, így pl. a szebocitákra különösen jellemző szkvalént (Smith és Thibout, 2008). A szébum állatokban szerepet játszik a bunda impregnációjában és a hőszigetelésben, egyes fajok esetén pedig a szexuális és területjelző ferromononok kiválasztására specializálódtak faggyúmirigyek. Mivel emberben ezek a

funkciók jórészt felismerhetetlenek, sokáig úgy gondolták, hogy az emberi faggyúmirigy csupán egy evolúciós reliktum, mely ugyan hozzájárul a bőr lipidösszetételének kialakításához, élettani szerepe azonban legalábbis kérdéses (Pochi és Strauss, 1977). Az utóbbi idők kutatásai azonban egyértelműen igazolták, hogy a szebociták szerepe nem merül ki a bőr passzív, barrier funkciójának kialakításában. Számos parakrin, endokrin és immunológiai funkciójával döntően hozzájárul a bőr normál homeosztatiszikus működésének kialakításához és résztvesz azok szabályozásában (Zouboulis 2004; Zouboulis és mtsai 2008a).

A faggyúmirigy fenti funkcióinak felderítéséhez nagyban hozzájárultak a különböző, *in vitro* is vizsgálható szebocita modellek. A különböző állati modellek (pl. rágcsálók preputionális mirigyéből származó sejtek (Potter és mtsai, 1979; Wheatley és mtsai, 1979) vagy hörcsög fülének faggyúmirigyei (Plewig és Luderschmidt, 1977)) mellett egyre nagyobb szerepet kaptak a humán szebociták *in vitro* tenyésztői (Zouboulis és mtsai, 1998, 2008b). A primer szebocita tenyészetek fenntarthatóságát azonban nagyban limitálja a sejtek terminális differenciálódása (Rosenfield, 1989; Fujie és mtsai, 1996), ezért a kutatások számára igen hasznosnak bizonyultak a humán faggyúmirigyből létrehozott sejtvonalak, így a SEB1 (Thibout és mtsai, 2003), az SZ95 (Zouboulis és mtsai, 1999), vagy a legújabban kifejlesztett Seb-E6E7 (Lo Celso, 2008). Ezek az *in vitro* modelleken napjainkban is zajló kutatások egyre mélyebb bepillantást engednek a szebociták működésének molekuláris szintű regulációjába is.

Régóta ismert, hogy az androgének serkentik a faggyúmirigyek működését és a szébum termelését (Pochi és Strauss, 1977; Thody and Shuster, 1989). A szebociták azonban maguk is rendelkeznek a szteroid hormonok produkciójához szükséges enzimaparátussal (Chen és mtsai, 2002; Thiboutot és mtsai, 2003), valamint képesek az androgének metabolizálására is (Fritsch és mtsai, 2001; Seifert és mtsai, 2007).

A szebocitákon az androgének hatásának kifejlődéséhez úgy tűnik a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR-ok) aktivitása is szükséges (Rosenfield és mtsai, 1998; Makrantonaki és Zouboulis, 2007). A nukleáris receptorok közé tartozó PPAR-ok központi szerepet játszanak a lipidanyagcsere szabályozásában számos szövet sejtjeiben (Desvergne és Wahli, 1999; Lee és mtsai, 2003). Számos tanulmány kimutatta, hogy a PPAR-ok a szebociták működésében is kulcsszerepet játszanak, fokozzák a sejtek terminális differenciálódását és az ezt kísérő lipidszintézist (Rosenfield és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2003; Trivedi és mtsai, 2006). A szebociták differenciálódása a PPAR ligandok mellett

arachidonsavval is indukálható, minek hatására fokozódik a lipidek felhalmozódása és a sejtek apoptózisa (Wrobel és mtsai, 2003).

A szebociták differenciálódásának szabályozásában további endokrin faktorok is részt vesznek. A növekedési hormon, az inzulin és az inzulin szerű növekedési faktor-1 (IGF-1) egyaránt szerepet játszanak a differenciálódás és a proliferáció szabályozásában (Deplewski és Rosenfield, 1999), de a hipotalamusz-hipofízis rendszer mediátorai közül a kortikotropin releasing hormonnól (CRH), az α -melanocitastimuláló hormonnól (α MSH) és a β -endorfinról is leírták, hogy fokozza a sejtek lipidszintézisét, miközben ezen mediátorok receptorait is kimutatták a szebocitákon (Thiboutot és mtsai, 2000; Böhm és mtsai, 2002; Zouboulis és mtsai, 2002; Zouboulis és Böhm, 2004).

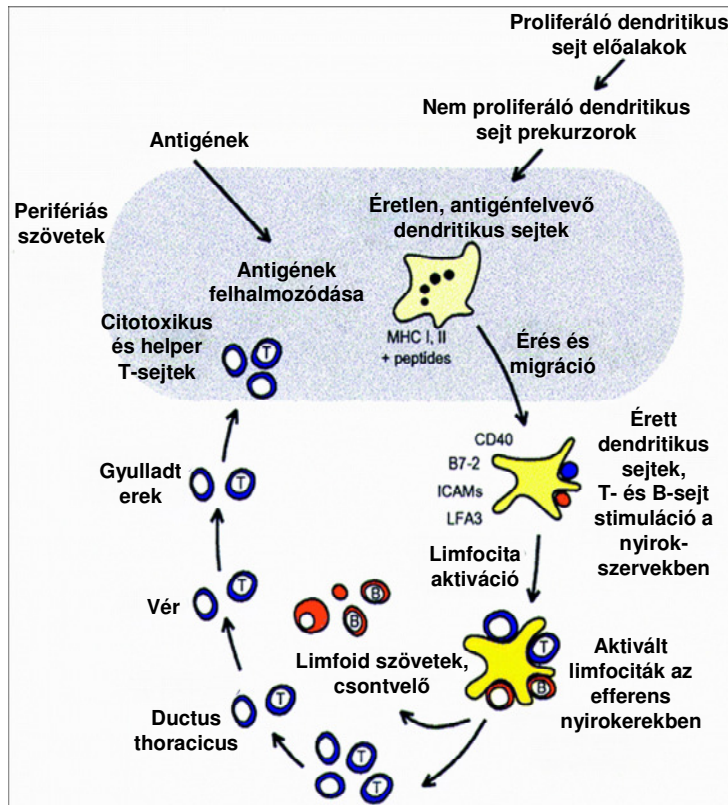
A szebociták résztvesznek a bőr immunológiai funkcióiban és a gyulladási folyamatok szabályozásában is. Kimutatták, hogy képesek különböző citokinek (interleukin-6 (IL-6), interleukin- 1β (IL- 1β), tumornekrózis faktor- α (TNF α)), valamint lipid természetű gyulladási mediátorok (leukotrién- B_4 (LTB $_4$), prosztaglandin- E_2 (PGE $_2$)) termelésére, amely folyamatok szabályozásában a PPAR-ok szintén szerepet játszhatnak (Alesta és mtsai., 2006; Zhang és mtsai, 2006). Bakteriális induktorok hatására antimikrobiális peptidket is termelnek, valamint fokozódik a proinflammatorikus TNF α és az interleukin-8 (IL-8/CXCL8) termelésük is (Nagy és mtsai, 2006). A szenzoros neuron eredetű SP is fokozza a gyulladási mediátorok szintjét (Lee és mtsai, 2008), valamint a faggyúmirigyek differenciálódását és proliferációját (Toyoda és Morohashi, 2001).

A dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek csontvelői őssejtekből származó, hivatásos antigénprezentáló sejtek, melyek elsősorban a specifikus immunválasz beindításában játszanak fontos szerepet. Mikroszkópos képükre tüskeszerű nyúlványok jellemzőek, innen származik nevük is. Jelen vannak a legtöbb szerv kötőszöveti állományában, valamint a nyirokcsomók és a lép T-sejtekben gazdag területein. Monocitászertű éretlen előalakjaik igen kis hányadban (a fehérvérsejtek kb. 0,2%-át képezik) megtalálhatóak a keringésben, valamint nagyobb sűrűségben a nyálkahártyák felszínén, illetve Langerhans-sejtekként a bőrben. Ebben a differenciáltsági állapotban pinocitózissal vagy fagocitózissal kórokozókat, membrán fragmentumokat, oldott fehérjéket képesek felvenni. Az antigének felvételének hatására aktiválódnak, majd a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol T- és B-limfocitákkal kerülnek kölcsönhatásba. Közben érési folyamaton mennek át, antigénfelvevő képességüket elvesztik,

azonban fokozottan expresszálják a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláit (Banchereau és Steinmann, 1998; ld. 3. ábra).

Az éretlen dendritikus sejtek számos patogénekre jellemző molekuláris mintázatot felismerni képes ún. Pattern Recognition Receptorral (PRR) rendelkeznek. Ilyenek a – más



3. ábra: A dendritikus sejtek szerepe az immunfolyamatok szabályozásában.

A perifériás éretlen dendritikus sejtek antigénekkal találkozásképesek azokat fagocitálni. Ennek hatására aktiválódnak, érési folyamaton mennek keresztül, majd a nyirokcsomókba vándorolva limfocitákat aktiválnak. (Banchereau és Steinmann, 1998 alapján)

sejtek felszínén is expresszálódó – Toll-like receptorok (TLR), amelyek többek között a bakteriális sejtfal elemeit (LPS, lipoproteinek), a csillókra jellemző flagellint, kettős szálú RNS és bakteriális/virális DNS molekulákat, valamint idegen sejtek nonspecifikus felszíni markereit képesek felismerni (Barton és Medzhitov, 2002). Aktiválódásuk indukálja a dendritikus sejtek érését és antigénspecifikus immunválaszok kialakulásához vezet (Medzhitov, 2001). Szintén a PRR-ok közé tartoznak a dendritikus sejtekre, illetve egyes alcsoportjaikra jórészt specifikus C típusú lektinek (pl. a 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 (Gordon, 2002; Novak és Bieber, 2008). Antigen felvételére a dendritikus sejtek más úton is képesek lehetnek, így pl. fagocitózissal, makropinocitózissal, vagy – IgE opsonizált antigének esetén – az IgE iránt nagy affinitású Fc receptoraik (FcεRI) segítségével (Novak és Bieber, 2008).

Az antigének felvételét követően a dendritikus sejtek a nyirokcsomókba migrálnak (Austyn, 2001), amely folyamatban különböző kemokin hatások fontos szerepet játszanak (Sozzani és mtsai, 2001) A dendritikus sejtek migrációját indukálják pl. a CCL19/CCL21 (kemokin C-C motívum ligand 19 és 21) kemokinek az aktivált sejtek felszínén megjelenő

CCR7 (kemokin C-C motívum receptor 7) kemokinreceptorokon keresztül (Förster és mtsai, 1999; Ohl és mtsai, 2004). A migráció közben érési folyamatokon mennek át, melynek során fokozódik az MHC-II molekulák expressziója és felszíni féléletidejük is többszörösére nő (Cella és mtsai, 1997), de egyéb érési markerek (pl. CD83 – Lechmann és mtsai, 2002; Cao és mtsai, 2005) expressziója is indukálódik. A dendritikus sejtek a nyirokcsomókban egyaránt aktiválhatják a citotoxikus (T_c), és a helper (T_h) T-sejteket (Caux és mtsai, 1995; Wettendorff és mtsai, 1995; Grouard és mtsai, 1996; Brocker, 1997) valamint a B sejteket (Fayette és mtsai, 1998; Dubois és mtsai, 1999, 2001) is. A dendritikus sejtek és a limfociták között kialakuló immunológiai szinapszis kialakításában az antigénprezentáló sejtek az MHC komplexek mellett expresszálódnak ún. kostimulációs molekulákkal (pl. CD40, CD80, CD86) is résztvesznek (O'Sullivan és Thomas, 2003; Reichardt és mtsai, 2007). 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.) szekrécijával is szabályozzák a kialakuló immunválaszt (Kalinski és mtsai, 2001; Tan és O'Neill, 2005).

A dendritikus sejtek működésükkel hidat képeznek a veleszületett és az adaptív immunitás között (Steinman és Hemmi, 2006); kevésbé specifikus ingerek felismerését követően képesek lehetnek sejtes és humorális specifikus immunválasz kialakítására, ugyanakkor immuntoleranciát is indukálhatnak (Lutz és Schuler 2002; Hugues és mtsai, 2006). Sokoldalú funkciójukat figyelembe véve, a dendritikus sejteket joggal tarthatjuk az immunrendszer egyik karmesterének.

Eredetük alapján a dendritikus sejteknek két fő populációja különíthető el:

(1) A mieloid eredetű dendritikus sejtek olyan CD34 pozitív előalakokból származnak, amelyek mieloid markereket is expresszálnak, mint például a CD11b, CD11c, CD13, CD33 vagy a mannóz receptorok. A mieloid eredetű dendritikus sejtek közé tartoznak az epidermális CD1a, CD207 (langerin) és E-kadherin pozitív Langerhans-sejtek (Romani és mtsai, 2003) és a velük szoros rokonságot mutató, szintén mieloid prekurzorból származó intersticiális dendritikus sejtek is, melyek a fenti Langerhans-sejt markerek helyett CD9 és CD68 molekulákat expresszálnak (Liu 2001; Liu és mtsai, 2001; Shortman és Liu, 2002). A mieloid dendritikus sejtek nemcsak sejtfelszíni markereik (Hart és mtsai, 2001), de funkcionális sajátásaik alapján is nagyfokú heterogenitást mutatnak, amit a különböző dendritikus sejt aktiváló szignálok is befolyásolhatnak. A bakteriális (pl. LPS) vagy a T sejt (pl. CD40 ligand - CD40L) szignálok által aktivált (mieloid) dendritikus sejtek a limfociták T helper-1 (T_h1) irányú indukcióját, ezen keresztül pedig a celluláris immunválasz kialakítást serkentik, míg egyes antiinflammatorikus molekulák [pl. transzformáló növekedési faktor β (TGF β), IL-10,

PGE₂, szteroidok] vagy a T sejteken expresszálandó OX40 ligand gátolják a Th₁ irányú indukciót és a Th₂ sejtek (humorális immunválasz) kialakulását segítik elő (Liu és mtsai, 2001). A mieloid eredetű dendritikus sejtekkel gyakorlatilag azonosnak tekinthetők a monocitákból granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) és IL-4 jelenlétében *in vitro* differenciálható éretlen dendritikus sejtek is (Sallusto és Lanzavecchia, 1994; Shortman és Liu, 2002).

(2) A dendritikus sejtek másik fő csoportját a limfoid markerekkel is jellemezhető plazmocitoid dendritikus sejtek alkotják, melyek eredete kevésbé ismert. Progenitoraik a CD34 mellett a CD45 nagy molekulású izoformájára (CD45RA) nézve is pozitívak. Ezekből a sejtekből limfociták és dendritikus sejtek egyaránt differenciálódhatnak. Limfoid eredetű dendritikus sejtek *in vitro* tímuszából izolált alacsony CD4 pozitivitást mutató prekurzorokból is differenciálhatóak, ez viszont a mieloid dendritikus sejtektől eltérően módon indukálható: a sejtek fejlődéséhez IL-3 szükséges (Grouard és mtsai, 1997), viszont nem igényel GM-CSF-et (Wu és Galy, 2001). A plazmocitoid dendritikus sejtekre jellemző, hogy egyes vírusok hatására interferonokat termelnek, és az aktiválódásukat a mieloid sejtektől eltérő citokinek válthatják ki (Banchereau és Steinmann, 1998; Liu 2001; Shortman és Liu, 2002; McKenna és mtsai 2005).

A mieloid és a plazmocitoid dendritikus sejtek nemcsak különböző prekurzorokból származnak, de eltérően reagálnak bizonyos aktivációs szignálokra is. CD40L hatására a plazmocitoid dendritikus sejtek IL-12 termelése csupán töredéke a mieloid dendritikus sejtek esetében tapasztaltnak. A mieloid dendritikus sejtek emellett CD40L hatására IL-1 α -t, IL-1 β -t, IL-6-ot és IL-10-et is termelnek, ami a plazmocitoid dendritikus sejtekre nem jellemző. Emellett a T sejtek differenciálódását is eltérően befolyásolják: míg a mieloid dendritikus sejtek elsősorban Th₁, addig a plazmocitoid dendritikus sejtek Th₂ irányú differenciálódást indukálnak (Liu, 2001; Liu és mtsai, 2001).

A perifériás vérből izolált monocitákból GM-CSF és IL-4 jelenlétében differenciáltatott sejtek a humán dendritikus sejt vizsgálatok egyik leggyakrabban használt modellje. Más mieloid dendritikus sejtekhez hasonlóan, ezek a monocita eredetű dendritikus sejtek is eltérően reagálnak a különböző aktivációs szignálokra. Interferon- γ (IFN γ) hatására például olyan érett dendritikus sejtekké alakulnak, melyek nagy mennyiségű IL-12-t szabadítanak fel és a T sejteket Th₁ irányba differenciáltatják, PGE₂-vel történő aktivációjuk viszont a Th₂ irányú differenciációnak kedvez (Kapsenberg és mtsai, 1999). A PGE₂ emellett központi szerepet játszik a CCR7 expressziójának és a sejtek migrációjának szabályozásában (Scandella és mtsai, 2002, 2004). Felszíni markereik alapján a monocita eredetű dendritikus

sejtek is heterogének, donorfüggő mértékben expresszálnak CD1a-t, aminek szabályozásában a környezetben jelenlevő lipidek fontos szerepet játszanak (Gogolak és mtsai, 2007).

A TRPV1 szerepe a bőr biológiájában – a korábbi kutatások eredményei

A kapszaicinnal legszélesebb körben „megtámasztott” szerv minden kétséget kizáróan a bőr és a bőr alatti kötőszövetek. 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 (Szállási és Blumberg, 1996; Bíró és mtsai, 1997). A helyileg alkalmazott kapszaicint, mint adjuváns analgetikumot, számos neuropathiás fájdalommal járó állapotban kipróbálták, így pl. posztherpeszes neuralgiában, diabéteszes neuropátiában, masztekтомиát követő fájdalom esetében (Hautkappe és mtsai, 1998). Számos klinikai kísérlet számol be emellett a topikálisan alkalmazott kapszaicin kedvező hatásáról viszketéssel járó különböző megbetegedésben, mint például notalgia paresztetika, pszoriázis, prurigo noduláris, urémiás és kolesztázis pruritusz vagy pruritusz ani eseteiben (Ellis és mtsai, 1993; Wallengren és mtsai, 1995; Tarng és mtsai, 1996; Stander és mtsai, 2001; Bíró és mtsai, 2005; Steinhoff és mtsai, 2006; Paus és mtsai, 2006).

További érdekes megfigyelés, hogy topikális, intranazálisan adott kapszaicin jelentősen csökkentette a vazomotoros rhinitisz tüneteit (Lacroix és mtsai, 1991; Blom és mtsai, 1997), emellett egyszeri intranazálisan alkalmazott kapszaicin hatékonynak bizonyult pollen által kiváltott allergiás rhinitiszhez társuló orrdugulásos tünetek hosszan tartó enyhítésében (Stjärne és mtsai, 1998).

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 non-neurális sejtek esetleges szerepére a folyamatokban (Bíró és mtsai, 2005; Paus és mtsai, 2006). Egyre többet tudunk ugyanis a kapszaicin hatásáról a bőr non-neurális sejtfeleségein. A kapszaicin szenzitív TRPV1 jelenlétét már néhány éve kimutatták az epidermisz keratinocitáin, illetve immortalizált HaCaT keratinocitákon, valamint igazolták, hogy a kapszaicin ezen sejteken specifikus Ca^{2+} influxot indukál, illetve fokozza a ciklooxygenáz-2 (COX-2) expresszióját, valamint az IL-8 és a PGE_2 felszabadulását (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003). A TRPV1-et emellett *in situ* kimutatták humán bőr hajfollikulusaiban, annak külső és belső gyökérhüvely, valamint mátrix keratinocitáin, dermális fibroblasztokon, verejtékmirigyen, erek endotheliumán, Langerhans

sejteken, valamint a faggyúmirigy sebocitáin (Bodó és mtsai, 2004; Ständer és mtsai, 2004). A receptor specifikus aktivációja kapszaicinnal humán szőrtüszőkön gátolta a sejtek proliferációját és apoptózist indukál, valamint a hajciklus katagén irányú eltolódását okozza (Bodó és mtsai, 2005). A hajciklus ilyen jellegű eltolódását TRPV1 knock-out egérmodell alkalmazásával is igazolták (Bíró és mtsai, 2006).

Habár egyre több információval rendelkezünk a TRPV1 szerepéről a bőr működésének szabályozásában, számos sejtípussal kapcsolatban meglehetősen hiányosak az ismereteink. Korábbi kutatásaink ugyan bizonyították a receptor jelentőségét a szőrtüsző biológiájában, a pilo-sebaceus egység másik tagján, a faggyúmirigyen eddig csupán a TRPV1 in situ expresszióját írtuk le (Bodó és mtsai, 2004). Semmilyen funkcionális adattal nem rendelkezünk azonban a molekula szerepéről a sebociták működésében.

Szintén kevés és ellentmondásos adattal rendelkezünk a kapszaicin hatásairól és a TRPV1-ről azzal kapcsolatban, hogy milyen funkciót lát el a bőrben – az epidermiszben és a dermiszben egyaránt – megtalálható dendritikus sejteken. Basu és Srivastava (2005) egér csontvelő eredetű dendritikus sejtjein leírták a TRPV1 expresszióját és kimutatták, hogy a kapszaicin indukálja a sejtek érését és migrációját, mely jelenség kapszazepinnel gátolható és TRPV1 knock out egereken nem tapasztalható. Ezzel szemben egy másik tanulmányban (O’Connell és mtsai, 2005) nem találtak bizonyítékot a TRPV1 expressziójára és a kapszaicin hatására a fenti sejteken. Még kevesebbet tudunk a téma humán vonatkozásairól. Laboratóriumunk korábbi munkája során (Bodó és mtsai, 2004) in situ kimutatták a TRPV1 expresszióját az epidermis dendritikus sejtjein, a Langerhans sejteken, de a humán dendritikus sejteken nincs információnk a receptor szerepéről.

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 sejtvonalat választottuk, mely gyakorlatilag korlátlan fenntarthatósága mellett is megőrizte a szebocitákra jellemző fenotípusát és differenciálódási képességét (Zouboulis és mtsai, 1999). Az SZ95 szebociták vizsgálata során 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 kapszaicinnel 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 primeren izolált monocitákból GM-CSF és IL-4 segítségével *in vitro* differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket használtunk (Sallusto és Lanzavecchia, 1994). 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?

A fenti kérdésekre kombinált farmakológiai eljárások és molekuláris biológiai technikák felhasználásával végzett kísérleteinkben kerestük a válaszokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt kapszaicinből, kapszazepinből, jodo-reziniferatoxinból (I-RTX) és arachidonsavból (mind Sigma, St. Louis, MO, USA) abszolút etanolban (Spektrum-3D, Debrecen, Magyarország) oldva a kezelések végkoncentrációjához képest 1000-szeres koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk, amit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a szükséges koncentrációkat a sejtek tenyésztő oldatában, 1000-szeres hígítást alkalmazva. Így az oldószer koncentrációja a kezelések folyamán maximum 0,1% volt. A kezelések során kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos hígítását használtuk.

SZ95 szebociták tenyésztése

A humán faggyúmirigyből származó SZ95 szebocitákat (Zouboulis és mtsai, 1999) 10% főtális borjú savóval (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK), 1 mM CaCl_2 -dal (Spektrum-3D), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma), 50 U/ml penicillinel és 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinnel (mindkettő TEVA, Debrecen, Magyarország) kiegészített Sebomed Basal Medium (Biochrom, Berlin, Németország) tápoldatban tenyésztettük. Az így összeállított 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 -t nem tettünk a tenyésztőmédiumba, így a Ca^{2+} koncentrációt 0,25 mM-ra állítottuk be. Az oldatot minden második-harmadik napon cseréltük és a sejteket 80-90%-os konfluenciát elérve passzáltuk. Külön figyelmet fordítottunk a szubkonfluens állapot folyamatos fenntartására, ezáltal is megelőzve a sejtek idő előtti terminális differenciálódását.

Monocita szeparálás humán perifériás vérből

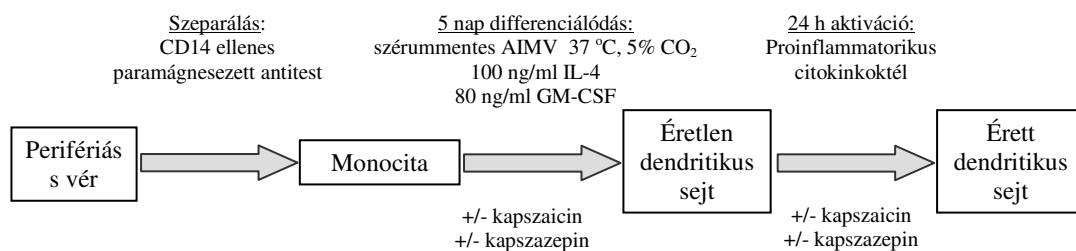
A trombocitamentes humán perifériás vérkészítményt a Hajdú-Bihar Megyei Vérellátó Központból kaptuk, melyet Ficoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) grádiensen centrifugáltuk, majd a monomorfonukleáris sejteket tartalmazó rétegből monocitákat szeparáltunk. A monocitákat CD14 specifikus paramágnesezett antitestek (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) felhasználásával mágneses sejtszeparátor [VarioMACS (Miltenyi Biotech)] segítségével izoláltuk, követve a gyártó protokollját.

A dendritikus sejtek differenciálódása monocitákból

Az izolált monocitákat szérumentes A-IMV tápoldatban (Invitrogen) tenyésztettük 37°C-on 5% CO₂ jelenlétében, párásított légtérben 2×10⁶ sejt/ml denzitásban. A tenyésztő médiumot 100 ng/ml IL-4-gyel (Invitrogen) és 80 ng/ml GM-CSF-ral (Invitrogen) egészítettük ki, amit az izolálást követő második napon megismételtünk. Az IL-4 és a GM-CSF jelenlétében a monociták az ötödik napra éretlen dendritikus sejtekké differenciálódtak, amit sejt-specifikus 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. Kontrollként a kapszaicin és a kapszazepin oldószerét használtuk, a kezelésekkel megegyező hígításban (4. ábra).

A dendritikus sejtek érése és aktivációja

Az éretlen dendritikus sejtek érését és aktivációját a differenciálódás ötödik napján, oldatcserét követően egy többkomponensű proinflammatorikus citokinkoktéllal indukáltuk 24 órán keresztül. Ez a „koktél” A-IMV médiumban oldva az alábbi citokineket tartalmazta: 80 ng/ml GM-CSF, 5 ng/ml IL-1β, 100 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNFα (valamennyi Invitrogen) és 1 μg/ml PGE₂ (Sigma). Ezt a kezelést kapszaicin és kapszazepin jelenlétében és hiányában egyaránt elvégeztük, kontrollként az oldószer megfelelő arányú hígítását alkalmazva (4. ábra).



4. ábra: A dendritikus sejteken végzett kísérletek elrendezése.

A perifériás vérből izolált monocitákból IL-4 és GM-CSF jelenlétében éretlen dendritikus sejteket differenciáltattunk. Az éretlen dendritikus sejtek érését a szövegben részletezett proinflammatorikus citokinkoktéllal indukáltuk 24 órán keresztül. Mind a differenciálót, mind az aktivációt elvégeztük kapszaicin és kapszazepin jelenlétében, valamint hiányában is.

Morfológiai vizsgálatok áramlásos citometriával

A sejtek fenotípusos karakterizálása áramlásos citometriával meghatározott forward ill. 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. Az SZ95 szebociták vizsgálatát Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) míg a monociták és a dendritikus sejtek vizsgálatát FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) áramlásos citométerek segítségével végeztük.

A sejtfelszíni markerek vizsgálata áramlásos citometriával

A monocitákat és a dendritikus sejteket áramlásos citometriás mérésekhez FACS pufferben, azaz 1% borjú szérum albumint (BSA), valamint 0,4% azidot (mindkettő Sigma) tartalmazó Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes foszfát puffer oldatban (CMF-PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM foszfát, pH: 7,4) gyűjtöttük össze 10^6 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 [mindkettő Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA]); anti-DC-SIGN/CD209-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CCR7-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN), valamint IgG_{2a}-PE, IgG_{2b}-FITC, IgG₁-PE, sAb-FITC, mint az immunglobulin izotípusnak megfelelő kontrollrok (mindegyik BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). A jelölést a gyártó által meghatározott protokoll szerint végeztük. Ezt követően a sejtek fluoreszcenciáját a fenti FACSCalibur áramlásos citométer segítségével állapítottuk meg, majd ezek után az adatok analízise a WinMDI szoftverrel (Joseph Trotter, La Jolla, CA, USA) történt.

Az apoptózis vizsgálata áramlásos citometriával

Az SZ95 szebociták késői 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 (Sigma) jelöltük, követve a gyártó protokollját. Ennek során a sejteket 30 percig inkubáltuk a kit részét képező Annexin binding pufferben az Annexin-V-FITC és a propidium jodid jelenlétében. A sejteket mosást követően FACS pufferben gyűjtöttük össze és a fluoreszcencia intenzitást Coulter Epics XL (Beckman Coulter) áramlásos citométer segítségével detektáltuk.

RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol (Invitrogen) felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk 15 U AMV reverz transzkriptázt (Promega, Madison, WI, USA) és 0,025 µg/µl random primert (Promega) felhasználva. Az így előállított cDNS-ből kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (Q-PCR) segítségével mutattuk ki a TRPV1 specifikus transzkriptjét TaqMan primerek és próbák alkalmazásával a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alapján. A génextpresszió relatív mennyiségét a Δ CT módszer (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg. A Q-PCR kísérleteket ABI Prism 7000 készüléken (Applied Biosystems) végeztük el. Kísérleteink során az egyes transzkriptek kimutatására az alábbi TaqMan Gene Expression Assay-eket (Applied Biosystems), valamint egyedileg szintetizált primereket és próbákat alkalmaztuk: humán TRPV1 (assay ID: Hs00218912_m1); humán RXR β (assay ID: Hs00232774_m1); humán PPAR γ (forward primer GATGACAGCGACTTGGCAA, reverse primer CTTCAATGGGCTTCACATTCA probe FAM-CAAACCTGGGCGGTCTCCACTGAG-TAMRA); humán PPAR δ (forward primer AGCATCCTCACGGCAAAG, reverse primer CCACAATGTCTCGATGTCGTG, probe FAM-CAGCCACACGGCGCCCTTTG-TAMRA); humán PPAR α (forward primer CATTACGGAGTCCACGCGT, reverse primer ACCAGCTTGAGTCGAATCGTT, probe FAM-CAAACCTGGGCGGTCTCCACTGAG-TAMRA); human RXR α (forward primer GGCCTACTGCAAGCACAAGTA, reverse primer CAGGCGGAGCAAGAGCTTA, probe FAM-CGAACCTTCCCGGCTGCTCTG-TAMRA); humán CD83 (assay ID Hs00188486_m1), humán CCR7 (assay ID Hs00171054_m1), humán TNF α (assay ID Hs00174128_m1), humán IL-1 β (assay ID Hs00174097_m1), humán IL-6 (assay ID Hs00985639_m1), humán IL-8 (assay ID Hs00174103_m1), humán IL-10 (assay ID Hs00174086_m1), humán IL-12B (assay ID Hs01011518_m1). Belső kontrollként humán gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, Assay ID: Hs99999905_m1), valamint humán ciklofilin (forward primer ACGGCGAGCCCTTGG, reverse primer TTTCTGCTGTCTTTGGGACCT, probe FAM-CGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGCA-TAMRA) transzkriptjeit határoztuk meg.

Immuncitokémia

Az SZ95 sejteket 24-lyukú lemezen steril fedőlemezre szélesztettük és 60%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük. A sejteket 5 perc acetonos fixálást követően 0,1% Triton-

X-100-at (Sigma) tartalmazó PBS-ben permeabilizáltuk. A sejteket PBS oldatban történő mosás és 1%-os BSA-nal (Sigma) történő blokkolás után nyúlban termeltetett anti-TRPV1 primer antitesttel (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) 1:50 hígításban 60 percig inkubáltuk, majd PBS-sel háromszor mostuk. Fluoreszcens mikroszkópiához a fedőlemezeket 60 percig Texas-Reddel konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes másodlagos antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk (1:200-os hígítás PBS-ben) és a sejtmagokat DAPI festés (Vector Laboratories) segítségével tettük láthatóvá. Fénymikroszkópos immuncitómiai festések során a TRPV1 kimutatása nyúl ellenes EnVisionnel (Dako, Glostrup, Dánia) történt, mely egy kecskében termeltetett nyúl ellenes tormaperoxidáz polimer konjugált másodlagos antitest. Az előhívást diamino-benzidinel (DAB – Dako) végeztük. A sejtmagokat Mayer-féle haematoxilinnal (Sigma) tettük láthatóvá, majd a színreakció kifejlődését követően vizes bázisú beágyazó médiummal (Dako) fedtük a metszeteket. A sejteket egy Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon, Tokio, Japán).

A dendritikus sejtek vizsgálatához a monociták izolálását követően a sejteket 24-lyukú lemezen steril fedőlemezre szélesztettük, és a fentebb leírtak szerint 5 napos differenciálódást követően nyertük a fedőlemezen kitapadó éretlen dendritikus sejteket. A dendritikus sejteket a szebocitákkal megegyező módon fixáltuk és jelöltük nyúlban termeltetett anti-TRPV1 primer antitesttel (Sigma, 1:200) és FITC konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes másodlagos antitesttel (Vector Laboratories). A sejtmagokat ebben az esetben is DAPI-val tettük láthatóvá.

Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével plasztikai műtétek során nyert normál humán bőrmintákból készített 3-5 µm vastag, előzetesen formaldehiddel fixált és paraffinba ágyazott metszeteken végeztük. A TRPV1 humán bőrben történő kimutatására a streptavidin-biotin-komplex (SABC) eljárást alkalmaztuk (Paus, 1998). A szövetben előforduló endogén peroxidázok gátlására a metszeteket 0,5% H₂O₂-t tartalmazó 100%-os metanollal kezeltük, majd 2% BSA (Sigma, PBS-ben, pH=7,6) oldattal inkubáltuk, hogy gátoljuk az elsődleges antitest nem-specifikus kötődését. A metszeteket nyúlban termeltetett elsődleges TRPV1 ellenes antitesttel (1:50, Santa Cruz) egy éjszakán át inkubáltuk, amit kecskében termeltetett, biotinilált nyúl-ellenes másodlagos antitest (1:500, DAKO, Glostrup, Dánia) hozzáadása követett. Az streptavidin-

konjugált torna-peroxidáz (1:400, DAKO) biotinhoz való kötődése után a peroxidáz-aktivitás kimutatására DAB (Vector Laboratories) kromogént alkalmaztuk. A magfestésre hematoxin Gill I (Surgipath Europe, Peterborough, UK) szolgált. A reakció specificitásának ellenőrzésére negatív kontrollként az elsődleges antitestet szintetikus blokkoló peptiddel (Santa Cruz) inkubáltuk, illetve elhagytuk a TRPV1 ellenes antitestet. Pozitív kontrollként patkány gerincvelő hátsó szarvából készült metszeteken is elvégeztük a TRPV1 jelölését (Bodó és mtsai, 2004, adatok nem mutatva). További ellenőrzésként (FITC konjugált másodlagos antitest felhasználásával) immunfluoreszcens TRPV1 festést végeztünk vad típusú C57BL/6J és TRPV1 knock-out B6.129S4-Trpv1 egereken (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) (Bíró és mtsai, 2006; adatok nem mutatva).

Western blot

A Western blot analízist a laboratóriumunkban már korábban használt protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998; Boczán és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2003) alkalmaztuk. A sejteket lízis-pufferben arattuk le (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EGTA, proteáz inhibitor koktél 1:100-ban hígítva, mind a Sigmától), majd jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Ezt követően a lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg, ennek alapján mintát készítettünk (5% β -merkaptoetanol, 10% glicerin, 2% Na-dodecil-szulfát (SDS), 0,062 M Tris, 20 mM ditiotreitol, 0,0025 g brómfenolkék, mind Sigma), majd 10 perces főzéssel 100°C-on denaturáltuk a fehérjéket. Az így elkészített mintákból azonos protein tartalmú mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) 100 V konstans feszültségen. Az elektroforézishez 7,5 %-os poliakrilamid gél-t öntöttünk, majd 1-1 mintafellevő vályúba 60 μ g protein tartalmú mintát vittünk fel. Ezt követően a gélből a proteint nitrocellulóz membránra (Whatmann, Maidstone, UK) transzferáltuk, 100 V konstans feszültségen. A membrán szabad kötőhelyeit 5% zsírmentes tejport tartalmazó PBS-ben 20 percig blokkoltuk, majd a kísérlet során alkalmazott molekula standardok alapján 40 kDa alatt a futási irányra merőlegesen kettévágtuk. A magasabb molekulásúlyokat tartalmazó membránokat a szebocita minták vizsgálata során nyúlban termeltetett elsődleges TRPV1 ellenes antitesttel (Santa Cruz) 1:100 hígításban, 5% tej-PBS-ben inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. A dendritikus sejtek jelöléséhez szintén nyúlban termeltetett anti-TRPV1 elsődleges antitestet (Sigma) használtunk 1:200 hígításban. Az alacsony molekulatömegű fehérjéket tartalmazó membránrészeket nyúlban termeltetett citokróm-C ellenes antitesttel

(Santa Cruz) 1:50 arányban hígítva a TRPV1-gyel megegyező módon inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig mostuk PBST-ben (1% Tween-20-at (Sigma) tartalmazó PBS-ben), majd nyúl ellen kecskében termeltetett másodlagos, torna peroxidázzal-konjugált antitesttel (Bio-Rad) 60 percen keresztül inkubáltuk. Újabb 3x10 perc PBST-s mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens szubsztrát kit segítségével (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce) tettük láthatóvá, a jeleket Intelligent Dark Box (Fujifilm, Tokió, Japán) alkalmazásával detektáltuk. A kemilumineszcencia intenzitását az optikai denzitás meghatározásával számszerűsítettük Image Pro Plus szoftver (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) segítségével. A TRPV1 specifikus sávok értékét mindig az ugyanazon mintából, ugyanabban a kísérletben meghatározott citokróm C értékére normálva adtuk meg, a kontroll értékét 100-nak tekintve. A szebociták esetében az 50%-os konfluenciájú tenyészetből, míg a dendritikus sejtek esetében a monocitákból származó minták szolgáltak kontrollként.

RNS interferencia (RNSi)

Az SZ95 szebocitákat 6 lyukú lemezekben tenyésztettük a fentiek szerint kiegészített, de antibiotikum mentes Sebomed tápoldatban. Az 50-70%-os konfluencia elérésekor a tápoldatot szérumentes OptiMEM médiumra (Invitrogen) cseréltük, majd a sejteket 40 nM humán TRPV1 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal (Stealth RNAi – Invitrogen, azonosító kódok: HSS111305 és HSS111306, a továbbiakban rendre siRNS-5 és siRNS-6) transzfektáltuk Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control (Invitrogen) 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 (ld. 16.A-B ábrák).

Az intracelluláris lipidek detektálása

A szebaceous lipidek szemikvantitatív detektálására a sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük, és 48 órán keresztül kezeltük a különböző anyagokkal. A lipid cseppeket Oil Red O (Fluka/Sigma) lipid festékkal festettük. A sejteket rövid PBS-sel történő mosás után egy óráig 4%-os paraformaldehiddal (Sigma) szobahőn fixáltuk, majd kétszer PBS-sel és egyszer 60%-os isopropanollal (Spektrum-3D) mostuk. Ezután húsz percig frissen elkészített

0,3% Oil Red O oldattal 37 °C-on festettük, oldószerként 60%-os isopropanolt használva. Végül ismételt mosás után a sejtmagokat húsz másodpercig tartó Mayer-féle haematoxin (Sigma) festéssel tettük láthatóvá. A színreakció kifejlődését követően vizes bázisú beágyazó médiummal (Dako) fedtük a metszeteket.

A kvantitatív mérésekhez a szebocitákat fekete falú, átlátszó aljú, 96-lyukú lemezekon (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) tenyésztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, és különböző ideig kezeltük a megfelelő anyagokkal. Ezt követően a felülúszók leszívása után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd minden lyukhoz 100 µl PBS-ben oldott Nile Red-et (1 µg/ml) (Sigma) adtunk. A lemezeket ezután 20 percig inkubáltuk 37°C-on majd a lipidekben oldódó Nile Red fluoreszcenciáját Molecular Devices FlexStation 384 II (Molecular Devices, San Francisco, CA USA) spektrofluorométerrel detektáltuk. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyított relatív fluoreszcencia egységek százalékában határoztuk meg. Kihhasználva, hogy a Nile Red emissziós spektruma kék irányba tolódik a lipidközeg polaritásának csökkenésével, lehetőség nyílt a neutrális és poláris lipidek egymás melletti detekciójára. Neutrális lipidek esetében 485 nm-es excitáció és 565 nm-es emissziós hullámhosszat, poláros lipidek esetében 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmaztunk (Alesta és mtsai., 2006).

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

A humán monocitákat az izolálást követően 6 lyukú tenyésztőlemezen steril fedőlemezre szélesztettük. A fentebb leírtak szerint 5 napos GM-CSF-ral és IL-4-gyel indukált differenciálódást követően a fedőlemezen kitapadó éretlen dendritikus sejteket nyertünk. Kísérleteink egy részében a fedőlemezen kitapadó dendritikus sejtek érését a fentebb bemutatott proinflammatorikus citokinkoktállal további 24 órán keresztül indukáltuk. Az éretlen és érett dendritikus sejteket 5 µM fluoreszcens kalcium érzékeny Fura-2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Invitrogen) 90 percig inkubáltuk A-IMV oldatban. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket hordozó fedőlemezeket invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon) tárgyasztalára helyeztük az $[Ca^{2+}]_{IC}$ méréséhez. A mérés során a sejteket lassan perfundáltatott Tyrode-oldattal (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g/l glükóz, (mind Sigma) pH 7,4) folyamatosan mostuk. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével, majd a fluoreszcens emissziót fotoelektron-sokszorozóval 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva (PTI

Deltascan készülék, Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA). 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 sejtek növekedését MTT alapú kolorimetriás assay (Sigma) segítségével határoztuk meg. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje az MTT-ben (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólium bromid) és analógjaiban található tetrazólium gyűrűt hasítja. Ennek hatására formazán kristályok keletkeznek, melyek mennyisége savas oldásukat követően kolorimetriásan mérhető. Az SZ95 szebocitákat 96-lyukú edényekben 5000-40.000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük, majd 1-6 napig tenyésztettük. A mérés napján a sejtekről a tápoldatot eltávolítottuk, ezután minden lyukhoz 10-10 μ l 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adunk, majd a sejteket két óráig inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubáció végén a képződött formazán kristályokat 0,1 M izopropanolban oldott sósavban feloldottuk, majd a koncentrációt kolorimetriás úton mértük 550 nm-en. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg. A kontrollhoz viszonyított növekményt a sejtproliferáció fokozódásaként értelmeztük, míg a kontrollhoz viszonyított csökkenés esetén további vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk, hogy csak a proliferáció gátlásáról, vagy a sejtek pusztulásáról van szó.

A dendritikus sejtek életképességének vizsgálatához a frissen izolált monocitákat 96 lyukú tenyésztőlemezen, 200.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük, melyből a differenciálódás 5. napjára kb. 100.000 éretlen dendritikus sejtet nyertünk. A dendritikus sejtek életképességét az MTT assay elvein alapuló EZ4U assay (BioMedica, Bécs, Ausztria) segítségével határoztuk meg, követve a gyártó protokollját. Ez az assay nem igényel előzetes mosási lépéseket és a keletkező formazán kristályok utólagos feloldását, valamint a sejtekre sem toxikus, ezért alkalmasabbnak találtuk a szebocitáknál gyengébben letapadó és toxikus hatásokra érzékenyebb primer monocita eredetű dendritikus sejtek vizsgálatára. A keletkezett termék abszorbanciáját 450 nm-en mértük; a mért abszorbancia ebben az esetben is arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg.

A mitokondriális membránpotenciál meghatározása

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legelső markere (Green és Reed, 1998; Susin és mtsai, 1998). Az SZ95 sejtek mitokondriális membránpotenciálját 24 órás kapszaicin kezelés után határoztuk meg MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Molecular Probes/Invitrogen) használatával. Az alkalmazott koncentrációban a festék a jelentős membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban halmozódik fel. Az apoptotikus folyamatok esetén a sejtek mitokondriális membránpotenciálja csökken, így kevesebb festék halmozódik fel bennük, ami a fluoreszcencia csökkenésének formájában vizualizálható. A szebocitákat fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekben (Greiner Bio-One) tenyésztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, és 1 napig kezeltük kapszaicin illetve arachidonsav különböző dózisaival. A mitokondriális membránpotenciál csökkenését pozitív kontrollként alkalmazott karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazonnal (CCCP-vel) váltottuk ki. A felülúszók leszívása után a sejteket a gyártó utasításai szerint 1:200 hígított DiIC₁(5) munkareagenssel 37 °C-on húsz percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, és a DiIC₁(5) fluoreszcenciát 630 nm-es excitációs és 670 nm-es emissziós hullámhosszon mértük FlexStation 384 II (Molecular Devices) spektrofluorométer segítségével. Az eredményeket ebben az esetben is a kontroll százalékában adtuk meg.

Az izolált monocitákat szintén fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekben (Greiner Bio-One) szélesztettük 200.000 sejt/lyuk denzitásban és a korábban bemutatottak szerint 5 nap alatt differenciáltattuk a dendritikus sejteket. A kísérletek egy részében ezt követően az inflammatorikus citokinekkel további 24 órán keresztül indukáltuk a dendritikus sejtek érését. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálatát a szebocitákkal megegyező módon végeztük, MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit felhasználásával.

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálatával párhuzamosan SYTOX Green (Invitrogen) jelölést is végeztünk, a sejteket a két festékkel együtt inkubálva (ld. „A citotoxicitás vizsgálata”).

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 (G6PD Cytotoxicity assay kit – Invitrogen). A sejteket 96-lyukú fekete falú átlátszó aljú lemezekben (Grenier Bio-One) tenyésztettük és 24 órán keresztül kezeltük kapszaicin és arachidonsav különböző dózisaival.

A kétszeres töménységű reakcióoldatot a gyártó protokollja alapján állítottuk össze, és 1:1 arányú hígításban tettük a sejtek tenyésztő oldatához, majd 37°C-on húsz percig inkubáltuk. A keletkező resorufin mennyiségét FlexStation 384 II (Molecular Devices) spektrofluoriméterrel 545 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk. Az adatokat a pozitív kontrollként használt előzetesen lizált sejtek esetén mért fluoreszcencia százalékában adtuk meg.

A sejtekből felszabaduló G6PD aktivitása 24 óra után jelentősen csökkenhet, ezért a hosszútávú kezelések esetleges citoxikus hatását SYTOX Green jelöléssel vizsgáltuk. A SYTOX Green nagy méretű fluoreszcens festék, amely a sejtmagban a duplaszálú DNS-hez kötődik, azonban az ép sejtek membránján nem permeál. Így csak a ruptúrált membránú, nekrotikus sejtekbe jut be, ahol megfelelő gerjesztés esetén zölden fluoreszkál. A zöld fluoreszcencia detektálásából a tenyésztetben lévő citotoxikus folyamatokra következtethetünk. A vizsgálatok során a sejteket 96-lyukú, fekete falú, átlátszó aljú lemezen (Grenier Bio-One) tenyésztettük és több napon keresztül kezeltük kapszaicin különböző dózisaival. A kezelések végeztével a sejteket tápoldatban hígított 1 μM SYTOX Green DNS festékkel (Molecular Probes-Invitrogen) inkubáltuk 37 °C-on 30 percen keresztül. Kétszeri CMF PBS-ben történő mosást követően a SYTOX Green fluoreszcencia intenzitását az egyes lyukakban FlexStation 384 II (Molecular Devices) spektrofluoriméterrel határoztuk meg 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett. Az eredményeket a kontroll százalékában tüntettük fel.

A fagocitózis vizsgálata

A fagocitotikus aktivitás mérése Vybrant Phagocytosis Assay Kit (Invitrogen) segítségével történt. A dendritikus sejteket 96 lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekben (Greiner Bio-One) differenciáltattuk. A tenyésztőoldatot leszívtuk, majd a lyukakhoz egyenként 100 μl , fluoreszceinnel konjugált *Escherichia coli* biopartikulumokat tartalmazó oldatot pipettáztunk, amit a gyártó protokollja alapján állítottunk össze. Két óra 37°C-on történő inkubáció után – mely idő alatt a sejtek képesek voltak a baktériumrészek felvételére – a sejtekről az oldatot leszívtuk, ezután lyukanként 100 μl 0,25 mg/ml koncentrációjú tripánkék (Invitrogen) oldatot adtunk a sejtekhez. A tripánkék oldatot egy perc inkubációt követően eltávolítottunk, majd FlexStation 384 II (Molecular Devices) fluoriméter segítségével mértük a fluoreszcencia intenzitását 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszon. Az eredményeket a kontroll százalékában tüntettük fel.

A citokinfelszabadulás vizsgálata

A sejtek által kiválasztott citokinek meghatározásához a sejtek felülűsóját 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, követve a gyártó protokollját. A citokinek mért mennyiségét a kontroll százalékában kifejezve adtuk meg.

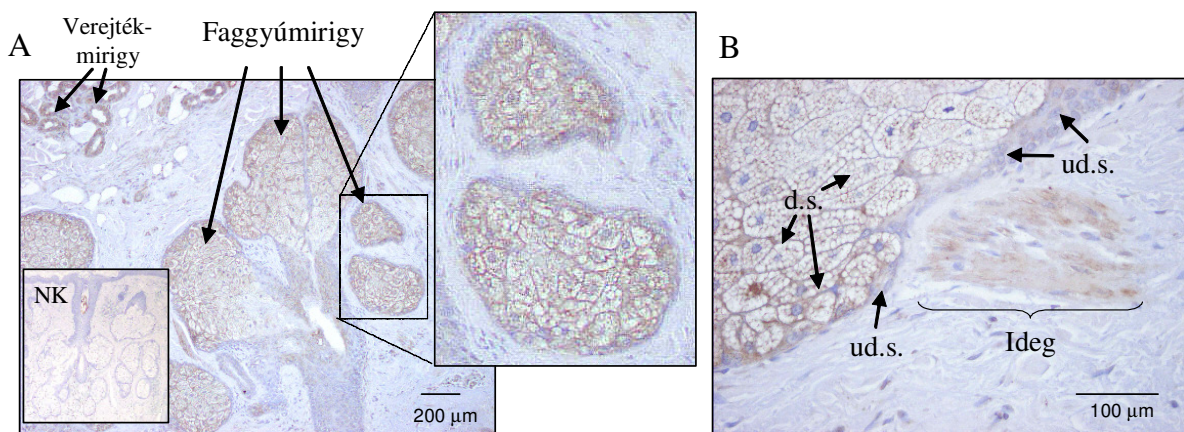
Statisztikai analízis

A kapott eredményeket, ha azt a továbbiakban másként nem jelezzük, a megfelelő kontroll százalékában adtuk meg. Hibasávbán az eredmények standard hibájának átlagát (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros *t*-próbával, egyéb esetekben független mintás *t*-próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), valamint Bonferoni és Dunett post-hoc tesztekkel vizsgáltuk SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statisztikai szoftver segítségével. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

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

Korábbi eredményeinket (Bodó és mtsai, 2004) megerősítve immunhisztokémia segítségével kimutattuk, hogy a humán faggyúmirigyek *in situ* expresszálják a TRPV1-et (5. ábra). A korábbi irodalmi adatokkal (Ständer és mtsai, 2004) megegyezően emellett azt is megállapítottuk, hogy a TRPV1 expressziója kifejezettebb a faggyúmirigyben centrálisan található differenciálódott szebocitákon, míg a mirigy perifériáján elhelyezkedő differenciálatlan sejtek kevésbé intenzíven jelölődtek (5.B ábra).

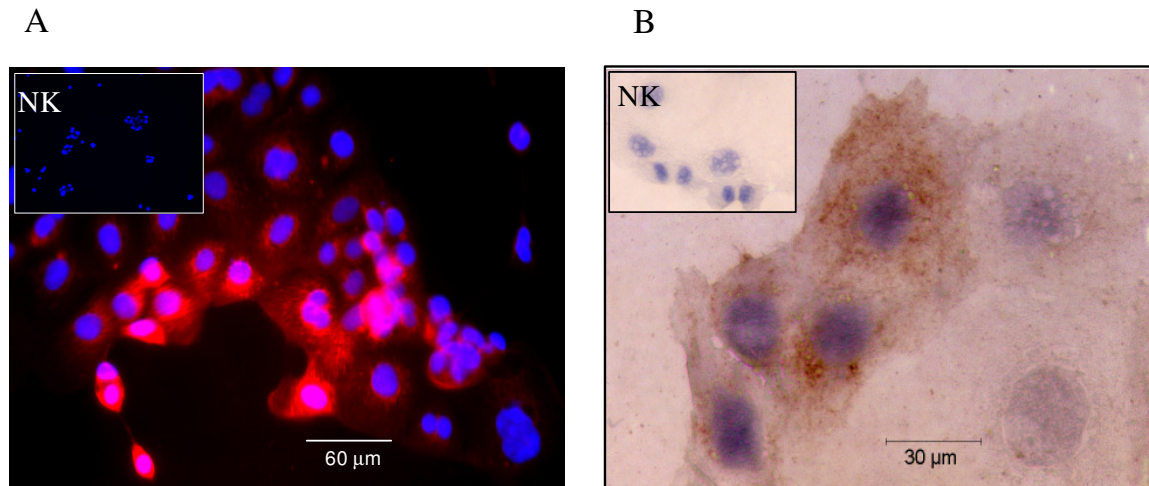


5. ábra: A TRPV1 kifejeződése a humán faggyúmirigyben in situ

A TRPV1 expresszióját streptavidin-biotin-komplex eljárást alkalmazva DAB jelöléssel mutattuk ki; az immunpozitív reakciót barna szín jelöli. **A:** A TRPV1 expressziója a humán bőr dermiszében és a faggyúmirigyekben. **B:** A TRPV1 expressziója a szebocitákon in situ. Az immunpozitivitás a centrálisabb helyzetű, differenciálódott szebocitákon (**d.s.**) erőteljesebb, mint a perifériás lokalizációjú differenciálatlan szebocitákon (**ud.s.**). Előbbiekben a membránjelölődés is jól megfigyelhető. Jól látható a „belső pozitív kontrollként” is használható perifériás ideg TRPV1 pozitivitása. **NK:** preabszorpciós negatív kontroll.

Ezt követően megvizsgáltuk a TRPV1 kifejeződését a humán faggyúmirigy eredetű SZ95 sejtvonalon is. A receptor protein és az azt kódoló mRNS jelenlétét egyaránt sikerrel igazoltuk (6-8. ábra). Az immuncitokémiai vizsgálatok alapján a receptor expresszióját, a keratinocitákon korábban leírtakhoz (Denda és mtsai, 2001; Bodó és mtsai, 2004; 2005) hasonlóan, inhomogénnek találtuk (6. ábra), ami feltehetően összefügg a sejtek differenciáltsági állapotával. Ezt támasztják alá a Western blot és a kvantitatív PCR kísérleteink eredményei is, melyek során azt tapasztaltuk, hogy a TRPV1 expressziója mind

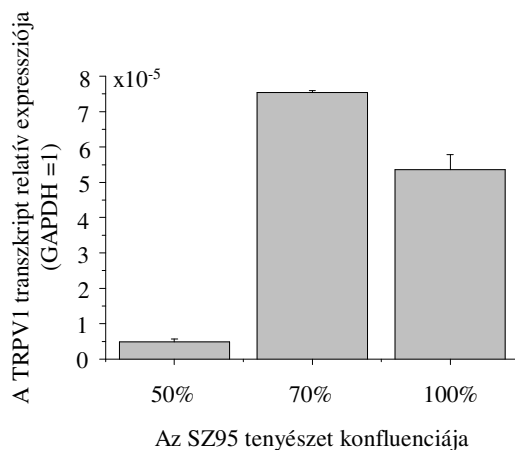
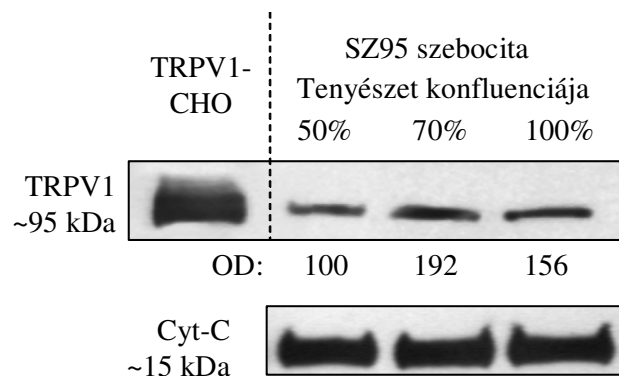
protein (7. ábra), mind pedig mRNS (8. ábra) szinten fokozódik a konfluencia növekedésével, ami a differenciálódás fokozódásával jár együtt.



6. ábra: A TRPV1 kifejeződése a humán faggyúmirigy eredetű SZ95 sebocitákon
 A TRPV1 expresszióját különböző immuncitokémiai technikákkal mutattuk ki. **A:** Texas Red jelölés. Szembetűnő a sejtek között tapasztalható fluoreszcenciaintenzitás különbsége. **B:** DAB jelölés. Az immunpozitivitás részben intracelluláris helyzetűnek tűnik. **NK:** Negatív kontroll.

7. ábra: A TRPV1 protein szintű expressziója különböző konfluenciájú SZ95 kultúrákban

Különböző konfluenciánál összegyűjtött SZ95 sejtekből meghatároztuk a TRPV1 protein expresszióját Western immunoblot segítségével. Pozitív kontrollként a receptort overexpresszáló CHO sejtvonalat (TRPV1-CHO) használtunk. Ugyanazon kísérlet során meghatároztuk a minták citokróm-C (Cyt-C) expresszióját is. Meghatároztuk az immunpozitív sávok optikai denzitását, a TRPV1 expresszió értékeit ugyanazon minta citokróm-C értékére normáltuk, és a kontroll értékét 100-nak tekintve adtuk meg (OD).

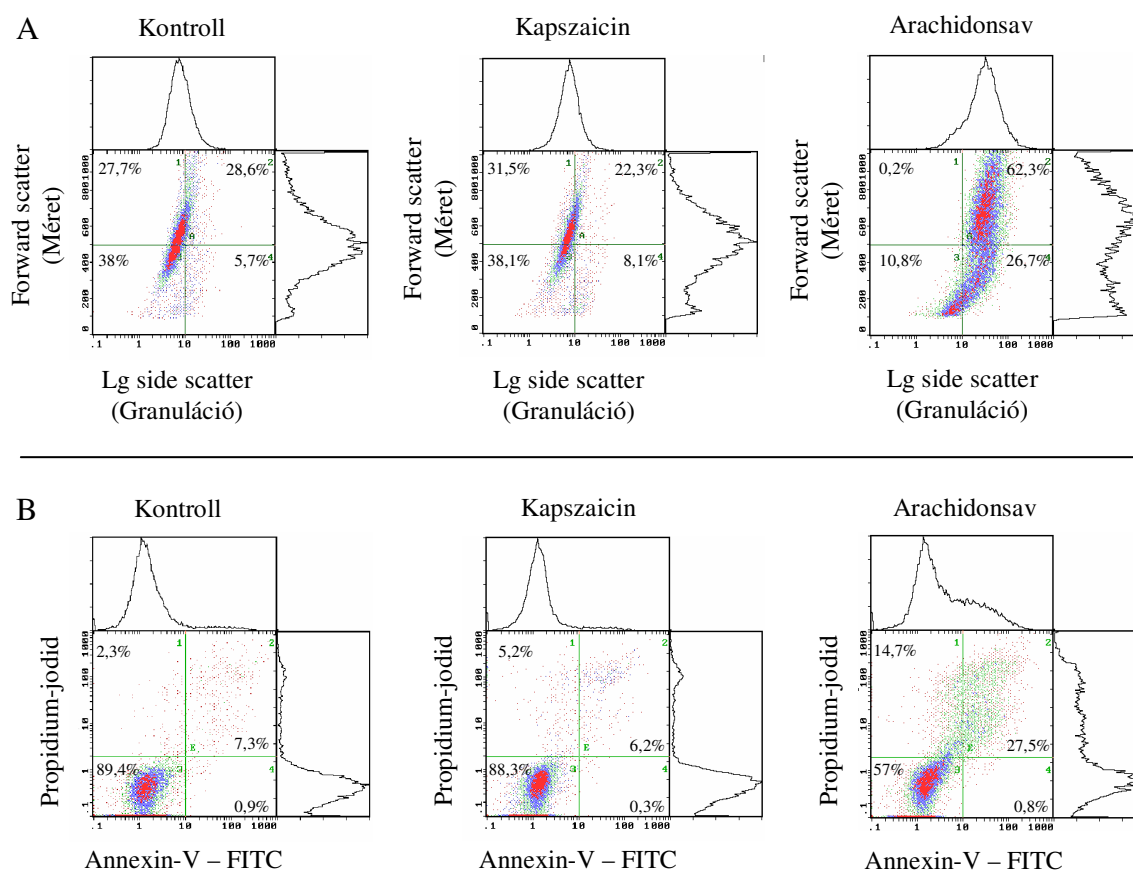


8. ábra: A TRPV1 mRNS expressziója különböző konfluenciájú SZ95 sejttenyészetekben

A különböző konfluenciájú SZ95 sebocitákból RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót követően kvantitatív valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk a TRPV1 specifikus mRNS transzkript kifejeződését. Az eredményeket a belső kontrollként használt GAPDH expresszióra normálva adtuk meg.

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

A továbbiakban a szebocitákon expresszáldó TRPV1 funkcionális szerepét vizsgáltuk. A szebociták legfontosabb feladata a változatos összetételű szébum termelése. A sejtek terminális differenciálódásuk során egyre több lipidet termelnek, miközben méretük megnő, granulációjuk fokozódik. Ennek során a sejtek plazmájában egyre több és nagyobb – főleg neutrális – lipideket tartalmazó zsírcsepp halmozódik fel (Rosenfield, 1989; Thody és Shuster, 1989; Doran és mtsai, 1991, Zouboulis és mtsai, 1998). Ezért megvizsgáltuk a TRPV1 specifikus aktivátor kapszaicin hatását az SZ95 sejtek lipidszintézisére és terminális differenciálódására.

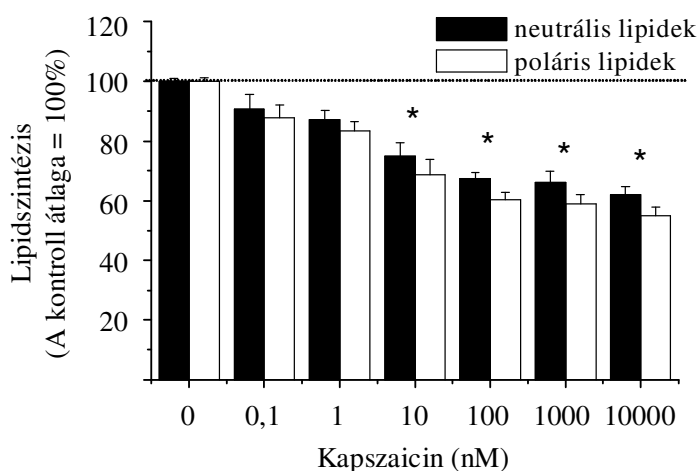


9. ábra: Az SZ95 szebociták áramlásos citometriás vizsgálata

A sejteket 48 órán keresztül 10 μ M kapszaicinnal vagy 100 μ M arachidonsavval kezeltük. **A:** A szebociták fenotípusos karakterizálása a fényoszórás adatok alapján történt. **B:** FITC-konjugált annexin-V és propidium-jodid kettős festés segítségével a sejthalál apoptotikus és nekrotikus formáit vizsgáltuk. A kapszaicinkezelés nem okozott változást egyik paraméterben sem, viszont az arachidonsav növelte a sejtek méretét, fokozta a granulációjukat és a sejtek pusztulását indukálta.

Áramlásos citometriás vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy 10 μM -ban alkalmazott kapszaicin 48 órás kezelést követően sem fokozta a sejtek granulációját (side scatter) és nem növelte méretüket (forward scatter) (9.A ábra). Ezzel ellentétben, mint azt Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás méréseinkkel kimutattuk, már 24 óra elteltével dóziszfüggő módon csökkentette mind a poláris, mind a neutrális lipidek bazális szintézisét (10. ábra).

A lipidtermelődést gátló hatása mellett a kapszaicin nem volt hatással az SZ95 sejtek életképességére. Áramlásos citometriás mérések során azt tapasztaltuk, hogy a 48 órás 10 μM koncentrációban alkalmazott kapszaicinkezelés nem változtatta meg sem az apoptotikus



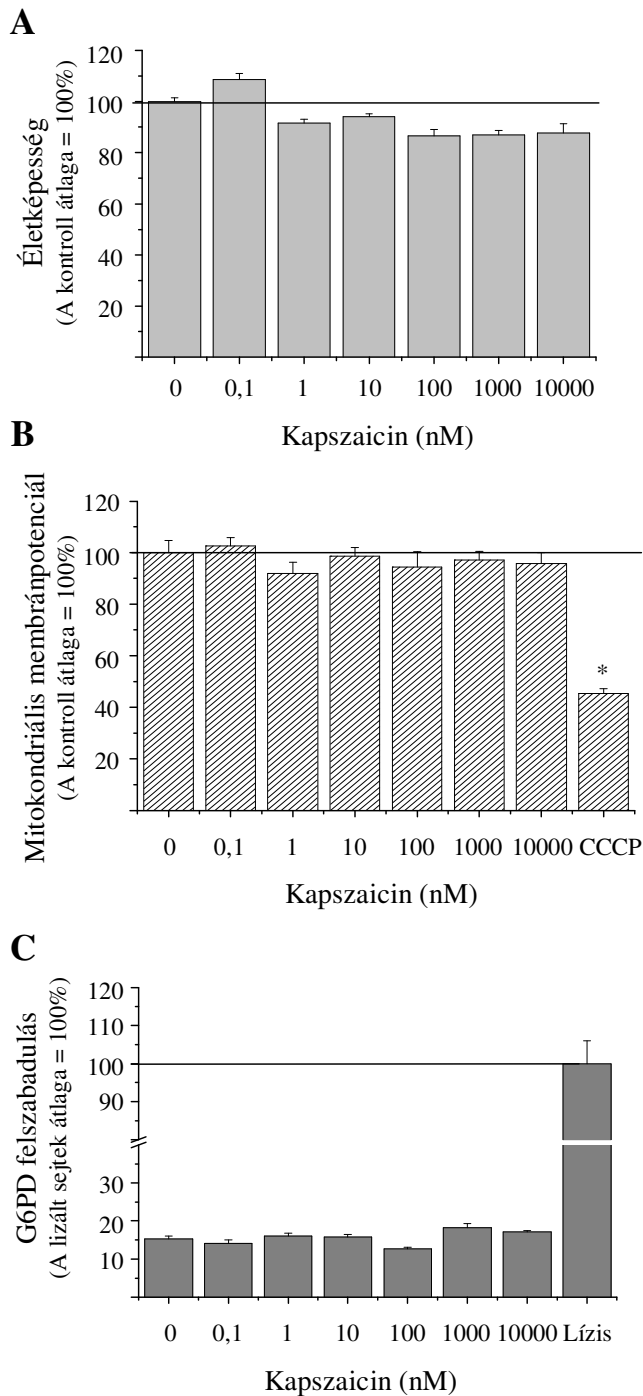
10. ábra: A kapszaicin hatása az SZ95 szebociták lipidszintézisére

Az SZ95 szebocitákat 24 órán keresztül kezeltük különböző koncentrációjú kapszaicinnel, majd Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás mérés segítségével vizsgáltuk a sejtek lipidszintézisét. $N=4$, $*p<0,05$

(Annexin-V+ / propidium-jodid–), sem pedig a nekrotikus (propidium-jodid+) sejtek arányát a tenyészetekben (9.B ábra). Kimutattuk továbbá, hogy a 24 órán keresztül alkalmazott kapszaicin a vizsgált 0,1 nM – 10 μM koncentráció-tartományban nem változtatta meg az élő sejtek számát sem (11.A ábra). Az élő sejtek számához hasonlóan nem változott a sejtek mitokondriális membránpotenciálja (11.B ábra) és G6PD felszabadulása (11.C ábra)

sem, vagyis a kapszaicin az alkalmazott koncentrációkban nem indukált sem apoptotikus, sem pedig nekrotikus változásokat.

Kísérleteinkben pozitív kontrollként arachidonsavat alkalmaztunk, melyről már korábban is kimutatták, hogy serkenti az SZ95 szebociták terminális differenciálódását (Wrobel és mtsai, 2003). A korábbi irodalmi adatokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy az arachidonsav – a kapszaicinnel ellentétben – fokozta a szebociták differenciálódását, 48 óra elteltével a sejtek granulációja és mérete egyaránt megnőtt (9.A ábra). Oil Red O festés segítségével kimutattuk emellett, hogy 50 μM arachidonsav már 24 óra elteltével fokozta a sejtekben a lipidek felhalmozódását (12.A ábra). Nile Red jelölést követő kvantitatív méréseink szerint az arachidonsav – a differenciálódásra jellemzően – elsősorban a neutrális zsírok termelődését fokozta (12.B ábra). A lipidszintézis fokozódásával párhuzamosan arachidonsav hatására a sejtek mitokondriális membránpotenciálja jelentősen csökkent

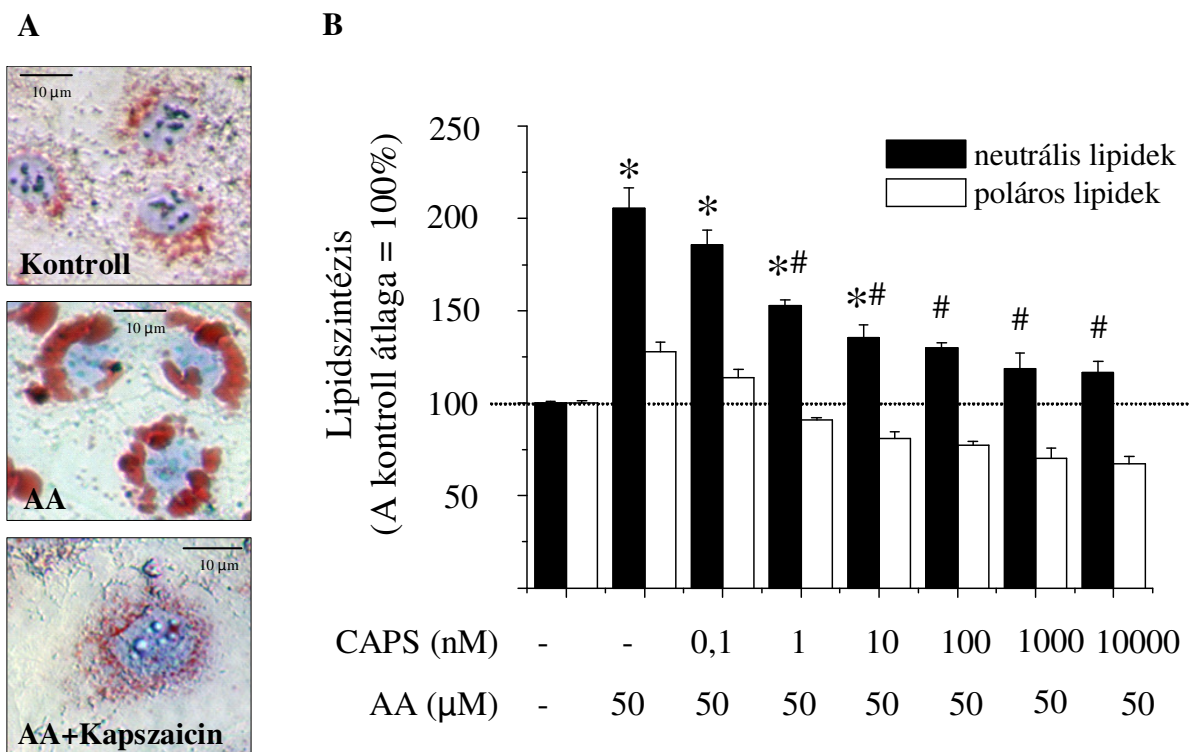


11. ábra: Kapszaicin hatása az SZ95 szebociták életképességére

A sejteket 24 órán keresztül kezeltük kapszaicinnal az ábrán bemutatott koncentrációkban. **A:** A sejtek életképességét MTT assay-vel határoztuk meg. **B:** A mitokondriális membránpotenciált DilC₁(5) jelöléssel követtük nyomon. Pozitív kontrollként CCCP-t használtunk. **C:** A nekrotikus folyamatokat G6PD felszabadulás segítségével vizsgáltuk. A feliülűszóban detektált enzimaktivitás mértékét a pozitív kontrollként használt lizált sejtek százalékában adtuk meg. N=4, *p<0,05

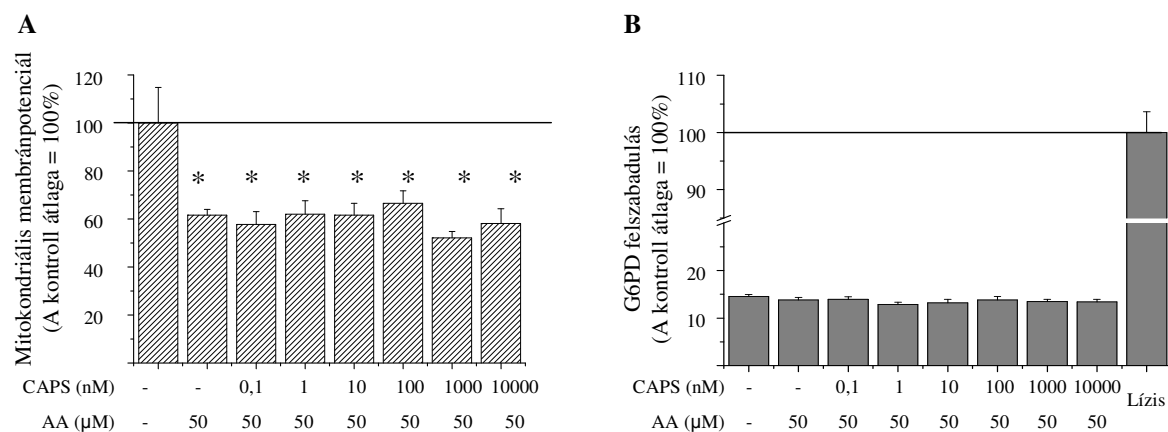
(apoptotózis) (13.A ábra), de nem nőtt a G6PD felszabadulás (13.B ábra); azaz az arachidonsav nem volt citotoxikus hatású. 100 μ M arachidonsav alkalmazását követően 48 órával pedig késői apoptotikus/nekrotikus változásokat is megfigyelhettünk; az arachidonsavval kezelt tenyészetekben az Annexin-V és a propidium-jodid pozitív sejtek aránya egyaránt megnőtt (9.B ábra).

Ezt követően megvizsgáltuk a kapszaicin hatását az SZ95 szebociták arachidonsavval indukált differenciálódására. Azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin dóziszfüggően gátolta az arachidonsav lipidszintézist fokozó hatását (12. ábra), viszont nem befolyásolta az arachidonsav indukált apoptotikus folyamatokat; azaz nem volt hatással az arachidonsav által okozott mitokondriális membránpotenciál csökkenésre. (13.A ábra). A két anyag együttes alkalmazása sem váltott ki nekrotikus hatásokat, a G6PD felszabadulást együttesen sem fokozták (13.B ábra). Mindezek alapján megállapíthattuk, hogy a szebociták (bazális és arachidonsav által indukált) lipidszintézisét a rövidtávú (24 h) kapszaicin kezelés szelektíven és dóziszfüggő módon csökkenti anélkül, hogy befolyásolná a sejtek életképességét.



12. ábra: A kapszaicin hatása az SZ95 szebociták archidonsav által indukált lipidszintézisére.

A: Az SZ95 szebocitákat 24 órán keresztül kezeltük 50 μM arachidonsavval (AA) vagy 50 μM arachidonsav és 10 μM kapszaicin kombinációjával. A sejtek fixálását követően az intracelluláris lipidcseppeket Oil Red O festéssel jelöltük, a sejtmagot pedig Mayer-féle hematoxilinnel tettük láthatóvá. **B:** A sejteket szintén 24 órán keresztül kezeltük kapszaicinnel (CAPS) és arachidonsavval (AA), az ábrán bemutatott kombinációkban és koncentrációkban majd Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás mérés segítségével vizsgáltuk a sejtek lipidszintézisét. N=4, * $p < 0,05$, a kontrollhoz viszonyítva; # $p < 0,05$ az önmagában alkalmazott 50 μM arachidonsav kezeléshez viszonyítva.

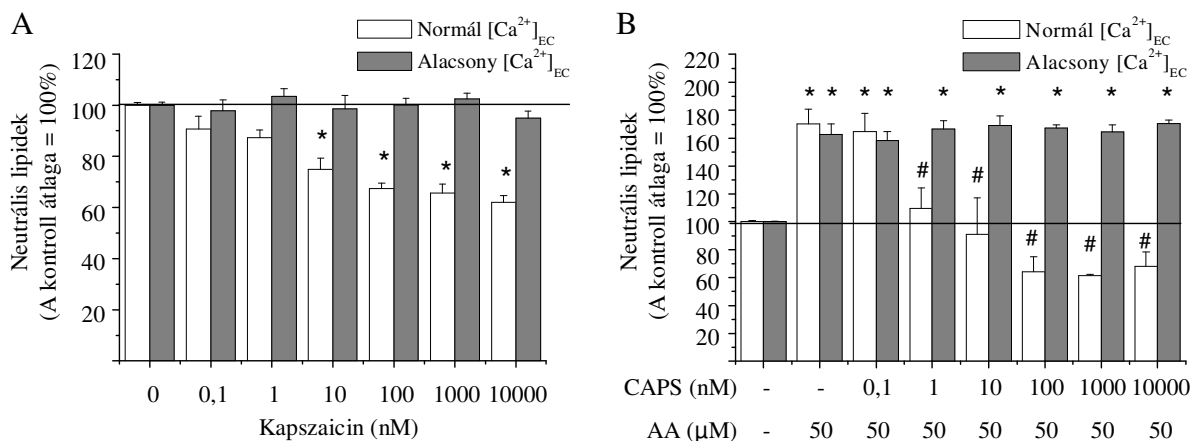


13. ábra: Az arachidonsav és a kapszaicin hatása az SZ95 szebociták apoptotikus és nekrotikus folyamataira

A sejteket 24 órán keresztül kezeltük kapszaicinnel (CAPS) és arachidonsavval (AA), az ábrán bemutatott kombinációkban és koncentrációkban. **A:** A mitokondriális membránpotenciált DilC₁(5) jelöléssel követtük nyomon. **B:** A nekrotikus folyamatokat G6PD felszabadulás segítségével vizsgáltuk. A felülűszóban detektált enzimaktivitás mértékét a pozitív kontrollként használt lizált sejtek százalékában adtuk meg.

A kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatását a TRPV1 közvetíti

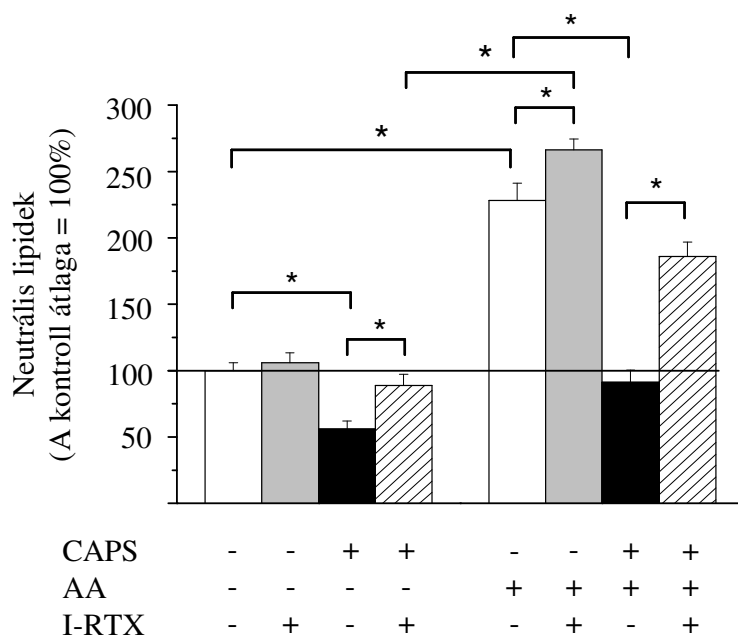
További vizsgálataink arra szolgáltattak bizonyítékot, hogy a kapszaicin az SZ95 szebocitákban is a TRPV1-en keresztül fejt ki hatását. Korábbi kutatások számos sejttípuson igazolták, hogy a TRPV1 funkcionális Ca^{2+} -csatornaként működik (Bevan és mtsai, 1993; Caterina és mtsai, 1997; Bíró és mtsai, 1998; Birder és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Bodó és mtsai, 2005). Ezért elsőként megvizsgáltuk a Ca^{2+} szerepét a kapszaicin hatásának kifejlődésében. Korábbi kapszaicin kezeléseinket célzottan megismételtük normál és csökkentett Ca^{2+} -tartalmú médiumban is, majd Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás mérésekkel vizsgáltuk a sejtek lipidszintézisét. Eredményeink szerint a csökkentett Ca^{2+} -koncentrációjú közegben a kapszaicin (a normál Ca^{2+} -szint mellett tapasztalt) gátló hatása elmaradt, mind a bazális, mind az arachidonsav indukált lipidszintézis esetében (14. ábra). Ez felveti a TRPV1, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna szerepét a kapszaicin hatásának kifejlődésében.



14. ábra: Az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció szerepe a kapszaicin lipidcsökkentő hatásának kialakulásában
A: Az SZ95 szebocitákat 24 órán keresztül kezeltük az ábrán jelzett kapszaicin koncentrációkkal normál és alacsony Ca^{2+} tartalmú médiumban. A neutrális lipidek szintjét Nile Red jelölést követően fluorimetriás mérésekkel határoztuk meg. **B:** A normál és alacsony Ca^{2+} tartalmú médiumban történt kezelést különböző koncentrációjú kapszaicin (CAPS) és arachidonsav (AA) kombinációjával is megismételtük, a neutrális lipidek szintjét az előbbieket szerint detektáltuk. $N=4$, * $p<0,05$, a kontrollhoz viszonyítva; # $p<0,05$ az önmagában alkalmazott 50 μ M arachidonsav kezeléshez viszonyítva.

Ezt a feltevést farmakológiai vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Ennek során a TRPV1 specifikus gátlószerét, az I-RTX-et (Wahl és mtsai, 2001) alkalmaztuk kapszaicinnal, valamint arachidonsavval kombinálva, és vizsgáltuk a sejtek lipidszintézisét. Az I-RTX jelenlétében a kapszaicin nem fejtette ki hatását; azaz sem a bazális, sem az arachidonsav által indukált lipidszintézist nem volt képes csökkenteni (15. ábra), amely jelenség alátámasztja a TRPV1 szerepét a lipidszintézis gátlásában. Érdekes megfigyelésnek adódott, hogy az I-RTX

jelenlétében az arachidonsav hatása, kismértékben ugyan, de fokozódott, ami a TRPV1 endogén aktivitására utalhat (ld. alább).

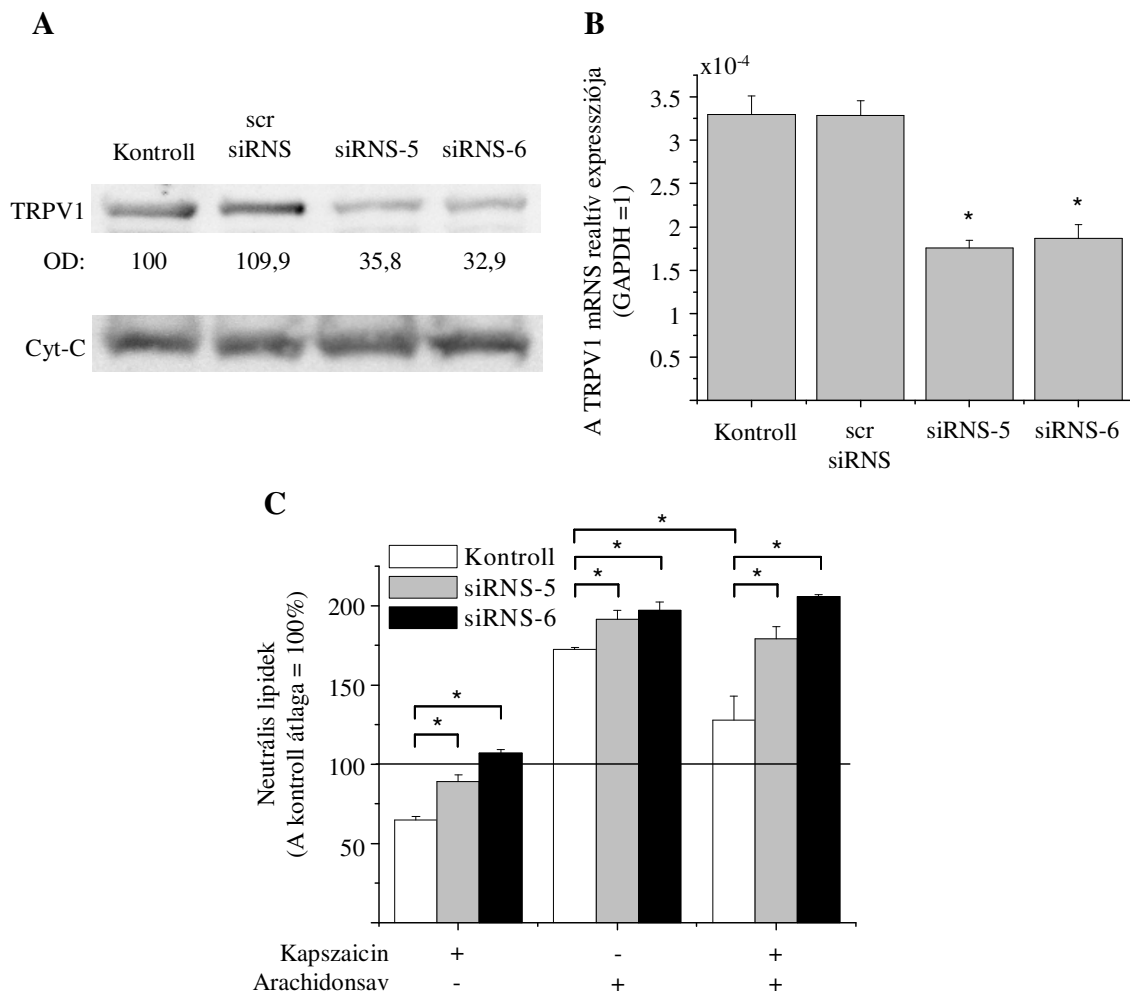


15. ábra: A TRPV1 szerepe a kapszaicin lipidszintézist gátló hatásának kialakulásában

A szebocitákat 24 órán át kezeltük 10 μ M kapszaicinnal (CAPS) és 50 μ M arachidonsavval (AA), valamint a TRPV1 specifikus antagonistá I-RTX 50 nM-os koncentrációjával az ábrán jelzett kombinációkban. A neutrális lipidek szintjét a korábban leírtak szerint Nile Red jelölést követően határoztuk meg. N=4, *p<0,05, a jelzett csoportok között.

Végezetül RNS interferencia technikát alkalmazva is vizsgáltuk a TRPV1 szerepét a kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatásában. Az SZ95 szebocitákat két eltérő, de a TRPV1 mRNS-ére egyaránt specifikus siRNS-sel is transzfektáltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. Western blot és Q-PCR technikák alkalmazásával kimutattuk, hogy mindkét siRNS hatékonyan csökkentette a TRPV1 expresszióját protein

(16.A ábra) és mRNS (16.B ábra) szinten egyaránt. 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 szelektív gátlása esetén a kapszaicin gyakorlatilag hatástalannak bizonyult, azaz sem a bazális, sem az arachidonsav indukált lipidszintézist nem volt képes gátolni (16.C ábra). Az arachidonsav viszont kis mértékben bár, de ebben az esetben is hatásosabbnak mutatkozott a TRPV1 csendesített sejtekben, ami ismét csak arra utal, hogy a TRPV1 endogén aktivitása konstitutívan gátolhatja a lipidszintézist. Eredményeink összhangban állnak az I-RTX kezelés esetén tapasztaltakkal, vagyis elmondható, hogy a TRPV1 farmakológiai gátlása és RNS interferenciával történő csendesítése egyaránt gátolta a kapszaicin hatásának kifejlődését. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a kapszaicin lipidszintézist gátló hatását a TRPV1-en keresztül fejt ki.



16. ábra: A TRPV1 specifikus RNSi hatása az SZ95 szebociákra

Az SZ95 szebocitákat az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint transzfektáltuk TRPV1-re specifikus siRNS-ekkel (siRNS-5 és siRNS-6), valamint scrambled siRNS-sel (scr RNS). **A:** A TRPV1 expresszió vizsgálata western blot technikával a transzfektációt követő második napon. A TRPV1 expresszió mértékét az immunpozitív sávok optikai denzitásával jellemeztük, amiket a belső kontrollként használt citokróm C (Cyt-C) értékeire normalizáltuk. A normalizált optikai denzitás értékeket (OD) a kontroll százalékában adtuk meg. **B:** A TRPV1 specifikus mRNA transzkript mennyiségét kvantitatív valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk, szintén két nappal a transzfektációt követően. Az expresszió értékeit a GAPDH expressziójára normalizálva, három független mérés adatai alapján adtuk meg. **C:** A kapszaicin hatása a lipidszintézisre TRPV1 specifikus siRNS-sel transzfektált és kontroll szebocitákon. Az SZ95 sejteket a transzfektáció másnapján 96 lyukú tenyésztőlemezre szélesztettük, majd 24 óra múlva (vagyis a transzfektációt követő második napon, mikor a TRPV1 expresszióját a legalacsonyabbnak találtuk) kezeltük 10 μ M kapszaicinnal és 50 μ M arachidonsavval az ábrán bemutatott kombinációkban. Ezt követően újabb 24 órával Nile Red jelölést követően mértük a lipidek mennyiségét fluorimetriás úton. N=4, * $p < 0,05$, a jelzett csoportok között.

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

A kapszaicinról, részben laboratóriumunk munkái során, már korábban kiderült, hogy – többek között a humán bőr keratinocitáin is – képes a génexpressziót, valamint egyes citokinek felszabadulását is megváltoztatni (Bíró és mtsai, 1998b; Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005). Ezért a szebocitákkal kapcsolatosan is felvetődött a kérdés, hogy a kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatásában szerepet játszhatnak-e génexpressziós változások is. Megvizsgáltuk tehát a lipidszintézis szabályozásában központi szerepet játszó PPAR-ok expresszióját és annak változását a kapszaicin hatására. A PPAR-ok funkcionális formájukban heterodimert képeznek a retinoid-X receptorokkal (RXR) (Bardot és mtsai, 1993; Chandra és mtsai, 2008), melyek kifejeződését szintén tanulmányoztuk. Kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk mindhárom ismert PPAR izoforma (PPAR α , PPAR δ és PPAR γ), valamint a velük leggyakrabban heterodimerizálódó RXR α és RXR β mRNS transzkriptjét. Az 1.A táblázatban bemutatott adatokból jól látszik, hogy 1 μ M-ban alkalmazott kapszaicin 24 óra elteltével (mely időn belül hatékonyan gátolta a sejtek lipidszintézisét is) valamennyi vizsgált gén expresszióját csökkentette a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Mindez arra utal, hogy a kapszaicin lipidszintet csökkentő hatásában szerepet játszik a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expressziójának gátlása.

1. táblázat: A kapszaicin hatása a lipidszintézis szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok génexpressziójára (A) és egyes proinflammatorikus citokinek felszabadulására (B) SZ95 szebocitákon

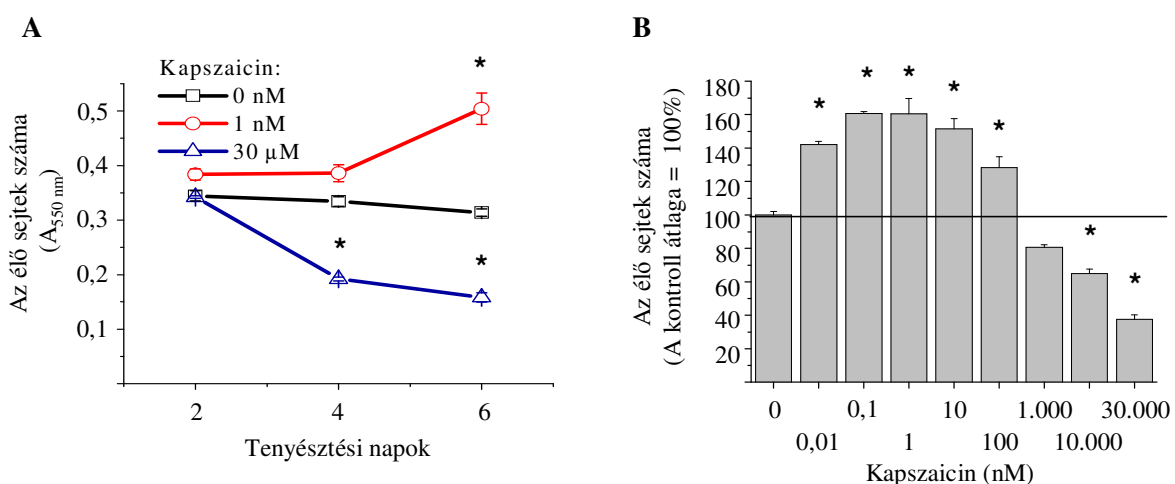
A: Génexpresszió	1 μM kapszaicin	
	6 h	24 h
PPARα	87 \pm 17 %	63 \pm 14%*
PPARγ	95 \pm 11%	58 \pm 16%*
PPARδ	123 \pm 19%	51 \pm 11%*
RXRα	103 \pm 11%	54 \pm 14%*
RXRβ	34 \pm 13%*	69 \pm 9%*
B: Citokinfelszabadulás		
IL-1β		27 \pm 9%*
IL-6		95 \pm 13%
TNFα		106 \pm 21%

Az SZ95 szebocitákat 6 illetve 24 órát kezeltük 1 μ M kapszaicinnal. **A:** A kezelést követően kvantitatív valós idejű PCR segítségével meghatároztuk a táblázatban feltüntetett transzkripciós faktorok génexpresszióját. Az adatokat a humán ciklofilin expressziójára normáltuk. **B:** A kezelést követően a sejtekről eltávolítottuk a felülírt és specifikus OptiEIA kiték segítségével meghatároztuk a táblázatban feltüntetett citokinek mennyiségét. Az értékeket mindkét esetben négy független mérés alapján adtuk meg. * $p < 0,05$ az oldószerrel kezelt kontrollhoz viszonyítva.

A génexpresszió mellett megvizsgáltuk, hogy a kapszaicin képes-e [a korábban keratinocitákon leírtakhoz (Southall és mtsai, 2003) hasonlóan] citokin fehérjék termelődését is megváltoztatni. Specifikus ELISA technikák alkalmazásával vizsgáltuk a felszabaduló IL-1 β , IL-6 és TNF α mennyiségét, mely proinflammatorikus citokinek termelődését SZ95 szebocitákon már korábban is igazolták (Alesta és mtsai, 2006). Eredményeink szerint a kapszaicin szignifikánsan csökkentette az IL-1 β felszabadulását, miközben nem változtatta meg az IL-6 és a TNF α felülúszóban mért mennyiségét (1.B táblázat).

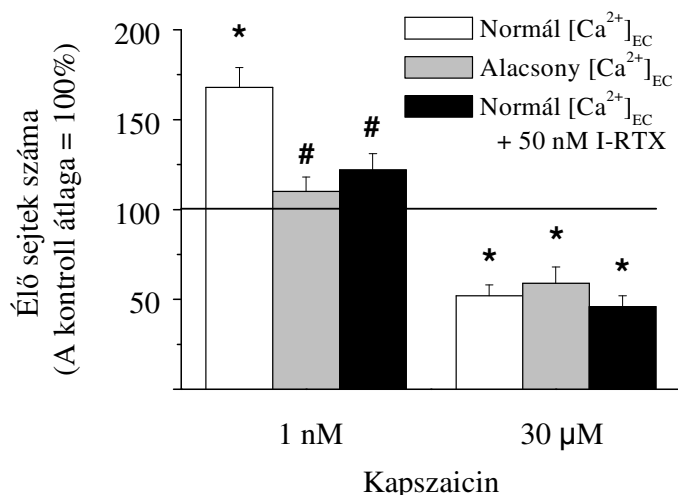
A hosszútávú kapszaicin kezelés dóziszfüggően eltérő hatása az SZ95 szebociták proliferációjára

Az eddigi vizsgálataink során a kapszaicint rövid ideig (<48 h) alkalmaztuk, és azt tapasztaltuk, hogy miközben TRPV1 specifikus módon csökkenti a szebociták lipidszintézisét (10., 12., 14-16. ábrák), nincs hatással a sejtek életképességére (9., 11., 13. ábrák). Korábbi munkáink során viszont azt állapítottuk meg, hogy a hosszútávú (>3-5 nap) kapszaicin kezelés izolált szórtüsző és keratinocita tenyészetekben egyaránt csökkentette a proliferációt és apoptózist indukált (Bodó és mtsai, 2005). Ezért kíváncsaiak voltunk arra is, a szebociták életképességét/proliferációját hogyan változtatja meg a hosszútávon alkalmazott kapszaicin kezelés. Ahhoz, hogy a proliferáció változásait érzékenyebben vizsgálhassuk, némileg módosítottunk a tenyésztési körülményeken.



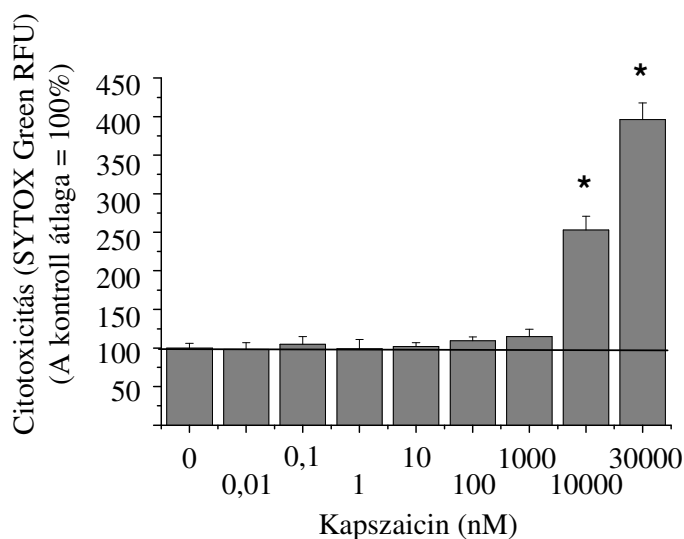
17. ábra: A hosszútávú kapszaicin kezelés hatása az SZ95 szebociták proliferációjára.

A nagy denzitásban, alacsony szérumtartalom mellett tenyésztett szebocitákat 6 napon keresztül naponta kezeltük kapszaicinnal az ábrán bemutatott koncentrációkban. Az élő sejtszámot MTT assay-vel határoztuk meg, kolorimetriás úton, az abszorbanciát 550 nm-es hullámhosszon mérve. **A:** Az SZ95 sejtek növekedési görbéje kis és nagy koncentrációban alkalmazott kapszaicin kezelés mellett, valamint oldószerrel kezelt kontroll esetben. Az élő sejtek számát a jelzett napokon határoztuk meg. **B:** 6 napos kapszaicin kezelés dózis-hatás görbéje. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll százalékában fejeztük ki. N=4, *p<0,05, a kontrollhoz viszonyítva.



18. ábra: A TRPV1 szerepe a hosszútávú kapszaicin kezelés proliferációra gyakorolt hatásában

A nagy denzitásban alacsony szérumszám mellett tenyésztett szebocitákat 6 napon keresztül naponta kezeltük kapszaicinnal és I-RTX-szel normál és alacsony kalcium tartalmú médiumban az ábrán bemutatott kombinációkban. Az élő sejt számot a 6. napon MTT assay-vel határoztuk meg, kolorimetriás úton, az abszorbanciát 550 nm-es hullámhosszon mérve. Az értékeket minden esetben a megfelelő kalcium tartalmú médiumban tartott, oldószerrel kezelt kontroll százalékában adjuk meg. $N=4$, $*p<0,05$, a kontrollhoz viszonyítva; $\#p<0,05$, a normál kalcium koncentráció mellett csak kapszaicinnal kezelt csoporthoz viszonyítva.



19. ábra: A hosszútávú kapszaicin kezelés citotoxikus hatásának vizsgálata

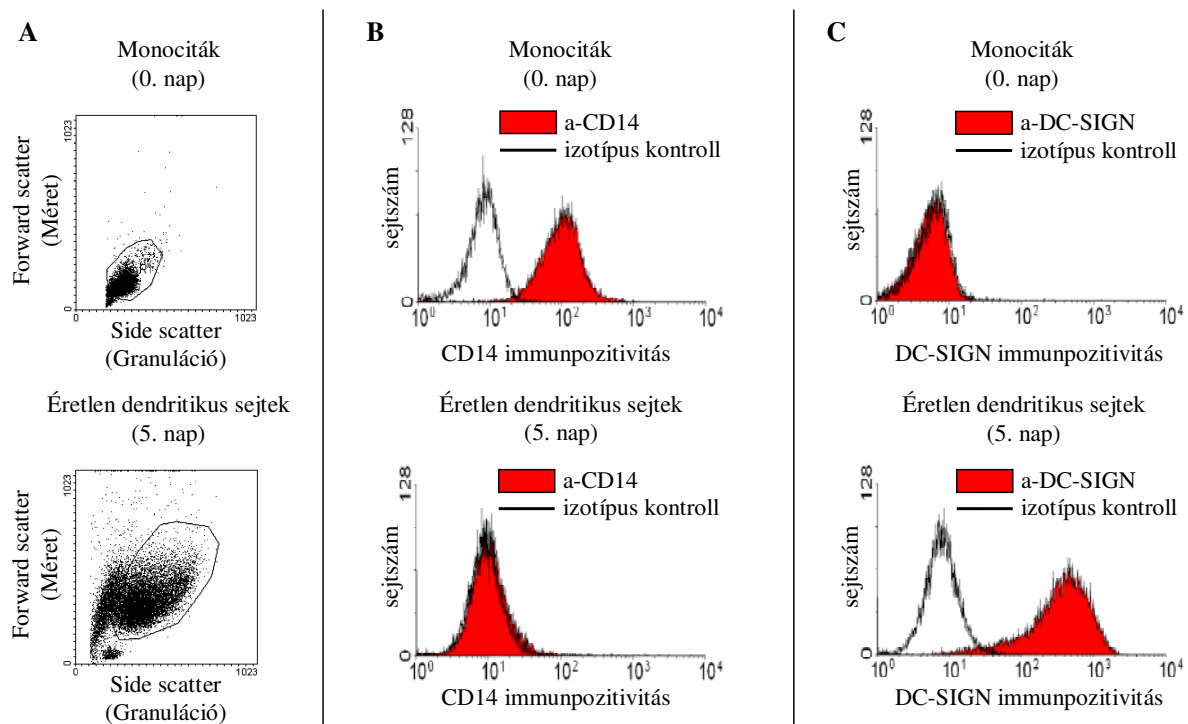
A nagy denzitásban, alacsony szérumszám mellett tenyésztett szebocitákat 6 napon keresztül naponta kezeltük kapszaicinnal az ábrán bemutatott koncentrációkban. A nekrotikus folyamatokat a 6. napon SYTOX Green jelölést követően fluorimetriás méréssel vizsgáltuk. Az értékeket az oldószerrel kezelt kontroll értékének százalékában adjuk meg. $N=4$, $*p<0,05$, a kontrollhoz viszonyítva.

A szebocitákat nagy denzitásban (40.000 sejt/lyuk) szélesztettük 96 lyukú tenyésztő-lemezre, a tápoldat szérumszámát pedig 3%-ra csökkentettük. Ilyen körülmények között a sejtek életképessége 6 nap alatt sem csökkent, ugyanakkor proliferációt sem tapasztaltunk (17.A ábra). Ha ilyen körülmények között kezeltük a sejteket kapszaicinnal, érdekes változást figyelhettünk meg. 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 (17. ábra). A kis koncentrációban alkalmazott kapszaicin hosszútávú proliferációt fokozó hatása TRPV1 specifikusnak bizonyult, amennyiben a receptor specifikus antagonistá I-RTX hatékonyan gátolta (18. ábra). Eredményeink szerint az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése szintén kivédte a kis koncentrációban alkalmazott kapszaicin hatását; azaz a TRPV1 feltehetően funkcionális Ca^{2+} -csatornaként vesz részt a folyamatban. Ezzel szemben sem az I-RTX, sem pedig az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése nem volt képes kivédeni a nagy

koncentrációban alkalmazott kapszaicin élő sejtszámot csökkentő hatását; úgy tűnik tehát, hogy ez a hatás független a TRPV1-től. A nagy koncentrációban (10-30 μM) alkalmazott kapszaicin vizsgálataink szerint 6 nap után a sejtmembrán integritását károsítja, ami a SYTOX Green jelölődés szignifikáns növekedéséhez vezet (19 ábra), vagyis az ilyen dózisban alkalmazott kapszaicin toxikus a sejtekre.

A humán monocita eredetű dendritikus sejtek expresszálják a TRPV1-et

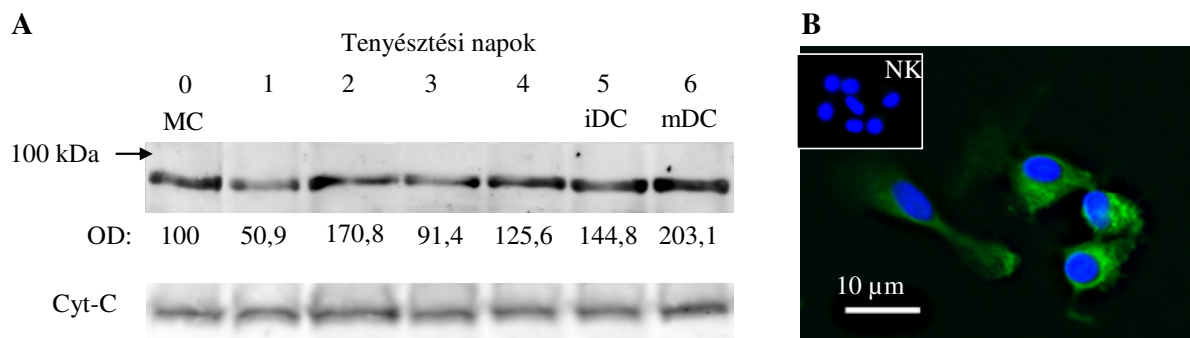
Kísérleteink során elsőként vizsgáltuk a TRPV1 expresszióját a humán monocita eredetű dendritikus sejteken. Az éretlen dendritikus sejteket humán perifériás vérből izolált monocitákból 5 nap alatt differenciáltattuk IL-4 és GM-CSF jelenlétében az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A differenciálódás során megváltozik a sejtek morfológiája és sejtfelszíni marker expressziója (20. ábra). A dendritikus sejtek felszínéről eltűnik a monocitákra specifikus CD14 marker (20.B ábra), és megjelenik a monociták felszínén nem expresszáló dendritikus sejtekre specifikus DC-SIGN (20.C ábra).



20. ábra: A humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódásának áramlások citometriás vizsgálata

A humán perifériás vérből izolált monocitákat az izolálás napján és az azt követő 2. napon 100 ng/ml IL-4 és 80 ng/ml GM-CSF kombinációjával kezelve az izolálást követő 5. napra a sejtek éretlen dendritikus sejtekké differenciálódnak. A sejtek fenotípusát és felszíni marker expresszióját áramlások citometriával vizsgáltuk **A**: A sejtek karakterizálása a fényszórási adatok alapján történt közvetlenül az izolálás után és az azt követő ötödik napon. **B**: A monocitákat és az éretlen dendritikus sejteket a monocitaspecifikus CD14 ellen termeltetett PE-konjugált antitestekkel és a megfelelő izotípus kontrollal jelöltük és a CD14 immunopozitivitást eloszlási hisztogrammon ábrázoltuk. **C**: A sejteket DC-SIGN ellenes FITC-konjugált antitestekkel is megjelöltük, az ábrán a DC-SIGN pozitívitást eloszlási hisztogrammon ábrázoltuk.

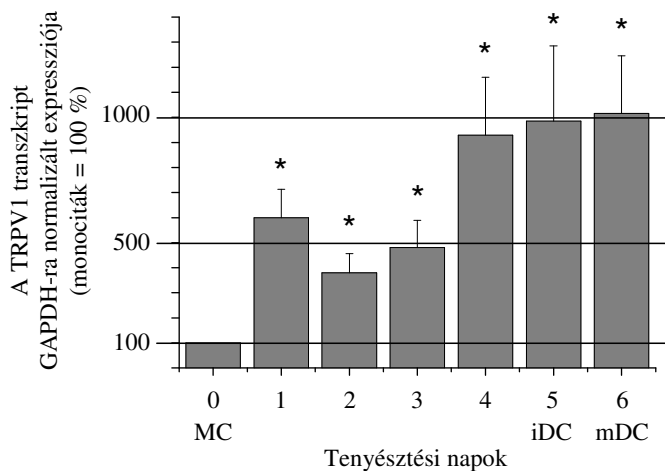
A TRPV1 expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy a receptor a monocitákon és az éretlen dendritikus sejteken egyaránt kifejeződik mind protein (21. ábra), mind pedig mRNS (22. ábra) szinten. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 expressziója az éretlen dendritikus sejtek differenciálódása során, a monocitákhoz képest, jelentősen fokozódott. Azt is megfigyeltük, hogy a protein szint változása egy nap késéssel követi az mRNS szintben tapasztalt változásokat, ami a TRPV1 protein megnövekedett turn over-ére utal a differenciálódási folyamat során (21-22. ábrák). Ez alapján felvetődött, hogy a TRPV1 szerepet játszik a dendritikus sejtek differenciálódásában.



21. ábra: A TRPV1 protein expresszió változása a humán monociták dendritikus sejté történő differenciálódása során

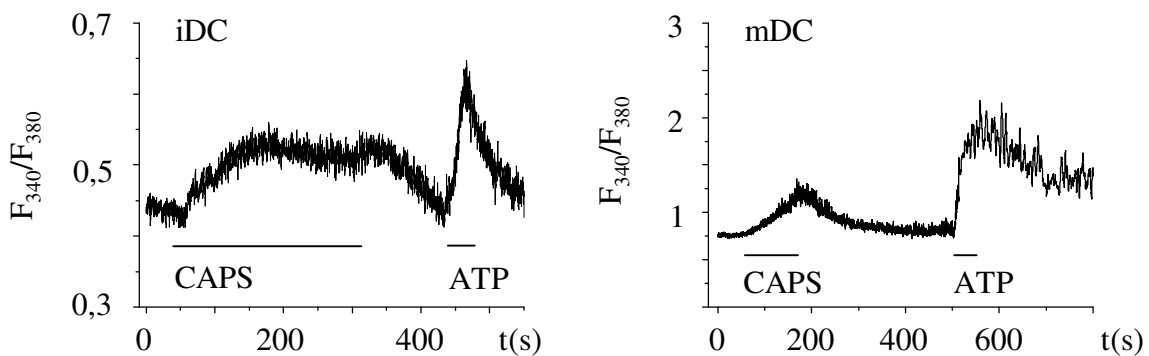
A: A TRPV1 fehérje expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk a monociták dendritikus sejté történő differenciálódása során naponta gyűjtött mintákból, valamint a dendritikus sejtek proinflammatorikus citokin koktéllal indukált érését követően. **MC:** monocita, **iDC:** éretlen dendritikus sejt, **mDC:** érett dendritikus sejt. A TRPV1 expresszió mértékét az immunpozitív sávok optikai denzitásával jellemeztük, amiket a belső kontrollként használt citokróm C (**Cyt-C**) értékeire normalizáltuk. A normalizált optikai denzitás értékeket (**OD**) a monociták százalékában adtuk meg. **B:** A TRPV1 expresszióját immuncitokémiai segítségével mutattuk ki, TRPV1 ellen nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges ellenanyag és nyúl ellenes FITC-konjugált másodlagos antitest felhasználásával. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. **NK:** Negatív kontroll.

A receptor expresszióját követően megvizsgáltuk, hogy a dendritikus sejteken kifejeződő TRPV1 funkcionális Ca^{2+} csatornaként működik-e. Ehhez fura 2-AM Ca^{2+} -érzékeny festék segítségével optikai úton mértük a sejteken az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ban bekövetkező változásokat a TRPV1 specifikus agonista kapszaicin hatására (23. ábra). Az akután alkalmazott kapszaicin rövid időn belül megnövelte az érett és éretlen dendritikus sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját, mely hatás kimozhatónak bizonyult, vagyis a kapszaicin elvételét követően hamarosan visszaállt a normál Ca^{2+} -szint. A sejtek reaktivitását pozitív kontrollként ATP-t alkalmazva ellenőriztük, melyről korábban kimutatták, hogy számos más sejtípushoz hasonlóan, tranziens módon növeli a dendritikus sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját (Berchtold és mtsai, 1999).



22. ábra: A TRPV1 mRNS expresszió változása a humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódása és érése során

Az éretlen dendritikus sejtek differenciálódása, majd proinflammatorikus citokinekkel segítségével indukált érése (ld. „Anyagok és módszerek” fejezet) során naponta RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót követően kvantitatív valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk a TRPV1 specifikus mRNS transzkript kifejeződését. Az eredményeket a belső kontrollként használt GAPDH expresszióra normalizáltuk, majd a kapott eredményeket a monocitákon (MC) mért génexpresszió százalékában adtuk meg. **iDC:** éretlen dendritikus sejtek, **mDC:** érett dendritikus sejtek, $p < 0,05$, $N: 3-7$.



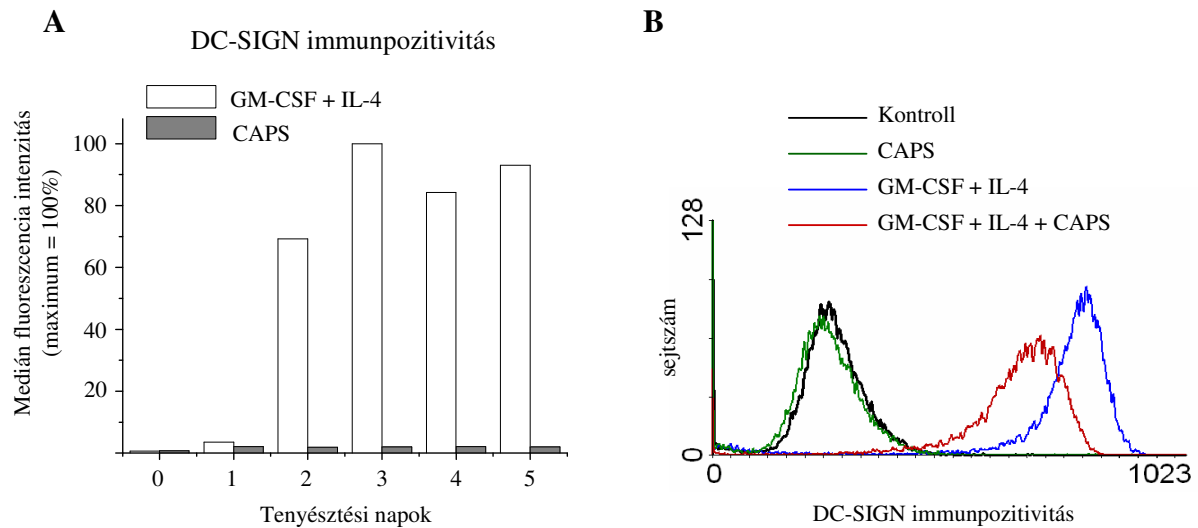
23. ábra: A kapszaicin hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra dendritikus sejteken

Az éretlen (**iDC**) és az érett dendritikus sejteket (**mDC**) fura 2-AM Ca^{2+} érzékeny festékkel töltöttük fel és az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint vizsgáltuk az egyes sejtek $[Ca^{2+}]_{IC}$ változását akut $10 \mu M$ kapszaicin (**CAPS**) kezelés hatására. Pozitív kontrollként $180 \mu M$ ATP alkalmaztunk.

A TRPV1 aktivációja gátolja a humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódását

A TRPV1 expresszió kimutatását követően megvizsgáltuk milyen hatással van a receptor aktivációja a dendritikus sejtek differenciálódására. Ennek során a sejteket kapszaicinnal és/vagy IL-4 és GM-CSF kombinációjával kezeltük, majd áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk a sejtek felszínén a dendritikus sejtekre specifikus 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 (24. ábra). Ezzel szemben az önmagában alkalmazott IL-4 és GM-CSF (mint azt korábban is láttuk) hatékonyan indukálta a sejtek DC-SIGN expresszióját, vagyis a monociták dendritikus sejtekké differenciálódtak

(20.C és 24. ábrák). 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 (24.B ábra).



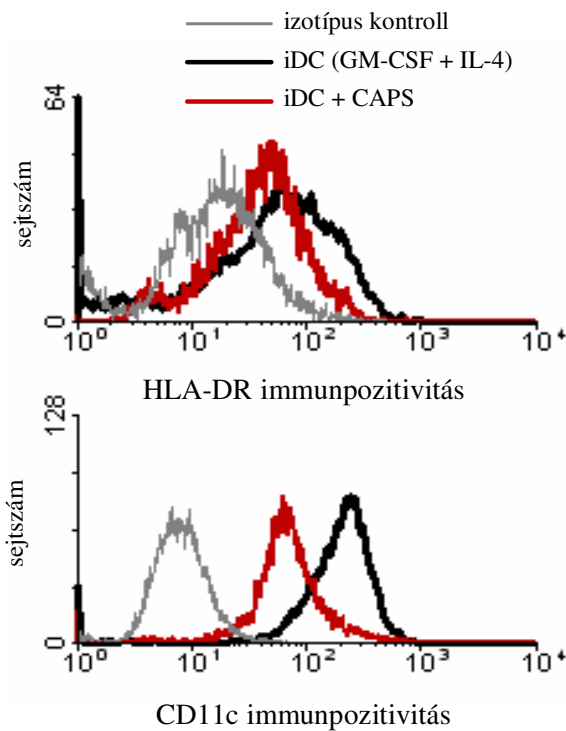
24. ábra: A kapszaicin hatása a monociták dendritikus sejté történő differenciálódására

A humán perifériás vérből izolált monocitákat 5 napon keresztül kezeltük 80 ng/ml GM-CSF és 100 ng/ml IL-4 valamint 10 μ M kapszaicin (CAPS) az ábrán látható kombinációival. A sejtek DC-SIGN expresszióját FITC konjugált monoklonális antitest jelölést követően áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk. Az ábrán egy reprezentatív donor eredményei láthatók; 3 kísérlet hasonló eredményt adott. **A:** A DC-SIGN expressziót naponta vizsgáltuk, az ábrán a mért medián fluoreszcencia értékeket a maximális érték százalékában fejeztük ki. **B:** Az 5. napon végzett áramlásos citometriás mérések eredményei. A DC-SIGN pozitivitást eloszlási histogramon ábrázoltuk.

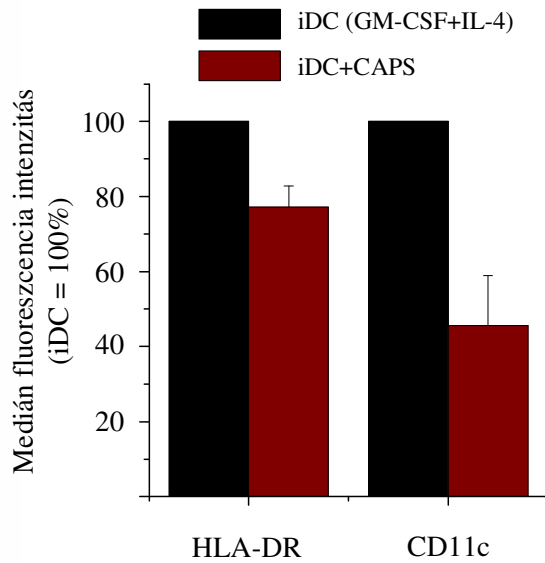
Ezt követően a dendritikus sejtek IL-4 és GM-CSF által indukált differenciálódása során megvizsgáltuk a differenciálódás kezdetétől naponta alkalmazott kapszaicin hatását más, a differenciált dendritikus sejtekre jellemző sejt felszíni markerek expressziójára is. A kísérletek 5. napján áramlásos citometria segítségével mértük a dendritikus sejtmarker CD11c, valamint az idegen peptid antigének prezentációjában szerepet játszó, hivatásos antigénprezentáló sejtekre jellemző, MHC-II osztályba tartozó HLA-DR kifejeződését is a sejtek felszínén. Azt tapasztaltuk, hogy az 5 napon keresztül alkalmazott kapszaicin, a DC-SIGN-hoz hasonlóan, a CD11c és a HLA-DR expresszióját is csökkentette (25. ábra). Mindezen eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a kapszaicin folyamatos jelenléte gátolja a monociták IL-4 és GM-CSF által indukált dendritikus sejtekké történő differenciálódását.

A fentiekkel megegyező kezeléseket követően a kísérlet 5. napján tanulmányoztuk a kapszaicin hatását a sejtek életképességére is. Az élő sejtek számát MTT assay segítségével követtük nyomon, míg a mitokondriális membránpotenciál és a sejtmembrán integritásának vizsgálatával az apoptotikus és a nekrotikus folyamatokat kísértük figyelemmel.

A



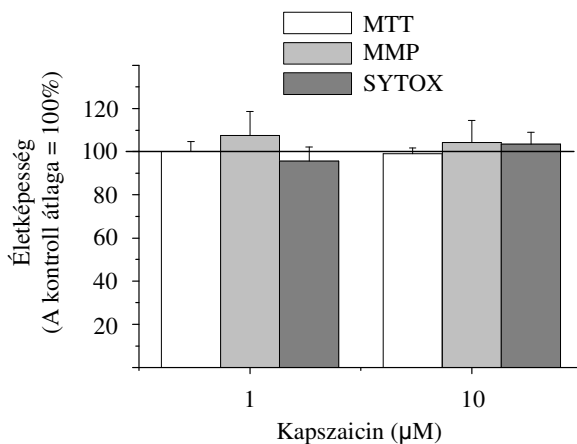
B



25. ábra: A kapszaicin hatása a dendritikus sejtek sejtfelszíni markereinek expressziójára

Az éretlen dendritikus sejtek (iDC) differenciálódását IL-4 és GM-CSF segítségével indukáltuk, naponta alkalmazott 10 μ M kapszaicin jelenlétében (CAPS) vagy hiányában. Az 5. napon a sejtek HLA-DR és CD11c expresszióját FITC- és PE- (rendre) konjugált monoklonális antitest jelölést követően áramlások citometria segítségével vizsgáltuk. **A:** Egy reprezentatív donor eredményei, eloszlási histogramon ábrázolva. **B:** A medián fluoreszcencia változása 2 független donor átlaga alapján.

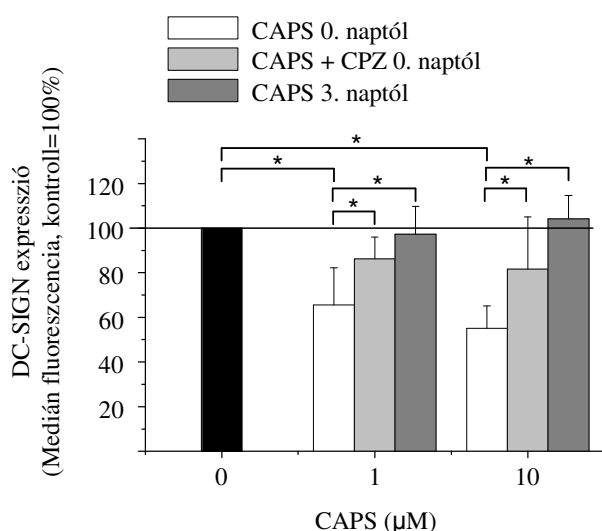
A mitokondriális membránpotenciált Mitoprobe assayvel, a membránintegritást pedig SYTOX Green jelölés segítségével vizsgáltuk (26. ábra). Eredményeink szerint a dendritikus sejtek differenciálódása során a 0. naptól naponta alkalmazott kapszaicin kezelés nem befolyásolta az élő sejtek számát. Emellett 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).



26. ábra: A kapszaicin hatása a dendritikus sejtek életképességére.

A sejteket az IL-4 és GM-CSF indukált differenciálódás során naponta kezeltük kapszaicinnal az ábrán feltüntetett koncentrációkban. Az 5. napon vizsgáltuk az élő sejtek számát MTT assayvel (MTT), a sejtek mitokondriális membránpotenciálját (MMP) DiIC₁(5) jelölést követően valamint a citotoxicitást SYTOX Green (SYTOX) jelölést követően fluoreszcens mikroplate reader segítségével. Az eredményeket a kapszaicinnal nem kezelt kontroll százalékában fejeztük ki. N=4.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a kapszaicin differenciálódást csökkentő hatása a TRPV1-en keresztül érvényesül-e. Ennek során a kapszaicin mellett a receptor-specifikus



27. ábra: A TRPV1 aktiváció hatása a humán monociták dendritikus sejté történő differenciálódására

Az IL-4 és GM-CSF jelenlétében differenciálódó sejteket a differenciálódás 0. illetve 3. napjától naponta kezeltük a TRPV1 specifikus agonista kapszaicinnel (CAPS) az ábrán feltüntetett koncentrációkban, valamint kapszaicin és 5 μM TRPV1 specifikus antagonistá kapszazepin (CPZ) kombinációjával. A kísérlet 5. napján FITC konjugált DC-SIGN ellenes antitest jelölést követően áramlásos citometriával vizsgáltuk a DC-SIGN sejtfelszíni expresszióját. Három független donor medián fluoreszcencia értékeinek átlagát a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg. * $p < 0,05$

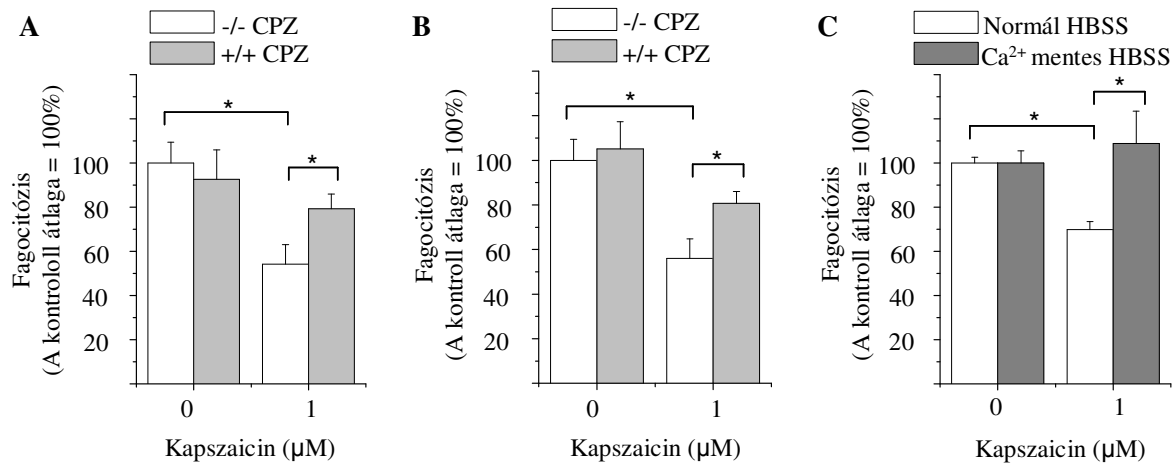
antagonista kapszazepinnel is kezeltük a sejtjeinket, szintén a differenciálódás 0. napjától, naponta alkalmazva. Kimutattuk, hogy a kapszaicin dózisfüggő módon gátolta a DC-SIGN expresszióját, amely hatás kapszazepin egyidejű adagolásával kivédhetőnek bizonyult (27. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen arra utaltak, hogy a monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódása során a kapszaicin hatását a TRPV1 közvetíti.

Fény derült arra is, hogy ha a kapszaicin kezelést csak a differenciálódás 3. napjától alkalmazzuk, a differenciálódást gátló hatás teljes mértékben elmaradt (27. ábra). Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a kapszaicin a monocita – dendritikus sejt differenciálódási folyamatnak feltehetően valamilyen korai lépését gátolta.

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

A dendritikus sejtek differenciálódási markerei után megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a differenciálódás során alkalmazott kapszaicinkezelés az éretlen dendritikus sejtek funkciójára. Ennek során az IL-4 és GM-CSF kombinációjával differenciáltatott éretlen dendritikus sejtek fagocitózist vizsgáltuk, FITC konjugált *Escherichia coli* biopartikulák segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy a 0. naptól naponta kapszaicinnel kezelt sejtek fagocitotikus aktivitása jelentős mértékben csökkent (28.A ábra). Ez a hatás szintén TRPV1 specifikusnak mutatkozott, hiszen naponta alkalmazva 5 μM kapszazepinnel hatékonyan

gátolni lehetett. Ezek alapján elmondható, hogy a dendritikus sejtek differenciálódása során a kísérlet 0. napjától naponta alkalmazott kapszaicin a sejtfelszíni differenciálódási markerek expressziója mellett az éretlen dendritikus sejtek funkcióját/fagocitózist is TRPV1 specifikusan gátolta.



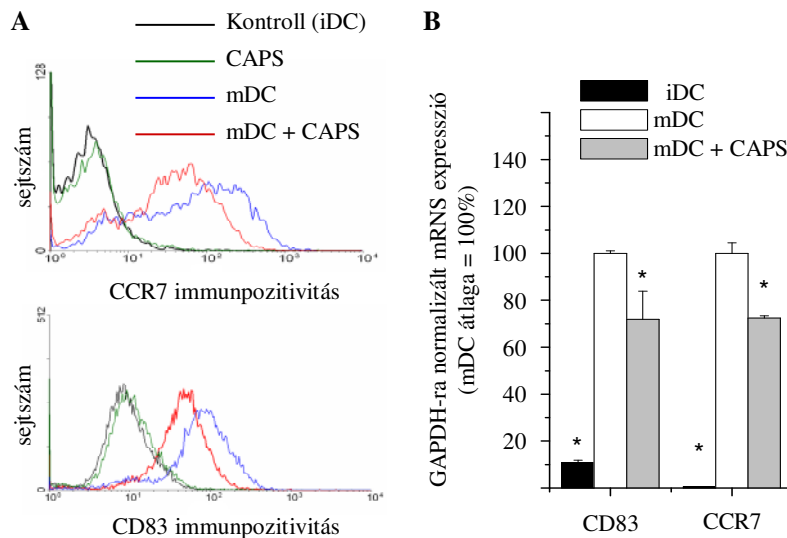
28. ábra: A fagocitózis vizsgálata humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejteken

Az éretlen dendritikus sejtek fagocitotikus aktivitását az IL-4 és GM-CSF jelenlétében történt differenciálódást követően a kísérlet 5. napján vizsgáltuk, FITC konjugált *E. coli* biopartikulumok internalizációját követő kvantitatív fluorimetriás mérésekkel. **A:** A sejteket a differenciálódás 0. napjától naponta kezeltük a kapszaicinnal 5 μM kapszazepin (CPZ) jelenlétében (+/+) vagy hiányában (-/-). **B:** Az éretlen dendritikus sejteket a differenciálódást követően (a kísérlet 5. napján) 2 órán keresztül kezeltük a kapszaicinnal 5 μM kapszazepin (CPZ) jelenlétében (+/+) vagy hiányában (-/-). **C:** Az éretlen dendritikus sejteket a differenciálódást követően (a kísérlet 5. napján) 2 órán keresztül kezeltük a kapszaicinnal normál Ca²⁺-tartalmú és Ca²⁺-mentes Hank oldatban (Hank's Balanced Salt Solution - HBSS). Az adatokat minden esetben a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg, N=4, *p<0,05.

További vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy milyen hatással van a TRPV1 kapszaicinnal történő aktivációja a már differenciálódott éretlen dendritikus sejtek funkcióira. Az IL-4 és GM-CSF jelenlétében 5 nap alatt differenciáltatott humán monocita eredetű éretlen dendritikus sejteket csak a kísérlet 5. napján kezeltük kapszaicinnal, majd vizsgáltuk a FITC-konjugált *E. coli* biopartikulumok fagocitózist. Azt tapasztaltuk, hogy a fagocitotikus aktivitás csupán két órás kapszaicin kezelést követően is szignifikánsan csökkent (28.B ábra). Ezt a hatást a receptor specifikus antagonistá kapszazepinnel hatékonyan tudtuk gátolni, ami arra enged következtetni, hogy a kapszaicin ebben az esetben is a TRPV1 aktivációján keresztül fejtette ki hatását. A kísérletet Ca²⁺-mentes Hank oldatban is megismételve azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin fagocitózist gátló hatása elmaradt (28.C ábra), ami szintén alátámasztja azt a feltevésünket, hogy a kapszaicin hatását a TRPV1, mint funkcionális Ca²⁺-csatorna közvetíti.

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. Ennek során először a monocitákból differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket 24 órán keresztül kezeltük kapszaicinnal, majd áramlásos citometria segítségével megvizsgáltuk az érett dendritikus sejteket jellemző sejtfelszíni marker (a CD83 kostimulációs molekula), valamint az érett dendritikus sejtek migrációjában



29. ábra: Az érési markerek kifejeződése humán monocita eredetű dendritikus sejteken

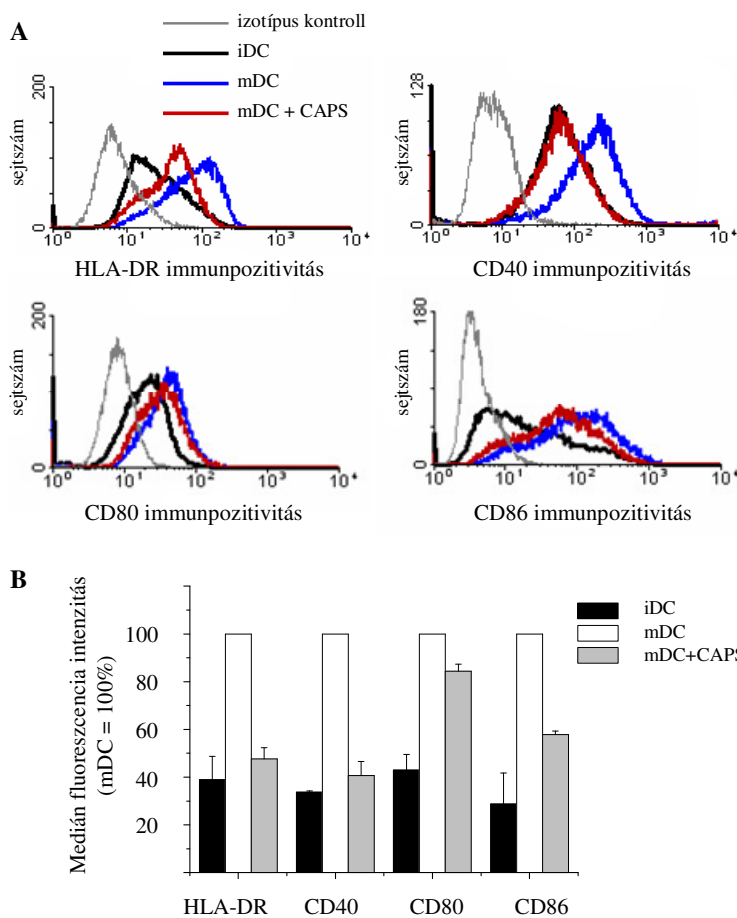
A humán monocitákból differenciálódott éretlen dendritikus sejteket 24 órán keresztül kezeltük 1 μ M kapszaicinnal (CAPS) vagy a kapszaicin oldószerével (Kontroll). A dendritikus sejtek érését az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt proinflammatorikus citokin koktéllal indukáltuk (matured dendritic cells - mDC). Az érés indukációját kapszaicin jelenlétében is elvégeztük (mDC+CAPS). **A:** A CCR7 és a CD83 érési marker fehérjék sejtfelszíni kifejeződése. A kezelést követően 24 órával CCR7 és CD83 ellenes fluorokrómmal konjugált antitestekkel jelöltük a sejteket, majd áramlásos citometria segítségével mértük a fluoreszcencia intenzitást. Az eredményeket eloszlási hisztogramon ábráztuk. Az ábrán egy reprezentatív donor eredményeit mutattuk be, három független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **B:** A CD83 és a CCR7 érési marker mRNS transzkriptek relatív expressziója. Az érési indukációt követő 24 órával a sejteket összegyűjtöttük, RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót követően Q-PCR segítségével vizsgáltuk a CD83 és CCR7 mRNS-ek expresszióját, amit a háztartási gén GAPDH expressziójára normalizáltunk. Vizsgálatainkat kezeletlen, éretlen dendritikus sejteken (immatured dendritic cells – iDC) is elvégeztük. Az eredményeket az érett dendritikus sejteken mért átlagértékek százalékában fejeztük ki. Az ábrán három független meghatározás átlagát tüntettük fel, további két donorból izolált sejteken hasonló eredményeket kaptunk.

szerepet játszó CCR7 kifejeződését. Azt tapasztaltuk, hogy a 24 órás kapszaicin kezelés nem indukálta ezen markerek expresszióját a kezeletlen éretlen dendritikus sejtekhez képest (29.A ábra), vagyis nem váltotta ki a sejtek érését.

Ezzel szemben az „Anyagok és módszerek” fejezetben bemutatott többkomponensű proinflammatorikus citokinkoktéllal 24 órán át alkalmazva a CD83 és a CCR7 expresszióját is indukálta, vagyis a dendritikus sejtek érését és aktivációját váltotta ki (29. ábra). A citokinkoktéllal együtt alkalmazott kapszaicin viszont mind mRNS, mind protein szinten csökkentette az érett

dendritikus sejteken mért CD83 és a CCR7 expressziót, vagyis gátolta a proinflammatorikus citokinekkel érést indukáló hatását (29. ábra).

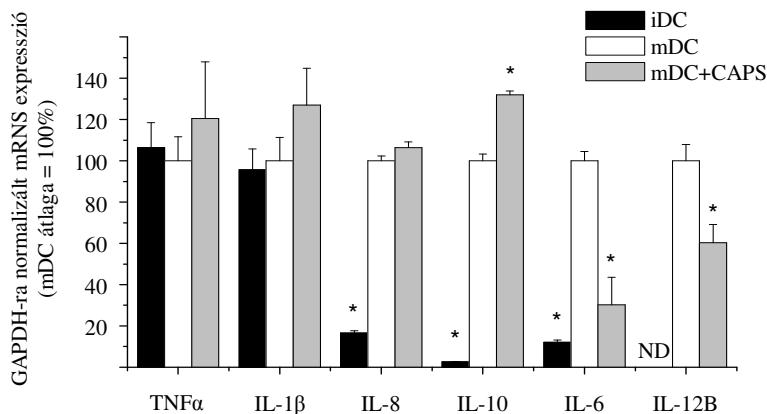
A fentiek mellett áramlásos citometria segítségével megvizsgáltuk egyéb érett dendritikus sejtekre jellemző felszíni markerek kifejeződését; így a kostimulációs molekulák közé tartozó CD40, CD80 és CD86, valamint a hivatásos antigénprezentáló sejtek antigénprezentációjában szerepet játszó HLA-DR sejt felszíni expresszióját is. Kimutattuk, hogy az alkalmazott proinflammatorikus citokin koktéll hatására (a CD83-hoz és a CCR7-hez



30. ábra: A kapszaicin hatása a dendritikus sejtek indukált éréseire
Az éretlen dendritikus sejteket (iDC) az „Anyagok és módszerek” fejezetben bemutatott proinflammatorikus citokin koktéllal kezelve 24 óra alatt nyertük az érett dendritikus sejteket (mDC). Az érést 1 μ M kapszaicin (CAPS) jelenlétében is indukáltuk, majd fluorokrómokkal konjugált monoklonális antitestekkel történő jelölést követően áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk a HLA-DR (FITC), valamint a CD40 (PE), CD80 (FITC) és CD86 (PE) expresszióját a dendritikus sejteken. **A:** Egy donorból származó reprezentatív eredmények, eloszlási histogramon ábrázolva. **B:** A medián fluoreszcencia változása 2 független donor átlaga alapján.

hasonlóan) 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 (30. ábra).

Az érés során aktiválódó dendritikus sejtekből jelentősen megnő egyes citokinek felszabadulása is (Kalinski és mtsai, 2001). A kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az alkalmazott proinflammatorikus citokin koktéll 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. Bebizonyosodott továbbá, hogy az aktivációval egyidejűleg alkalmazott kapszaicin



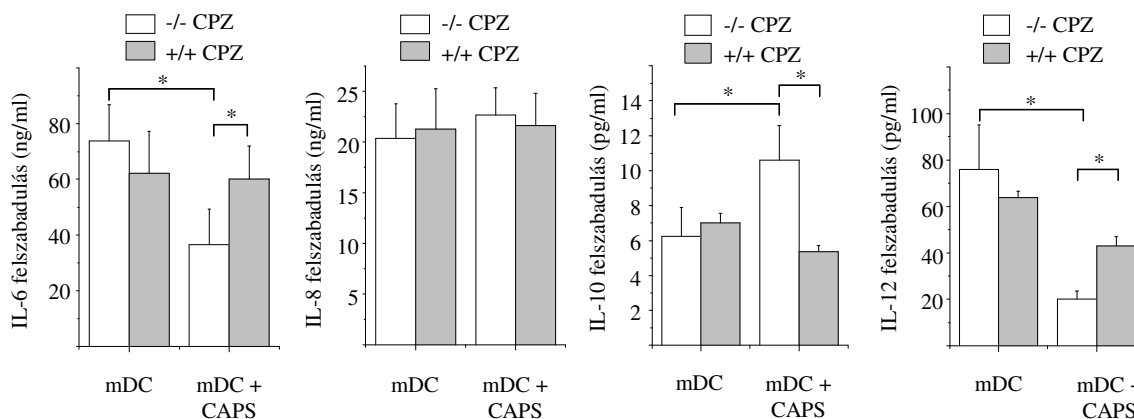
31. ábra: A kapszaicin hatása egyes citokinek génexpressziós változására a humán monocita eredetű dendritikus sejtek indukált érés során

Az éretlen dendritikus sejtek érését az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt proinflammatorikus citokin koktéllal indukáltuk (matured dendritic cells - **mDC**) 1 μ M kapszaicin (**CAPS**) jelenlétében és hiányában. Kontrollként kezeltelen, éretlen dendritikus sejteket (immatured dendritic cells – **iDC**) használtunk. Az érési indukciót követő 24 órával a sejteket összegyűjtöttük, RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót követően Q-PCR segítségével vizsgáltuk az ábrán feltüntetett citokin gének kifejeződését. Az mRNA-ek expresszióját a háztartási gén GAPDH expressziójára normalizáltunk, és az érett dendritikus sejteken mért átlagértékek százalékában adtuk meg. Az ábrán három független meghatározás átlagát tüntettük fel, további két donorból izolált sejteken hasonló eredményeket kaptunk.

szelektíven csökkentette a proinflammatorikus IL-6 és IL-12B transzkriptek mennyiségének a növekedését. Ugyanakkor a kapszaicin nem befolyásolta az IL-8 kifejeződését, miközben az antiinflammatorikus IL-10 mRNA expresszióját tovább fokozta (31. ábra).

Az mRNA szintű vizsgálatokat követően ELISA technikával megvizsgáltuk a felülészóba kiválasztott IL-6, IL-8, IL-10 és IL-12 protein mennyiségét is. Az mRNA szinten tapasztalt

változásokkal egybecsengően azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin gátolta az aktiváció során fokozódó IL-6 és IL-12 felszabadulást. Ugyanakkor ezzel egyidejűleg növelte az IL-10



32. ábra: A TRPV1 aktiváció hatása az érett dendritikus sejtek citokin termelésére

Az éretlen dendritikus sejtek érését és aktivációját az „Anyagok és módszerek” fejezetben bemutatott proinflammatorikus citokinoktól 24 órás alkalmazásával indukáltuk (érett dendritikus sejtek – **mDC**). Az érés során a sejteket 1 μ M kapszaicinnal (**CAPS**) és 5 μ M kapszazepinnel (**CPZ**) kezeltük az ábrán feltüntetett kombinációkban. A kezeléseket követően a sejtekről eltávolított mediumban ELISA technikával vizsgáltuk az IL-6, IL-8, IL-10 és az IL-12 mennyiségét. N=3, *p<0,05

szintjét, de az IL-8 felszabadulását nem befolyásolta. A TRPV1 specifikus antagonistá kapszazepin jelenléte a kísérlet során gátolta a kapszaicin hatásait a citokinek felszabadulására, ami arra utal, hogy a kapszaicin hatása ebben az esetben is a TRPV1-en keresztül valósult meg (32. ábra).

DISZKUSSZIÓ

A TRPV1 gátolja a humán szebociták differenciálódását és csökkenti azok lipidszintézisét

Korábban *in situ* a szenzoros neuronok mellett a bőr számos nemneurális sejtfeleségén is kimutatták a TRPV1 jelenlétét, többek között az epidermisz és a szőrtüsző keratinocitáin, a verejtékmirigyek epitélium sejtjein, az erek endotél és simaizom sejtjein, hízósejteken, valamint a faggyúmirigyeken és az epidermisz dendritikus sejtjein, a Langerhans sejteken (Bodó és mtsai, 2004; Stander és mtsai, 2004). A receptor funkcionalitását normál humán epidermális keratinocitákon és HaCaT keratinocita sejtvonalon egyaránt igazolták (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003), valamint kimutattuk a szerepét a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában is (Bodó és mtsai, 2005; Bíró és mtsai, 2006). Jelen munkánkban a TRPV1 funkcióját vizsgáltuk humán szebocitákon és monocita eredetű dendritikus sejteken.

Vizsgálataink során a TRPV1 fehérje expresszióját egyaránt kimutattuk *in situ* a humán faggyúmirigyeken (Bodó, és mtsai, 2004; 5. ábra), valamint a humán faggyúmirigyből származó SZ95 szebocitákon is (6-8. ábrák). Az eredmények arra utalnak, hogy a TRPV1 expressziója a szebocitákon inhomogén és feltehetően fokozódik a sejtek differenciálódása során. Ezt támasztja alá, hogy (1) a TRPV1 expressziója *in situ* erőteljesebb a differenciált szebocitákon, mint a faggyúmirigyek perifériáján elhelyezkedő differenciálatlan sejteken (Stander és mtsai, 2004; 5. ábra), valamint, hogy (2) *in vitro* a nagyobb konfluenciájú SZ95 tenyészeteken magasabb TRPV1 expressziót tapasztaltunk mind fehérje, mind pedig RNS szinten (7-8. ábrák). Korábbi vizsgálataink során a szőrtüszőben szintén a TRPV1 expresszió fokozódását tapasztaltuk az anagén-katagén átmenet során, a szőrtüszők kezelése kapszaicinnal pedig elősegítette a katagén fázis kialakulását (Bodó és mtsai, 2005).

A szebocitákat 24 órán keresztül a TRPV1-specifikus agonista kapszaicinnal kezelve nem tapasztaltuk a sejtek terminális differenciálódását; sem a sejtek lipidszintézise (10., 12.A ábrák), sem pedig az apoptotikus folyamatok intenzitása (9.B ábra) nem fokozódott. Morfológiai változásokat (9.A ábra) sem tapasztaltunk (9-10., 12.A ábrák), és az agonista nem változtatta meg a sejtek életképességét sem (9.B, 11. ábrák). Eredményeink szerint a kapszaicin nemhogy nem indukálta a differenciálódást, de gátolta a szebociták bazális lipid

szintézisét is (10. ábra); szignifikánsan csökkentette a sejtekben felhalmozódó poláris és neutrális zsírok mennyiségét.

A szebociták terminális differenciálódását arachidonsavval tudtuk indukálni, ami a sejtek lipidszintézisét és apoptózisát (Wrobel és mtsai, 2003; 12-13. ábrák) egyaránt fokozta, és a differenciált szebocitákra jellemző fenotípus kialakulását indukálta (9. ábra). Az arachidonsav hatásai közül a kapszaicin szelektíven gátolta a lipidszintézis fokozódását (12. ábra), azonban az apoptózis indukcióját nem védte ki (13. ábra). Eredményeink szerint a kapszaicin lipidszintézist csökkentő hatását a TRPV1-en keresztül fejt ki, hiszen ez mind a receptor specifikus antagonistá I-RTX alkalmazásával (15. ábra), mind pedig a TRPV1 expresszió RNS interferencia-mediált csendesítésével (16. ábra) kivédhetőnek bizonyult.

Korábban a normál humán epidermális keratinocitákon, HaCaT sejtvonalon és a szőrtüsző külső gyökérhüvely (outer root sheath – ORS) keratinocitáin egyaránt leírták a kapszaicin TRPV1-specifikus hatásait (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005). Ezekben az esetekben a kapszaicin a sejtek differenciálódását, apoptózisát, valamint IL-8 és PGE₂ termelését indukálta, amiben a TRPV1 mint funkcionális, kalcium permeábilis csatorna működött közre. Jelen vizsgálatainkban a külső kalcium-koncentráció csökkentése gátolta a kapszaicin kiváltotta válaszokat (14. ábra), ami szintén alátámasztja a TRPV1 csatorna szerepét a fenti folyamatban.

Korábbi vizsgálatok során azt találták, hogy a TRPV1-mediálta $[Ca^{2+}]_{IC}$ fokozódás a neuronok (Winter és mtsai, 1990; Chard és mtsai, 1995) mellett számos nem-neurális sejtfeleségen, többek között gliómasejteken (Bíró és mtsai, 1998a), timocitákon (Amantini és mtsai, 2004) vagy keratinocitákon (Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005) is gátolta a sejtek proliferációját és (jobbára apoptotikus) pusztulását indukálta. Ezzel szemben az SZ95 szebocitákon a 24 órán keresztül alkalmazott kapszaicin kezelés nem befolyásolta a sejtek életképességét, nem indukálta sem apoptotikus, sem nekrotikus (9.B, 11. ábrák) pusztulásukat, és nem védte ki az arachidonsav apoptózist indukáló hatását sem (13. ábra). A hosszútávú kapszaicin kezelés kis koncentrációk alkalmazása esetén fokozta az SZ95 szebociták proliferációját (17. ábra), mely hatást eredményeink szerint a TRPV1 közvetítette (18. ábra). Ez a hatás, habár ellentétes a legtöbb fenti sejten tapasztaltakkal, nem példa nélküli; kimutatták, hogy a TRPV1 szerepet játszhat a pulmonáris artéria simaizomsejtek hipoxia hatására fokozódó proliferációjában is (Wang és mtsai, 2008). Ezek szerint a TRPV1 aktiváció hatása jelentős sejt- és szövetspecifitást mutathat, akár egyetlen szerven belül is, mint azt a bőrben a keratinociták és a szebociták esetében is tapasztalhattuk. A keratinociták és a szebociták esetében tapasztalható ellentétes hatások magyarázata lehet, hogy a két

sejtféleség celluláris funkcióit a Ca^{2+} -koncentráció változása eltérő módon befolyásolja. A magas Ca^{2+} -koncentráció a keratinociták differenciálódását váltja ki (Yuspa és mtsai, 1988; Micallef és mtsai, 2009), ezzel szemben a sebociták differenciálódását a környezet alacsony Ca^{2+} -tartalma fokozza, míg a nagyobb Ca^{2+} -koncentráció a proliferációjukat serkenti és gátolja a differenciálódásukat (Seltmann és mtsai, 2005).

A nagy koncentrációban ($> 1 \mu\text{M}$), hosszú ideig alkalmazott kapszaicin viszont gátolta a faggyúmirigy sejtek proliferációját és pusztulásukat indukálta (17., 19. ábrák), amiben viszont eredményeink szerint a TRPV1 nem játszott szerepet (18. ábra). Ebben az esetben feltehetően a vanilloid vegyületek vanilloid receptoroktól független sejthalált indukáló hatásaival (Hail, 2003) kell számolnunk.

A kapszaicinnal ellentétben az arachidonsav fokozta az SZ95 sebociták differenciálódását, növelte lipidtermelésüket és indukálta apoptózisukat (Wrobel és mtsai, 2003; 9., 12., 13. ábrák). Habár az arachidonsav származékai, az eikozanoidok közé tartozó leukotriének vagy az N-arachidonil-dopamin és az endokannabinoid anandamid (Zygmunt és mtsai, 1999; Hwang és mtsai, 2000; Huang, 2002; Dinis és mtsai, 2004) fokozhatják a TRPV1 működését, úgy tűnik, a sebociták esetében a TRPV1 nem játszik szerepet az arachidonsav hatásának mediálásában. Más vizsgálatainkban az endokannabinoidok célpontjaként a CB2 kannabinoid receptort azonosítottuk az SZ95 sebocitákon, melynek aktiválása – az arachidonsavhoz hasonlóan – serkentette a sejtek differenciálódását (Dobrosi és mtsai, 2008).

Az arachidonsav és lipoxigenáz termékei valamint az endokannabinoidok egyaránt lehetnek a PPAR-ok aktivátorai (Devchand és mtsai, 1996; Desvergne and Wahli, 1999; Bouaboula és mtsai, 2005; Burnstein, 2005; O'Sullivan, 2007). A PPAR-ok a lipidmetabolizmus fontos regulátorai (Schoonjans és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 2003); a PPAR γ például az adipociták differenciálódásának egyik központi regulátora (Gregoire és mtsai, 1998), de a receptor család tagjai szerepet játszanak a sebociták lipidtermelésének szabályozásában is (Rosenfield és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2003; Trivedi és mtsai., 2006). Kísérleteinkben a kapszaicin a sebociták lipidszintézise mellett a PPAR-ok és az azokkal heterodimer párt alkotó RXR-ok expresszióját is csökkentette (1. táblázat).

A sebociták sokrétűen járulnak hozzá a bőr immunológiai működéséhez is. Képesek különböző gyulladási mediátorok (IL-1 β , IL-6, IL8/CXCL8, TNF α , LTB $_4$, PGE $_2$) termelésére, ami különböző gyulladási induktorok, így pl. UV sugárzás (Zhang és mtsai, 2006), mikrobiális fertőzések (Nagy és mtsai, 2006), SP (Lee és mtsai, 2008) vagy arachidonsav (Alesta és mtsai, 2006) hatására fokozódhat. Így a faggyúmirigy sejtjei központi szerepet játszhatnak olyan gyulladási kórképek kialakulásában, mint az akné. Az akné komplex

etiológiájú gyulladós kórkép, melynek patogenezisében egyaránt szerepet játszik a kartinociták hiperproliferációja miatt létrejövő comedoképződés, a szebociták fokozott és megváltozott lipidtermelése (hiperszeborrea), valamint patogén mikroorganizmusok (pl. *Propionibacter acne*) elszaporodása. A folyamat során a hiperproliferatív keratinociták IL-1 α -t, TNF α -t és GM-CSF-t termelnek, a szebocitákban pedig fokozódhat a gyulladós lipidmediátorok (pl. LTB₄) termelése, aminek hatására az érintett folliculusokat elsőként CD4+ T limfociták, majd neutrofil granulociták infiltrálják. Az újabb modellek szerint akné kórokozó mikroorganizmusok jelenléte nélkül is kifejlődhet, ha a gyulladós mediátorok termelődése a fenti, vagy más okok (pl. PPAR aktiváció, fokozott androgén hatás) miatt fokozódik (Farrar és Ingham, 2004; Zouboulis, 2004; Zouboulis és mtsai, 2005). *In vitro* az arachidonsav kezelés mimikálja a szebocitákon aknéban tapasztalható változások egy részét, fokozza a sejtek lipidszintézisét (Wrobel és mtsai, 2003; 12. ábra), valamint a gyulladós mediátorok termelését (Alestas és mtsai, 2006). Mivel a szebocitákon expresszálandó TRPV1 aktivációja gátolta az arachidonsav indukálta lipidtermelést (12. ábra), a PPAR gének expresszióját és a proinflammatorikus IL-1 β felszabadulását (1. táblázat), 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 monocitákon, a belőlük differenciálódó éretlen dendritikus sejteken és az aktivált, érett dendritikus sejteken is igazoltuk a TRPV1 protein (21. ábra) és mRNS (22. ábra) szintű kifejeződését. Úgy tűnt, a TRPV1 mind az éretlen, mind pedig az érett dendritikus sejteken Ca²⁺-csatornaként funkcionál (23. ábra).

A TRPV1 expressziója a monociták dendritikus sejté történő differenciálódása során jelentősen fokozódott (21-22. ábrák), ami felveti a receptor szerepét a folyamatban. Habár mindkettő fokozódik a differenciálódás során, az RNS és protein szint változása nem pontosan ugyanazt a mintázatot mutatja (21-22. ábrák). Elképzelhető, hogy a differenciálódási szignálok hatására megnő a TRPV1 turn-over, amit a receptor protein szintű átmeneti csökkenése mellett a transzkripció fokozódása jelezhet, amit csak időben némi késéssel követ a protein szint emelkedése. Eszerint a még nem differenciálódó monocitákon relatíve nagyobb protein és kisebb mRNS expresszió tapasztalható, amit eredményeink is alátámasztanak.

A monocitákat IL-4-gyel és GM-CSF-ral kezelve a sejtek dendritikus sejtékké differenciálódnak (Sallusto és Lanzavecchia, 1994; 20. ábra). A naponta alkalmazott

kapszaicin önmagában nem indukálta a monociták dendritikus irányú differenciálódást (24. ábra), viszont gátolta a citokinek indukálta dendritikus sejt differenciálódást; azaz mind a DC-SIGN és CD11c dendritikus sejtmarkerek, mind az MHC-II komplex alkotásában résztvevő HLA-DR kifejeződését csökkentette (24-25. ábrák). A kapszaicin folyamatos jelenléte nem csupán a felszíni markerek expresszióját csökkentette, hanem a sejtek funkcióját, a fagocitózist is gátolta (28.A ábra), viszont nem befolyásolta az életképességüket (26. ábra). A kapszaicin hatását a TRPV1 specifikus antagonistá kapszazepin hatékonyan gátolta (27., 28.A ábrák), vagyis a hatás feltehetően a TRPV1-en keresztül valósult meg. Érdekes módon, ha a kapszaicint csak az ötnapos differenciálódás harmadik napjától alkalmaztuk, nem befolyásolta a dendritikus sejtek differenciálódását (27. ábra), ami arra utal, hogy a TRPV1 aktiváció a monocita-dendritikus sejt átalakulás korai eseményeit gátolta.

A humán monocita eredetű dendritikus sejteket 24 órán keresztül kapszaicinnal kezelve nem tapasztaltuk a sejtek érését (29.A ábra), viszont mindössze két órás kapszaicin kezelés már gátolta a sejtek fagocitózist (28.B ábra). Ez utóbbi hatás kapszazepinnel és a külső Ca^{2+} koncentráció csökkentésével egyaránt kivédhető volt (28.B-C ábra), ami arra utal, hogy a kapszaicin hatását ez esetben is a TRPV1 közvetítette. Eszerint a TRPV1 aktivációja nemcsak a dendritikus sejtek differenciálódását, hanem a már differenciálódott dendritikus sejtek működését is gátolta.

Az éretlen dendritikus sejteket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt citokinek kombinációjával tudtuk indukálni, melynek hatására megnőtt a migrációs marker CCR7, a HLA-DR, valamint számos kostimulációs molekula (CD40, CD80, CD83, CD86) expressziója (29-30. ábrák). Ezzel párhuzamosan egyes citokinek transzkripciója (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) is fokozódott (31. ábra). A citokinekkel indukált érés során alkalmazott kapszaicin egyaránt gátolta a migrációs és érési markerek expresszió fokozódását (29-30. ábrák), valamint a proinflammatorikus IL-6 és IL-12 termelődését, viszont fokozta az antiinflammatorikus IL-10 szintézisét és felszabadulását, miközben az IL-8 szintézisére nem volt hatással (31-32. ábrák). A kapszaicin hatásait ebben az esetben is a TRPV1 mediálta, ugyanis kapszazepinnel gátolhatónak bizonyult (32. ábra). A fentiek alapján megállapítható, hogy a TRPV1 aktivációja a dendritikus sejtek gyulladáscsökkentő citokinek által történő aktivációját és érését is gátolta, és antiinflammatorikus hatást fejtett ki.

A monocitákból IL-4 és GM-CSF jelenlétében differenciáltatott dendritikus sejtek a mieloid dendritikus sejtek igen jó modelljei (Sallusto és Lanzavecchia, 1994; Shortman és Liu, 2002). A modell relevanciáját a legújabb felfedezések is alátámasztják, melynek során egér modellen igazolták, hogy a Langerhans sejtek *in vivo* is differenciálódhatnak

monocitákból (Ginhoux és mtsai, 2006). A monocita-dendritikus sejt átalakulásban – a szebociták regulációjához hasonlóan – fontos szerepet játszik a PPAR γ . A folyamat során, különösen az első 24 órában fokozódik a PPAR γ expressziója, majd számos PPAR γ célgén kifejeződése is változik (Szatmári és mtsai, 2006a, 2007). A PPAR γ aktivációja befolyásolja a kialakuló dendritikus sejtek fenotípusát, hiszen gátolja a CD1a és fokozza a CD1d kifejeződését (Gogolák és mtsai, 2007; Szatmári és mtsai, 2006b). Az LPS indukált érés során a PPAR γ csökkenti a CD40, CD80, és CD83 expresszióját, de nem befolyásolja a HLA-DR és a CD86 expresszió növekedését, valamint gátolja az éretlen (IL-6, TNF α) és az érett dendritikus sejtek (IL-10, IL-12, IL-15) citokintermelését (Nencioni és mtsai, 2002).

A PPAR ligandokhoz hasonlóan a kapszaicin is gátolta a dendritikus sejtek IL-4 és GM-CSF indukálta differenciálódását monocitákból (24., 25., 27., 28.A ábrák) és csökkentette a proinflammatorikus citokinek által indukált felszíni markerek (29-30. ábrák) expresszióját, valamint egyes interleukinok termelődését (31-32. ábrák). Vizsgálataink során a kapszaicin olyan felszíni markerek expresszióját is csökkentette, melyeket a PPAR γ aktivációja nem befolyásolt (HLA-DR, CD86); meg kell azonban jegyezni, hogy kísérleteink során mi a fentiekől eltérő módon indukáltuk a dendritikus sejtek érését, hiszen LPS helyett citokinek kombinációját (ld. „Anyagok és módszerek”) használtuk. A TRPV1 aktiváció a monocita-dendritikus sejt átalakulás korai eseményeit gátolta (27. ábra), amikor a PPAR γ aktivációja is a legkifejezettebb (Szatmári és mtsai, 2006a, 2007). Így elképzelhető, hogy a kapszaicin indukált TRPV1 szignalizációban – a szebocitákon tapasztaltakhoz hasonlóan – a dendritikus sejteken is szerepet játszhat a PPAR γ .

A kapszaicint már korábbi kutatások is „hírbe hozták” a PPAR γ -val (Kim és mtsai, 2004). Kimutatták, hogy a PPAR γ közvetlen aktiválásán keresztül is képes lehet gátolni a makrofágok TNF α termelését (Park és mtsai, 2004). A legfrissebb kutatások viszont a TRPV1 szignalizációról is igazolták, hogy 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 (Zhang és mtsai, 2007). Más vizsgálatokból is úgy tűnik, hogy az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció növekedése csökkentheti a PPAR γ expresszióját (Shi és mtsai, 2000).

A humán monocita eredetű dendritikus sejteken a kapszaicin és az általunk pozitív kontrollként alkalmazott ATP egyaránt megnövelte az [Ca²⁺]_{IC}-t koncentrációt (23. ábra). 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 – különösen TNF α -val együtt alkalmazva – fokozza a sejtek érését (Berchtold és mtsai, 1999;

Schnurr és mtsai, 2000). Más kutatások szerint az ATP ionotróp purinoreceptorokon keresztül ugyan fokozza az érési markerek megjelenését, de gátolhatja egyes proinflammatorikus citokinek (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) termelődését és a T_h1 irányú immunválaszok kialakulását (la Sala és mtsai, 2001). Az ATP P2Y₁₁ metabotróp purinoreceptoron és cAMP mediált útvonalon keresztül viszont serkentheti a sejtek érését és az IL-12 termelését (Wilkin és mtsai, 2002). A változatos hatás kialakításában a purinoreceptorok sokfélesége mellett a sejtek felszínén jelenlévő ektonukleáz CD39 is részt vesz, ami az ATP ADP-re történő bontásával befolyásolhatja az egyes purinoreceptorok aktivitását (Marteau és mtsai, 2004). Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy a Ca²⁺-hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak sokrétűen befolyásolhatják a dendritikus sejtek működését, függően a szignalizációt elindító receptortól, a Ca²⁺-koncentráció változás jellegétől, vagy a különböző egyéb (aktivációs) szignálok jelenlététől.

A dendritikus sejtek monocitákból történő differenciálódását a ciklikus nukleotidokhoz kapcsolt jelátviteli útvonalak is befolyásolhatják. A ciklikus nukleotidok szintjének emelése habár gátolja a CD1a+ és CD14- dendritikus sejtek kialakulását és a sejtek későbbi LPS indukált érését, nem befolyásolja a DC-SIGN és fokozza az MHC-II molekulák expresszióját. Ez arra utal, hogy a cAMP/cGMP – a TRPV1 mediált jelátviteli folyamatokkal szemben – nem a monocita-dendritikus sejt átalakulás korai lépéseit gátolja (Giordano és mtsai, 2003). A PGE₂ szintén cAMP kapcsolt receptorokon keresztül fejt ki hatását, ami TNF α -val alkalmazva serkenti a dendritikus sejtek érését (Steinbrink és mtsai, 2000), indukálja az IL-12 szintézisét, viszont LPS jelenlétében jelentősen gátolja azt (Rieser és mtsai, 1997). A PGE₂ részben IL-10 közvetítésével bonyolult parakrin és autokrin visszacsatolásokon keresztül egyaránt serkentheti és gátolhatja is a csontvelői eredetű dendritikus sejtek gyulladásos mediátor termelését (Harizi és Gualde, 2006). Emellett a PGE₂ (akárcsak a hisztamin) fokozza a dendritikus sejtek CCL17 és CCL22 termelését, ami T_h2 irányú differenciálódást indukál, miközben gátolja a T_h1 irányú differenciálódást kiváltó CXCL10 kiválasztását (McIlroy és mtsai, 2006). A PGE₂ továbbá hatékonyan indukálja a monocita eredetű dendritikus sejtek migrációját és a CCR7 sejtfelszíni marker megjelenését, de önmagában nem fokozza a proinflammatorikus mediátorok termelését, szemben a CD40L-dal, ami a PGE₂-vel ellentétes hatást fejt ki (Scandella és mtsai, 2002; Luft és mtsai, 2004). Ezek alapján úgy tűnik a cAMP kapcsolt útvonalak szerepe is jelentősen függ egyéb környezeti hatásoktól. Az általunk alkalmazott citokinkoktól nagy mennyiségben tartalmazott cAMP jelátvitelt aktiváló PGE₂-t, aminek hatását a TRPV1 aktivációja gátolta.

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. Kis dózisú kapszaicin szubkután injektálása szeptikus patkányokba csökkentette a plazma TNF α , IL-6 valamint egyéb gyulladással kapcsolatos markerek szintjét és fokozta az antiinflammatorikus IL-10 koncentrációját (Demirbilek és mtsai, 2004). Az antiinflammatorikus hatást több mechanizmus is közvetítheti: (1) a TRPV1-et expresszáló szenzoros neuronokon tartós aktiváció hatására csökkentheti a neurogén gyulladás kialakulásáért felelős neuropeptidek mennyiségét (Bíró és mtsai, 1997) vagy serkenti antiinflammatorikus mediátorok (pl. szomatosztatin – Helyes és mtsai, 2004; Pintér és mtsai, 2006) felszabadulását; (2) gátolhatja a makrofágok működését, az NF- κ B útvonal és az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz, valamint a ciklooxygenáz gátlásán keresztül (Kim és mtsai, 2003; Chen és mtsai, 2003; Park és mtsai, 2004); (3) a dendritikus sejteken keresztül jelen vizsgálataink a gyulladás csökkentő hatás egy újabb mechanizmusára világítottak rá: a TRPV1 kapszaicinnal történő aktivációja egyaránt gátolta a sejtek differenciálódását és érését.

Jelen eredményeinkkel szemben Basu és Srivastava (2005) egér dendritikus sejteken azt találták, hogy a TRPV1 aktivációja serkenti a dendritikus sejtek érését és aktivációját, és inkább proinflammatorikus szignálokat közvetíthet. Mint fentebb bemutattuk, az egyes szignálok hatását az egyidejűleg jelenlévő aktivációs és környezeti hatások jelentősen befolyásolhatják, és különbözőképpen érvényesülhetnek a dendritikus sejtek egyes alcsoportjain is. A két vizsgálat módszertana alapvetően különbözött egymástól, ennek fényében az alábbi tényezők (is) szerepet játszhatnak abban, hogy eltérő eredményekre jutottunk: (1) Faji különbségek. A korábbi vizsgálatokat egér modelleken végezték, mi pedig humán sejteken dolgoztunk. (2) A dendritikus sejt tenyésztési modellek különbségei. Basu és Srivastava (2005) csontvelői eredetű dendritikus sejteket vizsgáltak, mi pedig monocita eredetű dendritikus sejteket. (3) Az alkalmazott kísérleti elrendezés. Basu és Srivastava (2005) kapszaicin kezeléseik egy részét élő állaton végezték, és ezt követően izolálták a dendritikus sejteket, így a kapszaicin hatását egy sokkal komplexebb környezetben tanulmányozták. Ezért elképzelhető, hogy a kapszaicin, illetve a TRPV1 aktiváció bizonyos hatásai nem közvetlenül a dendritikus sejteken érvényesültek, hanem pl. szenzoros neuronokon

keresztül. A TRPV1 aktiváció hatására a szenzoros neuronokból felszabaduló peptidek és az általuk kiváltott neurogén gyulladás (Geppeti és Holzer, 1996; Black, 2002) is hozzájárulhat a dendritikus sejtek aktivációjához. Jelen munkánkban *in vitro* kezeléseket végeztünk az előzetesen izolált sejteken, így ilyen módosító hatásokkal nem kell számolnunk.

Érdekes eredményre vezettek O'Connell és mtsai (2005) vizsgálatai, akik egér csontvelői eredetű dendritikus sejteken nem tudták kimutatni a TRPV1 jelenlétét, de kimutatták a vele szoros rokonságban álló TRPV2-t. Korábbi kutatások kimutatták a különböző TRPV1 és TRPV2 heteromerizációjának lehetőségét (Rutter és mtsai, 2005), a dendritikus sejtek esetében azonban ezidáig nincs információnk a különböző TRPV proteinek kolokalizációjáról/heteromerizációjáról. Habár a fenti és saját vizsgálatainknak köszönhetően bepillantást nyerhettünk a TRPV1 dendritikus sejtek immunológiai folyamataiban betöltött szerepébe, a részletes mechanizmusok és a különböző környezeti tényezők módosító hatásainak feltárása még számos további vizsgálatot igényel.

A TRPV1 sokoldalú szerepet játszik a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában

Jelen dolgozatban bemutatott munkáink újabb két nem-neurális sejtfeleségen írták le a TRPV1 funkcionális szerepét: a humán faggyúmirigy sebocitáin és a humán dendritikus sejteken. Számos más munkával együtt ezek tovább bővítik ismereteinket a TRPV1 szerepéről a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában.

A TRPV1 a bőr számos sejtfeleségén expresszálódik, aktivációja változatos hatásokkal járhat (2. táblázat), 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 (Tominaga és mtsai, 1998; Caterina és Julius 2001), így a neuronok TRPV1-en keresztül történő deszenzitizációja szerepet játszhat különböző fájdalmas kórképek terápiájában (Bíró és mtsai, 1997). A szenzoros neuronok aktivációja ugyanakkor neuropeptidek felszabadulásával is jár, ami neurogén gyulladás kialakulásához vezethet. A felszabadult neuropeptidek pedig a bőr számos sejtfeleségét képesek aktiválni, endotél sejteken keresztül vazodilatációt válthatnak ki, és a különböző immunsejteket is aktiválhatják (Geppeti és Holzer, 1996; Black, 2002, O'Connor és mtsai, 2004).

2. táblázat: A TRPV1 szerepe a bőr sejtjeinek működésében

<i>TRPV1-et expresszáló struktúra</i>	<i>A TRPV1 aktiváció közvetlen hatása</i>	<i>→ A TRPV1 aktiváció következményei</i>
Szenzoros neuronok	[Ca ²⁺] _{IC} ↑, aktiváció	→ Fájdalom → Viszketés
	Neuropeptidek felszabadulása	→ Neurogén gyulladás → Akné
	Anandamid felszabadulása	→ Analgézia → Szebociták terminális differenciálódása fokozódik → Szőrtüsző regressziója, apoptózis, katagén átalakulás → Immunfunkciók, gyulladás lokális gátlása
	Szomatosztatin felszabadulása	→ Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás
	Neuropeptid raktárak depléciója	→ Analgézia → Lokális gyulladáscsökkentő hatás
	Deszenzitizáció	→ Analgézia
	Epidermális keratinociták	[Ca ²⁺] _{IC} ↑
Proliferáció gátlása/apoptózis		→ Hiperproliferatív kórképek terápiája? - prurigo nodularis - akné (hiperkeratinizáció)?
IL-8 és PGE ₂ felszabadulás		→ Lokális gyulladás? → Immunmoduláció → Neurális TRPV1 szenzitizációja
Szőrtüsző/ORS keratinociták	[Ca ²⁺] _{IC} ↑	
	Proliferáció gátlása/apoptózis Katagén transzformáció Növekedési faktorok szintje csökken IL-1β és TGF-β ₂ termelése nő	→ Szőrnövekedés gátlása → Hajciklus negatív regulációja → Lokális gyulladás?
Szebociták	Lipidszintézis gátlása Terminális differenciálódás gátlása	→ A bőr lipidhomeosztázis változása? → Szteroid anyagcsere változása? → Gyulladásos lipidmediátorok gátlása? → Akné/szeborea terápiája
	IL-1β felszabadulás gátlása	→ Antiinflammatorikus hatás → Akné terápiája?
Monocita eredetű dendritikus sejtek (dermális dendritikus sejtek/Langerhans sejtek?)	[Ca ²⁺] _{IC} ↑	
	Differenciálódás gátlása Fagocitózis gátlása Antigénprezentáció gátlása Migráció gátlás Érés/aktiváció gátlása IL-6 és IL-12 szekréció gátlása IL-10 szekréció fokozása	→ Antiinflammatorikus hatás → Immunmoduláció
Hízósejtek	[Ca ²⁺] _{IC} ↑	
	IL-4 szekréció	→ Immunmoduláció

Érdekes módon úgy tűnik, hogy a neuropeptidek gátolják a bőr dendritikus sejtjeinek immunfunkcióit (Seiffert és Granstein, 2006). Másrészt a SP viszont inkább proinflammatorikus hatású és az immunsejtek aktiválása mellett fokozza a szebociták terminális differenciálódását is és hozzájárulhat az akné kialakulásához (Toyoda és Morohashi, 2001; Lee és mtsai, 2008). Ilyen módon az akné kialakulása szempontjából a neurális (proinflammatorikus) és a szebocitákon (antiinflammatorikus) expresszálandó TRPV1 ellentétes hatásokat közvetíthet.

A TRPV1-et expresszáló szenzoros neuronok meghatározott alcsoportjai viszketést kiváltó, pruritogén ingereket is közvetíthetnek, így a TRPV1 aktivációja/deszzenzitizációja jelentősen befolyásolhatja a viszketés kialakulását (Bíró és mtsai, 2007). A TRPV1-et is aktiváló fájdalmas meleg hőmérséklet csökkentette a hisztamin-indukálta viszketés érzését és az ezzel járó vazodilatációt is (Ward és mtsai, 1996; Yosipovitch és mtsai, 2005, 2007). Ehhez hasonlóan a kapszaicin csökkentette mind a hisztamin által kísérletesen kiváltott, mind pedig a különböző bőrgyógyászati kórképekben (prurigo nodularis, atópiás dermatitisz, stb.) tapasztalható viszketést (Folster-Holst és Brasch, 1996; Weisshaar és mtsai, 1998; Ständer és mtsai, 2001; Lysy és mtsai, 2003). A TRPV1 nemcsak a szenzoros neuronokon keresztül befolyásolhatja a viszketést, hanem a bőr non-neurális elemein keresztül is kiválthatja pruritogén mediátorok felszabadulását, de a deszenzitizáció révén hozzájárulhat a kapszaicin fenti kórképekben mutatkozó jótékony hatásához is (Bíró és mtsai, 2005; Paus és mtsai, 2006; Steinhoff és mtsai, 2006). A TRPV1-et aktiváló lipid mediátorok egy része (pl. anandamid) a kannabinoid receptorokat is aktiválni képes endokannabinoidok közé tartozik. Ezen kannabinoid receptorok aktiválása szintén antipruritogén hatásúnak tűnik (Dvorak és mtsai, 2003). Anandamid a TRPV1 aktiváció hatására is felszabadulhat pl. a szenzoros neuronokból (Ahluwalia és mtsai, 2003b), de endokannabinoidokat más TRPV1-et is expresszáló képletben is kimutattunk, pl. a szőrtüszőben (Telek és mtsai, 2007) és a szebocitákban (Dobrosi és mtsai, 2008) is. Figyelembe véve az endovanilloid és endokannabinoid rendszer ezen szoros kapcsolatát, valószínűnek tűnik, hogy a viszketés modulációja során (is) funkcionális kölcsönhatásban áll a két rendszer.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a szőrtüszőben és a keratinocitákon, valamint a szebocitákon expresszálandó 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 (Bodó és mtsai, 2005), míg a szebocitákon gátolja a lipidek szintézisét és a sejtek differenciálódását, valamint serkenti proliferációjukat (10. 12. 15-18. ábrák). A keratinocitákon fokozza a gyulladást

mediátorok (PGE₂, IL-8 és IL-1β) szintézisét (Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005), míg szebocitákon csökkenti az IL-1β felszabadulását (1. táblázat). Ilyen módon a TRPV1 aktivációja 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-k, LT-k, IL-k, stb.) termelésére képesek, amelyek parakrin vagy autokrin módon befolyásolhatják a TRPV1 működését a bőr számos sejtfeleségén.

A TRPV1 bőrben betöltött szerepének talán legizgalmasabb kérdése a receptor immunológiai hatása. Ez közvetlenül a bőr immunsejtjein (pl. a receptort expresszáló hízó- és Langerhans sejteken – Bodó és mtsai, 2004) keresztül is megvalósulhat. A hízósejteken már korán kimutatták, hogy a kapszaicin kalciumbeáramlást és IL-4 felszabadulást vált ki, jelen vizsgálatainkban pedig a TRPV1 funkcionalitását humán dendritikus sejteken is igazoltuk.

A dendritikus sejtek farmakológiai befolyásolása a TRPV1-en keresztül számos bőrgyógyászati/immunológiai kórkép esetében felmerülhet. Ezen lehetőségek pontos feltársa azonban még számos további, specifikus dendritikus sejt altípuson végzett vizsgálatot igényel. A bőr dendritikus sejtjei ugyanis lokalizációjuk, felszíni markereik és funkcióik alapján egyaránt heterogének. A mieloid dendritikus sejtek két fő populációját a bőrben az epidermális Langerhans sejtek és a dermális dendritikus sejtek alkotják. A Langerhans sejtek CD1a-t, és langerint (CD207) expresszálnak, amik nem találhatóak meg a dermális dendritikus sejtek felszínén. Ez utóbbiak viszont kifejezik a DC-SIGN-t és a CD1d-t, amik viszont a Langerhans sejtekről hiányoznak (Valladeau és Saeland, 2005). A dermális dendritikus sejtek felszíni markereik alapján további alcsoportokba sorolhatók (Zaba és mtsai, 2007; Ochoa és mtsai, 2008). Talán a legfontosabb, funkcionális szempontokat is figyelembe véve a nyugvó (resident) és inflammatórikus dendritikus sejtek elkülönítése (Zaba és mtsai, 2009a). Az inflammatórikus dendritikus sejteket éretlen fenotípus jellemzi, CD11c pozitivitásuk mellett nem expresszálják a nyugvó dermális dendritikus sejtekre jellemző CD1c-t. Gyulladásos psoriázisban számuk jelentősen megnő, így a bőrben a CD11c pozitív dendritikus sejtek száma megközelítheti a T limfociták számát, miközben TNFα-t és indukálható nitrogén-monoxid szintázt termelnek (Lowes és mtsai, 2005). A T sejteket T_h1 és T_h17 (IL-17-et termelő T sejtek, autoimmun zavarok kialakításában játszhatnak szerepet – Steinman, 2007) irányba differenciáltatják, így fontos szerepet játszhatnak autoimmunitás kialakításában (Zaba és mtsai, 2009a, 2009b). Az atópiás dermatitiszben megjelenő inflammatórikus dendritikus sejtek viszont eltérő fenotípussal bírnak és inkább T_h2 irányú differenciálódást indukálnak (Guttman-Yassky és mtsai, 2007; Zaba és mtsai, 2009b).

A dermális dendritikus sejtekkel ellentétben fiziológias körülmények között úgy tűnik, hogy az epidermális Langerhans sejtek inkább az immuntolerancia kialakításában játszanak szerepet. Feltételezik, hogy allergének és patogének behatolása esetén a bőr egyéb sejtjei olyan vészjelző szignálokat küldhetnek, melyek hatására a tolerancia megszűnik, a Langerhans sejtek pedig – habár nem termelnek jelentős mennyiségű citokineket – olyan kemotaktikus szignálokat közvetítenek, melyek különböző gyulladásos sejtek, pl. inflammatórikus dendritikus sejtek invázióját okozzák (Novak és Bieder, 2008).

Eredményeink szerint az *in vitro* monocita eredetű dendritikus sejteken expresszáldó TRPV1 aktivációja ezen sejtek immunológiai működését hatékonyan 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 a dendritikus sejtek változatos fenotípusaira és azok sokoldalú funkcióira tekintettel még számos további vizsgálat szükségeltetik a dendritikus sejteken expresszáldó TRPV1 szerepének pontos feltárására a bőr komplex immunológiai folyamatainak szabályozásában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Korábban *in situ* kimutattuk a TRPV1 expresszióját a humán bőr faggyúmirigyében és az epidermisz dendritikus (Langerhans) sejtjein. Jelen munkánk során *in vitro* vizsgáltuk a TRPV1 szerepét humán faggyúmirigy eredetű SZ95 sebocita sejtvonalon és monocita eredetű dendritikus sejteken. A humán faggyúmirigyhez hasonlóan az SZ95 sebocitákon is igazoltuk a TRPV1 jelenlétét. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 specifikus aktivációja kapszaicinnal már egy napos kezelést követően gátolta a sebociták bazális és arachidonsav által indukált lipidtermelését, de nem befolyásolta a sejtek életképességét. A receptor specifikus gátlószer I-RTX és RNSi technika segítségével egyaránt 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 kívül azt is kimutattuk, hogy a TRPV1 aktivációja megváltoztatta a lipidanyagcsere szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok expresszióját és egyes citokinek termelését. A hosszútávú kezelés esetén azt tapasztaltuk, hogy a kis koncentrációban alkalmazott kapszaicin TRPV1-specifikusan fokozta az SZ95 sejtek proliferációját, míg nagy koncentrációban TRPV1-től független útvonalon toxikus hatást váltott ki, és csökkentette az élő sejtek számát. A perifériás vérből izolált monocitákon és a belőlük IL-4 és GM-CSF jelenlétében differenciálódó dendritikus sejteken szintén kimutattuk a TRPV1-et, és megállapítottuk, hogy expressziója fokozódott a dendritikus sejtek differenciálódása során. Úgy találtuk, hogy a dendritikus sejteken kifejeződő receptor Ca^{2+} -csatornaként működött. A sejtek 5 napos differenciálódása során a 0. naptól alkalmazott kapszaicin a TRPV1-en keresztül gátolta a dendritikus irányú differenciálódást, az éretlen dendritikus sejt felszíni markerek kifejeződését és a sejtek fagocitózist. A TRPV1 aktivációja a már differenciálódott éretlen dendritikus sejtek további érését nem indukálta, de csökkentette az *E. coli* biopartikulumok internalizációját. Az éretlen dendritikus sejtek érését proinflammatorikus citokinek segítségével tudtuk indukálni, amit a TRPV1 kapszaicinnal történő aktivációja szintén gátolt; csökkentette az érési markerek expresszióját, valamint egyes gyulladásos citokinek transzkripcióját és felszabadulását, miközben fokozta az antiinflammatorikus IL-10 szintjét. Vizsgálataink szerint a TRPV1 aktiválása gátolja a sebociták 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. acne vulgaris) befolyásolásában.

SUMMARY

In our previous studies, we have identified the *in situ* expression of TRPV1 on sebaceous glands and epidermal dendritic (Langerhans) cells of human skin. The aim of the current study was to investigate the role of TRPV1 in biology of human sebaceous gland derived SZ95 sebocytes and monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. Like the human sebaceous glands, SZ95 sebocytes also expressed TRPV1. Moreover, the TRPV1 activator capsaicin inhibited both the basal and arachidonic acid induced lipid synthesis (but did not influence the viability of the cells). The specific role of TRPV1 in mediating these effects was evidenced by using both the specific antagonist I-RTX and the RNAi technique. Results of the experiments carried out in decreased Ca^{2+} containing medium suggested that the TRPV1 took part in the effect of capsaicin as a functional Ca^{2+} channel. In addition, activation of TRPV1 altered the expression of transcription factors regulating lipid synthesis as well as the production of selected cytokines. Following long-term treatment, low concentrations of capsaicin increased the proliferation rate of SZ95 sebocytes acting via TRPV1, whereas high doses decreased the viability of the cells independently of TRPV1. TRPV1 was also identified on human monocytes and monocyte-derived dendritic cells where the expression of TRPV1 was increased during dendritic differentiation induced by GM-CSF and IL-4. In addition, TRPV1 expressed by dendritic cells was found to operate as a functional Ca^{2+} channel. Dendritic differentiation was inhibited by capsaicin in a TRPV1-dependent manner: capsaicin suppressed both the expression of differentiation markers characteristic for immatured dendritic cells and the phagocytosis of the cells. Moreover, stimulation of TRPV1 on differentiated, immatured dendritic cells did not induce the maturation, but decreased the internalization of *E. coli* bioparticules. Maturation of dendritic cells, induced by pro-inflammatory cytokines, was inhibited by the activation of TRPV1: capsaicin suppressed the expression of markers indicating maturation and inhibited the transcription and release of proinflammatory cytokines. In parallel, the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased by capsaicin. Our results suggest that activation of TRPV1 suppresses the lipid synthesis/differentiation of sebocytes and have an anti-inflammatory effect on dendritic cells. These data argue for the potential role of TRPV1 to influence immune processes of the human skin as well as of certain dermatoses with altered lipid homeostasis (e.g. acne vulgaris).

IRODALOMJEGYZÉK

- Acs G, Palkovits M, Blumberg PM. (1996): Specific binding of [3H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci.* 59(22), 1899-1908.
- Agopyan N, Bhatti T, Yu S, Simon SA. (2003a): Vanilloid receptor activation by 2- and 10-microm particles induces responses leading to apoptosis in human airway epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 192(1), 21-35.
- Agopyan N, Li L, Yu S, Simon SA. (2003b): Negatively charged 2- and 10-microm particles activate vanilloid receptors, increase cAMP, and induce cytokine release. *Toxicol Appl Pharmacol.* 186(2), 63-76.
- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. (2003a): Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci.* 17(12), 2611-2618.
- Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S, Nagy I. (2003b): Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J Neurochem.* 84(3), 585-591.
- Alestas T, Ganceviciene R, Fimmel S, Muller-Decker K, Zouboulis CC. (2006): Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med.* 84(1), 75-87.
- Amantini C, Mosca M, Lucciarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M, Santoni G. (2004): Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 11(12), 1342-1356.
- Austyn JM. (2001): Mobilization, migration and localization of dendritic cells. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells*. Academic Press, New York, 131-149.
- Banchereau J, Steinman RM. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673), 245-252.
- Barton GM, Medzhitov R. (2002): Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol.* 270(81-92).
- Basu S, Srivastava P. (2005): Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(14), 5120-5125.
- Benham CD, Davis JB, Randall AD. (2002): Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology.* 42(7), 873-888.
- Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Muhl-Zurbes P, Ogilvie A, Schuler G, Steinkasserer A. (1999): Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett.* 458(3), 424-428.
- Bevan SJ, Docherty RJ, Wood J. (1993): Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In: Wood JN. (ed.): *Capsaicin in the study of pain*. Academic Press, New York, 27-44.
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. (2001): Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23), 13396-13401.
- Biro T, Acs G, Acs P, Modarres S, Blumberg PM. (1997): Recent advances in understanding of vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2(1), 56-60.
- Biro T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Acs P, Blumberg PM. (1998a): Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 56(1-2), 89-98.
- Biro T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. (1998b): Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood.* 91(4), 1332-1340.
- Biro T, Ko MC, Bromm B, Wei ET, Bigliardi P, Siebenhaar F, Hashizume H, Misery L, Bergasa NV, Kamei C, Schouenborg J, Roostermann D, Szabo T, Maurer M, Bigliardi-Qi M, Meingassner JG, Hossen MA, Schmelz M, Steinhoff M. (2005): How best to fight that nasty itch - from new insights into the neuroimmunological, neuroendocrine, and neurophysiological bases of pruritus to novel therapeutic

- approaches. *Exp Dermatol.* 14(3), 225-240.
- Biro T, Bodo E, Telek A, Geczy T, Tychsen B, Kovacs L, Paus R. (2006): Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 126(8), 1909-1912.
- Biro T, Toth BI, Marincsak R, Dobrosi N, Geczy T, Paus R. (2007): TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8), 1004-1021.
- Black PH. (2002): Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun.* 16(6), 622-653.
- Blom HM, Van Rijswijk JB, Garrelds IM, Mulder PG, Timmermans T, Gerth van Wijk R. (1997): Intranasal capsaicin is efficacious in non-allergic, non-infectious perennial rhinitis. A placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy.* 27(7), 796-801.
- Bodo E, Kovacs I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovacs L, Biro T. (2004): Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol.* 123(2), 410-413.
- Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs 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.
- Bohm M, Schiller M, Stander S, Seltmann H, Li Z, Brzoska T, Metze D, Schioth HB, Skottner A, Seiffert K, Zouboulis CC, Luger TA. (2002): Evidence for expression of melanocortin-1 receptor in human sebocytes in vitro and in situ. *J Invest Dermatol.* 118(3), 533-539.
- Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. (2005): Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 517(3), 174-181.
- Brocker T. (1997): Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med.* 186(8), 1223-1232.
- Burstein S. (2005): PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.* 77(14), 1674-1684.
- Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J. (2005): Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* 106(2), 179-208.
- Campbell E, Bevan S, Dray A. (1993): Clinical applications of capsaicin and its analogues. In: Wood JN. (ed.): *Capsaicin in the study of pain.* Academic Press, New York, 256-272.
- Cao W, Lee SH, Lu J. (2005): CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J.* 385(Pt 1), 85-93.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389(6653), 816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288(5464), 306-313.
- Caterina MJ, Julius D. (2001): The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 24(487-517).
- Caterina MJ. (2007): Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(1), R64-76.
- Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Vanbervliet B, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. (1995): Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen. *J Immunol.* 155(11), 5427-5435.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 388(6644), 782-787.
- Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ. (1995): Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience.* 65(4), 1099-1108.
- Chen CW, Lee ST, Wu WT, Fu WM, Ho FM, Lin WW. (2003): Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol.* 140(6), 1077-1087.

- Chen W, Thiboutot D, Zouboulis CC. (2002): Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. *J Invest Dermatol.* 119(5), 992-1007.
- Chen W, Yang CC, Sheu HM, Seltsmann H, Zouboulis CC. (2003): Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. *J Invest Dermatol.* 121(3), 441-447.
- Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE. (2004): Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry.* 43(9), 2501-2511.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. (2001): Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature.* 411(6840), 957-962.
- Cosens DJ, Manning A. (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 224(5216), 285-287.
- Cruz F, Guimaraes M, Silva C, Reis M. (1997a): Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet.* 350(9078), 640-641.
- Cruz F, Guimaraes M, Silva C, Rio ME, Coimbra A, Reis M. (1997b): Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. *J Urol.* 157(2), 585-589.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. (2000): Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature.* 405(6783), 183-187.
- Demirbilek S, Ersoy MO, Karaman A, Gurbuz N, Bayraktar N, Bayraktar M. (2004): Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats. *Anesth Analg.* 99(5), 1501-1507; table of contents.
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. (2001): Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(5), 1250-1252.
- Deplewski D, Rosenfield RL. (1999): Growth hormone and insulin-like growth factors have different effects on sebaceous cell growth and differentiation. *Endocrinology.* 140(9), 4089-4094.
- Desvergne B, Wahli W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20(5), 649-688.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258(5090), 1946-1949.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. (1996): The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature.* 384(6604), 39-43.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, Cruz F. (2004): Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci.* 24(50), 11253-11263.
- Dobrosi N, Toth BI, Nagy G, Dozsa A, Geczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovacs L, Biro T. (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 22(10), 3685-3695.
- Dubois B, Bridon JM, Fayette J, Barthelemy C, Banchereau J, Caux C, Briere F. (1999): Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *J Leukoc Biol.* 66(2), 224-230.
- Dubois B, Massacrier C, Caux C. (2001): Selective attraction of naive and memory B cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 70(4), 633-641.
- Dvorak M, Watkinson A, McGlone F, Rukwied R. (2003): Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm Res.* 52(6), 238-245.
- Ellis CN, Berberian B, Sulica VI, Dodd WA, Jarratt MT, Katz HI, Prawer S, Krueger G, Rex IH, Jr., Wolf JE. (1993): A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 29(3), 438-442.

- Ellis JL, Sham JS, Udem BJ. (1997): Tachykinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med.* 155(2), 751-755.
- Farrar MD, Ingham E. (2004): Acne: inflammation. *Clin Dermatol.* 22(5), 380-384.
- Fayette J, Durand I, Bridon JM, Arpin C, Dubois B, Caux C, Liu YJ, Banchereau J, Briere F. (1998): Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol.* 48(6), 563-570.
- Fölster-Holst R, Brasch J. (1996): Effect of topically applied capsaicin on pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Treat.* 7(1), 13-15.
- Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 99(1), 23-33.
- Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. (2001): Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol.* 116(5), 793-800.
- Fujie T, Shikiji T, Uchida N, Urano Y, Nagae H, Arase S. (1996): Culture of cells derived from the human sebaceous gland under serum-free conditions without a biological feeder layer or specific matrices. *Arch Dermatol Res.* 288(11), 703-708.
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. (2000): Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem.* 275(42), 32552-32558.
- Gavva NR. (2008): Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci.* 29(11), 550-557.
- Gavva NR, Bannon AW, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, Davis J, Ernst N, Hever G, Kuang R, Shi L, Tamir R, Wang J, Wang W, Zajic G, Zhu D, Norman MH, Louis JC, Magal E, Treanor JJ. (2007): Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 323(1), 128-137.
- Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR, Kessler JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C, Davar G. (2008): Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain.* 136(1-2), 202-210.
- Geppetti P, Holzer P. (eds.) (1996): *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. (2006): Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol.* 7(3), 265-273.
- Giordano D, Magaletti DM, Clark EA, Beavo JA. (2003): Cyclic nucleotides promote monocyte differentiation toward a DC-SIGN+ (CD209) intermediate cell and impair differentiation into dendritic cells. *J Immunol.* 171(12), 6421-6430.
- Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, Rajnavolgyi E. (2007): Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood.* 109(2), 643-652.
- Gordon S. (2002): Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 111(7), 927-930.
- Green DR, Reed JC. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381), 1309-1312.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. (1998): Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78(3), 783-809.
- Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. (1996): Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature.* 384(6607), 364-367.
- Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. (1997): The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 185(6), 1101-1111.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. (2002): The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 23(4), 183-191.

- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. (1999): Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 11(3), 946-958.
- Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, Haider A, Khatcherian A, Carucci JA, Bergman R, Krueger JG. (2007): Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 119(5), 1210-1217.
- Hail N, Jr. (2003): Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. *Apoptosis.* 8(3), 251-262.
- Hajos M, Hjorth S, Carlsson A. (1987): Injection of capsaicin into the nucleus raphe dorsalis elicits heat loss in the rat. *Neurosci Lett.* 75(2), 199-204.
- Hajos M, Jancso G, Engberg G. (1987): Capsaicin-induced excitation of locus coeruleus neurons. *Acta Physiol Scand.* 129(3), 415-420.
- Hajos M, Engberg G, Nissbrandt H, Magnusson T, Carlsson A. (1988): Capsaicin-sensitive vasodilatory mechanisms in the rat substantia nigra and striatum. *J Neural Transm.* 74(3), 129-139.
- Harizi H, Gualde N. (2006): Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol.* 3(4), 271-277.
- Hart DNJ, MacDonald K, Vuckovic S, Clark GJ. (2001): Phenotypic characterization of dendritic cells. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells.* Academic Press, New York, 91-117.
- Hautkappe M, Roizen MF, Toledano A, Roth S, Jeffries JA, Ostermeier AM. (1998): Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. *Clin J Pain.* 14(2), 97-106.
- Heiner I, Eisfeld J, Luckhoff A. (2003): Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium.* 33(5-6), 533-540.
- Helyes Z, Szabo A, Nemeth J, Jakab B, Pinter E, Banvolgyi A, Kereskai L, Keri G, Szolcsanyi J. (2004): Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 50(5), 1677-1685.
- Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. (1997): Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol.* 159(11), 5654-5660.
- Holzer P. (1988): Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 24(3), 739-768.
- Holzer P. (1991): Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 43(2), 143-201.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. (2002): An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(12), 8400-8405.
- Hugues S, Boissonnas A, Amigorena S, Fetler L. (2006): The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr Opin Immunol.* 18(4), 491-495.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11), 6155-6160.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Denda M. (2002): Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(1), 124-129.
- James IF, Walpole CS, Hixon J, Wood JN, Wrigglesworth R. (1988): Long-lasting agonist activity produced by a capsaicin-like photoaffinity probe. *Mol Pharmacol.* 33(6), 643-649.
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. (1977): Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature.* 270(5639), 741-743.
- Jancso G, Kiraly E, Joo F, Such G, Nagy A. (1985): Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neurosci Lett.* 59(2), 209-214.

- Jancso N, Jancso A. (1949): Desensitization of sensory nerve endings. *Kísérletes Orvostudomány 2(Suppl)*, 15.
- Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. (1967): Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother.* 31(1), 138-151.
- Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. (1968): The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol Chemother.* 33(1), 32-41.
- Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, Jancso N. (1970a): Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *J Physiol.* 206(3), 495-507.
- Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, Jancso N. (1970b): Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiol.* 208(2), 449-459.
- Johnson DM, Garrett EM, Rutter R, Bonnert TP, Gao YD, Middleton RE, Sutton KG. (2006): Functional mapping of the transient receptor potential vanilloid 1 intracellular binding site. *Mol Pharmacol.* 70(3), 1005-1012.
- Jordt SE, Julius D. (2002): Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell.* 108(3), 421-430.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. (2000): Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14), 8134-8139.
- Jung MY, Kang HJ, Moon A. (2001): Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett.* 165(2), 139-145.
- Kalinski P, Lotze MT, Kapsenberg ML. (2001): Dendritic cell-related immunoregulation: signals and mediators. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells*. Academic Press, New York, 51-76.
- Kapsenberg ML, Hilkens CM, Wierenga EA, Kalinski P. (1999): The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy.* 29 Suppl 2(33-36).
- Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, Takeuchi K. (2003): Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol.* 66(6), 1115-1121.
- Kechagias S, Botella S, Petersson F, Borch K, Ericson AC. (2005): Expression of vanilloid receptor-1 in epithelial cells of human antral gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 40(7), 775-782.
- Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. (2001): Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 276(30), 28613-28619.
- Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R. (2003): Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal.* 15(3), 299-306.
- Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R. (2004): Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food.* 7(3), 267-273.
- Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK. (2006): Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol.* 177(7), 4322-4329.
- Kuzhikandathil EV, Wang H, Szabo T, Morozova N, Blumberg PM, Oxford GS. (2001): Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *J Neurosci.* 21(22), 8697-8706.
- Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY, Oh U. (2000): Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J Neurosci.* 20(22), 8298-8304.
- la Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. (2001): Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol.* 166(3), 1611-1617.
- Lacroix JS, Buvelot JM, Polla BS, Lundberg JM. (1991): Improvement of symptoms of non-allergic chronic rhinitis by local treatment with capsaicin. *Clin Exp Allergy.* 21(5), 595-600.
- Laemmli UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259), 680-685.

- Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. (1998): Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol.* 86(1), 80-86.
- Lazzeri M, Beneforti P, Turini D. (1997): Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin in humans: preliminary results in stable and unstable detrusor. *J Urol.* 158(6), 2093-2096.
- Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. (2004): Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur Urol.* 46(6), 792-798.
- Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. (2002): CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* 23(6), 273-275.
- Lee CH, Olson P, Evans RM. (2003): Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology.* 144(6), 2201-2207.
- Lee H, Caterina MJ. (2005): TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflugers Arch.* 451(1), 160-167.
- Lee WJ, Jung HD, Lee HJ, Kim BS, Lee SJ, Kim do W. (2008): Influence of substance-P on cultured sebocytes. *Arch Dermatol Res.* 300(6), 311-316.
- Lee YS, Nam DH, Kim JA. (2000): Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 161(1), 121-130.
- Liu YJ. (2001): Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 106(3), 259-262.
- Liu YJ, Soumelis V, Kadowaki N. (2001): T-cell activation and polarization by dendritic cells. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells*. Academic Press, New York, 21-29.
- Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, Watt FM. (2008): Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells.* 26(5), 1241-1252.
- Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, Novitskaya I, Carbonaro H, Cardinale I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Wittkowski KM, Papp K, Garovoy M, Dummer W, Steinman RM, Krueger JG. (2005): Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(52), 19057-19062.
- Luft T, Maraskovsky E, Schnurr M, Knebel K, Kirsch M, Gorner M, Skoda R, Ho AD, Nawroth P, Bierhaus A. (2004): Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood.* 104(4), 1066-1074.
- Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T. (2007): Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci.* 27(26), 7070-7080.
- Lundberg JM. (1993): Capsaicin sensitive sensory nerves in the airways - implications for protective reflexes and disease. 219-238.
- Lutz MB, Schuler G. (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol.* 23(9), 445-449.
- Lysy J, Sistiery-Ittah M, Israelit Y, Shmueli A, Strauss-Liviatan N, Mindrul V, Keret D, Goldin E. (2003): Topical capsaicin--a novel and effective treatment for idiopathic intractable pruritus ani: a randomised, placebo controlled, crossover study. *Gut.* 52(9), 1323-1326.
- Maggi CA, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A, Turini D. (1989): Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans. *J Urol.* 142(1), 150-154.
- Makrantonaki E, Zouboulis CC. (2007): Testosterone metabolism to 5alpha-dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol.* 156(3), 428-432.
- Marsh SJ, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. (1987): The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience.* 23(1), 275-289.
- Marteanu F, Communi D, Boeynaems JM, Suarez Gonzalez N. (2004): Involvement of multiple P2Y receptors

- and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 76(4), 796-803.
- McIlroy A, Caron G, Blanchard S, Fremaux I, Duluc D, Delneste Y, Chevailler A, Jeannin P. (2006): Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. *Immunology.* 117(4), 507-516.
- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. (2005): Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol.* 79(1), 17-27.
- Medzhitov R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1(2), 135-145.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. (2000): Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7), 3655-3660.
- Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, Simon A. (2009): Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 18(2), 143-151.
- Montell C, Caterina MJ. (2007): Thermoregulation: channels that are cool to the core. *Curr Biol.* 17(20), R885-887.
- Montell C, Rubin GM. (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 2(4), 1313-1323.
- Moran MM, Xu H, Clapham DE. (2004): TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 14(3), 362-369.
- Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, McBride WH, Kizaki M, Koeffler HP. (2006): Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 66(6), 3222-3229.
- Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, Seltmann H, Patrick S, Zouboulis CC, Kemeny L. (2006): Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect.* 8(8), 2195-2205.
- Nelson EK. (1919): The constitution of capsaicin—the pungent principle of capsicum. *J Am Chem Soc.* 41, 1115-1117.
- Nencioni A, Grunebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. (2002): Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol.* 169(3), 1228-1235.
- Nilius B. (2007): TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8), 805-812.
- Novak N, Bieber T. (2008): 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 121(2 Suppl), S370-374; quiz S413.
- Ochoa MT, Loncaric A, Krutzyk SR, Becker TC, Modlin RL. (2008): "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol.* 128(9), 2225-2231.
- O'Connell PJ, Pingle SC, Ahern GP. (2005): Dendritic cells do not transduce inflammatory stimuli via the capsaicin receptor TRPV1. *FEBS Lett.* 579(23), 5135-5139.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. (2004): The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 201(2), 167-180.
- Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R. (2004): CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 21(2), 279-288.
- Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D. (2002): Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol.* 168(1), 293-297.
- O'Sullivan B, Thomas R. (2003): CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol.* 23(1-2), 83-107.
- O'Sullivan SE. (2007): Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated

- receptors. *Br J Pharmacol.* 152(5), 576-582.
- Papp H, Czifra G, Lazar J, Gonczi M, Csernoch L, Kovacs L, Biro T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 12(6), 811-824.
- Park JY, Kawada T, Han IS, Kim BS, Goto T, Takahashi N, Fushiki T, Kurata T, Yu R. (2004): Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor alpha by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPARgamma ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS Lett.* 572(1-3), 266-270.
- Partsch G, Matucci-Cerinic M. (1993): Capsaicin stimulates the migration of human polymorphonuclear cells (PMN) in vitro. *Life Sci.* 53(19), PL309-314.
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. (2003): ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 4(7), 529-539.
- Paus R. (1998): Principles of hair cycle control. *J Dermatol.* 25(12), 793-802.
- Paus R, Schmelz M, Biro T, Steinhoff M. (2006): Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J Clin Invest.* 116(5), 1174-1186.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 38(3-4), 233-252.
- Petersen CC, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL. (1995): Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J.* 311 (Pt 1)(41-44).
- Pinter E, Helyes Z, Szolcsanyi J. (2006): Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther.* 112(2), 440-456.
- Piomelli D. (2001): The ligand that came from within. *Trends Pharmacol Sci.* 22(1), 17-19.
- Plewig G, Luderschmidt C. (1977): Hamster ear model for sebaceous glands. *J Invest Dermatol.* 68(4), 171-176.
- Pochi PE, Strauss JS. (1977): Studies on the sebaceous glands in acne and endocrine disorders. *Bull N Y Acad Med.* 53(4), 359-367.
- Porszasz R, Legvari G, Pataki T, Szilvassy J, Nemeth J, Kovacs P, Paragh G, Szolcsanyi J, Szilvassy Z. (2003): Hepatic insulin sensitizing substance: a novel 'sensocrine' mechanism to increase insulin sensitivity in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 139(6), 1171-1179.
- Potter JE, Prutkin L, Wheatley VR. (1979): Sebaceous gland differentiation. I. Separation, morphology and lipogenesis of isolated cells from the mouse preputial gland tumor. *J Invest Dermatol.* 72(3), 120-127.
- Premkumar LS. (2001): Interaction between vanilloid receptors and purinergic metabotropic receptors: pain perception and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(12), 6537-6539.
- Premkumar LS, Ahern GP. (2000): Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature.* 408(6815), 985-990.
- Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Yoshino M. (2005): Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosci Res.* 51(2), 175-183.
- Reichardt P, Dornbach B, Gunzer M. (2007): The molecular makeup and function of regulatory and effector synapses. *Immunol Rev.* 218(165-177).
- Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. (1997): Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med.* 186(9), 1603-1608.
- Rohacs T, Thyagarajan B, Lukacs V. (2008): Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. *Mol Neurobiol.* 37(2-3), 153-163.
- Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. (2003): Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS.* 111(7-8), 725-740.
- Rosenfield RL. (1989): Relationship of sebaceous cell stage to growth in culture. *J Invest Dermatol.* 92(5), 751-754.
- Rosenfield RL, Deplewski D, Kentsis A, Ciletti N. (1998): Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation. *Dermatology.* 196(1), 43-46.

- Rosenfield RL, Kentsis A, Deplewski D, Ciletti N. (1999): Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J Invest Dermatol.* 112(2), 226-232.
- Rutter AR, Ma QP, Leveridge M, Bonnert TP. (2005): Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia. *Neuroreport.* 16(16), 1735-1739.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179(4), 1109-1118.
- Sanchez AM, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Vara D, Chiloeches A, Diaz-Laviada I. (2007): Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis.* 12(11), 2013-2024.
- Sanchez AM, Sanchez MG, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Diaz-Laviada I. (2006): Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis.* 11(1), 89-99.
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y. (1998): Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport.* 9(9), 2045-2048.
- Saunders CI, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP. (2007): Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol.* 44(6), 1429-1435.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. (2002): Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 100(4), 1354-1361.
- Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, Groettrup M. (2004): CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood.* 103(5), 1595-1601.
- Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A. (2000): Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 165(8), 4704-4709.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. (1996): The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1302(2), 93-109.
- Seiffert K, Seltmann H, Fritsch M, Zouboulis CC. (2007): Inhibition of 5alpha-reductase activity in SZ95 sebocytes and HaCaT keratinocytes in vitro. *Horm Metab Res.* 39(2), 141-148.
- Shi H, Halvorsen YD, Ellis PN, Wilkison WO, Zemel MB. (2000): Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics.* 3(2), 75-82.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U. (2002): Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15), 10150-10155.
- Shortman K, Liu YJ. (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2(3), 151-161.
- Smith KR, Thiboutot DM. (2008): Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe?, *J Lipid Res.* 49(2), 271-281.
- Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. (2001): Dendritic cells and chemokines. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells.* Academic Press, New York, 203-211.
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. (2003): Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(1), 217-222.
- Stander S, Luger T, Metze D. (2001): Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. *J Am Acad Dermatol.* 44(3), 471-478.
- Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M. (2004): Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol.* 13(3), 129-139.
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F. (2004): Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and

- male genital tract. *J Urol.* 172(3), 1175-1178.
- Steinbrink K, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. (2000): Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res.* 292(9), 437-445.
- Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M, Maurer M, Wei E, Biro T. (2006): Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol.* 126(8), 1705-1718.
- Steinman RM, Hemmi H. (2006): Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 311(17-58).
- Stjarne P, Rinder J, Heden-Blomquist E, Cardell LO, Lundberg J, Zetterstrom O, Anggard A. (1998): Capsaicin desensitization of the nasal mucosa reduces symptoms upon allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol.* 118(2), 235-239.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. (2002): Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* 88(1), 544-548.
- Surh Y. (1999): Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res.* 428(1-2), 305-327.
- Suri A, Szallasi A. (2008): The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci.* 29(1), 29-36.
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* 1366(1-2), 151-165.
- Szabo T, Biro T, Gonzalez AF, Palkovits M, Blumberg PM. (2002): Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 98(1-2), 51-57.
- Szallasi A, Blumberg PM. (1989): Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience.* 30(2), 515-520.
- Szallasi A, Blumberg PM. (1990): Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* 524(1), 106-111.
- Szallasi A, Blumberg PM. (1996): Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain.* 68(2-3), 195-208.
- Szallasi A, Blumberg PM. (1999): Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 51(2), 159-212.
- Szallasi A, Joo F, Blumberg PM. (1989): Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Res.* 503(1), 68-72.
- Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. (2006a): PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci.* 1088, 207-218.
- Szatmari I, Pap A, Ruhl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, Rajnavolgyi E, Dezsó B, Nagy L. (2006b): PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med.* 203(10), 2351-2362.
- Szatmari I, Torocsik D, Agostini M, Nagy T, Gurnell M, Barta E, Chatterjee K, Nagy L. (2007): PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood.* 110(9), 3271-3280.
- Szolcsanyi J. (1977): A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol (Paris).* 73(3), 251-259.
- Szolcsanyi J. (2004): Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides.* 38(6), 377-384.
- Szolcsanyi J, Bartho L. (1982): Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci Lett.* 34(3), 247-251.
- Takahata K, Chen X, Monobe K, Tada M. (1999): Growth inhibition of capsaicin on HeLa cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Sci.* 64(13), PL165-171.
- Tan JK, O'Neill HC. (2005): Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol.* 78(2), 319-324.

- Tang HB, Inoue A, Oshita K, Nakata Y. (2004): Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *Eur J Pharmacol.* 498(1-3), 37-43.
- Tarnag DC, Cho YL, Liu HN, Huang TP. (1996): Hemodialysis-related pruritus: a double-blind, placebo-controlled, crossover study of capsaicin 0.025% cream. *Nephron.* 72(4), 617-622.
- Telek A, Biro T, Bodo E, Toth BI, Borbiro I, Kunos G, Paus R. (2007): Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 21(13), 3534-3541.
- Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. (2003): Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol.* 120(6), 905-914.
- Thiboutot D, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. (2000): The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J Invest Dermatol.* 115(4), 614-619.
- Thody AJ, Shuster S. (1989): Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev.* 69(2), 383-416.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21(3), 531-543.
- Toyoda M, Morohashi M. (2001): Pathogenesis of acne. *Med Electron Microsc.* 34(1), 29-40.
- Tresh LT. (1846): Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* 6, 941
- Trivedi NR, Cong Z, Nelson AM, Albert AJ, Rosamilia LL, Sivarajah S, Gilliland KL, Liu W, Mauger DT, Gabbay RA, Thiboutot DM. (2006): Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *J Invest Dermatol.* 126(9), 2002-2009.
- Tuoya, Baba N, Shimoishi Y, Murata Y, Tada M, Koseki M, Takahata K. (2006): Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. *Life Sci.* 78(13), 1515-1519.
- Valladeau J, Saeland S. (2005): Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* 17(4), 273-283.
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. (2001): Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol.* 534(Pt 3), 813-825.
- Veronesi B, Carter JD, Devlin RB, Simon SA, Oortgiesen M. (1999a): Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides.* 33(6), 447-456.
- Veronesi B, Oortgiesen M, Carter JD, Devlin RB. (1999b): Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 154(1), 106-115.
- Wallengren J, Klinker M. (1995): Successful treatment of notalgia paresthetica with topical capsaicin: vehicle-controlled, double-blind, crossover study. *J Am Acad Dermatol.* 32(2 Pt 1), 287-289.
- Wang YX, Wang J, Wang C, Liu J, Shi LP, Xu M. (2008): Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Membr Biol.* 223(3), 151-159.
- Ward L, Wright E, McMahon SB. (1996): A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain. *Pain.* 64(1), 129-138.
- Weisshaar E, Heyer G, Forster C, Handwerker HO. (1998): Effect of topical capsaicin on the cutaneous reactions and itching to histamine in atopic eczema compared to healthy skin. *Arch Dermatol Res.* 290(6), 306-311.
- Welch JM, Simon SA, Reinhart PH. (2000): The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25), 13889-13894.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. (1995): TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21), 9652-9656.
- Wettendorff M, Massacrier C, Vanbervliet B, Urbain J, Banchereau J, Caux C. (1995): Activation of primary allogeneic CD8+ T cells by dendritic cells generated in vitro from CD34+ cord blood progenitor cells.

- Wheatley VR, Potter JE, Lew G. (1979): Sebaceous gland differentiation: II. The isolation, separation and characterization of cells from the mouse preputial gland. *J Invest Dermatol.* 73(4), 291-296.
- Wilkin F, Stordeur P, Goldman M, Boeynaems JM, Robaye B. (2002): Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10. *Eur J Immunol.* 32(9), 2409-2417.
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, Bevan S. (1990): Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 520(1-2), 131-140.
- Winter J, Walpole CS, Bevan S, James IF. (1993): Characterization of resiniferatoxin binding sites on sensory neurons: co-regulation of resiniferatoxin binding and capsaicin sensitivity in adult rat dorsal root ganglia. *Neuroscience.* 57(3), 747-757.
- Wood JN, Walpole C, James IF, Dray A, Coote PR. (1990): Immunochemical detection of photoaffinity-labelled capsaicin-binding proteins from sensory neurons. *FEBS Lett.* 269(2), 381-385.
- Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. (1988): Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci.* 8(9), 3208-3220.
- Wrobel A, Seltmann H, Fimmel S, Muller-Decker K, Tsukada M, Bogdanoff B, Mandt N, Blume-Peytavi U, Orfanos CE, Zouboulis CC. (2003): Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol.* 120(2), 175-181.
- Wu L, Galy A. (2001): The development of dendritic cells from hematopoietic precursors. In: Lotze M, Thomson A.(eds.): *Dendritic Cells.* Academic Press, New York, 3-11.
- Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, Fowler CJ, Anand P. (2001a): Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int.* 87(9), 774-779.
- Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, Anand P. (2001b): Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet.* 357(9265), 1338-1339.
- Yosipovitch G, Duque MI, Fast K, Dawn AG, Coghill RC. (2007): Scratching and noxious heat stimuli inhibit itch in humans: a psychophysical study. *Br J Dermatol.* 156(4), 629-634.
- Yosipovitch G, Fast K, Bernhard JD. (2005): Noxious heat and scratching decrease histamine-induced itch and skin blood flow. *J Invest Dermatol.* 125(6), 1268-1272.
- Yuspa SH, Hennings H, Tucker RW, Jaken S, Kilkenny AE, Roop DR. (1988): Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 548(191-196).
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. (2007): Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest.* 117(9), 2517-2525.
- Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. (2009a): Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 129(2), 302-308.
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA. (2009b): Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 129(1), 79-88.
- Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, Wang LJ, Zhao ZG, Zhu SJ, Schrader M, Thilo F, Zhu ZM, Tepel M. (2007): Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res.* 100(7), 1063-1070.
- Zhang Q, Seltmann H, Zouboulis CC, Konger RL. (2006): Involvement of PPARgamma in oxidative stress-mediated prostaglandin E(2) production in SZ95 human sebaceous gland cells. *J Invest Dermatol.* 126(1), 42-48.
- Zouboulis CC. (2004): Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol.* 22(5), 360-366.
- Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H, Seltmann H, Fritsch M, Hornemann S, Ruhl R, Chen W, Nau H, Orfanos CE. (1998): The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatology.* 196(1), 21-31.
- Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. (1999): Establishment and characterization of an

- immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol.* 113(6), 1011-1020.
- Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, Chen W, Young M, Oeff M, Scherbaum WA, Orfanos CE, McCann SM, Bornstein SR. (2002): Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(10), 7148-7153.
- Zouboulis CC, Bohm M. (2004): Neuroendocrine regulation of sebocytes -- a pathogenetic link between stress and acne. *Exp Dermatol.* 13(Suppl 4), 31-35.
- Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, Rosenfield R. (2005): What is the pathogenesis of acne?, *Exp Dermatol.* 14(2), 143-152.
- Zouboulis CC, Baron JM, Bohm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, Thielitz A. (2008a): Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol.* 17(6), 542-551.
- Zouboulis CC, Schagen S, Alestas T. (2008b): The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea, seborrhoea and acne. *Arch Dermatol Res.* 300(8), 397-413.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999): Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400(6743), 452-457.

TÓTH ISTVÁN BALÁZS *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények:

Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltsmann 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 IB**, 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 IB**, 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**

TÁRGYSZAVAK

Tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1)

Kapszaicin

Faggyúmirigy

Szebocita

Lipidszintézis

Dendritikus sejt

Gyulladás

Akné

Bőr

Immunológia

Keywords:

Tranziens receptor potential vanilloid-1 (TRPV1)

Capsaicin

Sebaceous gland

Sebocyte

Lipid synthesis

Dendritic cell

Inflammation

Acne

Skin

Immunology

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetet mondok témavezetőmnek, **Dr. Bíró Tamásnak**, aki mindenben támogatott, munkámhoz felbecsülhetetlen segítséget nyújtott, és akitől nagyon sokat tanulhattam.

Külön köszönetet mondok **Dr. Kovács László professzor úrnak** és **Dr. Csernoch László professzor úrnak**, az Élettani Intézet egykori és jelenlegi vezetőinek, amiért lehetővé tették, hogy munkámat az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Élettani Laboratóriumában folytathassam.

Köszönettel tartozom kollaborációs partnereinknek, hogy segítségükkel és tudásukkal hozzájárultak munkám sikeréhez. Köszönöm **Dr. Benkő Szilviának** és **Dr. Rajnavölgyi Évának** a munkámban nyújtott sok-sok segítséget, valamint hogy az Immunológiai Intézet lehetőségeit is hozzáférhetővé tették számomra. Köszönöm **Dr. Nagy Lászlónak** és **Dr. Dózsa Anikónak** a kísérletek során nyújtott, mindenre kiterjedő segítségüket. Köszönöm **Dr. Christos Zouboulisnak** és **Dr. Ralf Pausnak**, hogy a gyümölcsöző együttműködés lehetőségét biztosították számomra.

Közvetlen kollegáimnak, **Czifra Gabriellának**, **Dobrosi Nórának**, **Marincsák Ritának**, **Nagy Georginának**, **Bodó Enikőnek**, **Griger Zoltánnak**, **Szöllősi Attilának**, **Géczy Tamásnak**, **Borbíró Istvánnak** és **Oláh Attilának** köszönöm a sok segítséget, amelyet nap, mint nap nyújtottak, és köszönöm, hogy bármikor számíthattam rájuk.

A nélkülözhetetlen technikai segítségért **Dr. Vargáné Kis Ibolyának**, mindenki Ibcsikéjének tartozom hálával.

Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet valamennyi dolgozójának**, **PhD és TDK hallgatójának**, akik az évek során segítettek munkámat.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények