

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG  
VÉGZŐDÉSEK SZEREPE A GYULLADÁSOS  
BŐRBETEGSÉGEK PATOMECHANIZMUSÁBAN**



Bánvölgyi Ágnes

Neurofarmakológiai Program

*Programvezető:* Dr. Szolcsányi János, akadémikus

*Témavezető:* Dr. Pintér Erika, egyetemi docens

Pécsi Tudományegyetem

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2006

## **Bevezetés**

Napjainkban a környezetünkben felhalmozódott szennyezőanyagok (pl. a vizek, a levegő és a talaj kémiai szennyezettsége) fokozott terhelést jelentenek a szervezetünkre, így az immunrendszerre is. Az immunrendszer egyensúlyának felborulása pedig számos patológiai folyamatot indít el a szervezetben, mint az autoimmun betegségek, az asztma, az allergiás reakciók. A bőrben (mely a külvilággal közvetlenül érintkező szerv) jelentkező immun- és gyulladásos betegségek: az allergiás kontakt dermatitisz, ekcéma, pszoriázis stb. egyre gyakrabban és súlyosabb formában fordulnak elő a fejlett országokban. A bőrbetegségek több szempontból is figyelmet érdemelnek. Az érintett személyre nézve nemcsak életminőséget befolyásoló tényezők, hanem komoly pszichés jellegű megterhelést is jelentenek. Ezen túlmenően a foglalkozási betegségek nagy részét az ekcéma/dermatitisz csoport teszi ki.

E betegségek hátterében meghúzódó gyulladásos folyamatokat három szakaszra oszthatjuk: az akut szakaszban létrejövő helyi értágulat és érpermeabilitás fokozódás előkészíti a szubakut fázisban megfigyelhető sejtbeáramlást, a fehérvérsejtek és fagocitáló sejtek felhalmozódását az érintett területen. A krónikus, proliferatív szakaszban szöveti degeneráció és fibrózis kialakulása figyelhető meg.

Az utóbbi évek kutatásai igazolták, hogy a bőrben található szenzoros neuronokból lokálisan felszabaduló neuropeptidok kiemelkedően fontosak a gyulladás patomechanizmusában (*Brain, S. D. 1997; Szolcsányi, J. et al 1996*).

## **Neurogén gyulladás**

A neuropeptideket a bőrben található kis átmérőjű, mielinhüvellyel nélküli afferens neuronok, ún. C polimodális nociceptorok valamint vékony, mielinhüvellyel borított A $\delta$  rostokkal rendelkező neuronok termelik (*Scholzen, T. et al 1998*). A *Capsicum* növény családba tartozó paprikafélékben található csípős anyag, a kapszaicin szelektíven izgatja, valamint nagy dózisban deszenzitizálja e fájdalomérző (nociceptív) idegsejtek egy csoportját, melyet ez alapján „kapszaicin-érzékeny afferens neuronok”-nak hívunk (*Szolcsányi, J. et al 1996*). A kapszaicin-érzékeny idegrostok perifériás végződéseiből inger hatására felszabaduló gyulladásokeltő neuropeptidok (tachykininek, és kalcitonin gén-rokon peptid - CGRP) vazodilatációt és plazma protein kiáramlást okoznak, ezzel hozzájárulva az ödéma kialakulásához (*Brain, S. D. 1997*). Ezek a lokális változások a legfőbb jellemzői a neurogén gyulladásnak.

## **A mustárolaj**

A kapszaicin mellett a mustárolaj (allyl-isothiocyanate) is képes gyulladáskeltő neuropeptideket felszabadítani. Mindkét vegyület a rágcsálók bőrére kenve neurogén értágulatot (vazodilatációt) és ödémát vált ki (*Jancsó, N. et al 1967*). A mustárolajat először a *Brassica* nemzetségbe tartozó növények (pl. *B. nigra*, *B. juncea*) csípős kivonatában azonosították.

## **A kapszaicin és a TRPV1 receptor**

A kapszaicin (8-metil-N-vanillil-6-nonenamid) a paprika csípős anyaga melynek erős, szelektív fájdalomkeltő és deszenzitizáló hatását először Hőgyes Endre írta le 1878-ban. Caterina és munkatársai 1997-ben sikeresen klónozták a kapszaicin receptorát (*Caterina, M. J. et al 1997*), amelyet először vanilloid 1 (VR1), majd később szerkezeti sajátosságai alapján tranziens receptor potenciál vanilloid 1, röviden TRPV1 receptornak nevezték el.

A kapszaicin – az alkalmazott dózistól függően – excitátoros, blokkoló vagy toxikus hatást okozhat a kapszaicin-érzékeny neuronokban. A szenzoros neuronblokkoló hatás a válaszkészség funkcionális károsodását jelenti nemcsak a kapszaicin receptor fehéjén, hanem akár az egész neuron területén is. Működését tekintve a TRPV1 receptor egy nem szelektív kationcsatorna, kapszaicin hatására a sejtbe áramló  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok depolarizációt okoznak, így létrejön a nociceptív szignál, valamint a neuron perifériás végződéseiből szenzoros neuropeptidek szabadulnak fel. A csatorna hosszútávú nyitott állapota miatt megnő az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint, ami gátolja a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat és mitokondriális duzzadást indukál, ezzel létrejön a szenzoros neuronblokkoló hatás. Ha tovább nő a nyitott állapotú csatornák száma és a nyitott állapot időtartama, létrejöhet a neurotoxikus hatás: a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta proteázok a sejtek lízisét okozzák.

A kapszaicinon kívül más vanilloid származékok is képesek aktiválni a TRPV1 receptort, például a gyömbérből származó zingerone és a bors csípős anyaga, a piperin, vagy az *Euphorbia resinifera*-ból származó ultra-potens agonista, a resiniferatoxin (RTX). De mi lehet a TRPV1 receptor endogén aktivátora? Egyes szerzők az endokannabinoidok csoportjába tartozó anandamidot (arachidonil-etanolamid, AEA) tartották a TRPV1 receptor endogén ligandjának. Zygmunt és munkacsoportja kimutatta, hogy az anandamid a kapszaicin-érzékeny idegrostokon keresztül relaxálja az erek simaizomsejtjeit. Továbbá az anandamid közvetlen alkalmazása a klónozott TRPV1 receptoron capsazepinnel (TRPV1 antagonist) gátolható akciós potenciálokat gerjeszt, mely bizonyítja, hogy képes aktiválni a TRPV1 receptort (*Zygmunt, P. M. et al 1999*).

A protonok, melyek patofiziológias körülmények között gyulladás vagy ischémia során szabadulnak fel képesek szenzitiválni, nagy mennyiségben pedig aktiválni a szenzoros neuront a TRPV1 receptoron keresztül. Gyulladásos szövetekben a lokális pH 5 körüli értékre csökken, ekkor a receptor aktiválása hozzájárul a fájdalom kialakulásához.

Jelentős aktiváló hatással bír a 42 °C feletti hőmérséklet, a receptor szenzitiválása után azonban már az alacsonyabb hőfok is kiváltja az akciós potenciált.

Az arachidonsavból oxidációval létrejövő prosztaglandinok (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> stb.) is endogén ligandként szerepelhetnek krónikus gyulladások során (Szabó, Á. et al 2005). Így például a bradikinin hatására aktiválódó foszfolipáz A<sub>2</sub> enzim arachidonsavat szabadít fel, majd ebből a 12-lipoxigenáz enzim által létrehozott 12-HPETE (12-hidroperoxieikozatetraénsav) belülről kötődik a TRPV1 receptorhoz, így aktiválva azt.

A fentiekből is kitűnik, hogy a TRPV1 receptor a legkülönbözőbb környezeti ingereket képes integrálni.

## **Szenzoros proinflammációs neuropeptidek**

### **A tachykininek**

A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokból stimuláció hatására felszabaduló gyulladáskeltő neuropeptidek egyik csoportja a tachykininek: neurokinin A, neurokinin B és a P-anyag. Mindhárom peptid C-terminálisán a Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> aminosav szekvencia található. G-fehérjéhez kapcsolt receptoraik az NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> és NK<sub>3</sub> receptor, melyekhez nem egyforma affinitással kötődnek. A tachykinin család legjelentősebb tagja a P-anyag, vagy Substance P (SP) a posztkapilláris venulák falain található neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>) receptoron keresztül fejt ki érpermeabilitást fokozó hatását (McDonald, D. M. et al 1996). NK<sub>1</sub> receptor található még hízósejteken, polimorfonukleáris leukociták, makrofágok és limfocita sejtek membránjában is (Grant, A. 2002). Így a P-anyagnak szerepe van a makrofágok és hízósejtek aktivációjában, a limfociták proliferációjában, a T-sejtek kemotaxisában és a B limfociták immunglobulin teremtésének fokozásában. A P-anyag fontos szerepet játszik a neutrofil granulociták akkumulációjában, melyet többek között patkány légutakban is vizsgáltak (Baluk, P. et al 1999).

### **A kalcitonin gén-rokon peptid**

A 37 aminosavból álló kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) egy több mint 90%-os szerkezeti hasonlóságot mutató fehérjecsalád tagja (α és β formájuk is ismert). Biológiai hatásukat a CGRP<sub>1</sub> és CGRP<sub>2</sub> receptorokon fejtik ki, a legtöbb vaszkuláris hatás azonban a CGRP<sub>1</sub> receptoron keresztül valósul meg. A CGRP hosszan tartó értágító hatását az érfalak simaizomsejtjein található CGRP<sub>1</sub> receptorokon keresztül váltja ki, általában nitrogén-monoxidtól független úton. A CGRP az adenil-cikláz enzimaktivitását fokozza,

ezzel megnövelve az intracelluláris cAMP szintet, mely a protein kináz A-t aktiválja, így nyitja az ATP-szenzitív K<sup>+</sup> csatornákat, amely a simaizomsejtek relaxációjához vezet. CGRP<sub>1</sub> receptor található továbbá T és B limfocitákon, valamint granulocitákon is.

### ***Az elvégzett kísérletek tudományos háttere***

A mustárolajjal végzett kísérleteink alapját az az elképzelés adta, hogy a mustárolaj kis koncentrációban az érző idegrostok szelektív izgatása révén neurogén gyulladást okoz. Bár egyes szerzők adatai szerint a 20%-os mustárolaj oldat is tisztán neurogén gyulladást okozott, melyet patkány denervált talpbőrén nem lehetett kimutatni (*Bester, H. et al 1998*), az irodalomban azonban a legtöbb bizonyítékot a tisztán neurogén hatásra az 5% alatti koncentrációk alkalmazása esetén írták le, patkány láb bőrére ecsetelve. Elsőként Jancsó Miklós és munkatársai mutatták ki az 5%-os mustárolaj hatástalanságát patkány denervált bőrében, a saphenus ideg átvágása után (*Jancsó, N. et al 1967*). Tíz évvel később Jancsó Gábor és kollégái igazolták, hogy újszülött patkányokon végzett kapszaicin előkezelés gátolta az 5%-os mustárolajjal kiváltott plazma protein extravazációt a bőrben (*Jancsó, G. et al 1977*).

Inoue és kollégái egérfülön vizsgálták a 0,5-20%-os mustárolajjal kiváltott plazma extravazáció és ödéma mechanizmusát. Jelentős különbséget találtak a kapszaicinnal illetve a mustárolajjal kiváltott stimulációban, mivel - a kapszaicinnal ellentétben - a mustárolaj ismételt alkalmazása sem okozott deszenzibilizációt. A gyulladáshoz vezető folyamatot nem befolyásolta a hisztamin H<sub>1</sub> és szerotonin 5-HT<sub>2</sub> receptort blokkoló vegyületekkel illetve a kapszaicin receptor funkcionális gátlójával, a ruthenium vörössel történt előkezelés. Az NK<sub>1</sub> receptor antagonistá SR140333 gátolta az 5%-os mustárolajjal kiváltott gyulladást ami arra utal, hogy az így fellépő plazma extravazáció az NK<sub>1</sub> receptor agonisták, elsősorban a P-anyag felszabadulása révén jön létre (*Inoue, H. et al 1997*).

A kapszaicin-érzékeny idegrostokból való neuropeptid felszabadulás történhet TRPV1 receptor aktiváláson keresztül, vagy TRPV1 receptortól független úton is (*Bánvölgyi, Á. et al 2004*). Kapszaicint kenve a bőr felszínére az akut válasz során megfigyelhetőek a neurogén gyulladás jellemzői, vagyis a felszabaduló neuropeptid hatására a vérkeringés fokozódik, ödéma alakul ki (*Grant, A. 2002*). Köztudott, hogy a neurogén komponensek számos gyulladáshoz vezető kórkép (asztma, allergiás dermatitisz, pszoriázis, ekcéma, gyulladáshoz vezető betegségek) kialakulásában is szerepet játszanak. A különböző betegségek során endogén mediátorok útján aktiválódott TRPV1 receptor szerepe azonban még kevésbé ismert. Rágcsálókban végzett kísérletekből tudjuk, hogy a kapszaicin vagy resiniferatoxin kis dózisaival aktiválják a szenzoros rostokon található

TRPV1 receptorokat, nagyobb mennyiségben alkalmazva depletálják a szenzoros neuropeptideket, és az idegvégződések deszenzitizációját okozzák. Ez a szenzoros neurogén komponens funkciójának szelektív blokkolásához vezet.

A kontakt dermatitisz a környezetben jelen lévő irritánsok és allergének hatására kialakuló allergiás megbetegedés, ami bőrgyulladással és viszketéssel jár. Az a koncepció, hogy a C és A $\delta$  rostokkal rendelkező szenzoros idegek modulálják az allergiás kontakt dermatitisz (ACD) lefolyását már felvetődött a szakirodalomban, azonban a pontos mechanizmus még ismeretlen (*Brain, S. D. 1997*). Az ACD szenzitizációs fázisában a haptén, vagyis egy kisméretű lipofil molekula penetrál a bőrbe, ahol fehérjéhez (legtöbbször albuminhoz) kapcsolódva válik komplett antigénné. Az antigént a bőr makrofág jellegű sejtjei, a Langerhans sejtek kebelezik be, és prezentálják a felszínükön. A Langerhans sejtek a lokális nyirokcsomókba vándorolnak, ahol megkezdődik az antigén-specifikus T sejtek érése (egereknél 7, emberben 14 nap szükséges a folyamathoz). A hapténnel történő újabb kontaktus során a specifikus Th sejtek aktiválódnak, megindul a késői hiperszenzitív reakció indukciós (effektor vagy elicitációs) fázisa, ami igen súlyos gyulladással, ödémával, kipirulással, viszketéssel, sejtes akkumulációval, bőrléziókkal sőt nekrozissal jár. A neuropeptidek megemelkedett szintjét mutatták ki az effektor fázisban, emberben 72, egérben 24-48 óra múlva (*Krasteva, M. et al 1999*).

## Célkitűzések

1. Munkánk során célul tűztük ki a mustárolaj kezelés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek szerepének tisztázását az ödéma kialakulására és a leukociták akkumulációjára egérfülben.
2. Célunk volt megvizsgálni a mustárolaj egyszeri és ismételt alkalmazásának hatását az akut vaszkuláris és krónikus (6 órás) sejtes gyulladással fázisban is.
3. Az általunk beállított gyulladással modellben kívántuk meghatározni a TRPV1 és az NK<sub>1</sub> receptorok szerepét. A kérdések megválaszolásához kapszaicinnal történt szisztémás deszenzibilizációt, szelektív NK<sub>1</sub> receptor antagonistát valamint NK<sub>1</sub> és TRPV1 receptor génhiányos egértörzseket is felhasználtunk.
4. Az egérfülön oxazolonnal indukált allergiás kontakt dermatitisz modellben terveztük a TRPV1 receptor szerepének tisztázását receptor génhiányos egértörzs valamint szisztémás RTX előkezelés alkalmazásával.

5. Elemezni kívántuk az ACD jelenségeit a tachykinin NK<sub>1</sub> receptor- és  $\alpha$ CGRP génhiányos állatokon, valamint szelektív receptor antagonisták használata után.
6. Célunk volt megfigyelni a gyulladásoos jelenségeket a szövettani változások és a lokális citokin szintek alakulásának nyomonkövetésével.

## **Anyag és módszer**

### ***Felhasznált állatok***

Kísérleteinket magyarországi és brit laboratóriumokban végeztük, az érvényes állatvédelmi törvények betartásával. BALB/c (20-25g) és C57BL/6 (20-25g) egér törzseket használtunk. A transzgenikus TRPV1 receptor génhiányos egereket Dr. John B. Davis bocsátotta rendelkezésünkre (Neurology and GI Centre of Excellence for Drug Discovery, GlaxoSmithKline, Research and Development Ltd., U.K.). A vad típusú és NK<sub>1</sub> receptor génhiányos Sv129+C57BL/6 egereket Dr. Norma Gerard (Perlmutter Laboratory Children`s Hospital Boston, USA) adományozta a londoni laboratóriumnak. Az  $\alpha$ CGRP génhiányos egér tenyészpárt Dr. Anne Marie Salmon (Neurobiologie Moléculaire, Institut Pasteur, Párizs) küldte a londoni laboratóriumnak.

Az állatok standard rágcsáló tápot és vizet kaptak *ad libitum* ellenőrzött klímájú körülmények között. Mindhárom génhiányos egértörzs normális növekedést és viselkedést mutatott.

### ***Az ödéma mérése***

A fül vastagságát mikrométerrel mértük 0,1 mm pontossággal a kezelés előtt valamint a kezelést követően a megadott időpontokban. Az adatokat a fülvastagság %-os változásában adtuk meg a kontroll értékekhez viszonyítva.

### ***Neutrofil granulocita akkumuláció mérése***

A lefagyasztott egérfül mintákat 0,5% hexadecyl-trimethylammonium-bromide (HTAB) detergenst tartalmazó foszfát pufferben homogenizáltuk (1 ml puffer/fül) standard körülmények között. Az így nyert homogenizátumot 10 percig centrifugáltuk 10,000g-n, 4 °C-on, majd a felülúszót Eppendorf csőbe gyűjtöttük. A neutrofil granulociták akkumulációjának mértékét a minták mieloperoxidáz enzim aktivitásából számoltuk, melyet standard egér leukocita preparátumhoz hasonlítottunk. A mieloperoxidáz aktivitást H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reagenssel határoztuk meg 96-lyukú lemezen, szobahőmérsékleten. A minták optikai denzitását

(OD) mikrolemes leolvasóban, 620 nm-en mértük, öt perces időközönként harminc percen keresztül.

## **Statisztika**

A kapott adatokat átlagoltuk, az átlagtól való standard eltérést (S.E.M) is feltüntettük. A kezelt és kezeletlen csoportok eredményeit ANOVA és azt követően Dunnett`s poszt-tesztel hasonlítottuk össze az ödéma esetén valamint kétmintás t-próbát használtunk a neutrofil granulocita akkumulációs vizsgálatok során nyert adatoknál. A valószínűségi értéket  $P < 0,05$ -nél tekintettük szignifikánsnak.

## **A. Mustárolajjal kiváltott gyulladás egérfülben**

### **Alkalmazott anyagok**

Az altatást ketaminnal (100 mg/kg i.p.) és xylazinnal (5 mg/kg i.m.) végeztük. Mindkét fül külső és belső oldalára is 10-10  $\mu$ l 1%-os mustárolajat kentünk, melyet paraffinolajban oldottunk fel.

Ezt az eljárást 6 órán keresztül minden órában megismételtük. Egy másik kísérleti csoportban az állatok csak egyszer illetve kétszer kaptak kezelést, a 6 órás periódus első és második órájában. A kontroll csoport csak paraffin olajat kapott azonos mennyiségben és időben. A megfelelő csoportokban SR140333 (240 nmol/kg s.c.) előkezelést alkalmaztunk 15 perccel a mustárolaj bőrre kenése előtt, hogy gátoljuk az NK<sub>1</sub> receptorokat. A kísérleti idő letelte után a fülből nyert mintákat szövettani vizsgálatokhoz készítettük elő, vagy -20 °C-on tároltuk a neutrofil granulocita akkumuláció vizsgálatához.

### **Szisztémás kapszaicin-előkezelés**

A kapszaicin-érzékeny idegrostok szenzoros neuropeptid tartalmának depletálására szisztémás kapszaicin előkezelést, deszenzitizációt alkalmaztunk. A kapszaicint etanolban (10%), Tween 80-ban (10%) és fiziológias sóoldatban (80%) oldottuk fel. Az altatott állatoknak 30 mg/kg s.c. kapszaicint adtunk a nyakbőr alá három egymást követő napon. Így a kapott teljes dózis 90 mg/kg. Az előkezelés sikerességét egy csepp 0,1%-os kapszaicin oldat szembe cseppentésével ellenőriztük (ha nem váltott ki pislogást, az előkezelést sikeresnek tekintettük). Az állatokat 14 nappal a kapszaicin előkezelés után vittük kísérletbe.

### **Szövettani vizsgálatok**

A szövetmintákat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. Paraffinos beágyazást követően 6  $\mu$ m-es metszeteket készítettünk a fül alapjánál majd hematoxilín-eozinnal



festést végeztünk. A gyulladás sejtes szakaszának vizsgálatához kloroacetát-észterázzal jelöltük a mieloid sejteket.

## ***B. Oxazolonnal kiváltott allergiás kontakt dermatitisz egérfülön***

### **Alkalmazott anyagok**

Az altatást ketaminnal (100 mg/kg i.p.) és xylazinnal (5 mg/kg i.m.), valamint (az angliai laboratóriumban) 2%-os izofluránnal végeztük, amit altatógéppel adagoltunk. Az állatokat két egymást követő napon 2%-os oxazolonnal (50-50 µl) érzékenyítettük, melyet a leborotvált hasbőrre kentünk (szenszítizációs fázis).

Hat nap elteltével a bal fülre 96%-os etanolt (kontroll), a jobb fülre pedig 2%-os oxazon oldatot kentünk (15-15 µl oldat a fül külső és belső oldalára - elicitációs fázis). A megfelelő csoportokban a kezelés előtt 15 perccel 240 nmol/kg SR140333 NK<sub>1</sub> receptor blokkolót adtunk s.c. a nyaki régióba, és ezt megismételtük az elicitációs szakaszban 24 és 48 óra múlva is. A kísérleti periódus végén az állatokat leöltük, a fülszöveteket előkészítettük a szövettani vizsgálatokhoz, vagy -80 °C-on tároltuk további elemzésekhez.

### **Szisztémás resiniferatoxin-előkezelés**

A kapszaicin-érzékeny neuronokat szisztémás resiniferatoxin (RTX) előkezeléssel deszenzibilizáltuk. (Az RTX már kisebb dózisban is képes ugyanazt a neurotoxikus hatást kiváltani a kapszaicin-érzékeny afferensekben mint a kapszaicin, tapasztalataink szerint az RTX-et az állatok akutan jobban tolerálták.) Az RTX-et kevés 96%-os etanollal vittük oldatba, majd fiziológiás sóoldattal hígítottuk a kívánt koncentrációkra (3, 7, 10 µg/ml). Az altatott állatoknak 30, 70 és 100 µg/kg RTX-et adtunk három egymást követő napon, s.c. a nyaki régióba. Az előkezelés sikerességét egy csepp 0,1%-os kapszaicin oldat szembe cseppentésével ellenőriztük (ha nem váltott ki pislogást, az előkezelést sikeresnek tekintettük). Az állatokat 14 nappal a kapszaicin előkezelés után vittük kísérletbe.

### **Szövettani vizsgálatok**

A fülszöveteket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. 6 µm-es metszeteket készítettünk a fül alapjánál és hematoxilin-eozinnal festettük. A gyulladás sejtes fázisának vizsgálatához kloroacetát-észteráz festést is végeztünk, mely a mieloid sejtek markere. A gyulladás mértékének összehasonlításához pontosítottuk az alábbi hisztopatológiai elváltozásokat: ödéma mértéke, a szőrtüszők nekrozisa után kialakuló mikroabcesszusok száma, a szövetben akkumulálódott mononukleáris és polimorfonukleáris sejtek száma. Az ödémát a metszetek szélessége alapján µm-ben

mértük számítógépes program (AnalySIS) segítségével, az etanollal kezelt fülmetsetet tekintettük kontrollnak (0 pont). A mikroabcesszusok abszolút számát számoltuk egy metszetben és pontoztuk 0-5-ig. A szövetbe kiáramlott sejtek számát 200x-os nagyításon metszetenként három látótérben számoltuk meg, a kapott értéket átlagoltuk és pontoztuk 0-5-ig.

## **Áramlási citometriai vizsgálatok – Mikrogyöngy technika**

Az allergiás kontakt dermatitisz (ACD) során bekövetkező citokin profilt érintő változásokat a BD Biosciences által forgalmazott Th1/Th2 egér CBA (cytometric bead array) kittel határoztuk meg. A kit öt jól elkülönülő fluoreszcens intenzitással rendelkező gyöngypopuláció keverékét tartalmazza, melyekre IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  és TNF $\alpha$  citokineket befogó antitesteket kapcsoltak, így lehetővé vált öt különböző citokin mérése egyetlen mintából. A mintákat 1 ml 1%-os phenylmethanesulfonyl-fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich, Budapest) tartalmú RPMI-1640 szövettenyésztő médiumban homogenizáltuk, majd centrifugálás után a felülúszóból 50  $\mu$ l-t, további 50  $\mu$ l befogó gyöngykeveréket, és 50  $\mu$ l phycoerythrin (PE) jelölt detektáló antitest keveréket összekevertünk, és két órán keresztül inkubáltunk. A minták fluoreszcens intenzitását áramlási citométerrel (FACS Calibur, BD Biosciences) határoztuk meg, az eredményeket CellQuest szoftverrel analizáltuk. A minták citokin tartalmát standard görbe felállítása után a SAT2 szoftver (Soft Flow, USA) segítségével állapítottuk meg.

## **Eredmények**

### ***A. Mustárolajjal kiváltott gyulladás egérfülben***

#### **A./1 Mustárolajjal kiváltott gyulladás BALB/c egerekben**

Az 1%-os mustárolaj egyszeri kenése BALB/c egérfülre 15%-os fülvastagodást idézett elő, míg ismételt alkalmazása kifejezettebb, 30%-os választ okozott. A kialakult ödéma 6 óra múlva már egyik esetben sem volt megfigyelhető. Az egyszeri kenést követően a leukociták száma alig növekedett a fülszövetben 6 óra alatt, de az 1%-os mustárolajat kétszer alkalmazva szignifikánsan nőtt a minták mieloperoxidáz enzim aktivitást mutató sejttartalma a paraffin olajjal kezelt kontroll csoporthoz képest, és ezt a szisztémás kapszaicin előkezelés sem befolyásolta.

Az óránként alkalmazott mustárolaj 25-30%-os fülduzzadást váltott ki, mely a hat órás kísérlet alatt sem csökkent. A szisztémás kapszaicin előkezelés a kísérlet első három órájában szignifikánsan csökkentette az ödémát, de a kísérlet második felében újra fokozódott a gyulladás mértéke. Az NK<sub>1</sub> receptor blokkoló SR140333 alkalmazása szintén

csak az első három órában csökkentette az ödémát, abban az esetben is, ha a második periódusban újra kezeltük vele az állatokat. A mustárolaj óránkénti alkalmazása jelentős neutrofil sejt kiáramlást okozott a fülszövetekben, de ezt a folyamatot sem az SR140333, sem a szisztémás kapszaicin előkezelés nem gátolta.

## **A./2 Mustárolajjal kiváltott fülgyulladás TRPV1 receptor génhiányos egerekben**

A 2,5%-os kapszaicin oldat egyszeri alkalmazása nagymértékű ödémát váltott ki a C57BL/6 egerek vad egyedeiben, de csak minimálisat a TRPV1 receptor génhiányos egerekben.

A mustárolaj viszont hasonló mértékű fülduzzadást váltott ki a knockout állatokban mint a vad C57BL/6 csoportban. A receptor génhiányos csoportban az ödéma azonban tovább megfigyelhető volt, de ez a válasz NK<sub>1</sub> receptor blokkoló SR140333 hatására mindkét csoportban teljesen eltűnt.

A többször alkalmazott mustárolaj 30-40%-os fülduzzadást tartott fent a C57BL/6 egerekben. Az SR140333 előkezelés hasonló kinetikájú választ eredményezett mint a BALB/c egerek esetében, vagyis a kísérlet első három órájában szinte teljesen kivédte a duzzadást, míg a második periódusban nem volt megfigyelhető hatása. A TRPV1 receptor hiánya nem befolyásolta a leukocita akkumuláció mértékét.

## **A./3 Mustárolajjal kiváltott fülgyulladás NK<sub>1</sub> receptor génhiányos egerekben**

Az 1%-os mustárolaj ismételt alkalmazása 20-25%-os ödémát okozott az Sv129+C57BL/6 vad típusú egerekben összehasonlítva az oldószerral kezelt kontroll csoporttal ahol nem tapasztaltunk változást. Az NK<sub>1</sub> receptor hiánya szignifikánsan csökkentette a fülduzzadást, ezzel igazolva a P-anyag jelentős szerepét a mustárolajjal kiváltott ödémában. A kezelést követően majdnem háromszorosára emelkedett a szövetminták mieloperoxidáz enzim tartalma a paraffinolajjal kezelt kontroll csoportéhoz képest, de nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az NK<sub>1</sub> receptor génhiányos állatcsoport és a vad típusú egerek között. Ez alátámasztja korábbi adatainkat, melyek szerint az NK<sub>1</sub> receptor antagonistá SR140333 nem gátolta a mustárolajjal kiváltott leukocita akkumulációt a BALB/c törzsben.

## **A./4 Szövetteni eredmények**

A hematoxin-eozinnal festett szövetteni metszeteken jól megfigyelhető, hogy az 1%-os mustárolaj többszöri alkalmazása 20-30%-os fülvastagság növekedést okozott. A paraffinolajjal kezelt kontroll mintákhoz képest a mustárolaj fokozta a leukociták

kiáramlását az érpályákból a szövetbe. A TRPV1 és az NK<sub>1</sub> receptorok hiánya nem befolyásolta az akkumulálódott mieloid sejtek számát mustárolaj kezelést követően.

## ***B. Oxazolonnal kiváltott allergiás kontakt dermatitisz egérfülön***

### **B./1 A TRPV1 receptor szerepe az oxazolonnal kiváltott ACD reakcióban**

Az oxazolonnal kiváltott allergiás kontakt dermatitisz (ACD) reakcióban mért fülvastagságok mind a három vad típusú egértörzs (BALB/c, C57BL/6, Sv129+C57BL/6) esetében hasonlóan alakultak. Jelentős fülduzzadás volt megfigyelhető az elicitációt követő 24 órában, amely még a következő 72 órában is fennmaradt.

A TRPV1 receptor genetikai deléciója minden mérési időpontban 40-80%-kal növelte a fülduzzadás mértékét összehasonlítva a vad típusú csoport eredményeivel. Hasonló eredményre vezetett a kapszaicin-érzékeny idegrostok szenzoros neuropeptid tartalmának kémiai úton történő depléciója szisztémás resiniferatoxin előkezelés által. Ebben az esetben 50-70%-kal fokozódott a fülduzzadás oxazolon kezelés hatására.

Méréseinket a szövettani vizsgálatok is alátámasztották. Az oxazolon alkalmazását követően 48 órával levett szövetmintákban szignifikánsan megnövekedett a mieloperoxidáz enzim aktivitása, mely a polimorfonukleáris és egyéb mieloid sejtek felszaporodására utal.

Ezt az eredményt a szövettani metszetek szintén igazolták. Az oxazolonnal indukált sejtes gyulladást azonban sem az RTX előkezelés, sem a TRPV1-, illetve az NK<sub>1</sub> receptor gén hiánya, sem az  $\alpha$ CGRP hiánya nem csökkentette szignifikánsan a kontrollhoz viszonyítva.

### **B./2 A Th1/Th2 citokin profil változása oxazolonnal kiváltott ACD reakcióban**

Az oxazolon alkalmazását követő 24 és 48 órában levett mintákból mikrogöngy módszerrel meghatároztuk a Th1 sejtes válaszra jellemző IL-2, interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) és TNF $\alpha$  valamint a Th2 vonal aktiválásakor megjelenő IL-4 és IL-5 citokinek mennyiségét. Az így kapott eredmények meglepő képet mutatnak. Az IL-2 szintje alacsony maradt, míg a TNF $\alpha$  citokin mennyisége szignifikánsan megemelkedett, amely a TRPV1 receptor génhianyos csoportban jól korrelált a gyulladás során tapasztalt növekedéssel. Az IL-4 koncentrációja szintén megnövekedett különösen a 24 órás BALB/c csoport mintáiban. Érdekes módon az RTX előkezelés hatására a citokinek koncentrációja minden csoportban alacsonyabb volt.

## **B./3 A P-anyag és az $\alpha$ CGRP szerepe az oxazolonnal kiváltott ACD reakcióban**

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 receptor hiányának gyulladáskeltő hatása magyarázható-e a jelentősebb vazoaktív neuropeptidok (P-anyag, CGRP) hatásainak kiesésével. A P-anyag receptorát, az NK<sub>1</sub> receptort SR140333 antagonistával gátoltuk. Az így mért fülduzzadás eredmények megközelítőleg 40%-os csökkenést mutattak, igazolva a P-anyag jelentős szerepét a folyamat szabályozásában. Az NK<sub>1</sub> receptor gén hiánya szintén csökkentette az ödémaképződést a vad típusú kontroll csoporthoz képest, azonban kevésbé gátolta a reakciót mint azt az SR140333 antagonistával kezelt BALB/c csoportban tapasztaltuk. Az  $\alpha$ CGRP gén hiánya is mérsékelte az oxazolonnal kezelést követő ödémát összehasonlítva a vad típusú C57BL/6 csoport eredményeivel, de a 24 óra múlva kialakult 40%-os gátlás csak körülbelül 25%-osra mérséklődött 48 és 72 óra elteltével.

A kontrollhoz viszonyítva sem az NK<sub>1</sub> receptor sem az  $\alpha$ CGRP hiánya nem okozott csökkenést a 48 órás minták mieloperoxidáz enzim aktivitásában. A citokin vizsgálatok eredményei szerint 48 óra elteltével az NK<sub>1</sub> receptor és az  $\alpha$ CGRP hiánya is csökkentette a TNF $\alpha$  koncentrációját.

## **Megbeszélés, következtetések**

### ***A. Mustárolajjal kiváltott gyulladás egérfülben***

Kísérleteink igazolták, hogy a mustárolaj neurogén és nem neurogén módon képes gyulladást indukálni egérfülön. A mustárolaj egyszeri vagy ismételt alkalmazása is kiváltotta az ödémát, mely a korai szakaszban (0-3 óra) neurogén folyamatok során jött létre. Meglepő módon a szenzoros idegvégződés aktivációja a TRPV1 receptor génhianyos egerekben is létrejött, ebből következik, hogy az aktiváció TRPV1 receptoroktól független mechanizmusokon keresztül is megtörténik. Kísérleteinkből kiderült továbbá, hogy a mustárolaj ismételt alkalmazását követő 3-6 óra múlva a gyulladási folyamatokat már főleg a neurogén komponensektől független mediátorok uralják, melyek nemcsak fenntartják az ödémát hanem fokozzák a neutrofil sejtek akkumulációját is, mellyel megindul a gyulladás sejtes fázisa.

Eredményeink szerint az 1%-os mustárolaj egyszeri alkalmazása átmeneti vaszkuláris gyulladást hoz létre (15%-os fülduzzadás) BALB/c egéren, mely 6 órán belül fokozatosan és teljesen eltűnik. Ez az egyszeri stimulus nem okoz mérhető leukocita akkumulációt a fülszövetben mely azt jelenti, hogy az átmeneti érpályát érintő változásokat nem követi sejtes válasz. Ha azonban egy óra múlva megismételtük a

mustárolajos kenést szignifikáns neutrofil beáramlást tapasztaltunk, mely a szisztémás kapszaicin-előkezelés hatására sem csökkent. Ez azt bizonyítja, hogy az 1%-os mustárolaj ismételt dózisban képes olyan kemotaktikus utakat aktiválni, melyek függetlenek a neurogén komponensektől. A hat órán keresztül óránként megismételt mustárolajos kenés 25-30%-os folyamatos fülvastagság növekedést eredményezett. Bár korábbi munkákban feltételezték, hogy a mustárolaj (5-20%-os koncentrációban) kizárólag neurogén módon hoz létre gyulladást egerekben (*Inoue, H. et al 1997*) és patkányokban (*Bester, H. et al 1998*), jelen adataink következetesen alátámasztják, hogy a 6 órás kísérleti periódus első 3 órájában neurogén, míg a második felében már nem kizárólag neurogén mechanizmusok indukálják és tartják fent a gyulladást. Ezt az eredményt megerősítik a kapszaicin-előkezeléssel és az NK<sub>1</sub> receptor antagonistával végzett kísérleteink is. A kapszaicin-előkezelés során a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződések neuropeptid tartalma depletálódik, és ez képes kivédeni a korai szakaszban a fülduzzadást. A 3-6 órás periódusban a kapszaicin előkezelésnek már nincs gátló hatása a gyulladási folyamatokra, hasonlóan az NK<sub>1</sub> receptor antagonistá SR140333 előkezeléséhez.

A mustárolaj ismételt alkalmazásával háromszoros mieloperoxidáz enzim aktivitást tapasztaltunk a fülszövetből vett mintákban. Ez jelentős mértékű neutrofil granulocita akkumulációra utal, melyet a szövettani metszetek vizsgálata is alátámasztott. Mivel a fokozott sejtkiáramlást sem a szisztémás kapszaicin-előkezelés, sem az NK<sub>1</sub> receptor antagonistá SR140333 előkezelés nem befolyásolta, így a szenzoros neuropeptidok szerepét kizárhatjuk ebben a folyamatban.

Jelen munkánk célja egy olyan kísérleti modell kifejlesztése volt, mely alkalmas a neurogén gyulladás sejtes fázisának vizsgálatára. Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan (*Cao, T. et al 2000; Pintér, E. et al 2002*) most sem találtunk bizonyítékot arra, hogy a szenzoros idegvégződések stimulációjával indukált endogén neuropeptidok felszabadulása neutrofil granulocita beáramlást idézne elő a bőrben. A kapszaicinnal kiváltott fülduzzadás nem jelenik meg TRPV1 receptor génhiányos egerekben, de a mustárolaj kezelést követően kialakuló fülödémát nem befolyásolja a TRPV1 receptor hiánya. TRPV1 receptor génhiányos egereken végzett kísérleteink alapján feltételezzük, hogy a mustárolaj hat a kapszaicin-érzékeny idegrostokon, de a TRPV1 receptortól független úton aktiválja az idegvégződést. Az a tény, hogy az NK<sub>1</sub> receptor antagonistá SR140333 gátolja a korai ödémát mind a C57BL/6 vad típusú, mind a TRPV1 receptor génhiányos egerekben igazolja, hogy a mustárolaj okozta gyulladás neurogén szakasza NK<sub>1</sub> receptorokon keresztül mediált. A TRPV1-, és NK<sub>1</sub> receptorok szerepe a kontakt dermatitisz során kialakuló neutrofil akkumuláció során nem bizonyított.

## **B. Oxazolonnal kiváltott allergiás kontakt dermatitisz egérfülön**

Eredményeink alátámasztották azt a feltevést, hogy a TRPV1 receptor jelentős módosító szereppel bír a kontakt dermatitisz során. A TRPV1 receptorok genetikai hiánya, vagy a szenzoros neuropeptidok depléciója szisztémás RTX előkezeléssel fokozta az oxazolonnal kiváltott gyulladást, mely egybevág azzal az elképzeléssel, hogy az érzőideg rostok aktivációja a TRPV1 receptoron keresztül patofiziológiás körülmények között gyulladáscsökkentő hatású. Ezt szintén igazolja az allergiás kontakt dermatitiszben a TRPV1 knockout egerekben mért magas TNF $\alpha$  szint is. Összehasonlítva a sejtakkumulációval, akár a szövettani adatok, akár a mieloid sejtek mieloperoxidáz enzim aktivitása alapján megállapítható, hogy a folyamat során bekövetkező sejtkiáramlásra nincs hatása a TRPV1 receptor kiesésének. Néhány korábbi publikációban bizonyítást nyert, hogy a szisztémás kapszaicin-előkezelés/deszzenzitizálás fokozza az ödémát ACD reakció során (Giolomoni, G., Tigelaar, R. E. 1990; Veronesi, B. et al 1998), és az általunk kapott eredmények is ezt igazolják. A gyulladás súlyosbodása ACD során azt feltételezi, hogy a TRPV1 receptort is expresszáló kapszaicin-érzékeny neuronokból felszabaduló mediátorok eredő hatása az, hogy gátolják a dermatitisz kifejlődését.

Kísérleteink során az NK<sub>1</sub> receptorok genetikai hiánya és az antagonistá SR140333 használata is megerősítette, hogy a P-anyag gyulladáskeltő hatású.

A CGRP vizsgálata során egyesek gyulladáskeltő (Ek, L., Theodorsson, E. 1990; Goebeler, M. et al 1994), míg mások gyulladáscsökkentő (Asahina, A. et al 1995) hatását írták le az allergiás kontakt dermatitiszben. Az *in vitro* kísérletek többségében a CGRP és az immunsejtek kapcsolatát vizsgálták és arra a következtetésre jutottak, hogy a CGRP elősegíti a gyulladás sejtes fázisát (Grant, A. 2002; Torii, H. et al 1997). Néhány adat arra enged következtetni, hogy a szenzoros rostokból felszabaduló endogén CGRP *in vivo* gyulladáscsökkentő hatású. Az  $\alpha$ CGRP génhíányos egerekkel végzett kísérleteink megerősítik a CGRP proinflammációs hatását az ACD folyamatában. Ha tehát a P-anyag és a CGRP hatása is fokozza a gyulladást, hogyan magyarázható az ACD látható súlyosbodása RTX előkezelést követően, vagy a TRPV1 receptor génhíányos állatokban?

Laboratóriumunk korábbi vizsgálataiban bizonyítást nyert, hogy a folyamat során felszabaduló neuropeptidoknak (pl. szomatosztatin) nemcsak lokális, hanem szisztémás gyulladáscsökkentő hatásuk is van (Helyes, Zs. et al 2003; Szolcsányi, J. et al 1998), és számos más neuropeptidról is kiderült, hogy rendelkezik gyulladást gátló hatással, például a galanin (Xu, X. J. et al 1991), az opioid peptidok (Carlton, S. M., Coggeshall, R. E. 1997), a VIP (Delgado, M. et al 2001; Foey, A. D. et al 2003; Williams, R. O. 2002) és a PACAP-38 (Németh, J. et al 2006) amely a felszabadult mennyiségtől függően vált ki lokális vagy szisztémás gyulladáscsökkentő hatást.

A haptének által kiváltott késői típusú hiperszenzitív reakció T-sejt specifikus immunválaszt indít el a szervezetben. A kemotaktikus hatású T-helper limfociták aktiválják a mieloid sejtek akkumulációját (*Saulnier, M. et al 1995*), amit a mieloperoxidáz enzim aktivitás alapján kimutattunk a fűszövetben allergiás kontakt dermatitiszben. Korábban Goebeler és munkatársai publikálták (*Goebeler, M. et al 1994*), hogy a P-anyag és a CGRP topikális alkalmazása a bőrben fokozza a leukociták beszűrődését a kezelt területre, jelen munkánkban azonban nem sikerült egyértelmű bizonyítékot találni arra, hogy a felszabaduló endogén neuropeptidek befolyásolnák a leukocita akkumulációt az ACD során.

Eredményeink szerint a  $TNF\alpha$  a kulcs-citokin e folyamatban, melynek mennyisége lokálisan megemelkedik allergiás kontakt dermatitiszben. Bár az IL-4 is növekedett volt, elsősorban a 24 órás mintákban, szerepe azonban a kontakt hiperszenzitív reakciókban ellentmondásos. Egyes szerzők immunszuppresszív hatásairól számolnak be (*Asada, H. et al 1997; Gautam, S. C. et al 1992*), míg mások szerint induktor szerepet tölt be (*Dieli, F. et al 1999; Salerno, A. et al 1995; Weigmann, B. et al 1997*). Azt azonban mindenképpen kijelenthetjük, hogy az oxazonon indukálta ACD az egérfülben a várakozásokkal szemben nem tipikus Th1 típusú válasz, a Th2-es citokinek, elsősorban az IL-4 szerepe szintén kiemelt jelentőségű. Az a tény, hogy a TRPV1 receptort expresszáló neuronok RTX-szel történt deszenzibilizációja mind az IL-4 mind a  $TNF\alpha$  szintet csökkentette arra utal, hogy a neurogén komponensek hatással vannak a citokin termelésre. Magának a TRPV1 receptorfehérjének genetikai hiánya növelte a  $TNF\alpha$  szintet és az inflammációs tüneteket is. Az  $NK_1$  receptor knockout és az  $\alpha$ CGRP hiányos egereknél, főleg a 48 órás mintavétel esetén szignifikánsan kisebb  $TNF\alpha$  szintet mértünk a vad típusú kontrollokhoz képest, ami jól korrelál az enyhébb gyulladáshoz képpel.

Legjelentősebb következtetésként elmondhatjuk, hogy a TRPV1 receptor akár genetikai akár kémiai depléciója súlyosbítja az oxazonon által indukált ACD tüneteit. Az idegvégződésekből felszabaduló P-anyag és CGRP proinflammációs hatásokat okoznak, tehát szükségszerű feltételeznünk, hogy a TRPV1 receptor izgatása során nemcsak ezek a proinflammációs mediátorok, hanem gyulladásgátló peptidek (pl. szomatosztatin) is felszabadulnak, melyek mint endogén gátló rendszer, enyhítik az allergiás dermatitiszben létrejövő gyulladáshoz tartozó tüneteket. A közeljövőben megvizsgáljuk, hogy a neurális szomatosztatin szerepet játszik-e a folyamat modulációjában. Fontos célkitűzésünk, hogy újabb láncszemeket ismerjünk meg a szenzoros neuropeptidek és gyulladáshoz tartozó sejtek közötti kapcsolatban, és így hozzájáruljunk az idegrendszer és az immunrendszer közötti kommunikáció minél pontosabb megismeréséhez.



## Tudományos munkám értékelése a legfrissebb irodalmi adatok tükrében

1. A mustárolajjal kiváltott akut gyulladásszerű modellben kapott eredményeinket 2004-ben publikáltuk a *Neuroscience* című folyóiratban, amelyben elsőként bizonyítottuk funkcionális vizsgálatok alapján, hogy a mustárolaj nem a TRPV1 receptorokat aktiválja. Nem sokkal később Sven-Eric Jordt és munkatársai igazolták, hogy a mustárolaj (és más isothiocianát molekulák) az ANKTM1 (ankirin-like transmembrane protein-1) receptoron keresztül izgatja a kapszaicinre is érzékeny idegrostokat (*Jordt, S. E. et al 2004*). Az ANKTM1 receptor a tranziens receptor potenciál, vagyis a TRP receptorcsalád tagja, így e receptor/kation csatorna új elnevezése TRPA1. Szerkezete hasonlít a TRP ioncsatornához, de N-terminális régiója különösen sok, 17 ankirin repeat domént tartalmaz. TRPA1 receptor található a belső fülben, ahol a szőrsejteken mechanoreceptorként funkcionál (*Corey, D. P. et al 2004*), valamint a hátsó gyöki és trigeminális ganglion sejteken. Itt olyan kis átmérőjű neuronokon jelenik meg, melyek TRPV1 receptort igen, de TRPM8 receptort nem expresszálnak (*Bautista, D. M. et al 2005; Kobayashi, K. et al 2005; Story, G. M. et al 2003*).

A TRPA1 receptort a természetben található csípős anyagok közül (a mustárolajon kívül) a fahéjban található cinnamaldehyd, a metil szalicilát (a kúszó fajdbogyóból – *Gaultheria procumbens*), az eugenol (a szegfűszegből kivont vegyület), és az allicin, a fokhagyma csípős anyaga is aktiválja. Ezek a vegyületek a bőrön alkalmazva fájdalmas égő és szúró érzést váltanak ki, így elmondható, hogy a TRPA1 receptor is szerepet játszik bizonyos fájdalmas ingerek érzékelésében.

Caterina és munkatársai 1997-ben elsőként írták le a TRPV1 receptor termoszenzitív tulajdonságát (*Caterina, M. J. et al 1997*), mely intenzív kutatásokat indított el a hőérzékelés molekuláris szintű feltárására. A későbbiekben a TRP receptorcsalád újabb tagjáról, a TRPM8 receptorról bizonyosodott be, hogy a 23 °C alatti, nem fájdalmas hideg ingerre valamint a bőrön alkalmazott mentolra és az icilinre érzékeny (*McKemy, D. D. et al 2002; Peier, A. M. et al 2002*). A TRPA1 receptor hőérzékelésben betöltött szerepe ellentmondásos. Story és munkatársai különböző sejtenyészeteken végzett kísérleteikkel bizonyították, hogy a TRPA1 receptor a fájdalmas, 17 °C alatti hideg ingerek továbbításában játszik szerepet (*Story, G. M. et al 2003*). Bautista és munkatársai azonban TRPA1 receptor génhiányos egerek használatával kimutatták, hogy a knockout állatok fájdalmas hideg érzékelése valamint a vesztibuláris és auditoros érzékelése sem tért el a vad típusú állatokétól. Ugyanakkor a TRPA1 génhiányos egerekben a mustárolaj okozta ödéma illetve a bradykininnel kiváltott termális hiperalgészia nagy mértékben csökkent (*Bautista, D. M. et al 2006*). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy

a TRPA1 a fájdalom kialakulásában egy olyan ioncsatorna, melyet számos különböző inger képes aktiválni (Kwan, K. Y. et al 2006).

2. Az utóbbi öt évben a TRPV1 receptorok szerepét számos fájdalom- és gyulladásos modellben vizsgálták. Bár több közleményben leírták a TRPV1 receptorok pronociceptív és proinflammátoros szerepét az akut fájdalom és gyulladás mediációjában (Bölcsej, K. et al 2005; Geppetti, P. et al 2006) de a krónikus gyulladásos és fájdalom tesztekben a receptor funkciója ellentmondásos (Bölcsej, K. et al 2005; Szállási, Á. et al 2006) A TRPV1 knockout egereken végzett kísérletekből kiderült, hogy a receptor genetikai hiánya csökkenti az experimentális artritisz tüneteit (Szabó, Á. et al 2005; Barton, N. J. et al 2006; Keeble, J. et al 2005). 2005-ben elsőként írtuk le a TRPV1 receptor protektív hatását az oxazolonnal kiváltott allergiás kontakt dermatitiszben (Bánvölgyi, Á. et al 2005). Ezt követően más modellekben is bizonyítást nyert, hogy a TRPV1 receptor gén hiánya nem csökkenti, hanem súlyosbítja a tüneteket. Massa és munkatársai 2006-ban írták le a dinitrobenzén-szulfonsavval kiváltott colitis-ben (Massa, F. et al 2006), valamint ezt az eredményt igazolták lipopoliszachariddal indukált légúti gyulladás és hiperreaktivitás során is intézetünk munkatársai (Helyes Zs. et al, in press, 2007).

A TRPV1 molekulán ható antagonisták nagyon ígéretesnek tűntek a fájdalom-kórképek és gyulladásos betegségek kezelésének eszközeként. Az általunk is megerősített legújabb adatok azonban arra utalnak, hogy a TRPV1 receptort nem tekinthetjük kizárólag proinflammátoros és pronociceptív molekulának, mivel egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy ezen receptorok aktiválását követően gyulladásgátló és antinociceptív hatások is érvényesülnek.

## **Az értekezés új eredményei**

1. Kísérleteink igazolták, hogy a mustárolaj neurogén és nem neurogén módon is képes gyulladást indukálni egérfülön.
2. Eredményeink szerint az 1%-os mustárolaj egyszeri alkalmazása átmeneti vaszkuláris gyulladást okoz, melyet nem követ sejtkiáramlás. A mustárolaj ismételt dózisban már képes olyan kemotaktikus utakat aktiválni, melyek függetlenek a neurogén komponensektől.
3. Funkcionális kísérletekkel elsőként bizonyítottuk, hogy a mustárolaj a TRPV1 receptortól független úton aktiválja a kapszaicin-érzékeny idegrostokat. A

mustárolaj okozta gyulladás neurogén szakasza NK<sub>1</sub> receptoron keresztül mediált.

4. Elsőként írtuk le, hogy a TRPV1 receptor akár genetikai akár kémiai depléciója súlyosbítja az oxazolonnal kiváltott ACD tüneteit, valamint a TRPV1 receptor aktivációja során felszabaduló neuropeptidek jelentős módosító szereppel bírnak a kontakt dermatitisz során.
5. Kísérleteink megerősítették, hogy a P-anyag és a CGRP gyulladáskeltő hatású az allergiás kontakt dermatitisz folyamatában.
6. Megfigyeltük, hogy az egérfülben oxazolonnal indukált ACD a várakozásokkal szemben nem tipikus Th1 típusú válasz, a Th2-es citokinek, elsősorban az IL-4 szerepe szintén kiemelt jelentőségű.

## Publikációs lista

### ***A tézis alapját képező elsőszerzős közlemények***

1. **Ágnes Bánvölgyi**, Gábor Pozsgai, Susan D. Brain, Zsuzsanna Helyes, János Szolcsányi, Minakshi Ghosh, Béla Melegh and Erika Pintér: Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice, *Neuroscience* 2004, (Vol.125): 449-459.  
*IF: 3,5*
2. **Ágnes Bánvölgyi**, László Pálinkás, Tímea Berki, Natalie Clark, Andrew D. Grant, Zsuzsanna Helyes, Gábor Pozsgai, János Szolcsányi, Susan D. Brain, Erika Pintér: Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model, *Journal of Neuroimmunology* 2005 (69): 86-96.  
*IF: 2,82*

### ***További közlemények***

3. Zsuzsanna Helyes, Árpád Szabó, József Németh, Balázs Jakab, Erika Pintér, **Ágnes Bánvölgyi**, László Kereskai, György Kéri, and János Szolcsányi: Antiinflammatory and Analgesic Effects of Somatostatin Released From Capsaicin-Sensitive Sensory Nerve Terminals in Freund's Adjuvant-Induced Chronic Arthritis Model of the Rat, *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1677-1685.  
*IF: 7,39*
4. Árpád Szabó, Zsuzsanna Helyes, Katalin Sándor, Andrea Bite, Erika Pintér, József Németh, **Ágnes Bánvölgyi**, Kata Bölcskei, Krisztián Elekes, János Szolcsányi: Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis: in Vivo Study Using Gene-Deficient Mice, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2005, 314(1):111-119.  
*IF: 4,31*

**A tézis alapját képező idézhető előadáskivonatok száma: 2**  
**A tézis alapját képező előadások száma: 1**  
**A tézis alapját képező posztterek száma: 8**  
**A tézis alapját nem képező posztterek száma: 9**  
**A tézis alapját képező publikációk összesített impakt faktora: 23,2**

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom Dr. Szolcsányi János akadémikusnak, a Neurofarmakológia Program vezetőjének, aki lehetővé tette számomra, hogy az intézetében végezhessem Ph.D. tanulmányaimat, és munkásságával példát mutatott az évek során.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pintér Erikának és Dr. Helyes Zsuzsannának munkám során nyújtott szakmai irányításukat, és támogatásukat. Köszönöm hasznos tanácsaikat, és emberséges hozzáállásukat.

Külön köszönet illeti Minakshi Ghosht az Orvosi Genetikai és Gyermekefejlődéstani Intézetből, aki a TRPV1 receptor knockout állatok genetikai meghatározásában, a PCR technika megismertetésében segített. Köszönöm Dr. Pálinkás Lászlónak az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársának az áramlási citometriás mérésekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni munkatársaimnak, Dr. Pozsgai Gábornak a mieloperoxidáz enzim aktivitás mérésében nyújtott segítségével, valamint Dr. Hírné Perkecz Anikónak a professzionális szövettani metszetek elkészítéséért. Köszönettel tartozom Olaszné Zádor Csillának, aki az elmúlt évek során kifogástalan asszisztensi munkájával járult hozzá a kísérletek zökkenőmentes elvégzéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom férjemnek és családomnak türelmükért, megértésükért, és odaadó szeretetükért.

PhD THESIS

**THE ROLE OF CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY  
NEURONS IN THE PATHOMECHANISM OF SKIN  
INFLAMMATION**



Ágnes Bánvölgyi

Neuropharmacology Program

*Program director:* János Szolcsányi MD, PhD, Dsc

*Supervisor:* Erika Pintér MD, PhD, Dsc

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy

Faculty of Medicine, University of Pécs

2006

## **Introduction**

Nowadays, the extended amount of polluting agents in our surroundings (e.g. chemical contamination of water, air, soil, etc.) heavily charge our immune system and causes imbalance or pathological processes such as autoimmune diseases, asthma and allergic reactions. In the skin (which organ directly interacts with the environment), immune- and inflammatory diseases like allergic contact dermatitis, eczema, psoriasis manifest more often and severe form in developed countries. Skin diseases exert negative influence on the quality of life and they mean a great psychic expense to the patients. Furthermore the eczema/dermatitis group takes a great proportion of occupation-related diseases.

Inflammatory processes in the background of skin diseases can be divided into three parts: the evolving local vasodilatation and increased permeability in the acute phase introduce the extravasation of leukocytes in the inflamed area in subacute phase. In the chronic, proliferative phase tissue degeneration and fibrotic deformation can be observed.

Experiments in the latest years proved that neuropeptides released locally from sensory neurons have outstanding importance in the pathomechanism of cutaneous inflammatory processes (*Brain, S. D. 1997; Szolcsányi, J. et al 1996*).

### ***Neurogenic inflammation***

Neuropeptides in the skin are produced by small diameter, unmyelinated afferent neurons, called C polimodal nociceptors and neurons with thin, myelinated A $\delta$  fibers (*Scholzen, T. et al 1998*). Capsaicin, the pungent ingredient of paprika-plants in *Capsicum* genus, selectively excites and in high dose desensitises a major subpopulation of nociceptive sensory nerve fibres classified as "capsaicin-sensitive afferents" (*Szolcsányi, J. et al 1996*). Peripheral endings of these sensory fibres release neuropeptide mediators, such as tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) which mediate efferent responses leading to vasodilatation and plasma protein extravasation with subsequent oedema formation (*Brain, S. D. 1997*). These local vascular changes are major features of neurogenic inflammation.

### ***Mustard oil***

Mustard oil (allyl-isothiocyanate) as well as capsaicin, have been historically used as chemical algogens in studies of neurogenic inflammation, with topical administration resulting in increases in blood flow and vascular permeability in rodent skin (*Jancsó, N. et al 1967*). Mustard oil was first identified as a pungent plant extract, in this case from several members of the genus *Brassica* (e.g. *B. nigra*, *B. juncea*).

## ***Capsaicin and TRPV1 receptor***

The strong and selective algogenic and desensitizing effect of capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid) was first described by Andreas Högyes in 1878. Caterina and co-workers have identified and cloned the receptor for capsaicin (*Caterina, M. J. et al 1997*), first named as vanilloid receptor 1 (VR1), and recently - regarding its structure - transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1 receptor.

Capsaicin – dose dependently – causes excitatory, neuron blocking or neurotoxic effects on capsaicin-sensitive sensory neurons. The sensory neuron blocking effect means impaired function of the response not only on the capsaicin receptor protein itself but on the whole sensory neuron. TRPV1 receptor is a non-selective cation channel, following capsaicin stimuli Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions enter the cell and cause depolarization for the nociceptive signal, and neuropeptides release from the peripheral endings. Long-term open state of the TRPV1 channel raises intracellular Ca<sup>2+</sup> level which inhibits the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and causes mitochondrial swelling and neuronblocking effect. If more ion channels are still open neurotoxicity occurs: Ca<sup>2+</sup>-activated proteases induce cell lysis.

Besides capsaicin other vanilloid derivatives are also able to activate the TRPV1 receptor like zingerone from ginger, piperine the pungent principal of black pepper or the ultrapotent agonist resiniferatoxin (RTX), the irritant compound of a cactus-like plant *Euphorbia resinifera*. Significant efforts were made to identify the endogenous ligand of capsaicin-receptor. Anandamide (arachidonyl-ethanolamide, AEA) has been described to be an agonist on the cloned TRPV1 receptor. Zygmunt and co-workers showed that anandamide induce vasodilatation by activating TRPV1 on peripheral sensory nerves and cause CGRP release (*Zygmunt, P. M. et al 1999*). Furthermore the application of anandamide to the cloned TRPV1 receptor evokes capsazepine-reversible currents (*Smart, D. et al 2000*).

Protons produced under pathophysiological circumstances, e. g. inflammation or ischemia can sensitise and in high dose excite sensory neurons via the TRPV1 receptor. In inflamed tissues local pH decreases to pH 5, therefore the activation of TRPV1 receptor contributes to pain sensation.

Noxious heat (>42 °C) has significant activatory effect but after sensitization of the TRPV1 receptor, even lower temperature can elicit action potentials as well.

Numerous lipid metabolites of arachidonic acid such as prostaglandins (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) are endogenous ligands of TRPV1 receptor during chronic inflammations (*Szabó, Á. et al 2005*). For example, bradykinin activates phospholipase A<sub>2</sub> enzyme it releases arachidonic acid from membrane phospholipids, and from which 12-lypoxigenase enzyme

produces 12-HPETE (12- hydroperoxyeicosatetraenic acid). 12-HPETE directly activate TRPV1 receptor through intracellular binding site.

The above mentioned processes highlight the ability of TRPV1 receptor to integrate diverse environmental stimuli.

## ***Proinflammatory neuropeptides of sensory neurons***

### **Tachykinins**

The major group of neuropeptides released from capsaicin-sensitive sensory neurons after stimulation are tachykinins: neurokinin A, neurokinin B and substance P. Tachykinins share a common C-terminal pentapeptide sequence: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Three G-protein coupled receptors, the NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor have been identified and tachykinins have different binding affinity to these receptors. Substance P (SP), the best known member of the tachykinin family, is a potent mediator of increased microvascular permeability acting via neurokinin 1 (NK<sub>1</sub>) receptors, which are most commonly expressed on post-capillary endothelial cells (*McDonald, D. M. et al 1996*). NK<sub>1</sub> receptor was found on mast cells, polymorphonuclear leukocytes, and on macrophages and lymphocytes as well (*Grant, A. 2002*). Substance P is able to stimulate macrophages and mast cells, it has effects on the proliferation of lymphocytes, chemotaxis of T-cells and immunoglobulin production of B-cells. SP could act directly on neutrophils *in vivo* via NK<sub>1</sub> receptors to stimulate their accumulation in inflamed areas (*Baluk, P. et al 1999*).

### **Calcitonin gene-related peptide**

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a 37 amino acid peptide and a member of a closely related peptide family with 90% structural homology ( $\alpha$  and  $\beta$  forms known). CGRP acts via CGRP<sub>1</sub> and CGRP<sub>2</sub> receptors to exert biological effects, but most vascular effects of CGRP are mediated via the CGRP<sub>1</sub> receptor. Its long-lasting vasodilator effect mediated by CGRP<sub>1</sub> receptors found on epithelial smooth muscle cells through a nitrogen-monoxide independent mechanism, in general. CGRP attenuates the activity of adenylate-cyclase enzyme, which rises the intracellular cAMP level. This cyclic nucleotide activates protein-kinase A, which opens the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels resulting in the relaxation of smooth muscle cells. CGRP<sub>1</sub> receptor was detected on T- and B-lymphocytes and granulocytes.

### ***Scientific background of our experiments***

Studies with mustard oil are in keeping with the concept that low doses stimulate sensory nerves and cause neurogenic inflammation. First N. Jancsó and co-workers published the ineffectiveness of 5% mustard oil on denervated rat skin after transection



of the saphenous nerve (*Jancsó, N. et al 1967*). Ten years later G. Jancsó and colleagues demonstrated that neonatal capsaicin pre-treatment inhibited cutaneous plasma protein extravasation induced by 5% mustard oil in the rat (*Jancsó, G. et al 1977*).

Inoue and colleagues examined the mechanism of mustard oil-induced (0.5-20%) plasma extravasation and oedema formation in the mouse ear. They demonstrated a major difference between capsaicin and mustard oil stimulation: in contrast to capsaicin, repeated administration of mustard oil did not cause desensitisation. In addition the inflammatory response was unaffected by pre-treatment with H<sub>1</sub> (histamine) and 5-HT<sub>2</sub> (serotonin) receptor antagonists or with ruthenium red, the functional inhibitor of capsaicin receptor, which inhibited capsaicin-induced oedema. However, the tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333 inhibited the response for 5% mustard oil, which suggests that mustard oil elicits plasma extravasation through the release of sensory neuropeptides, but its mechanism of action differs from that of capsaicin (*Inoue, H. et al 1997*).

Sensory neuropeptides can be released from the capsaicin-sensitive nerve endings by TRPV1 receptor mediated or TRPV1 receptor independent mechanisms (*Bánvölgyi et al, 2004*). Smearing of capsaicin to the skin surface, the neurogenic inflammatory reactions can be observed during acute response: released neuropeptides increase blood flow and oedema formation appears (*Grant, A. 2002*). It is well documented that neurogenic components play important role in the development of many inflammatory diseases like asthma, allergic dermatitis, psoriasis, eczema, inflammatory bowel diseases. The role of TRPV1 receptor, activated by endogenous mediators during these processes is less known. Experiments with rodents clearly demonstrate that low doses of capsaicin or resiniferatoxin activate TRPV1 receptors on sensory neurons, but in high doses they deplete sensory neuropeptides and desensitise the nerve endings. This leads to the selective block of the neurogenic inflammatory component.

Environmental allergens and irritants elicit contact dermatitis which means skin inflammation and itching. The concept, that sensory neurons with C and A $\delta$  fibers modulate the process of allergic contact dermatitis have been published in the literature, but the exact mechanism is unclear (*Brain, S. D. 1997*). Allergic contact dermatitis (ACD) is an immune process consisting of induction and elicitation phase. In the induction phase (also referred to as afferent phase or sensitization phase) the lipophilic hapten molecule penetrates into the skin and forms complex with host cell proteins to provide a complete antigen which is subsequently taken up by Langerhans cells. These antigen-presenting cells migrate from the epidermis to the draining lymph nodes, where hapten specific memory T cells develop in the paracortical area. The sensitization period lasts for 5-15

days in humans and 5-7 days in mice. The second contact with the allergen induces the elicitation phase (efferent or challenge phase) and the sensitised lymph node cells travel to the site of chemical contact and produce characteristic inflammatory reactions such as erythema, oedema and cellular infiltration. Marked infiltration of neutrophils, eosinophils and antigen-sensitised mononuclear cells (lymphocytes, macrophages) can be observed in the effector phase after 72 h in human and 24-48 h in mice (*Krasteva M. J. et al, 1999*).

## **Aims**

1. Our aim is to elucidate the role of sensory neuropeptides on oedema formation and leukocyte accumulation in mouse ear following mustard oil treatment.
2. We would like to investigate the effect of single and repeated application of mustard oil on acute vascular and chronic (6 hrs) cellular phase of the inflammation.
3. We would like to determine the role of TRPV1 and NK<sub>1</sub> receptors in this inflammatory model, applying systemic capsaicin pre-treatment, selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist and NK<sub>1</sub> or TRPV1 receptor knockout mouse strains.
4. Our aim is to investigate the role of the TRPV1 receptor in oxazolone-induced allergic contact dermatitis on mouse ear, using TRPV1 receptor deficient mouse strains and systemic RTX pre-treatment.
5. We would like to analyse the ACD reaction on NK<sub>1</sub> receptor- and  $\alpha$ CGRP gene knockout animals and using selective receptor antagonists.
6. Our aim is to observe the histological changes and local cytokine levels in the inflammatory process.

## **Experimental procedures**

### ***Animals***

Experiments were performed in Hungarian and British laboratories and the design of this study was carried out according to the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Great Britain) and Act for Animal Protection and Forbearance 1998 (Hungary). BALB/c (20-25g) and C57BL/6 (20-25g) strains were obtained from Charles River Ltd, Hungary. TRPV1 receptor knockout transgenic mice were donated by Dr. J.B. Davis, Neurology and GI Centre of Excellence for Drug Discovery, GlaxoSmithKline, Research and Development Ltd., and bred in the animal house of the Hungarian laboratory. Wild-type and NK<sub>1</sub> receptor knockout Sv129+C57BL/6 mice were a gift from Dr. N. Gerard, Perlmutter Laboratory Children's Hospital Boston, then bred in the animal house of KCL in London, UK. Animals were given standard diet and water *ad libitum* in climatically controlled environment. Both knockout strains displayed normal growth and behavioural characteristics.

### ***Measurement of ear oedema***

Ear thickness was measured with an engineer's micrometer with 0.1 mm accuracy, before challenge with test agents and after the challenge at different time points. Data were expressed as % increase of ear thickness compared to the initial values.

### ***Measurement of neutrophil accumulation***

The ears were thawed and chopped into small pieces then homogenized in phosphate buffer containing 0.5% hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB) detergent (1 ml buffer/ ear). The homogenate was centrifuged at 10,000g at 4 °C for 10 min and 0.5 aliquots of supernatant placed in Eppendorf tubes. Neutrophil accumulation was assessed by comparing the myeloperoxidase enzyme activity in sample extracts with mouse standard leukocyte preparation. Myeloperoxidase activity was assayed using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Reactions were performed in 96-well microtitre plates in room temperature. The optical density (OD) at 620 nm was measured at 5 min intervals for 30 min, using a microplate reader and plotted. The reaction rate ( $\Delta$  OD/time) was derived from an initial slope of the curve. A calibration curve was then produced, with the rate of reaction plotted against the number of neutrophils in the standard samples. This was used to convert reaction rates to number of neutrophils for the ear sample homogenates.

## **Statistics**

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons between treated and non-treated animals were made by ANOVA followed by Dunnett's post-test for oedema data and by unpaired t-test for neutrophil accumulation studies. Probability values  $P < 0.05$  were regarded as significant.

### ***A. Mustard oil evoked inflammation in mouse ear***

#### **Application of substances**

Anaesthesia was induced by ketamine (100 mg/kg i.p., repeated as required) with xylazine (5 mg/kg i.m.). Both ears were smeared with 1% mustard oil dissolved in paraffin oil, with 10  $\mu$ l applied to each of the inner and outer surfaces. This procedure was repeated every hour for 6 hrs. In separate experimental groups animals received either single or double treatments at the beginning of the 6 h experiment. In the control group, paraffin oil was applied on both ears in the same volume at the required times. In the relevant groups, SR140333 (240 nmol/kg s.c.) was applied 15 min before mustard oil to inhibit NK<sub>1</sub> receptors. At the end of the incubation period animals were killed by cervical dislocation and ears were dissected for histological procedures or put on -20 °C for the neutrophil accumulation assay.

#### **Systemic capsaicin pre-treatment**

Depletion of sensory neuropeptides from the capsaicin-sensitive neurons was achieved by systemic capsaicin desensitization. Capsaicin was dissolved in ethanol (10%), Tween 80 (10%) and isotonic saline (80%). BALB/c mice under anaesthesia received 30 mg/kg s.c. capsaicin, in the neck region, on three consecutive days. The cumulative dose was 90 mg/kg. The animals were used in the experiment 14 days after pre-treatment with capsaicin. The success of the procedure was validated by the eye wiping test. The capsaicin pre-treatment was considered satisfactory, if one drop of 0.1% capsaicin solution did not evoke wiping movements in the eye.

#### **Histological studies**

Dissected ears were fixed in 4% paraformaldehyde. Cross-sections (6  $\mu$ m) were cut at the base of the ears after paraffin embedding and stained with haematoxylin-eosin. Chloroacetate-esterase staining as myeloid marker was used to analyse the cellular phase of inflammation.

## ***B. Oxazolone-induced allergic contact dermatitis on mouse ear***

### **Application of substances**

Anaesthesia was induced by ketamine (100 mg/kg i.p., repeated as required) with xylazine (5 mg/kg i.m.) or isoflurane (2%). Animals were sensitised on two consecutive days by smearing 2% oxazolone (50-50 µl) on the shaved abdomen (induction phase). On the 6th day right ears were smeared with 2% oxazolone dissolved in 96% ethanol: 15-15 µl solution was applied on each of the inner and the outer surfaces (elicitation phase). Left ears were treated with 96% ethanol in the same way. In the relevant groups, SR140333 (240 nmol/kg s.c.) was administered 15 min before oxazolone to inhibit NK<sub>1</sub> receptors, and was repeated in the elicitation phase at 24 and 48 hrs.

At the end of the incubation period animals were killed and ears were dissected for histological procedures or put on -80 °C for the neutrophil accumulation assay and cytometric bead array.

### **Systemic resiniferatoxin pre-treatment**

Depletion of sensory neuropeptides from the capsaicin-sensitive neurons was achieved by systemic resiniferatoxin (RTX) pre-treatment. Resiniferatoxin was dissolved in a minimal volume of 96% ethanol and made up the final volume with isotonic saline (3, 7, 10 µg/ml). BALB/c and C57BL/6 wild-type mice under anaesthesia received 30, 70 and 100 µg/kg s.c. RTX on three consecutive days. Animals were used 6 days after RTX pre-treatment. The success of the procedure was validated by the eye wiping test. The RTX pre-treatment was considered satisfactory, if one drop of 0.1% capsaicin solution did not evoke wiping movements in the eye.

### **Histological studies**

Dissected ears were fixed in 4% paraformaldehyde. Cross-sections (6 µm) were cut at the base of the ears after paraffin embedding and stained with haematoxylin-eosin. Chloroacetate-esterase staining as myeloid marker was used to analyze the cellular phase of inflammation. To reflect the severity of inflammation histopathological changes as oedema, formation of microabscess after necrosis of hair follicles and sebaceous glands and the number of accumulated mononuclear and polymorphonuclear cells were scored as follow:

Oedema was measured with Analysis software (Soft Imaging System) expressed in µm and the ethanol treated control was labelled with score 0.

The number of microabscesses per ear was counted and scored from 0-5.

The cellular infiltrate was evaluated by viewing at magnification of 200x, the number of accumulated mononuclear and polymorphonuclear cells per field received scores from 0-5.

## **Flow cytometric studies – Microbead technique**

Changes of cytokine profile during DTH reaction were determined by mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA, BD Biosciences). The CBA kit contains five bead populations with distinct fluorescent intensities have been coated with capture antibodies specific for IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  proteins. Ears were homogenized in 1 ml RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich Ltd, Budapest) and 1% phenylmethanesulfonyl-fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich Ltd, Budapest) mixture on 4 °C. Samples were centrifuged at 10000 g, for 10 min on 4 °C. The five bead populations were mixed together to form the CBA. 50  $\mu$ l mixed capture beads, 50  $\mu$ l ear sample and 50  $\mu$ l PE-labelled detection antibody solution were added into an assay tube and was incubated for 2 hrs. Fluorescent intensities were counted by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences). Data were enhanced by CellQuest Software. Concentration of cytokines in each sample was determined with SAT2 software (Soft Flow, USA) after calibration of standard curve.

## **Results**

### ***A. Mustard oil evoked inflammation in mouse ear***

#### **A./1 Mustard oil-induced inflammation in BALB/c mice**

A single application of 1% mustard oil to the ear of BALB/c mouse induced a 15% increase in ear thickness, whereas double treatment elicited more pronounced response, in both cases the response had diminished by 6 h. While the single treatment provoked a non-significant increase in the number of accumulated leukocytes by 6 h, the double application induced statistically significant recruitment of myeloperoxidase positive cells in the skin samples compared to the paraffin oil-treated control group, which was only slightly affected by systemic capsaicin pre-treatment. This was unaffected by a protocol designed to desensitise capsaicin-sensory nerves.

A 25-30% increase in ear thickness was maintained by the hourly reapplication of mustard oil over 6h. Systemic capsaicin pre-treatment significantly inhibited oedema formation in the first 3 hours, but oedema in this group increased from 3-6 h. The NK $_1$  receptor antagonist SR140333 also blocked the swelling in the first 3 h but it had only limited effect in the second half, despite a repeated administration during the third hour. This manner of mustard oil treatment elicited significant neutrophil cell accumulation in the ear samples, but neither NK $_1$  receptor antagonist SR140333 nor systemic capsaicin pre-treatment inhibited the cellular infiltration.

## **A./2 Mustard oil-induced inflammation in TRPV1 receptor knockout mice**

Single application of 2.5% capsaicin solution induced a large oedema in the wild-type mouse but it was only a minimal in the ear of TRPV1 receptor knockout mice. By comparison mustard oil generated the same degree of ear swelling in knockout animals as in wild-type C57BL/6 mice, moreover a longer-lasting effect was observed in knockout animals, but this response was completely abolished by the NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333 in both groups of animals. The repeated administration of mustard oil maintained 30-40% increase of ear thickness in C57BL/6 mice. The inhibitory effect of SR140333 pre-treatment followed the similar kinetics as observed in BALB/c mice. It almost completely abolished the ear oedema the first 3 h but was not effective in the second half of the 6 h experiment. The lack of TRPV1 receptors did not alter the amount of extravasated leukocytes in response to mustard oil.

## **A./3 Mustard oil-induced inflammation in NK<sub>1</sub> receptor knockout mice**

Repeated treatment with 1% mustard oil caused about 20-25% ear oedema in Sv129+C57BL/6 wild-type mice compared to the vehicle treated control. The lack of NK<sub>1</sub> receptors significantly decreased the ear swelling, confirming the important role of SP in mustard oil-evoked oedema. The activity of myeloperoxidase enzyme was almost three times higher after mustard oil treatment compared to the paraffin oil treated controls, but did not show significant differences between NK<sub>1</sub> receptor knockout and wild-type mice. These results support our previous data where the NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333 did not inhibit the mustard oil-induced leukocyte accumulation in BALB/c mice.

## **A./4 Histological findings**

Haematoxylin-eosin stained slides clearly demonstrate that repeated application of 1% mustard oil induced about 20-30% increase of ear thickness. Leukocyte accumulation can be also observed compared to the paraffin oil-treated control as it is observed in the chloroacetate-esterase stained slides. Disruption of TRPV1 or NK<sub>1</sub> receptors did not influence the number of accumulated myeloid cells after mustard oil.

## ***B. Oxazolone-induced allergic contact dermatitis on mouse ear***

### **B./1 Influence of the TRPV1 receptor in oxazolone-induced ACD reaction**

Ear swelling, measured as ear thickness, was similar in response to oxazolone-induced ACD in all three strains (C57BL/6 and BALB/c and Sv127+C57BL/6) of mice used

in this study. A significant increase in ear swelling was observed by 24h after elicitation of the response by topical application of oxazolone that remained significantly raised for the duration of the 72h experiment.

The genetic deletion of the TRPV1 receptors enhanced the ear swelling by 40-80% when compared to the wild type mice at all time points. Resiniferatoxin-desensitization, which depletes neuropeptide content from the capsaicin-sensitive sensory neurons, increased the oxazolone-induced ear thickness 50-70%.

Representative light micrographs of oxazolone-induced ear inflammation in BALB/c, C57BL/6 wild-types and TRPV1 knockouts support the above evidence in that deletion of the TRPV1 receptors enhanced the ear thickness. The observation of inflammatory cells was supported by measuring of MPO activity in supernatants from ear homogenates. A highly significant increase in MPO activity was observed in the ears of mice at 48h after oxazolone challenge, indicating a marked increase in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes and possibly other myeloid cells. Neither RTX pre-treatment, nor deletion of TRPV1 receptor caused any inhibition in MPO activity compared to their controls.

### **B./2 Changes in Th1/Th2 cytokine profile during oxazolone-induced ACD reaction**

Concentrations of IL-2, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (Th1 cell response) and IL-4, IL-5 (Th2 cell activation) cytokines were measured in ear samples 24 and 48h after oxazolone application. A surprising pattern was seen in that levels of IL-2 were low, whilst levels of TNF $\alpha$  were high in all wild-type samples and there was a correlation between the levels measured with the inflammation observed as levels were increased in TRPV1 knockout mice at 24h. IL-4 levels were also raised, especially in the 24h samples from BALB/c mice. Interestingly levels of all cytokines measured were low in the RTX pretreated mice.

### **B./3 Effect of removal of sensory neuropeptide components on oxazolone-induced ACD**

The possibility that the potentiating effects of the TRPV1 receptor were due to the loss of the effects of the major vasoactive neuropeptides (substance P, acting via the NK<sub>1</sub> receptor, and CGRP) was then investigated. Pharmacological removal of NK<sub>1</sub> receptors by pre-treatment with an NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333 caused approximately 40% inhibition of oedema response providing evidence for a pivotal role of substance-P in the mediation of this process. The lack of NK<sub>1</sub> receptors also significantly inhibited oxazolone-induced ear swelling, although a less pronounced inhibition was observed in the NK<sub>1</sub> knockouts compared to their WT (Sv129+C57BL/6) controls than observed when the BALB/c mice that were treated with the NK<sub>1</sub> receptor antagonist. A reduction in ear



swelling was also observed in the CGRP knockout mice when compared with their wild-type C57BL/6 controls. It is noted that whilst a 40% inhibition of ear thickness is observed after 24h, this was reduced to approximately a 25% inhibition after 48 and 72h.

Deletion of the NK<sub>1</sub> receptors, or  $\alpha$ CGRP gene did not cause any inhibition in MPO activity compared to their controls. It is also shown that TNF $\alpha$  expression induced by oxazolone treatment was significantly inhibited after 48h in mice lacking of either the NK<sub>1</sub> receptor or  $\alpha$ CGRP gene.

## **Discussion, conclusions**

### ***A. Mustard oil evoked inflammation in mouse ear***

This study has revealed that mustard oil can act via both neurogenic and non-neurogenic mechanisms to mediate inflammation in the mouse ear. Mustard oil, whether given as single or repeated administration evoked oedema formation, observed as ear swelling, that at the early time points (0-3 h) was mediated by neurogenic mechanisms. However, surprisingly the activation of the sensory nerves was still observed in TRPV1 knockout mice and thus we propose that activation occurs via a mechanism that is independent of the TRPV1 receptor. Secondly, we demonstrate that mustard oil, upon repeated administration induced a non-neurogenic inflammatory response over 3-6 h that consisted of sustained oedema formation and neutrophil accumulation.

Our present data revealed that single application of 1% mustard oil induces a transient swelling (15% increase) in the ear of BALB/c, which gradually and completely disappears in 6 h. This stimulus is not able to provoke a detectable leukocyte accumulation in the ear tissue, which means that the transient vascular changes are not followed by cellular events. However when application of mustard oil is repeated 1 h later, a significant increase in neutrophil accumulation is observed that is unaffected by systemic capsaicin desensitisation. Thus we provide evidence that mustard oil, in repeated doses, can mediate chemotactic effects, which seem to be independent of the neurogenic components. Hourly repeated mustard oil treatment maintained a 25-30% continuous enhancement of ear thickness. Although previous papers suggested that mustard oil up to 20% induces an exclusive neurogenic inflammation in the mouse and in the rat, our present data are consistent with a neurogenic stage, in the first three hours followed by a non-neurogenic stage in the second 3 h in oedema formation during the 6 h experiment. This hypothesis is supported by results from capsaicin-desensitization and NK<sub>1</sub> receptor antagonist studies. Capsaicin, which depletes the peptide-content of capsaicin-sensitive sensory neurons prevents the early swelling, but it is ineffective in the

second phase, and the NK<sub>1</sub> receptor antagonist shows a similar profile of activity. We conclude that a cumulative dose of mustard oil produces non-neurogenic inflammation by direct activation of inflammatory cells in the mouse ear. Mustard oil, given as a repeated application, induces a three fold increase in myeloperoxidase enzyme activity in the ear samples. The rise of myeloperoxidase activity indicates a significant accumulation of neutrophil granulocytes, as supported by histological analysis. Neutrophil accumulation is not affected by either systemic capsaicin-desensitization, nor pre-treatment with the NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333, therefore participation of sensory neuropeptides can be excluded.

The original aim of the present study was to develop a model for investigating the cellular phase of neurogenic inflammation. Instead, in agreement with our previous findings, we did not find evidence to support the concept that stimulation of sensory nerves leads to neutrophil accumulation in the naïve skin. The capsaicin-induced ear swelling does not occur in TRPV1 receptor animals, but ear oedema after mustard oil is unaffected by the absence of TRPV1 receptors. Our findings from TRPV1 receptor knockout mice suggest that mustard oil acts on the capsaicin sensitive neurons by a TRPV1 receptor independent process. This is in agreement with a previous paper demonstrating that mustard oil induces mouse skin inflammation through a mechanism different from capsaicin. Furthermore they found that mustard oil-induced plasma extravasation is not inhibited by ruthenium red, a non-specific TRPV1 receptor inhibitor (*Inoue, H. T. et al, 1997*). The fact that the NK<sub>1</sub> receptor antagonist, SR140333 inhibits the early oedema both in C57BL/6 wild-type and TRPV1 receptor knockout mice clearly demonstrates that the neurogenic phase of mustard oil-induced inflammation is mediated by NK<sub>1</sub> receptors. The role of TRPV1 receptors remains unclear in mediation of neutrophil accumulation.

Results obtained from NK<sub>1</sub> receptor knockout mice demonstrate the pivotal role of NK<sub>1</sub> receptors in ear swelling initiated by mustard oil, suggesting that SP mediates the oedema. These data are in agreement with previous results where specific NK<sub>1</sub> receptor antagonists, such as SR140333, and CP-96,345 inhibited the mustard oil-evoked oedema in the mouse or rat skin. Although, repeated administration of mustard oil is also able to induce neutrophil recruitment in these animals, there is no evidence for the role of NK<sub>1</sub> receptors in the cellular events.

### ***B. Oxazolone-evoked allergic contact dermatitis on mouse ear***

The results presented in this study provide evidence to support the hypothesis that the TRPV1 receptor plays a critical modulatory role in contact dermatitis. However, the genetic disruption of TRPV1 receptors or blockade of the TRPV1-dependent sensory

neurogenic component by RTX increased the observed inflammation, in keeping with the theory that the pathophysiological activation of the TRPV1 on sensory nerves is associated with an anti-inflammatory modulatory effect in ACD. The results are supported by the measure of increased levels of TNF $\alpha$  in ACD in TRPV1 knockout mice. By comparison, cell accumulation, determined either by analysis of histological sections or by assay of MPO activity for myeloid cells, suggests that accumulation of inflammatory cells was not markedly influenced by deletion of the TRPV1 receptor. Nevertheless, a few published studies present evidence that capsaicin pretreatment/desensitization/depletion increases inflammatory oedema in ACD (*Girolomoni, G., Tigelaar, R. E. 1990; Veronesi, B. et al 1998*) and the present results support these findings. This enhancement of ACD indicates that capsaicin-sensitive neurons that contain the TRPV1 receptor can overall act to down-regulate the hypersensitivity.

Pro-inflammatory role of SP is supported by our findings through either genetic deletion of the NK<sub>1</sub> receptor, or treatment with an NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333.

CGRP has been shown to exert either pro-inflammatory (*Ek, L., Theodorsson, E. 1990; Goebeler, M. et al 1994*) or anti-inflammatory (*Asahina, A. et al 1995*) effects in allergic contact dermatitis. A greater number of *in vitro* studies have been carried out on interactions between CGRP and immune cells and it is generally considered that CGRP attenuates cellular responses (*Grant, A. 2002; Torii, H. et al 1997*) but sparse evidence exists to suggest that endogenous CGRP released from sensory nerves can exert anti-inflammatory effects *in vivo*. The results presented here on  $\alpha$ CGRP knockout mice reveal that the lack of  $\alpha$ CGRP correlates with attenuation of the ear swelling in ACD, thus supporting the concept that CGRP plays a pro-inflammatory role in ACD overall *in vivo*.

If substance P and CGRP are suggested to play a pro-inflammatory role how can one explain the apparent worsening of ACD with either RTX depletion or in the TRPV1 knockouts? There are several mechanisms that may be involved. Studies in laboratories including our own have provided a range of evidence that anti-inflammatory neuropeptides (eg. somatostatin) are released from these nerves that can have systemic as well as local effects in down regulating the inflammation (*Helyes, Zs. et al 2003; Szolcsányi, J. et al 1998*). There is also evidence for an anti-inflammatory effect of various other neuropeptides including galanin (*Xu, X. J. et al 1991*), opioid peptides (*Carlton, S. M., Coggeshall, R. E. 1997*), VIP (*Delgado, M. et al 2001; Foey, A. D. et al 2003; Williams, R. O. 2002*) and PACAP-38 (*Németh, J. et al 2006*) which depending on the concentration released can exert local and systemic anti-inflammatory effects.

Hapten-induced DTH is characterized as a T-cell specific immune response, however the chemotactic T helper lymphocytes activate the accumulation of myeloid positive cells (*Saulnier, M. et al 1995*) in keeping with the determination of MPO activity

in the ear samples in ACD observed in this study. Previously Goebeler and co-workers (*Goebeler, M. et al 1994*) have published that concomitant topical application of SP and CGRP enhanced the leukocyte recruitment at the sites of challenge, but there is no evidence in the present study that endogenous peptides contribute to leukocyte accumulation during ACD.

The results show that the key cytokine measured was TNF $\alpha$  with high levels in all control/WT ACD tissues. In addition, IL-4 levels were raised, suggesting that it plays a pivotal regulatory role at the site of inflammation, especially after 24h. The role of IL-4 in CHS is controversial with suppressive (*Asada, H. et al 1997; Gautam, S. C. et al 1992*) in addition to inflammatory (*Dieli, F. et al 1999; Salerno, A. et al 1995; Weigmann, B. et al 1997*) roles of this cytokine shown. The findings are in keeping with the concept that Th2 in addition to Th1 cytokines play roles in the regulation of murine contact dermatitis. Interestingly, blockade via desensitization/depletion of the TRPV1 sensory neurogenic component with RTX reduced both IL-4 and TNF $\alpha$  levels, suggesting that the sensory neurogenic component can influence cytokine levels. By comparison, the absence of just the TRPV1 receptors was associated with an increase in the oxazolone-induced TNF $\alpha$  production. This result was complimentary to those in samples from mice lacking either NK $_1$  receptors or  $\alpha$ CGRP where a significantly reduced TNF $\alpha$  level was detected after 48h, in keeping with an anti-inflammatory effect.

In conclusion, this study has demonstrated that either genetic or chemical depletion of the TRPV1 receptor-mediated component is associated with a worsening of the ACD. Moreover by comparison, evidence is provided that both endogenous substance P and CGRP play a pro-inflammatory role. The present evidence explains previously-obtained conflicting results with this model and demonstrates the ability of the neurogenic component to influence ACD in a differential manner, depending on the precise activating and release mechanisms of the sensory neurogenic component. The results highlight the need to learn more about endogenous factors involved in the activation of sensory nerves in skin disease, especially the anti-inflammatory or protective mechanisms mediated by TRPV1 receptor activation in ACD.

## **Scientific significance of our work in the light of the most recent data in literature**

1. We published our results obtained on the mustard oil-induced acute inflammatory model in *Neuroscience* in 2004, first proved with functional tests that mustard oil acts via TRPV1 receptor independent mechanism. Soon after these data Sven-Eric Jordt and co-workers clarify that mustard oil and other isothiocyanate molecules exert

capsaicin-sensitive nerve fibers through ANKTM1 (ankyrin-like transmembrane protein-1) receptor (*Jordt, S. E. et al 2004*). ANKTM1 receptor belongs to the transient receptor potential (TRP) receptor family therefore it was named TRPA1. It has structure homology with TRP ion channels, but the amino-terminal contains relatively high, 17 ankyrin repeat domains. TRPA1 receptors operate as mechanoreceptors on hair cells in the internal ear (*Corey, D. P. et al 2004*), and are expressed on dorsal root and trigeminal ganglion neurons. TRPA1 is found in a subpopulation of nociceptive sensory neurons which co-express TRPV1 but not TRPM8 receptors (*Bautista, D. M. et al 2005; Kobayashi, K. et al 2005; Story, G. M. et al 2003*).

Mustard oil and other natural pungent compounds, such as cinnamaldehyde from cinnamon, methylsalicylate from wintergreen (*Gaultheria procumbens*), eugenol from clove and allicin from garlic can activate TRPA1 receptor. These agents applied on skin surface elicit burning and pricking sensation therefore it is concluded that TRPV1 receptor has a role in perception of certain painful stimuli.

Caterina and co-workers first described the thermosensitive feature of TRPV1 receptor (*Caterina, M. J. et al 1997*) which initiated intensive research to elucidate the molecular background of thermosensation. Furthermore, TRPM8 receptor – a member of the TRP receptor family – was demonstrated to be sensitive to non-painful cold (below 23 °C) stimuli and to menthol and icilin applied to the skin (*McKemy, D. D. et al 2002; Peier, A. M. et al 2002*). The role of TRPA1 receptor in thermal perception is contradictory. Story et al proved the role of TRPA1 receptor in the transmission of painful cold stimuli below 17 °C in different cell culture experiments (*Story, G. M. et al 2003*). Bautista and colleagues showed that TRPA1 deficient mice display normal cold sensitivity and unimpaired auditory function, which suggest that this receptor is not required for the detection of noxious cold *in vivo*. Furthermore, TRPA1 knockout mice exhibit significant deficits in mustard oil-induced oedema and bradykinin-evoked thermal hyperalgesia (*Bautista, D. M. et al 2006*). These results draw the conclusion that TRPA1 ion channel can be activated by various stimuli to develop painful conditions (*Kwan, K. Y. et al 2006*).

2. Numerous hyperalgesic and inflammatory models were developed during the last five years to investigate the role of TRPV1 receptors. Although many acute pain and inflammatory experiments support the pronociceptive and proinflammatory role of TRPV1 receptor (*Bölcseki, K. et al 2005; Geppetti, P. et al 2006*), its cue remains controversial in chronic tests (*Bölcseki, K. et al 2005; Szállási, Á. et al 2006*). Experiments with TRPV1 knockout mice elucidated that the lack of the receptor

decreases the symptoms of experimental arthritis (*Szabó, Á. et al 2005; Barton, N. J. et al 2006; Keeble, J. et al 2005*). We first described the protective role of TRPV1 receptors in oxazolone-induced allergic contact dermatitis in 2005 (*Bánvölgyi, Á. et al 2005*). In addition many experimental models proved that the lack of TRPV1 receptor does not decrease but even enhances the inflammatory symptoms. Massa and co-workers found the same result in dinitrobenzene-sulphonic acid-evoked colitis in 2006 (*Massa, F. et al 2006*), and this was proved in lipopolysaccharide-induced airway inflammation and hyperreactivity reaction by our collaborators (*Helyes et al, in press, 2007*).

Agonists acting on TRPV1 molecule seemed to be very promising tools in the treatment of painful inflammatory diseases. Nevertheless, latest data also confirmed by our laboratory, showed that TRPV1 receptor cannot be considered as pro-inflammatory and pronociceptive molecule all these pathophysiological conditions. Increasing evidence support its anti-inflammatory and antinociceptive effects.

## **Novel results**

1. Our experimental data prove that mustard oil induces inflammation in a neurogenic and non-neurogenic manner as well.
2. Results show that single application of 1% mustard oil elicits transient vascular changes which are not followed by cellular infiltration in the inflamed area. Repeated application of mustard oil activates chemotactic ways independent from neurogenic component.
3. Our functional data show that mustard oil can activate capsaicin-sensitive nerves via TRPV1 receptor independent mechanism. The neurogenic phase of mustard oil-induced skin inflammation mediated by NK1 receptors.
4. Our results demonstrate first that genetic or chemical depletion of TRPV1 receptor results in a worsening of oxazolone-induced ACD. Neuropeptides are released in response to activation of TRPV1 receptor exert significant modulatory effects on contact dermatitis.
5. Our experimental data confirm that substance P and CGRP play proinflammatory role in the process of allergic contact dermatitis.
6. Our studies present that the oxazolone-induced ACD in mouse ear in contrast to previous data is not a typical Th1-type response because Th2 derived cytokines, especially IL-4 has a pivotal role in this process.

## Publications

### *Articles used as a basis for the present thesis*

1. **Ágnes Bánvölgyi**, Gábor Pozsgai, Susan D. Brain, Zsuzsanna Helyes, János Szolcsányi, Minakshi Ghosh, Béla Melegh and Erika Pintér: Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice, *Neuroscience* 2004, (Vol.125): 449-459.  
IF: 3,5
2. **Ágnes Bánvölgyi**, László Pálincás, Tímea Berki, Natalie Clark, Andrew D. Grant, Zsuzsanna Helyes, Gábor Pozsgai, János Szolcsányi, Susan D. Brain, Erika Pintér: Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model, *Journal of Neuroimmunology* 2005 (69): 86-96.  
IF: 2,82
3. Zsuzsanna Helyes, Árpád Szabó, József Németh, Balázs Jakab, Erika Pintér, **Ágnes Bánvölgyi**, László Kereskai, György Kéri, and János Szolcsányi: Antiinflammatory and Analgesic Effects of Somatostatin Released From Capsaicin-Sensitive Sensory Nerve Terminals in Freund's Adjuvant-Induced Chronic Arthritis Model of the Rat, *Arthritis Rheum.* 2004 May; 50(5): 1677-1685.  
IF: 7,39
4. Árpád Szabó, Zsuzsanna Helyes, Katalin Sándor, Andrea Bite, Erika Pintér, József Németh, **Ágnes Bánvölgyi**, Kata Bölcskei, Krisztián Elekes, János Szolcsányi: Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis: in Vivo Study Using Gene-Deficient Mice, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2005, 314(1): 111-119.  
IF: 4,31

**Published abstracts related to the thesis: 2**

**Oral presentations related to the thesis: 1**

**Posters related to the thesis: 8**

**Posters not related to the thesis: 9**

**Total impact factor of publications related to the thesis: 23,2**

## Acknowledgement

First I wish to thank to Prof. Dr. János Szolcsányi, member of Hungarian Academy of Sciences, director of Neuropharmacology Program, who enabled me to do my Ph.D. work in the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, and his creative and outstanding scientific work inspired me during my fellowship.

I am very grateful to my supervisor, Dr. Erika Pintér and to Dr. Zsuzsanna Helyes for their professional guidance and encouragement. Thank you for their advices and emphatic attitude.

I would like to thank to Mrs. Minakshi Ghosh at the Department of Medical Genetics and Child Development for her help in genetic determination of TRPV1 receptor knockout animals and introducing to PCR technique. Thanks to Dr. László Pálincás at the Department of Immunology and Biotechnology for his indispensable help in measurements with flow cytometer.

Here I would like to interpret my thank to my colleagues, to Dr. Gábor Pozsgai for his help in measurements of myeloperoxidase enzyme activity and to Mrs. Anikó Perkecz for preparing professional histological sections. I wish to thank to Mrs. Csilla Zádor who contributed to my work with her unexceptional technical assistance.

Finally I am very grateful to my husband and my family for their patience and devoted love.