

## Fluorescein-izotiocianát kiváltotta fokozott perkután szenzibilizáció, különböző életkorú transzglutamináz-3 knockout egerekben

### Fluorescein isothiocyanate induced enhanced percutaneous sensitization in transglutaminase-3 knockout mice in different age

BOGNÁR PÉTER DR., TEMESVÁRI ERZSÉBET DR., NÉMETH ILONA,  
HÁRSING JUDIT DR., KUZMANOVSKAI DANIELLA DR., KÁRPÁTI SAROLTA DR.

Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, Budapest

#### ÖSSZEFOGLALÁS

A bőr barrier funkciója szempontjából az epidermisz legkülső rétege, egy komplex protein-lipid struktúra, a „cornified cell envelope” kiemelt jelentőségű. Kialakításában a stabil izopeptid és protein-lipid kötéseket létrehozó transzglutaminázok nélkülözhetetlenek. A közelmúltban létrehozott transzglutamináz-3 knockout egértörzs bőr barrier funkciója nyugalmi körülmények közt azonban intaktnak bizonyult. Célunk az volt, hogy látens bőr barrier károsodást feltételezve vizsgáljuk a törzs fogékonyságát a fluorescein-izotiocianát – dibutil-ftalát kontakt dermatitisz modelben, valamint a fluorescein-izotiocianát transz-epidermális penetrációját, két-foton lézermikroszkóppal in vivo is jellemezzük. Feltételezve a bőr barrier funkciójának életkorral való hanyatlását, a szenzibilizációs kísérleteket különböző életkorú (8-12 hetes, 6 hónapos, 18 hónapos) egereken is elvégeztük. A transzglutamináz-3 knockout egerek mindegyik korcsoportban fokozott szenzibilizációs hajlamot mutattak, ugyanakkor ennek mértékében nem találtunk különbséget a korcsoportok között. In vivo vizsgálatok során a fluorescein-izotiocianát fokozott epidermális penetrációját észleltük transzglutamináz-3 knockout egerekben. Eredményeink alapján a transzglutamináz-3 konckout egértörzs funkcionális bőr barrierje károsodott, a transzglutamináz-3 funkciója szükséges az intakt bőr barrier kialakulásához.

**Kulcsszavak:**  
bőr barrier funkció - kontakt  
szenzibilizáció - bőröregedés -  
transzglutamináz-3 -  
fluorescein-izotiocianát - dibutil-ftalát

#### SUMMARY

Cornified cell envelope as the outermost skin layer is of great significance in skin barrier function. During its assembly, members of the transglutaminase enzyme family catalyze formation of stable cross-linked proteins and protein-lipid complexes. The recently generated transglutaminase-3 knockout mice have failed to show any overt alteration in skin barrier under normal circumstances. Our goal was to elucidate a presumably latent skin barrier defect by observing the contact dermatitis response upon fluorescein-isothiocyanate-dibutyl-phtalate treatment. Furthermore we characterized the transepidermal penetration of fluorescein-isothiocyanate in vivo by two-photon microscopy. We investigated also the possible age-aggravated skin barrier perturbations by sensitization in mice with different age (8-12 weeks, 6 and 18 months). We could detect a significantly higher rate of fluorescein-isothiocyanate-dibutyl-phtalate induced contact dermatitis among transglutaminase-3 knockout mice, regardless of the age of the animals. Furthermore, we could observe a more invasive transepidermal fluorescein-isothiocyanate penetration pattern in knockout mice. Taking our findings together we could observe that transglutaminase-3 knockout mice exhibit a functionally defective skin barrier, thus the enzymatic activity of transglutaminase-3 is necessary for the development of a functionally intact skin barrier.

**Key words:**  
skin barrier function - contact  
hypersensitivity - skin ageing -  
transglutaminase-3 - fluorescein-  
isothiocyanate - dibutyl-phatale

A bőr egyik legfontosabb fiziológiai szerepe a megfelelő fiziko-kémiai és immunológiai barrier funkció, a külvilág felől érkező változatos károsító noxák elleni védelem biztosítása, valamint a transepidermális vízvesztés (TEWL) fi-

ziológias értékeken belüli szabályozása. A barrier funkció szempontjából kiemelt jelentőségű a külvilággal közvetlenül érintkező epidermisz legkülső, hámlás révén folyamatosan megújuló, elszarusodó rétege, az ún. „cornified cell

envelope” (CE), mely ellenálló, többszörösen keresztkötött, komplex protein-lipid struktúra (1). A CE kialakításában résztvevő struktúrproteinek (pl. involucrin, lorocrin, filaggrin, SPRs) izopeptid és protein-lipid (ceramid) komplexek kovalens kötésekkel keresztüli stabilizálásáért a transzglutamináz enzimes család tagjai felelősek (2, 3). A bőr teljes fiziko-kémiai barrier struktúrájának kialakításában a CE („air-liquid barrier”) mellett fontos a stratum granulosum (SG2) rétegében található tight junction-ök (TJ) említése is („liquid-liquid interface barrier”). A bőr rezidens és tranzienst immunsejtjei azonban a fentiekkel párhuzamosan egy állandó „immun surveillance”-t, „immunológiai barrier” is fenntartanak. A fiziko-kémiai és immunológiai bőrbarrier funkció szoros és kölcsönös kapcsolatban áll egymással. Az immunológiai barrier kulcsfontosságú sejtjei a Langerhans sejtek, melyek nyúlványaikkal nyugalmi állapotban elérik a TJ réteg alatti területeket, azonban „danger” szignálok hatására kialakuló „inflammosómában” nyúlványaik a TJ réteg fölötti területekről is képesek antigén prezentációra (4). A Langerhans sejtek központi szerepe az antigén prezentáción keresztül a kontakt szenzibilizáció kialakulásának folyamatában régóta ismert (5), újabban azonban egyéb professzionális antigén prezentáló sejteket is leírtak, melyek szerepe szintén nem elhanyagolható (6). A szenzitizációs fázisban kialakuló „inflammosoma” magára a fizikai bőr barrierre is hatással van, így fontos a megfelelő, a káros noxát elimináló, azonban a saját integritást megtartó mechanizmusok közti reguláció. A bőr barrier fiziko-kémiai, és immunológiai történéseinek időbelisége, kölcsönös egymásra hatása jelenleg intenzív kutatások tárgya, egyre több adattal rendelkezünk a veleszületett immunitás fontos közvetítő szerepéről (7). Az intakt CE a bőr barrier funkció szempontjából kiemelt jelentőségű. A fiziko-kémiai barrier diszfunkció és a szenzibilizáció kapcsolata leginkább az atópiás megbetegedések körében vizsgált, a legtöbb adattal a CE kialakításában szintén résztvevő filaggrin gén mutációiról rendelkezünk. Az atópiás dermatitis, ichthyosis vulgaris, Netherton-szindróma, valamint perkután szenzibilizáció kapcsolatáról is egyre több adat áll rendelkezésünkre (4, 8, 9). A transzglutamináz defektusok jelentősége a fokozott szenzibilizációs hajlamban még nem tisztázott.

A transzglutaminázok Ca<sup>2+</sup> függő módon lizin és glutamin aminosavak között kovalens intra-, vagy intermolekuláris izopeptid kötésekkel hoznak létre, ez a folyamat az ún. „crosslinking”. Az eddig leírt nyolc – enzimatikusan is aktív – transzglutamináz közül a CE formálásában jelen ismereteink szerint a transzglutamináz-1 (TGM1), a transzglutamináz-3 (TGM3), valamint a transzglutamináz-5 (TGM5) vesz részt. A transzglutamináz-2 (TGM2) ubiquiter, számos funkciója mellett a bőr fiziológiai történései során az extracelluláris mátrix kialakításában és a sebgyógyulásban betöltött szerepe emelhető ki (2, 3). Lamelláris ichthyosisban szenvedő betegekben TGM1 mutációkat mutattak ki (10), ezzel összhangban a TGM1 knockout egerek abnormális, letális keratinizációs zavart mutatnak (11). A TGM5 mutációit acral peeling szindrómában szenvedők egy csoportjában sikerült először igazolni (12). Jelenleg nem ismerünk TGM3 defektushoz

kapcsolódó kórképet, azonban a TGM3-at, mint autoantigént igazolták dermatitis herpetiformisban (13).

*John és mtsai.* 2012-ben publikált adatai (14) alapján a TGM3 knockout (TGM3<sup>-/-</sup>) egerek fizikai-kémiai és strukturális bőr barrierje a szőrzet kisfokú szerkezeti eltérései mellett intaktnak bizonyult, azonban a knockout egerekből izolált corneocyta ultrahanggal létrehozott mechanikai stresszel szemben csökkent stabilitást mutattak.

*Célkitűzés:* Célul tűztük ki a TGM3<sup>-/-</sup> egerek percutan szenzibilizációjának vizsgálatát a részletesen leírt, Th<sub>2</sub>-polarizált fluoreszcein-izotiocianát (FITC) – dibutil-ftalát (DBP) késői típusú túlérzékenységi reakció (kontakt dermatitisz) egérmodellben (15, 16). Azon feltételezésből indultunk ki, hogy ha egy dominánsan Th<sub>1</sub> immunválaszra hajlamos, C57BL/6 vad (WT) háttérű törzsön (17) létrehozott knockout törzs, egy Th<sub>2</sub> polarizált modellben is képes fokozott szenzibilizációt mutatni, akkor ennek hátterében nyugalmi körülmények közt nem kimutatható funkcionális bőr barrier defektus áll. Célunk volt továbbá a TGM3<sup>-/-</sup> egér bőr fiziko-kémiai barrierjének pontosabb *in vivo* vizsgálata is. Tekintettel a fiziko-kémiai, illetve immunológiai bőr barrier életkorral várható változásaira, a szenzibilizációt különböző életkorú, idősebb egereken is elvégeztük. Feltételezhető volt, hogy a TGM3<sup>-/-</sup> egerek bőr barrier funkciója az életkor előrehaladtával azonos korú WT társaikéhoz viszonyítva gyorsabban romlik, így a szenzibilizációra való hajlamuk is növekedhet.

## Anyag és módszer

A módszereket és az eredmények egy részét korábban már publikáltuk, így a részletes metodikai leírást tekintve utalunk a közleményre (18).

### TGM3<sup>-/-</sup> egértörzs

A TGM3<sup>-/-</sup> egértörzset a Kölni Egyetemről (University of Cologne, Köln, Németország) Prof. Mats Paulson és Neil Smyth bocsátotta rendelkezésünkre. A háttér törzs a C57BL/6-os vad típus (WT) volt, kontrollként ezt a törzset alkalmaztuk. A szenzibilizációs kísérletekhez 8-12 hetes, 6, ill. 18 hónapos állatokat használtunk.

A flow-cytometriás analízist, szérumban IgE vizsgálatot, ill. a P. acnes kiváltotta *in vivo* assay-t, valamint az *in vivo* két-foton mikroszkópiát 8-12 hetes nőstény állatokon végeztük el.

### Kontakt érzékenység kiváltása, a „mouse ear swelling test”

#### (MEST, fülvastagodás teszt)

Az egerek (WT ill. TGM3<sup>-/-</sup>) hasán kb. 1,5-2 cm<sup>2</sup>-es területet leborotváltunk, 24 óra múlva (1. nap) a területre 160 µl 0,5%-os FITC, vagy a kontroll csoportok esetében ugyanennyi oldószerként használt acetondibutil-ftalát oldatot helyeztünk 24 órán át tartó okklúziót biztosítva. Egy héttel később (8. nap) az előbbi kezelést megismételtük. A kísérlet 15. napján digitális mikrométer segítségével megmértük az egerek fülvastagságát (0 h), majd ezt követően mindkét fül hátsó oldalára 20 µl-t pipettáztunk az adott egérmél korábban is használt oldatból. A fülvastagságot ezt követően 24 és 48 órás időpontban értékeltük. Mindkét fül azonos időben mért átlagát használtuk statisztikai értékelésre. A 48 órás fülvastagság-mérést követően az állatok eutanáziája, a fülek, egyúttal a drenáló nyirokcsomók eltávolítása, valamint a retrobulbaris plexusból vérvétel is történt.

### Szövettan

A füleket formalin oldatban fixáltuk, majd standard feldolgozást követően, 2 µm-es metszetekben hematoxylin-eosin (HE), valamint toluidinkék festés után vizsgáltuk. A HE festett metszetekben az epidermisz hyperproliferációját, spongiosist és pörkök jelenlétét, a dermisben a gyulladáshoz infiltrátum mértékét értékeltük „0” (fiziológias állapot) ill. „+++” (masszív gyulladáshoz) között elhelyezkedő szemi-kvantitatív skálával. A toluidinkékkel festett metszeteken az előbbiektől függetlenül a subepidermalis, metachromasiásan festődő hízósejtek átlagos számát vizsgáltuk 5 látóteremben, 200x nagyítással. A hízó-

sejtszám szemikvantitatív kiértékelésére az alábbi skálát alkalmaztuk: 0-5 hízósejt = „0”, 5-10 hízósejt = „+”, >10 = „++”. A hízósejtszám az egy látótérben észlelt átlagos hízósejtszámot jelöli.

#### Flow-cytometria

A drenáló nyirokcsomókból (2-4 db/egér) készült sejtszuszpenziót CD3, CD4, ill. CD25, fluoreszcens festékkel konjugált antitestekkel (BD Biosciences) vizsgáltuk. (Becton Dickinson FACS Calibur, CellQuest program, n=5/csoport (8-12 hetes),  $10^4$  sejt/mérés.)

#### Szérum IgE

A 48 órás fülvastagodás időpontjában vett vérből nyert szérumban mértük az össz IgE koncentrációt (Mouse IgE ELISA KIT, BD Biosciences) (n=5/csoport, 8-12 hetes).

#### In vivo transzepidermális FITC penetráció mérése két-foton mikroszkópiával

Az állatokat intraperitonealis anaestheticummal elaltattuk, majd az egyik fülük ventrális oldalát pillanatragasztó segítségével szokványos

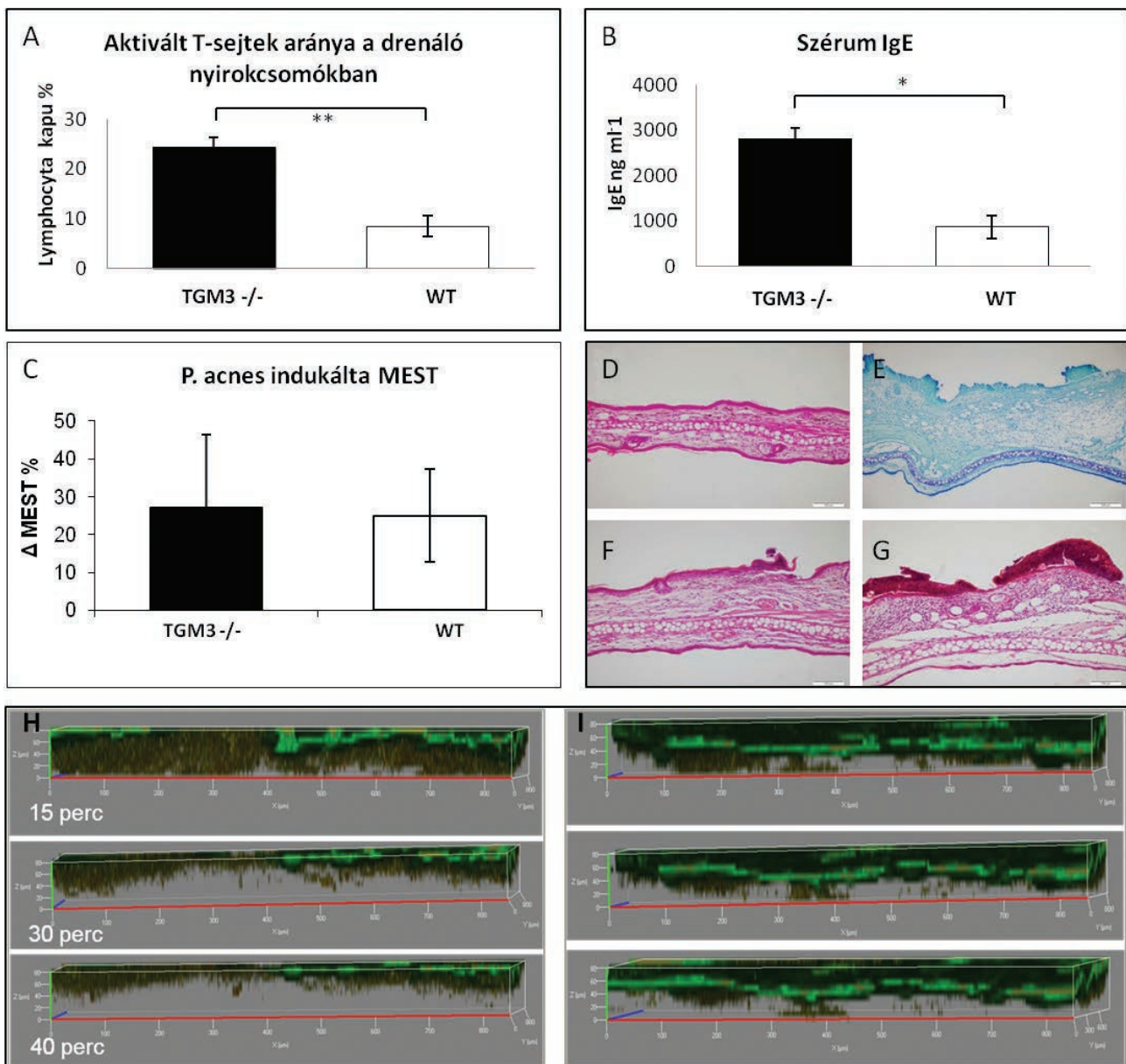
mikroszkópos tárgylemezhez rögzítettük. A dorsalis felszínre 2  $\mu$ l 50 mg/ml-es dimetil-szulfoxidban oldott FITC-et pipettáztunk, majd az oldat száradása után két-foton lézermikroszkóppal követtük a FITC penetrációját in vivo. A mérést az ellenoldali fülön is elvégeztük. (Carl Zeiss LSM 7 MP, excitációs hullámhossz 795 nm, n=3/csoport, 8-12 hetes).

#### Propionibacterium acnes kiváltotta MEST

Az állatok bal fülének dorsalis-proximális területére subepidermálisan 20  $\mu$ l PBS-ben szuszpendált  $10^{14}$  CFU-t tartalmazó *P. acnes*-t, a jobb fülbe kontrollként 20  $\mu$ l PBS-t injektáltunk. A kialakuló gyulladásos választ 48 óra múlva MEST-el értékeltük (n=3/csoport, 8-12 hetes).

### Eredmények

Eredményeink egy része már publikálásra került (18). Igazoltuk, hogy 8-12 hetes TGM3<sup>-/-</sup> egerek fokozott per-



1. ábra

Fiatal (8-12 hetes) TGM3<sup>-/-</sup> egerek fokozott szenzibilizálhatósága, a FITC-DBP modellben. (A): FITC kezelt TGM3<sup>-/-</sup> egerek nyirokcsomóiban emelkedett aktivált T-sejt arány, (B): FITC kezelt TGM3<sup>-/-</sup> egerekben emelkedett szérumban össz IgE szint, (C): *P. acnes* kiváltotta azonos mértékű gyulladás TGM3<sup>-/-</sup> és WT egérben, (D): vivóanyaggal kezelt WT egérfül, (E): FITC kezelt TGM3<sup>-/-</sup> egérfül, toluidinkék, (F): FITC kezelt WT, (G): FITC kezelt TGM3<sup>-/-</sup> egérfül, (H): in vivo FITC penetráció WT, (I): FITC penetráció TGM3<sup>-/-</sup>

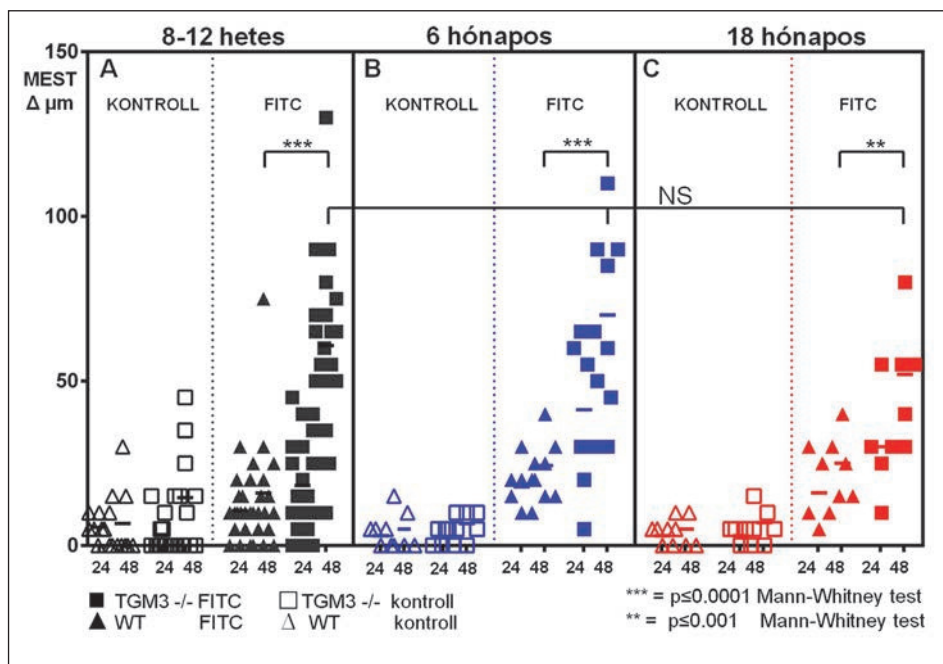
kután szenzibilizációs hajlamot mutatnak a FITC-DBP modellben. A FITC szenzibilizált TGM3<sup>-/-</sup> egerek fokozott MEST válasza mellett (2A. ábra), a nyirokcsomókban a CD4, CD25 pozitív, aktivált T-sejtek aránya (1A. ábra), valamint a szérumban a CD4, CD25 pozitív, aktivált T-sejtek aránya (1A. ábra), valamint a szérumban a CD4, CD25 pozitív, aktivált T-sejtek aránya (1A. ábra) is szignifikánsan magasabbnak bizonyult a FITC kezelt WT csoporthoz viszonyítva. Ahhoz, hogy értékelni tudjuk a fokozott szenzibilizációs hajlamot, igazolnunk kellett, hogy a knockout egerek immun reaktivitása nem tér el a vad genotípusúakétól. Ennek tisztázására végeztük el az intradermális *P. acnes* tesztet, melynek során az epidermális barriert kiiktatva az antigént közvetlenül a dermiszbe jutattuk.

A kialakult gyulladás intenzitásában nem volt különbség a knockout és WT csoportok között (1C. ábra).

Az in vivo két-foton mikroszkópos mérések során úgy találtuk, hogy a FITC a TGM3<sup>-/-</sup> egerek epidermiszén gyorsan áthatol, jól látható fluoreszcens „frontvonalat” mutat (1I. ábra), míg a WT egerek esetében a FITC tovább időzik az epidermisz felszínén és sokkal kisebb (mintegy  $4,5 \pm 0,5$  relatív) fluoreszcencia intenzitást mutat a dermiszben (1H. ábra).

A FITC szenzibilizált állatok maximális fülvastagodását a 48. órában észleltük, mely szignifikánsan különbözött a WT állatokétól (8-12 hetes populáció TGM3<sup>-/-</sup>:  $61 \pm 27 \mu\text{m}$ , WT:  $16 \pm 18 \mu\text{m}$ ,  $p \leq 0,0001$ ) (2A. ábra). A FITC kezelt 6 hónapos TGM3<sup>-/-</sup> egerek 48 órában mért átlagos MEST-je  $70 \pm 28 \mu\text{m}$  volt, míg ez az érték WT egerek esetében  $24 \pm 9 \mu\text{m}$ -nek bizonyult, a magasan szignifikáns ( $p \leq 0,0001$ ) különbség így ebben a korcsoportban is igazolható volt (2B. ábra). A 18 hónapos FITC kezelt populációkban mért értékek alapján az idős TGM3<sup>-/-</sup> egerek szenzibilizációs hajlama is hasonlóan bizonyult a fiatalabb TGM3<sup>-/-</sup> populációban tapasztaltakkal (TGM3<sup>-/-</sup>:  $52 \pm 18 \mu\text{m}$ , WT:  $25 \pm 11 \mu\text{m}$ ,  $p \leq 0,001$ ) (2C. ábra). A TGM3<sup>-/-</sup> egerek átlagos élettartama két év körüli, eredményeink alapján a TGM3<sup>-/-</sup> egerek fokozott szenzibilizálhatósága az életkor előrehaladásával nem módosult.

A szövettani kiértékelés során a MEST méréseknek megfelelő képet találtunk. Míg oldószer kezelés mellett sem a WT, sem a TGM3<sup>-/-</sup> populációban nem észleltünk



2. ábra  
MEST különböző életkorú TGM3<sup>-/-</sup> és WT egerekben

Csoportok	Epidermális hyperplasia	Dermális infiltrátum	Hízósejtek
TGM3 <sup>-/-</sup> FITC	++	++	++
TGM3 <sup>-/-</sup> kontroll	0	0	++
WT FITC	+	+	++
WT kontroll	0	0	++

1. táblázat  
FITC-DBP szenzibilizáció szemikvantitatív szövettani kiértékelése (összes korcsoport)

gyulladásos jeleket (1D. ábra), addig FITC-el kezelt WT állatok esetében mérsékelt gyulladásos jelek már megfigyelhetők voltak (1F. ábra), melyek a TGM3<sup>-/-</sup> populációban jól láthatóan nagyobb mértékűnek mutatkoztak (1G. ábra). A hízósejtek számában nem észleltünk különbséget az egyes csoportok között (1E. ábra, ill. 1. táblázat). A szövettani eredményekben korcsoportonkénti különbséget nem találtunk.

## Összefoglalás

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a TGM3<sup>-/-</sup> egértörzs, bár nyugalmi körülmények között, ill. strukturálisan intakt bőr barrierral rendelkezik, kontakt szenzibilizációra azonban lényegesen fogékonyabb. Tekintettel arra, hogy TGM3<sup>-/-</sup> background C57BL/6 törzs inkább Th<sub>1</sub> típusú immunválaszra hajlamos (17), a kísérletek szenzitivitása érdekében a Th<sub>2</sub>-polarizált immunválaszt provokáló FITC-DBP modellt választottuk (15). A kontakt szenzibilizálhatóság iránti fogékonyságban életkori különbséget azonban nem tudtunk kimutatni. A pusztán intrinsic módon idősödő CE is az életkor előrehaladásával számos funkcionális, strukturális, valamint genexpressziós eltérést

rést mutat. Példaként említhető a csökkenő filaggrin, és loricrin expresszió, a növekvő TGM1 expresszió, ezzel szemben a TGM3 kismértékben csökkenő expressziója is (19, 20), ezek a változások a bőr barrier funkció általános hanyatlásának irányába mutatnak, bizonyos anyagok transzepidermális penetrációja fokozódhat. A fenti változásától függetlenül azonban egy másik fontos tényező is megjelenik: a bőr immunrendszere is „öregszik”, idősebb populációban a késői típusú túlérzékenységi reakció kiválthatósága csökken (21, 22). Kísérleteink tanúsága szerint a TGM3<sup>-/-</sup> törzsben fokozott szenzibilizációs hajlam közel azonos mértékű marad, sem növekedést, sem szignifikáns csökkenést nem mutat. Két-foton mikroszkópos méréseinkkel a haptén FITC knockout egérbőrön való eltérő penetrációját in vivo is igazolni tudtuk. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a transzglutamináz-3 enzimaktivitása is szükséges az intakt bőr barrier funkció kialakulásához, a TGM3<sup>-/-</sup> egér, akár egy új látens bőr barrier egérmodellként is szerepelhet.

#### IRODALOM

1. Candi E., Schmidt R., Melino G.: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005) 6(4), 328-340.
2. Hitomi K.: Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol.* (2005) 15(5), 313-319.
3. Eckert R. L., Sturniolo M. T., Broome A. M. és mtsai.: Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* (2005) 124(3), 481-492.
4. Kubo A., Nagao K., Amagai M.: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* (2012) 122(2), 440-447.
5. Kripke M. L., Munn C. G., Jeevan A. és mtsai.: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol.* (1990) 145(9), 2833-2838.
6. Honda T., Egawa G., Grabbe S., Kabashima K.: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* (2013) 133(2), 303-315.
7. Kuo I. H., Yoshida T., De Benedetto A., Beck L. A.: The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2013) 131(2), 266-278.
8. Sandilands A., Smith F. J., Irvine A. D., McLean W. H.: Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* (2007) 127(6), 1282-1284.
9. Furio L., Hovnanian A.: Netherton syndrome: defective kallikrein inhibition in the skin leads to skin inflammation and allergy. *Biol Chem.* (2014) 395(9), 945-958.
10. Huber M., Rettler I., Bernasconi K. és mtsai.: Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science.* (1995) 267(5197), 525-528.
11. Matsuki M., Yamashita F., Ishida-Yamamoto A. és mtsai.: Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) 95(3), 1044-1049.
12. Cassidy A. J., van Steensel M. A., Steijlen P. M. és mtsai.: A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet.* (2005) 77(6), 909-917.
13. Sárdy M., Kárpáti S., Merkl B. és mtsai.: Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med.* (2002) 195(6), 747-757.
14. John S., Thiebach L., Frie C. és mtsai.: Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PLoS One.* (2012) 7(4), e34252.
15. Dearman R. J., Kimber I.: Role of CD4(+) T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology.* (2000) 101(4), 442-51.
16. Shigeno T., Katakuse M., Fujita T. és mtsai.: Ester-induced thymic stromal lymphopoietin mediates allergic dermatitis in mice. *Immunology.* (2009) 128 (1 Suppl), e849-857.
17. Takeshita K., Yamasaki T., Akira S. és mtsai.: Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int Immunol.* (2004) 16(5), 685-695.
18. Bognar P., Nemeth I., Mayer B. és mtsai.: Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol.* (2014) 134(1), 105-111.
19. Ghadially R., Brown B. E., Sequeira-Martin S. M. és mtsai.: The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest.* (1995) 95(5), 2281-2290.
20. Rinnerthaler M., Duschl J., Steinbacher P. és mtsai.: Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Exp Dermatol.* (2013) 22(5), 329-335.
21. Vukmanovic-Stejić M., Rustin M. H., Nikolich-Zugich J., Akbar A. N.: Immune responses in the skin in old age. *Curr Opin Immunol.* (2011) 23(4), 525-531.
22. Temesvári E., González R., Marschalkó M., Horváth A.: Age dependence of diphenylcyclopropanone sensitization in patients with alopecia areata. *Contact Dermatitis.* (2004) 50(6), 381-382.

Érkezett: 2015. 01. 15.

Közlésre elfogadva: 2015. 01. 30.