

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A bőr barrier egyes aspektusainak vizsgálata

Ádám-Nagy Dorottya

Témavezető: Dr. Oláh Attila



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A BŐR BARRIER EGYES ASPEKTUSAINAK VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az *Elméleti Orvostudományok* tudományágban

Írta: Ádám-Nagy Dorottya okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Oláh Attila

Az értekezés bírálói:

Dr. Bozó Renáta, PhD
Dr. Kemény Lajos Vince, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA rendes tagja

tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA rendes tagja
Dr. Dajnoki Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A
épület tanterme, 2025. szeptember 29. 13 óra

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Kutatócsoportunk munkája során többször a középpontba kerültek a bőrben található tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatornák; többek között annak igazolása is a laboratóriumunkhoz kötődik, hogy a hőérzékeny TRPV1, -2 és -4 ioncsatornák kifejeződnek humán szebocitákon. Az értekezést megalapozó egyik kutatásunk alapjául egy nemrégiben megjelent tanulmány szolgált, melyben kollaborációs partnereink leírták, hogy a TRP szupercsalád egyik tagja, a TRPM5 ígéretes terápiás célpont lehet a nemkívánt szőrnövekedéssel járó kórképek esetében. A publikáció alapján felmerült a kérdés, hogy a csatornát célzó kezelés milyen hatással lehet a szebociták biológiai folyamatira és kell-e esetleges faggyúmirigyeket érintő mellékhatásokkal számolni, így célul tűztük ki a TRPM5 kifejeződésének és funkcionális szerepének felderítését humán szebocitákon.

Az értekezést megalapozó második közlemény alapjául szolgáló kísérleteinkben egy korábbi projektet folytattunk, és egy sokoldalú, szelektív szerotoninvisszavétel-gátló szer, a fluoxetin (FX) hatásait vizsgáltuk humán epidermális keratinocitákon. A közelmúltban publikált eredményeink azt mutatták, hogy a FX, melyet a klinikumban hosszú évek óta alkalmaznak antidepresszánsként, 14 μM -ban alkalmazva csökkenti a poliinozin-policitidilsav [p(I:C)] által kiváltott gyulladásos választ és az endotelinfelszabadulást humán epidermális keratinocitákban a foszfoinozid-3-kináz (PI3K)-útvonal közvetett gátlásán keresztül. Mivel a PI3K-útvonalnak nemcsak a gyulladásos válaszok közvetítésében van szerepe, hanem a proliferáció pozitív regulátora is, így kísérleteinkben célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a FX hatékony gyulladásgátló koncentrációja (14 μM) milyen hatással van a humán epidermális keratinociták proliferációjára, differenciálódására és barrierformálási képességére.

Az epidermisz: keratinociták és a barrier funkció

A barrier kialakításának kulcsszereplői a keratinociták, melyek az epidermisz legbelső rétegében történő proliferációjukat követően a felszín felé migrálnak, és a differenciációs folyamat során változó morfológiájukkal jellegzetes rétegelt mintázatot adnak a felhámnak. E szigorúan szabályozott folyamat során (mely végül a sejtmag elvesztéséhez és apoptózishoz vezet) a keratinociták különféle proteineket

fejeznek ki, melyek a folyamat adott fázisára jellemzőek, így ezek számunkra hasznos állapotjelző markerek. A *stratum basale* hámsejtjeire jellemző a keratin (K) 5 és 14 termelése, majd a differenciáció kezdetétől, aminek első lépéseként a sejtek a *stratum spinosum*ba migrálnak, itt pedig a K1 és a K10 mellett involucrint is kezdenek expresszálni. A *stratum granulosum*ba a keratohialin granulomokba csomagolt lorikrin és profilaggrin (melyből később filaggrin képződik) jelenléte a jellemző. A folyamat során képződő fehérjék és egyéb intermedier filamentumok biztosítják az epidermisz felsőbb rétegeinek stabilitását, és többféle sejt-sejt kapcsolat kialakításában is részt vesznek: hozzájárulnak többek között a tight junction-ök létrejöttéhez. A tight junction kialakításának fontos alappillére – a kladinok mellett – az okkludin (OCLN), mely fehérjét szintén a keratinociták differenciáltsági állapotát jellemző markerként alkalmazunk a kutatásban.

A sejtek közötti térben epidermális lipidek találhatóak, melyek a keratinociták differenciálódása során képződnek. A folyamatosan termelődő koleszterin, ceramidok, szabadzsírsavak és egyéb lipidek, a faggyúmirigyek által termelt, felszínre jutó faggyúval kiegészülve, nemcsak a korneocitákat stabilizálják, hanem további szigetelést és fizikai védelmet is nyújtanak a bőrnek.

A faggyúmirigyek és a szebociták biológiája, a lipidbarrier

A faggyúmirigyek és sejtjeik a szebociták, melyek a szébum, azaz a faggyú termeléséért felelősek, szerves részei a bőr barrier és az immunrendszer komplex működésének.

A holokrin szekrécióval képződő faggyú döntően neutrális lipideket tartalmaz. Egyedi összetételének köszönhetően a faggyúnak több fronton is szerepe van a bőr barrier fenntartásában. A szebociták immunkompetens mivoltát és az immunológiai védelemben játszott szerepét az is alátámasztja, hogy több patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptort (pl. CD14, TLR2, -4 és -6) is expresszálnak, és a gyulladásos folyamatokban is részt vesznek. Képesek különböző antimikrobiális peptidek és lipidek, valamint gyulladásos citokinek termelésére: *in vivo* és *in vitro* is leírták az interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL8) és tumornekrózis faktor (TNF)- α expresszióját szebocitákon.

A tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatorna szupercsalád és a TRPM5

A TRP-k egy heterogén, változatos funkciókkal rendelkező csoportot alkotnak, ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetek számos sejtípusában expresszálódnak. A gerincesek TRP-csatornáit szerkezeti és szekvenciahomológiájuk alapján 7 alcsaládra oszthatjuk: klasszikus vagy kanonikus (TRPC), vanilloid (TRPV), ankirin (TRPA), policisztin (TRPP), mukolipin (TRPML), „no mechanoreceptor potential C” (NOMPC vagy TRPN) és melasztatin (TRPM).

A melasztatin alcsaládot multifunkcionális kationcsatornák alkotják változatos fiziológiai jellemzőkkel; az egyes tagok több izoformában is kifejeződhetnek. Az alternatív mRNS-splicing jelentősen befolyásolja a csatornák biofizikai jellemzőit, és akár funkcionálisan nem aktív változatokat is eredményezhet. A család egyik fontos tagja a TRPM5, amely egy Ca^{2+} -aktivált ioncsatorna, ami csak a monovalens kationok (Na^+ és K^+) számára átjárható. Több TRP csatornához hasonlóan a TRPM5 is termoszenzitív, hőaktivált csatorna.

A TRPM5-nek szerepe van az ízérzékelésben, kifejeződik a légzőrendszerben, a szaglórendszer kemoszenzoros sejtjein, és az inzulinszekréciónak egyik regulátora. Emellett a csatorna aktivitása a humán hajciklusra is hatással van. A TRPM5 általánosan használt (és általunk is alkalmazott) modulátorai az antagonistá trifenilfoszfin-oxid (TPPO), valamint az aktivátor 2-heptanon (Hept) és a 2,5-dimetilpirazin (DMP).

A TRP csatornák a humán bőrben

A TRP csatornák a bőr és a bőrfüggelékek számos sejtípusában kifejeződnek, így keratinocitákban, szebocitákban, melanocitákban, érző neuronokban és szőrtüszőkben is. Szerepük a bőrben összetett és szerteágazó; a csatornák hatással lehetnek többek között a keratinocita proliferációra és differenciációra, a barrierformálásra, a szebociták lipidtermelésére, gyulladáshoz vezető folyamatokra és a szőr növekedésére is.

Munkacsoportunk már korábban is foglalkozott a szebociták és a TRP csatornák kapcsolatának kutatásával. Ennek során a TRPV1, a TRPV2, a TRPV3 és a TRPV4 expresszióját sikerült igazolni, valamint kimutattuk, hogy a TRPA1 és a TRPM8 mRNS-szintű expressziója a detekciós küszöb alatti értéket mutat az SZ95 humán szebocitákon.

A közelmúltban kollaborátoraink a TRPM5 szerepét vizsgálták a humán szőrtüszőkben. Kísérleteik során megállapították, hogy a TRPM5 kifejeződik a humán a szőrtüszőkön és homeosztatis aktivitása szerepet játszik a hajciklus növekvő (anagén) fázisának fenntartásában, így a TRPM5 ígéretes terápiás célpont lehet a nemkívánt szőrnövekedéssel, illetve akaratlan szőrvesztéssel járó kórképek kezelése során. A publikációban közzétett immunfluoreszcens képek alapján azt láthatjuk, hogy a faggyúmirigyek perifériás sejtjei is TRPM5-pozitivitást mutatnak, így felmerült, hogy a TRPM5-öt célzó terápiás beavatkozások során faggyúmirigyekhez kötődő mellékhatások is jelentkezhetnek, ezért a jelen értekezést megalapozó egyik közlemény alapjául szolgáló kísérleteinkben a TRPM5 kifejeződését és az elérhető TRPM5 modulátorok hatásait vizsgáltuk meg humán szebocitákon.

Az antidepresszáns fluoxetin (FX) bőrgyógyászati repozicionálása

A fluoxetin (FX) egy igen elterjedt szelektív szerotoninvisszavétel-gátló (SSRI) szer, amelyet antidepresszáns gyógyszerként alkalmaznak, azonban az évek alatt számos más jótékony hatására is fény derült: képes fokozni a melanintermelést, a mikrodisszektált emberi szőrtüszők repigmentációját is elősegíti, sőt, topikálisan alkalmazva a sebgyógyulásra is pozitív hatással van, melyet diabéteszes egereknél, emberek esetében pedig fertőzött sebeknél igazoltak. Ezekon túlmenően ismert az is, hogy a FX gyulladáscsökkentő és a viszketéscsillapító hatást is képes kiváltani.

A fentiek miatt munkacsoportunkat is foglalkoztatni kezdte a FX lehetséges bőrgyógyászati felhasználásának lehetősége. Közelmúltban publikált kísérleteink során a FX a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációjának (14 μ M) a hatásait vizsgáltuk tenyésztett humán epidermális keratinocitákon. Megállapítottuk, hogy ebben a koncentrációban a FX a PI3K-útvonal közvetett gátlásával jelentősen csökkenti a TLR3 aktivátor p(I:C) által indukált gyulladáshoz vezető reakciót és az endogén viszketésmediátor endotelinek felszabadulását. Ismert, hogy a PI3K jelátvitel a gyulladáshoz vezető folyamatok szabályozása mellett az epidermális keratinociták proliferációját is fokozza, ami alapján felmerült, hogy a FX hosszabb távú alkalmazása során anti-proliferatív hatást fejthet ki a humán hámsejteken, és a proliferációs/differenciációs egyensúly megváltoztatásával hatással lehet a hámsejtérés folyamatára, valamint az epidermális barrier felépülésére is.

Célkitűzés

A fentiekben kifejtett irodalmi adatok és korábbi eredményeink alapján a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Kifejeződik-e a TRPM5 funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon?
2. Milyen hatással vannak a TRPM5 modulátorok a humán szebociták biológiai folyamataira?
3. A FX ígéretes, gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μM) milyen hatással van a humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára?

Anyagok és módszerek

SZ95 humán immortalizált szebociták

Az SZ95 szebociták (*a felhasználásukat lehetővé tevő anyagátadási szerződés száma: SZ95-A 236-1*) tenyésztése során a Sebomed Basal Medium[®] tápoldatot használtuk, melyet az alábbiakkal egészítettünk ki: hővel inaktivált magzati borjú szérum (FBS), CaCl_2 , humán rekombináns epidermális növekedési faktor, amfotericin B, MycoZap[™] Plus-CL. A sejteket 37 °C-os, párasított, 5% CO_2 tartalmú inkubátorban tenyésztettük, tápoldatot kétnaponta cseréltünk rajtuk. *Az SZ95 szebociták tenyésztését Arany József, Nyitrai Tamara, Barotáné Kovács Mónika, Pető Orsolya, Tolvaj Beatrix és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

A HaCaT humán immortalizált epidermális keratinocita sejtvonal

A HaCaT keratinociták tenyésztése alacsony Ca^{2+} -tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban (DMEM) történt. A tápoldatot az alábbiakkal egészítettük ki: hőinaktivált FBS, MycoZap[™] Plus-CL és L-glutamin. A sejteket 37 °C-os, párasított, 5% CO_2 tartalmú inkubátorban tenyésztettük, kétnaponta tápoldatot cseréltünk rajtuk, majd 70-80%-os konfluencia elérésénél passzáltuk. Bizonyos kísérleteink során, mikor a sejtek elérték a 100%-os konfluenciát, a differenciáció indukálásához egy másik, magasabb Ca^{2+} -tartalmú DMEM-et használtunk tápoldatként, melyhez hőinaktivált FBS-t és MycoZap[™] Plus-CL-t adtunk

kiegészítésként. *A HaCaT keratinociták tenyésztését Volascsekné Dr. Tóth Kinga Fanni, Barotáné Kovács Mónika és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK)

A primer humán epidermális keratinocitákat (NHEK) bőrgyógyászati szempontból egészséges felnőttek egyéb okból elvégzett sebészeti beavatkozása során eltávolított bőrdarabokból izoláltuk. A bőr eltávolítása előtt az önkéntes donorok megfelelő tájékoztatását követően írásos beleegyezésüket adták a minták kutatási célra történő felhasználásához. A kísérletekre a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Nemzeti Népegészségügyi Központ jóváhagyásával (azonosítók: *61566-5/2021/EÜIG, DE RKEB/IKEB 4988-2018*), a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartása mellett került sor. A bőrmintákból izolált primer keratinocitákat megfelelően kiegészített EpiLife tápoldatban tenyésztettük. A sejteket 37 °C-os, párasított, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban tenyésztettük, kétnaponta tápoldatot cseréltünk rajtuk, majd 60-70%-os konfluencia elérésénél passzáltuk. *A sejtek izolálását és tenyésztését Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellben végzett kísérletek

A 3D tenyésztést követően a mintákból 6 µm-es paraffinos metszeteket készítettünk a további vizsgálatokhoz (hematoxilín-eozin festés, K1 és K10, valamint Ki-67 immunjelölés és lucifer yellow [LY] festékpentrációs assay). A szemikvantitatív képanalízist *ImageJ 1.51j8* szoftver segítségével 300×-os eredeti nagyítással készült képek felhasználásával végeztük. *A tenyészetek létrehozását és feldolgozását Ádám-Nagy Dorottya végezte dr. Hanna Niehues és prof. dr. Ellen van den Bogaard felügyeletével. A HE festést, a K1 és K10 jelölést, valamint a LY assay-t Ádám-Nagy Dorottya, a Ki-67 jelölést pedig dr. Pór Ágnes végezte. A LY jelölés esetén a fényképek elkészítésében dr. Szabó László nyújtott segítséget. A kiértékelést dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A reverz transzkripcióhoz előre meghatározott, egységes koncentrációra hígítottuk az RNS mintákat, majd a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

with RNase Inhibitor-t alkalmazva, a gyártói protokollnak megfelelően a mintáinkból cDNS-t készítettünk.

Az mRNS-szintű expressziót valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) 5' TaqMan™ Gene Expression Assay-k és a TaqMan™ Gene Expression Master Mix használatával a gyártói protokollt követve vizsgáltuk, a detektáláshoz Roche LightCycler 480 System készüléket használtunk. Az egyes gének relatív expresszióját a Δ CT módszert alkalmazva ezen háztartási gének génexpressziójának értékeire normalizálva vagy esetenként a $\Delta\Delta$ CT módszert követve, előbb a háztartási gén, majd a kontrollcsoport relatív expressziójára normalizálva, átlag \pm SD formában adtuk meg. *Az RT-qPCR-hoz kapcsolódó kísérleteket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Szelektív géncsendesítés kis interferáló RNS segítségével (siRNS transzfekció)

Az SZ95 szebociták szelektív géncsendesítését a gyártó protokollját követve szérumentes Opti-MEM® médiumban végeztük Lipofectamine® RNAi MAX transzfekciós reagens segítségével. A csendesítés hatékonyságát fehérjeszinten, western blottal ellenőriztük. *A szelektív géncsendesítést Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Western blot

A gélekre sávonként azonos mennyiségű (20 μ g) mintát vittünk fel, majd az elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránokra transzferáltuk. A membránokat blokkolást követően egy éjszakán át 4 °C-on TRPM5- vagy EGFR-specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk. Másnap a membránokat mostuk, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a primer antitesttel kompatibilis toma-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitesttel. Az immunreaktív sávok megjelenítéséhez kemilumineszcens SuperSignal™ West Pico PLUS, illetve SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kitet használtunk; az előhívás KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülékben történt *Kodak MI 4.0.5* szoftver segítségével. Az siRNS transzfekciókat követő western blotok során „loading” kontrollként a β -aktint használtuk. Az egyik TRPM5-specifikus antitest specificitását a gyártó által ajánlott módon blokkoló peptiddel is ellenőriztük. Amikor szükséges volt, az előhíváskor rögzített jelek szemikvantitatív

denzitometriás elemzését az *ImageJ 1.51j8* szoftver segítségével végeztük el. *A western blotot Arany József és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

RNS szekvenálás

A globális transzkriptom adatok gyűjtéséhez az mRNS könyvtár készítése során csak olyan mintákat használtunk fel, amelyek RNS integritási száma (RIN értéke) >7 volt. Az RNS-Seq-elemzés nyers adatai az NCBI SRA adatbázisában érhetőek el (azonosítók: [PRJNA1122410](#), illetve [PRJNA1037731](#)). A főkomponens analízis, valamint az útvonalelemzés a *StrandNGS* szoftver, valamint a *CytoScape v3.4* és a *ClueGo v2.3.5.* alkalmazás segítségével történt. *Az RNS mintákat Volascsekné dr. Tóth Kinga Fanni és Ádám-Nagy Dorottya készítette elő. A szekvenálást és az adatok kiértékelését dr. Póliska Szilárd végezte.*

A citokin-felszabadulás vizsgálata (ELISA)

A sejtekből történő IL-6 és IL-8 (CXCL8) felszabadulás vizsgálatához a felülúszókat a megfelelő kezelés elvégzése után 3 és 24 óra elteltével gyűjtöttük be, a detektálást BD OptEIA Kit-ek segítségével végeztük. *A kísérleteket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Foszfokináz array

A foszfokináz array-hez a Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit-et használtuk. A membránokat azonos mennyiségű fehérjével inkubáltuk. A kapott szignálokat, melyek denzitása arányos a foszforilációval, szemikvantitatív denzitometriás elemzés alá vetettük *ImageJ 1.51j8* szoftverrel. Az egyes membránokon lévő negatív referencia pontok átlag denzitását háttérintenzitásnak tekintettük, ezeket kivontuk a nyers értékekből, majd a kapott eredményeket a kontrollra normalizáltuk és $\geq 1,3$ -szoros növekedést tekintettük releváns változásnak. *A foszfokináz array-t Arany József és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

A megfelelő kezeléseket követően a sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, és 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot mértünk rájuk. Ezt követően a lemezeket 37 °C-ra helyeztük, és 2,5 órán keresztül inkubáltuk, majd eltávolítottuk a felülúszót, és MTT szolubilizáló oldat hozzáadásával, szobahőmérsékleten történő rázatással feloldottuk a kristályokat, és a kapott homogén oldat abszorbanciáját 565 nm-en

FlexStation 3 készülék segítségével mértük le. *A sejtek életképességének vizsgálatát Nyitrai Tamara, Pető Orsolya és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása (Nile Red jelölés)

A megfelelő kezeléseket követően a sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, és minden wellbe 1 µg/ml Nile Red munkaoldatot mértünk. A 30 perces inkubációt követően (37 °C-on) a fluoreszcencia intenzitást FlexStation 3 készülék segítségével mértük le. A neutrális lipideket 485 nm-es excitációs és 565 nm-es emissziós hullámhosszon, míg a polárosakat 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós hullámhosszon detektáltuk. *A Nile Red jelölést Nyitrai Tamara, Pető Orsolya és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

A proliferáció vizsgálata (CyQUANT-assay)

A keratinocitákat a proliferációs CyQUANT assay-hez fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/well denzitásban. Elvégeztük a szükséges kezeléseket, majd eltávolítottuk a felülúszót a welléből és -80 °C-ra helyeztük a plateket legalább egy éjszakára, ezzel is elősegítve a sejtek permeabilizálását. A gyártó protokollját követve elvégeztük az assay-t, majd a fluoreszcens jel intenzitását FlexStation 3 készülékkel, 480 nm-es excitációs és 520 nm-es emissziós hullámhosszt alkalmazva detektáltuk. *A CyQUANT-assay-eket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Az intracelluláris ionhomeosztázis vizsgálata

Fluoreszcens Ca²⁺-mérés (Fura-2 AM jelölés)

A sejteket 2 µM végkoncentrációjú Fura-2 AM hozzáadásával inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. A fluoreszcens jelet 340 nm-es és 380 nm-es gerjesztési hullámhosszokon, valamint 510 nm-es detektálási hullámhosszon mértük. Annak vizsgálatára, hogy a TRPM5 moduláció közvetve befolyásolja-e egy a szobocitákon is kifejeződő, Ca²⁺-ra permeábilis TRP csatorna, a TRPV4-en keresztül történő Ca²⁺-beáramlást, a mérés utolsó lépéseként egy TRPV4 agonistát (GSK1016790A) adtunk a mérőoldathoz. *A Ca²⁺-jelek mérését Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Fluoreszcens Na⁺-mérés (SBFI AM jelölés)

A sejteket 10 µM SBFI AM-mel, egy Na⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel jelöltük. A tenyészeteket a festékoldattal 37 °C-on 40 percig inkubáltuk. A

fluoreszcens jelet 37 °C-on, 340 nm-es és 380 nm-es gerjesztési hullámhosszokon, valamint 500 nm-es detektálási hullámhosszon mértük. *A Na⁺-homeosztázis vizsgálatát Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

A HaCaT keratinociták elektromos impedanciájának valós idejű mérése

A HaCaT sejtréteg elektromos impedanciájának valós idejű nyomonkövetését az xCELLigence rendszer segítségével végeztük. A teljes konfluencia elérésekor a tápoldatot differenciálódást indukáló, magas Ca²⁺ tartalmú DMEM-ra cseréltük, mely vagy 14 µM FX-t vagy azonos térfogatú oldószert (DMSO-t) tartalmazott. *A sejtek előkészítését Ádám-Nagy Dorottya, a mérést dr. Váradi Judit végezte. A kiértékelést dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését és ábrázolását GraphPad Prism 10.1.0 (316), illetve 10.2.3 (403) szoftverrel végeztük. Ha szükséges volt, a kiugró értékek azonosítása ROUT teszttel (Q=1%) történt. A minta méretétől függően az adatok eloszlását Anderson-Darling vagy Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Adataink összevetésére normál eloszlás esetén kétoldali, párosítatlan *t*-tesztet (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t, majd Šidák-féle vagy Dunnett-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) végeztünk, nem normál eloszlás esetén kétoldali Mann-Whitney tesztet (páros összehasonlítások) vagy Kruskal-Wallis-tesztet, majd Dunn-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) alkalmaztunk. A Ki-67 pozitivitás donoronkénti elemzéséhez Fisher-féle egzakt tesztet használtunk. Szignifikáns különbségnek minden esetben a $P < 0,05$ értékeket tekintettünk. *A statisztikai analízist és az ábrák elkészítését dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

Eredmények

A TRPM5 kifejeződése kétséges SZ95 szebocitákon

Kísérleteink kezdetén a prekonfluens, azaz aktívan proliferáló és posztkonfluens, azaz spontán differenciálódott szebociták segítségével meg akartunk bizonyosodni a TRPM5 faggyúmirigysejteken való jelenlétéről. Bár két különböző TRPM5-specifikus TaqMan-próbát is alkalmaztunk, az ioncsatorna mRNS-szintű expresszióját minden esetben a detekciós küszöb körülnek vagy az alattinak találtuk.

Az expressziós vizsgálatot fehérje szinten folytattuk western blot technikával. Az első kísérletsorozat során az antitest mellett egy specifikus blokkoló peptidet is alkalmaztunk. Ez a kísérlet több, aspecifikusnak tűnő sávot eredményezett, melyek többsége eltűnt, amikor az antitestet a blokkoló peptiddel együtt inkubáltuk. A megfigyelhető sávok egyike sem a gyártó által előrejelzett molekulatömegnél (nagyjából 100, illetve 72 kDa-os magasságban) jelent meg, azonban gyenge jelölődés volt látható az UniProt adatbázis által megadott molekulatömeg (≈ 132 kDa) felett valamivel, ez utóbbi sáv viszont nem tűnt el a blokkoló peptid hatására.

Mivel több, nagy valószínűséggel nem specifikus sávot figyeltünk meg, a következőkben egy másik TRPM5-ellenes antitestet is kipróbáltunk. Ebben az esetben a western blot specifikusabbnak látszó sávokat eredményezett, azonban az immunpozitivitás nem a gyártó által prediktált molekulatömegnél (≈ 100 kDa), hanem felette (≈ 110 kDa magasságában) jelentkezett. Ebben az esetben a sávok specificitását – blokkoló peptid hiányában – siRNS transzfekcióval ellenőriztük, TRPM5-specifikus siRNS konstrukttal transzfektáltuk a szebocitákat, azonban a konstruktok egyike sem volt hatékony a western blot sávok relatív optikai denzitásának csökkentésében a scrambled (SCR) kontrollhoz viszonyítva.

Mivel az eddigi eredmények alapján megkérdőjelezhető volt a jelölések specificitása, az expressziós kísérleteink utolsó lépéseként megvizsgáltuk a TRPM5 funkcionális aktivitását is a szebocitákon. Mivel a TRPM5 ioncsatorna monovalens kationokra permeábilis, így a funkcionális vizsgálat során először azt teszteltük, hogyan hatnak a TRPM5 modulátorok a sejtek Na^+ -homeosztázisára, melyhez SBFI AM-et, egy Na^+ -érzékeny fluoreszcens festéket használtunk.

MTT-assay alapján kiválasztottunk egy magas, de biztosan nem citotoxikus koncentrációt, mely mindhárom modulátor esetében $300 \mu\text{M}$ volt, és megvizsgáltuk

a Na⁺-homeosztázisra gyakorolt hatásukat. Megállapítottuk, hogy sem az aktivátorok, sem az antagonista nem okoztak mérhető változást a szebociták intracelluláris Na⁺-szintjében.

A viszonylag magas (millimoláris nagyságrendű) intracelluláris Na⁺ koncentráció miatt az SBF1 AM és a hozzá hasonló fluoreszcens festéken alapuló módszerek nem eléggé érzékenyek ahhoz, hogy a kis mértékű változásokat is megfelelően tükrözzék, ezért a TRPM5 funkcionális kifejeződését közvetett módon is ellenőriztük Fura-2 AM alapú fluoreszcens Ca²⁺ méréssel.

A TRPM5 önmagában nem permeábilis a Ca²⁺-ra, de 37 °C-on megfigyelhető a csatorna spontán aktivitása, mely egy depolarizáló Na⁺-háttéráram kialakulásához vezet, melyet a csatorna aktivátorai fokozhatnak, gátlószerei pedig csökkenthetnek. A közvetett funkcionális vizsgálat során így azt figyeltük meg, hogy ezt a hipotetikus, Na⁺ által dominált háttéráramot a TRPM5 modulálása hogyan befolyásolja, és ez milyen hatással van az intracelluláris Ca²⁺-szint változására.

Mivel a Ca²⁺-ot átteresztő TRPV4 csatorna magas szinten fejeződik ki és funkcionálisan aktív szebocitákon, így ebben a kísérletben ismét kezeltük a sejteket a TRPM5 modulátorokkal (vagy térfogatazonos oldószerrel), ezt követően pedig egy ultrapotens, szelektív TRPV4 agonistát (GSK1016790A; 50 nM) adtunk hozzá a rendszerhez. A Fura-2 AM-mel végzett kísérlet során azt láttuk, hogy egyik TRPM5-modulátor sem befolyásolta a specifikus TRPV4-agonista GSK1016790A által kiváltott Ca²⁺-beáramlást, mely eredmény összhangban van az intracelluláris Na⁺-szint mérések esetén észleltekkkel.

A funkcionalitást célzó ionmérési vizsgálatok, az RT-qPCR, a western blot és az siRNS mediált transzfekció együttesen azt igazolják, hogy a szőrtüszőkkel ellentétben a humán szebociták nem fejeznek ki funkcionálisan aktív TRPM5-öt, illetve ha expresszálják is, a vizsgált modulátorok nem képesek mérhető mértékben befolyásolni a csatorna működését.

A TRPM5 antagonista TPPO fokozza a humán szebociták lipogenezisét és befolyásolja a sejtek immunfenotípusát

Eddigi adataink alapján megállapítható, hogy a TRPM5 funkcionális expressziója a humán szebocitákon valószínűtlen, így a szőrtüszőkön kifejeződő csatorna modulálása valóban szelektív TRPM5-modulátorokkal nem okozhat

faggyúmirigyekhez köthető mellékhatásokat. Ugyanakkor mindig előfordulhat, hogy az eredetileg egy adott célpontra specifikusnak gondolt szerről később kiderül, hogy nem szelektív; ezért le akartuk ellenőrizni, hogy azok a TRPM5-modulátorok, amelyekről kimutatták, hogy befolyásolják a hajciklust, hatással vannak-e a humán szebocitákra.

Ennek megfelelően a következő célunk az volt, hogy feltárjuk a TRPM5 antagonistá TPPO és egy választott aktivátor hatásait. Mivel a szőrtüszők vizsgálatánál az anagén fázis meghosszabbításában az aktivátorok közül a DMP hatékonyabbnak bizonyult, mint a Hept, így további kísérleteinkben a TPPO mellett – többnyire - a DMP használata mellett döntöttünk.

Első lépésként megerősítettük az MTT-assay során látott viabilitási adatainkat Nile Red jelölés segítségével is, melyhez a poláros, azaz membránlipidekből származó fluoreszcencia intenzitást használtuk, mivel az így kapott jel arányos a sejtszámmal. A 24 és 48 órás Nile Red mérés kimutatta, hogy 300 μM -ig a TPPO és a DMP csak elhanyagolható mértékben befolyásolták a sejtszámmal korreláló poláris lipidek szintjét, de 1000 μM -os koncentrációban a TPPO jelentősen csökkentette azt. Így kijelenthető, hogy mind a TPPO, mind a DMP biztonsággal, a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható 300 μM -os koncentrációig.

A modulátorok faggyúlipidekre gyakorolt hatásának kimutatásához ismét a Nile Red-jelölést használtuk, de ezúttal a neutrális lipidek szintjét vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a DMP nem befolyásolta, míg a TPPO 24 és 48 órás kezelése során jelentősen és koncentrációfüggő módon növelte a szebociták lipidszintézisét. Ezt egyik TRPM5-aktivátor sem tudta kivédeni, ami (korábbi expressziós adatainkkal összhangban) ismét arra utal, hogy a hatás TRPM5-független módon alakult ki.

A következő kérdés, amelyre a TPPO hatásával kapcsolatban a választ kerestük az volt, hogy hatékony lipogén koncentrációja hogyan befolyásolja a szebociták immunfenotípusát. A választ 3 és 24 órás TPPO-kezelést követően elvégzett RT-qPCR és ELISA kísérleteink adták meg. A TPPO gyulladáscsökkentő citokinek expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy szignifikáns mértékben növelni tudta az IL-6 mRNS-szintű kifejeződését, az IL-1 α és IL-1 β kifejeződését differenciáltan befolyásolta, az IL-8 esetében pedig nem

okozott szignifikáns eltérést. Ezzel párhuzamosan az RT-qPCR során tesztelt tényezetek felülűszójából megvizsgáltuk a TPPO citokin-felszabadulásra gyakorolt hatását is. Azt tapasztaltuk, hogy a TPPO nem befolyásolta szignifikáns mértékben az IL-6 (3 és 24 óra), illetve az IL-8 (3 óra) felszabadulását, viszont a 24 órás kezelések során jelentősen csökkentette az IL-8-szintet.

Az Akt és az EGFR aktiválása részt vesz a TPPO lipogén hatásának közvetítésében

A TPPO hatásainak a közvetítésében résztvevő jelátviteli utak azonosítására foszfokináz array-t alkalmaztunk, mely lehetővé teszi, hogy egyidejűleg több releváns jelátviteli utat is vizsgálni tudjunk.

A kísérlet során 10, 30 és 60 perces kezelést követően a TPPO 300 μ M-os koncentrációjának hatását vizsgáltuk. A rövidtávú kezelések több „akne-releváns” jelátviteli molekula foszforilációját is időfüggő módon növelték, így egyebek mellett fokozódott az Akt, a p38 α mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és a p38 α MAPK down-stream molekulájaként is funkcionáló hősokk protein (HSP)-27 foszforilációja is.

A fenti útvonalak gátlására GSK690693-at (Akt), tyrphostin AG 1478-at (EGFR), neflamapimodot (Nefl; p38 α MAPK), valamint J2-t (HSP27) használtunk. Ezen gátlószerek alkalmazásával kimutattuk, hogy az Akt, az EGFR és a p38 α MAPK gátlása jelentősen csökkenti a TPPO által kiváltott lipogenezist (Nile Red jelölés). A poláros lipidek szintjének ellenőrzésekor bizonyítást nyert, hogy az Akt-inhibitor GSK690693 és az EGFR-antagonista tyrphostin AG nem befolyásolta a sejtszámmal arányos poláros lipidek szintjét, tehát az Akt és az EGFR gátlása nagy valószínűséggel valóban az egyedi sejtek TPPO-indukálta faggyúlipid-termelését gátolta. Ezzel szemben a p38 α MAPK-gátló Nefl szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkentette a poláros lipidekből származó fluoreszcens jelet, ami arra utalt, hogy a liposztatikus hatás nagy valószínűséggel csak látszólagos volt, és valójában a sejtszám csökkenése okozta. Ezzel összhangban, amikor a p38 α MAPK down-stream effektoraként (is) funkcionáló HSP27-et gátoltuk, a TPPO lipogén hatásának mérséklődése mellett a poláris lipidek szintjének jelentős, koncentrációfüggő csökkentését figyeltük meg.

Kísérleteink következő lépéseként az EGFR szerepét siRNS-transzfekeció segítségével is megvizsgáltuk. Az előzetes kísérletek alapján kiválasztott siRNS konstrukt a transzfekeció utáni 4. napon szignifikánsan csökkentette az EGFR expresszióját, a géncsendesítés pedig (az EGFR antagonistával nyert eredményekkel összhangban) lényegében teljesen kivédte a TPPO lipogén hatását.

A TPPO által indukált IL-6 up-reguláció független a lipogén Akt-jelátviteltől, és valószínűleg az EGFR és a p38 α MAPK útvonalak közvetítik

Az inhibitorok leghatásosabb liposztikus koncentrációinak (Nefl: 1 μ M, GSK690693: 10 μ M, tyrphostin AG: 10 μ M) segítségével megvizsgáltuk a már említett jelátviteli útvonalak szerepét a TPPO indukálta IL-6 up-regulációban is. Megállapítottuk, hogy a Nefl, illetve tyrphostin AG alkalmazása szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni a TPPO által kiváltott IL-6 up-regulációt, míg az Akt-gátló GSK690693 nem befolyásolta azt. Eredményeink az jelentik, hogy a TPPO-indukált IL-6 up-reguláció valószínűleg független a lipogén Akt-jelátviteltől, és inkább az EGFR és a p38 α MAPK aktivációjának eredményeként alakulhat ki.

Az RNS-Seq elemzés eredményei arra utalnak, hogy a TPPO jelentősen befolyásolja a humán szebociták immunfenotípusát, és hatással van számos potenciálisan „akne-releváns” célgén kifejeződésére

Hogy mélyebb betekintést kapjunk a TPPO hatásának mechanizmusába, az SZ95 szebocitákat 24 órás kezelésnek vetettük alá: a sejteket 300 μ M TPPO-val vagy kontrollként oldószerrel kezeltük, majd a begyűjtött mintákat RNS szekvenálással elemeztük. Fontos kiemelni, hogy az RT-qPCR eredményeinkkel összhangban, mely során sem a pre-, sem a posztkonfluens szebocitákban nem volt detektálható a csatorna mRNS-szintű expressziója, a szekvenálás során sem jelent meg a vizsgált mintákban TRPM5-specifikus szekvencia, ami ismét amellet szól, hogy a humán faggyúmirigysejtek valóban nem expresszálják a csatornát.

A szekvenálást követő „GO:molekuláris funkció” útvonal adatbázisának használatával, a szignifikánsan ($\geq 1,5$ -szeres változás [„fold-change”], $P < 0,05$) up-, illetve down-regulálódó gének felhasználásával végezett elemzés kimutatta, hogy a TPPO-kezelés számos „szebocita-releváns” útvonalat is modulált, többek között a

„CXCR kemokin receptor kötődés”-t, az „acilglicerín-O-aciltranszferáz aktivitás”-t, és az „inzulinszerű növekedési faktor kötődés”-t.

Mivel az inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor (IGF-1R) a faggyúmirigyek lipogenezisének egyik ismert pozitív regulátora és a sebociták Akt szignalizációjának egyik lehetséges up-stream szabályozója, a fenti elemzés ismeretében felmerült annak a lehetősége, hogy a TPPO közvetlenül vagy közvetve aktiválhatja az IGF-1R-t, és ez lehet felelős a lipogén hatás kialakulásáért. A kérdés eldöntésére Nile Red jelölést alkalmaztunk. Eredményeink alapján az IGF-1R antagonistá AG1024 nem befolyásolta a TPPO által fokozott faggyúlipid-termelést, ami azt jelzi, hogy az IGF-1R valószínűleg nem célpontja a TPPO-nak.

A fentiekén túl, az analízis számos olyan fontos célgént is azonosított, melyekre a TPPO szignifikáns ($\geq 1,5$ -szeres változás [„fold-change”], $P < 0,05$) hatással volt. Csökkentette több, „akne-releváns”, gyulladásos és egyéb molekula expresszióját is, többek között a kolóniastimuláló faktor 2 (CSF2, más néven granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor [GM-CSF]), C-X-C motívumú kemokin ligand 1 (CXCL-1, más néven GRO- α), CXCL2, CXCL6, IL-32, NFKB inhibitor α (NFKBIA), tumornekrózis faktor szupercsalád 15-ös tag (TNFSF15), mátrix metalloproteináz 9 (MMP9), illetve az ATP-kötő kazetta A alcsalád 1-es tag (ABCA1), míg növelte a diacilglicerín O-aciltranszferáz 2 (DGAT2) expresszióját.

Mivel az ABCA1^{-/-} egereknél nagyobb faggyúmirigyeket és a bőrben magasabb szabad koleszterinszintet mutattak ki, illetve a DGAT2-ről ismert, hogy a triglicerid szintézis egyik kulcsenzime, így a következőkben 24 órás kezeléseket követően azt vizsgáltuk, hogy az Akt-, a p38 α MAPK-, illetve az EGFR-útvonal aktiválásának van-e szerepe az ABCA1 down-regulációjában, illetve a DGAT2 up-regulációjában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a TPPO valóban képes volt a DGAT2 expresszióját fokozni az ABCA1 expresszióját pedig csökkenteni 24 órás kezelést követően. A 300 μ M TPPO ABCA1-ra kifejtett hatását egyik gátlószer sem befolyásolta. Ezzel szemben a DGAT2 up-regulációját az Akt-inhibitor GSK690693 (10 μ M) kivédte, míg a p38 α MAPK (Nefl; 1 μ M) és az EGFR (tyrphostin AG; 10 μ M) gátlása nem befolyásolta.

Eredményeink alapján tehát a TPPO által indukált lipogenezis nagy valószínűséggel a DGAT2 Akt-függő up-regulációja és az EGFR-aktivációja

következtében alakul ki, amihez hozzájárulhat az ABCA1 (Akt-, p38 MAPK- és EGFR-független) down-regulációja is.

A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja gátolja az epidermális keratinociták proliferációját

A proliferációs vizsgálatokhoz először CyQUANT-assay-t alkalmaztunk, mely során a hagyományos „2D” keratinocita kultúrákat oldószerrel, illetve 14 μ M FX-nel kezeltük. A HaCaT humán immortalizált keratinociták esetében látható volt, hogy a FX kezelés gátolta a sejtek proliferációját 48 órás kezelést követően, és ez a hatás reprodukálható volt primer sejtek esetében is: az antiproliferatív hatást NHEK tenyészetek esetében 48 és 72 órás kezelést követően is megfigyeltük.

Következő lépésként a HaCaT és NHEK esetében látott antiproliferatív hatást egy „*in vivo-szerűbb*” modellrendszerben (3D rekonstruált humán epidermisz-ekvivalens) is ellenőriztük. Tenyészetünket 48 órás FX kezelésnek (14 μ M) vetettük alá. A mintafeldolgozást követően elsőként Ki-67 immunjelölést alkalmaztunk, hiszen, mint ismert, a Ki-67 nukleáris megjelenése a sejtproliferáció jellemző, széleskörben alkalmazott, megbízható markere.

Azt tapasztaltuk, hogy a FX egyértelműen csökkentette a Ki-67+ (proliferáló) sejtek arányát, a hatás azonban (a Ki-67+ sejtmagok arányának kontrollcsoportban tapasztalható erős donorfüggése miatt) nem volt statisztikailag szignifikáns ($P=0,0554$). A fenti donorfüggés kiküszöbölésére a vizsgálatainkat az egyes donorok szintjén végzett a Fisher-féle egzakt teszt segítségével folytattuk. Az elemzés kimutatta, hogy a FX hatása a proliferáló (Ki-67+) és a nem proliferáló (Ki-67-) sejtek számára mindhárom donor esetében szignifikáns volt ($P=0,0016$, $P<0,0001$ és $P=0,0001$), így eredményeink arra utalnak, hogy a FX hatékony gyulladásgátló koncentrációja (véltetőleg a pro-proliferatív PI3K útvonal indirekt gátlása révén) hosszabb távú kezelése során valóban csökkenti a hámsejtek proliferációját.

A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja nem befolyásolja jelentősen a humán epidermális keratinociták differenciálódását és barrierformáló képességét

A proliferációs vizsgálatokat követően azt is megvizsgáltuk, hogy a FX gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μ M) miként befolyásolja az epidermális keratinociták differenciációját és ezen keresztül a barrierformáló képességüket.

A 3D modell ismételt felhasználásával először az epidermális sejtrétegek vastagságának alakulását vizsgáltuk FX kezelést követően hematoxin-eozin (HE) festés segítségével. Az metszetekről készült felvételek felhasználásával képanalízist végeztünk. A hisztomorfometriai elemzés azt mutatta, hogy a FX kezelés nem okozott szignifikáns változást az epidermisz rétegeinek vastagságában.

Hogy mélyebb betekintést nyerjünk a FX hatásaiba, RNS szekvenálást végeztünk prekonfluens, azaz aktívan proliferáló, valamint differenciálódó HaCaT keratinocitákon, amelyeket a posztkonfluens állapot elérése után magas Ca^{2+} -tartalmú tápoldatban 24 órán keresztül oldószer, illetve FX (14 μM) kezelésnek vetettünk alá. Amint azt a főkomponens-elemzés kimutatta, a FX-nek nem volt jelentős hatása a génexpressziós mintázat sejtek differenciációjával összefüggő változásaira, mivel az oldószerrel és a FX-nel kezelt csoportok a minták közötti összes különbség 85,7%-áért felelős 1. főkomponens alapján lényegében nem különböztek egymástól.

A fentiekkel összhangban megállapítottuk azt is, hogy viszonylag alacsony volt azoknak a géneknek a száma, amelyeket a FX szignifikánsan (≥ 2 -szeres változás [„fold-change”], $P < 0,05$) up- (46 gén) vagy down-regulált (38 gén). Ezzel együtt az elvégzett útvonalelemzés a FX által jelentősen szabályozott útvonalként azonosította a „mitotikus sejtciklus folyamat”-ot, megerősítve azt a megfigyelést, hogy a FX potens gyulladásgátló koncentrációja hosszabb távú kezelések során a keratinocitákat egy kevésbé proliferatív fenotípus irányába hangolhatja. Összességében tehát adataink amellet szölktek, hogy a FX gyulladáscsökkentő és lehetséges viszketéscsillapító hatása hosszabb (48-72 órás) időskálán antiproliferatív aktivitással járhat együtt.

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a FX miként befolyásolja a keratinociták differenciációját, ezért primer keratinociták felhasználásával megvizsgáltuk két, a kísérletes bőrgyógyászati kutatásokban széles körben használt korai differenciációs marker, a K1 és a K10 expresszójának változásait. Három NHEK donorból prekonfluens (proliferáló) és posztkonfluens tenyészeteket készítettünk, amelyeket a megfelelő konfluencia elérésekor a differenciáció elősegítése érdekében magas Ca^{2+} -tartalmú oldatban kezeltünk oldószerrel, illetve 14 μM FX-nel 24 órán keresztül. Az mRNS-szintű vizsgálatból látható, hogy a

differenciáltatott kontrollhoz viszonyítva a FX kezelés nem csökkentette a K1 és a K10 differenciáció által indukált up-regulációját.

Annak érdekében, hogy az RT-qPCR során látottakat fehérje szinten is megvizsgáljuk, a már korábban is alkalmazott 3D modellen szemikvantitatív immunhisztomorfometriával meghatároztuk a K1 és a K10 expresszióját. A szövettani metszeteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 48 órás FX-kezelés nem változtatta meg jelentősen egyik keratin kifejeződését sem. Ez az eredmény (összhangban az eddig bemutatottakkal) azt erősíti meg, hogy a FX a hatásos gyulladáscsökkentő koncentrációjában (14 μM) alkalmazva nem befolyásolja jelentősen az epidermális differenciálódást.

Az epidermális differenciálódást és ezzel a fizikokémiai barrier kiépülését a K1 és a K10 mellett számos egyéb markerrel is nyomon lehet követni. Ezen markerek közé tartozik az OCLN is, amely a *stratum corneum* alatt, a *stratum granulosum*ban járul hozzá a tight junction barrier kialakításához. Az OCLN kifejeződését vizsgálva megállapítottuk, hogy a FX nem csökkentette a molekula differenciáció-indukálta up-regulációját primer humán epidermális keratinociták esetén.

Kísérleteink zárásaként a barrier funkcionális vizsgálatát végeztük el két modellrendszerben. Elsőként az elektromos impedancia valós idejű monitorozásával figyeltük meg a FX hatását a HaCaT keratinociták barrierformáló képességére. Az adatok elemzése során kiderült, hogy a FX-kezelés nem változtatta meg a megnövelt Ca^{2+} -szint által kiváltott, a differenciációval összefüggő jelemelkedést. Az epidermális barrier integritásának ellenőrzésére LY assay-t is alkalmaztunk. A topikálisan alkalmazott LY egyetlen donor esetén sem terjedt be a *stratum corneum* alá a kezelések hatására, ami arra utal, hogy az epidermisz szerkezete a FX-expozíciót követően is megtartott maradt. Adataink alapján tehát arra következtethetünk, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja valószínűleg nem befolyásolja érdemben a humán epidermális keratinociták differenciálódását és barrierformáló képességét, viszont gyulladáscsökkentő és lehetséges viszketéscsillapító hatása hosszabb időskálán antiproliferatív hatással járhat együtt.

Megbeszélés

A bőr összetett védelmi vonalként működik, megóvva a szervezetet a különböző külső hatásoktól, ártalmaktól, illetve a kórokozó mikroorganizmusoktól. Ezt a védelmet fizikai-kémiai, mikrobiológiai és immunológiai barriersek segítségével, illetve ezen barrierkomponensek szoros együttműködésével biztosítja. A bőr barrier ép szerkezete és megfelelő működése elengedhetetlen, mivel sérülése – például az epidermális keratinociták differenciációjának vagy a szebociták működésének zavara – hozzájárulhat olyan komplex patomechanizmusú betegségek kialakulásához, mint az atópiás dermatitisz vagy a pikkelysömör.

A TRP ioncsatorna szupercsalád tagjai a bőr számos sejttypusában kifejeződnek, ahol összetett szabályozó funkciót látnak el. Nem jelentenek kivételt ezalól a faggyúmirigy sejtjei sem. Az elmúlt években számos TRP csatornáról derült ki, hogy kifejeződik a humán szebocitákon, ezek közül a főleg Ca^{2+} -ra permeábilis TRPV1, TRPV3 és TRPV4 negatív szabályozói a faggyúmirigyek lipogenezisének, a TRPV3 pedig emellett jelentős pro-inflammatórikus hatással is bír.

Egy a közelmúltban megjelent publikációban leírták, hogy a TRP család egy másik tagja, a TRPM5 is jelen lehet a humán faggyúmirigyeken. A TRPM5 egy Ca^{2+} -aktivált, de monovalens kationokra permeábilis csatorna, mely az említett közlemény alapján a hajciklus hatékony pro-anagén szabályozója, így ígéretes terápiás célpont lehet különböző szőrnövekedési rendellenességekben. Anatómiai elhelyezkedésükből adódóan a szőrtüszők TRPM5 csatornáját célzó kezelések hatással lehetnek a szomszédos faggyúmirigyek biológiájára is, ami nem kívánt mellékhatások kialakulásához vezethet, így célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a TRPM5 expresszióját és a csatorna modulálásnak hatását a humán szebociták esetében. Jelen értekezés első fele az erre irányuló kísérleteket foglalja össze.

Kísérleteink során az SZ95 humán immortalizált sejt vonalat használtuk, mely a faggyúmirigysejtek egyik legjobb *in vitro* modellrendszere, a TRPM5 modulálására pedig az antagonistá TPPO-t és két aktivátort, a Hept-t és a DMP-t alkalmaztuk. Első lépésként több komplementer kísérletes megközelítést alkalmazva kimutattuk, hogy a TRPM5 valószínűleg nem expresszálódik funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon.

Valóban; bár két különböző TRPM5-specifikus TaqMan assay-t is teszteltünk, a csatorna mRNS-szintű kifejeződését nem tudtuk meggyőzően kimutatni, és ezzel összhangban a később elvégzett RNS szekvenálás során sem sikerült TRPM5-specifikus szekvenciát detektálnunk a mintákban ([PRJNA1037731](#)). Hasonlóképpen, bár a western blotok során két különböző TRPM5-specifikus antitestet is kipróbáltunk, egyik sem eredményezett specifikus sávokat a gyártók által jelzett, valamint az UniProt adatbázisban megadott molekulatömegnél; ráadásul a TRPM5 siRNS transzfekcióval mediált géncsendesítése sem változtatta meg szignifikánsan a feltételezett TRPM5-specifikus sávok optikai denzitását, és funkcionális méréseink alapján a TRPM5-modulátorok nem befolyásolták a szebociták Na^+ -, illetve Ca^{2+} -homeosztázisát.

Bár a fentebb bemutatott eredményeink alapján a csatorna valószínűleg nincs jelen funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon, úgy döntöttünk, hogy folytatjuk kísérleteinket, és megvizsgáljuk, hogy a TRPM5-szelektívnek gondolt modulátorok kiváltanak-e TRPM5-független, nem-specifikus hatásokat ezeken sejteken. Mivel a szórtüszők vizsgálatánál az anagén fázis meghosszabbításában a DMP felülmúlta a Hept hatékonyságát, így további kísérleteinkben az antagonistá TPPO mellett a TRPM5-aktivátorok közül a DMP-t részesítettük előnyben.

Munkánkat a szebociták egyik legmeghatározóbb jellemzőjének, a lipidtermelésnek a vizsgálatával folytattuk. A Nile Red jelölés során a sejtszámmal korreláló poláros lipidek fluoreszcens jele megerősítette az MTT-assay során is látottakat: a vizsgált modulátorok 300 μM -ig teljes biztonsággal alkalmazhatóak a citotoxicitás veszélye nélkül. A neutrális (faggyú-) lipidek detektálása során pedig adataink azt mutatták, hogy a DMP 1000 μM koncentrációig nem volt hatással a lipogenezisre, míg a TPPO nem citotoxikus koncentrációi dózisfüggően fokozták a sejtek lipidtermelését a 24 és 48 órás kezelések során; ráadásul sem a DMP, sem a Hept (mindkettő 100 μM -os koncentrációban alkalmazva) nem tudta csökkenteni ezt a hatást, megerősítve, hogy valóban TRPM5-független módon alakult ki.

A TPPO hatékony lipogén koncentrációja (300 μM) differenciálisan befolyásolta a szebociták citokinprofilját: a 3 és 24 órás kezelést követő RT-qPCR-ok során időfüggő hatást láttunk az IL-1 α és az IL-1 β expressziója esetében, míg a TPPO az IL-6 kifejeződését up-regulálta, az IL-8-ét pedig nem befolyásolta

szignifikáns mértékben. Érdekes módon az IL-6 felszabadulásban is megmutatkozott az expressziónál látott tendencia, de ebben az esetben a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns, az IL-8 felszabadulását pedig a 24 órás TPPO kezelés szignifikánsan csökkentette. Ezen adatok összességében arra utalnak, hogy a TPPO hatása az immunfenotípusra komplex formában mutatkozik meg, melyet kiegészítenek az RNS szekvenálás során nyert adataink. A TPPO lipogén koncentrációja ugyanis jelentősen csökkentette több releváns gyulladáscsökkentő molekula expresszióját, többek között a CSF2 (GM-CSF), CXCL-1 (GRO- α), CXCL2, CXCL6, IL-32, NFKBIA, TNFSF15 és MMP9 kifejeződését. Mivel ezen hatások többsége (valamint az IL-8 felszabadulás csökkenése) összességében inkább gyulladáscsökkentőnek tűnik, adataink felvetik annak lehetőségét, hogy a faggyútermelés mérsékelt emelése és dominánsan gyulladáscsökkentő hatása révén a TPPO (vagy még inkább a TPPO biztonságos funkcionális analógjai) jótékony hatást fejthetnek ki a gyulladással és bőrszárazsággal kísért kórképekben.

A továbbiakban a célunk az eddig látott hatások mechanizmusának felderítésre volt, melyhez elsőként foszfokináz array-t alkalmaztunk, ahol a TPPO korábban is alkalmazott hatékony lipogén koncentrációját (300 μ M) vizsgáltuk rövid távú kezeléseket (10, 30 és 60 perc) követően. Az array kiértékelése során azt figyeltük meg, hogy a TPPO időfüggő módon volt képes modulálni számos releváns jelátviteli molekula, pl. az Akt, az EGFR és a p38 α MAPK, valamint a p38 α MAPK downstream effektoraként is működő HSP27 foszforiláltságát.

A foszfokináz array alapján kiválasztott szelektív farmakológiai inhibitorokkal kimutattuk, hogy a TPPO lipogén hatása valószínűleg az Akt és az EGFR útvonalak aktiválásához kapcsolható, hiszen gátlószerek, a GSK690693 és a tyrphostin AG, képesek volt csökkenteni a TPPO által indukált faggyúlipid-termelést. Érdekes módon a p38 α MAPK- és a HSP27-inhibitorok (a Nefl és a J2) szintén csökkentették a faggyúlipidek szintjét, azonban liposztatikus hatásuk hátterében valószínűleg nem az egyedi sejtek lipidtermelésének mérséklődése, hanem a sejtek számának csökkenése állt. Ezzel szemben az Akt és az EGFR farmakológiai blokkolásakor tisztán liposztatikus hatást figyeltünk meg. Az EGFR részvételét siRNS-transzfekció által mediált szelektív géncsendesítés segítségével is megerősítettük.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a fenti szignalizációs útvonalaknak milyen szerepe van a TPPO által indukált IL-6 up-regulációban. Azt találtuk, hogy az Akt valószínűleg nem vesz részt a folyamatban, viszont a p38 α MAPK és az EGFR jelátvitelnek szerepe van benne, ugyanis gátlószereik (a Nefl és a tyrphostin AG) visszafordították a citokin expressziójának TPPO-indukált fokozódását.

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést kapjunk a TPPO biológiai hatásaiba, RNS szekvenálást végeztük, mely során összevetettük a 24 órán át oldószerrel, illetve 300 μ M TPPO-val kezelt humán szebociták transzkriptomját. Az analízis feltárta, hogy több releváns jelátviteli útvonalra (pl. „*inzulinszerű növekedési faktor kötődés*”) is jelentős hatással volt a TPPO-kezelés. Mivel az IGF-1-ről ismert, hogy az Akt jelátvitel szabályozásán keresztül serkenti a szebociták faggyúlipid-termelését, így felmerült annak a lehetősége is, hogy a TPPO közvetlenül vagy közvetve aktiválhatja az IGF-1R-t. A kérdés eldöntésére egy újabb Nile Red-jelölést alkalmaztunk, és kimutattuk, hogy az IGF-1R valószínűleg nem célpontja a TPPO-nak, az IGF-1R antagonistá AG1024 ugyanis nem befolyásolta a TPPO lipogén hatását.

Az RNS szekvenálás során a már említetteken túl két olyan lehetséges szabályozó molekulát is azonosítottunk, melyek szerepet játszhattak a TPPO lipogén hatásának kialakításában, a TPPO ugyanis jelentősen down-regulálta az ABCA1-et, és up-regulálta a DGAT2-t. Mivel a szakirodalmi adatok alapján ezek ígéretes célmolekuláknak tűntek – az ABCA1^{-/-} egereknél nagyobb faggyúmirigyeket és a bőrben magasabb szabadkoleszterin-szintet mutattak ki, míg a DGAT2-ről ismert, hogy a triglicerid szintézis egyik kulcsenzime – így a következőkben azt a kérdést tettük fel, hogy az Akt, a p38 α MAPK vagy az EGFR-útvonalnak az aktiválása szerepet játszik-e az ABCA1 le-, illetve a DGAT2 felszabályozásában. Eredményeink alapján elmondható, hogy az ABCA1 down-regulációját nem befolyásolta a fenti útvonalak gátlása, mivel egyik inhibitor sem ellensúlyozta a TPPO hatását, míg a DGAT2 up-regulációja kifejezetten az Akt-aktivitáshoz kapcsolható, hiszen a GSK690693 képes volt a TPPO-indukált expressziófokozódást visszafordítani. Mindez azt is jelenti, hogy – bár az EGFR szignalizáció elméletileg mind az Akt, mind a p38 α MAPK útvonalak aktiválásában szerepet játszhat –

esetünkben az Akt útvonal aktiválódása nagy valószínűséggel az EGFR-től függetlenül történt.

Adataink tehát amellettszólnak, hogy a valóban specifikus TRPM5 modulátorok használata valószínűleg közvetlen módon nem eredményez majd a faggyúmirigyekkel kapcsolatos mellékhatásokat, de a TPPO a TRPM5-től független módon kedvezően befolyásolhatja a faggyúmirigyek biológiai folyamatait. Adataink alapján felvetik a TPPO (vagy még inkább a biztonságos funkcionális TPPO analógok) alkalmazásának lehetőségét a gyulladásal és bőrszárazsággal kísért kórképek kezelésében.

Az értekezés második felében egy leginkább antidepresszánsként ismert szer, a FX humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban alkalmazva erős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki tenyésztett humán epidermális keratinocitákon, és a PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül csökkentette a viszketésmediátor endotelinek TLR3 aktivátor p(I:C) által indukált felszabadulását is. A PI3K-szignalizáció az epidermális keratinociták proliferációjának pozitív szabályozója, és fontos szerepet játszik pikkelysömörben a lézionális keratinociták proliferációjának fokozásában.

Mivel a keratinociták proliferációs-differenciációs egyensúlyát érintő hatások károsíthatják az epidermális barriert és ezzel különféle mellékhatások megjelenéséhez vezethetnek, jelen kísérletsorozatban azt kívántuk feltárni, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μM) miként befolyásolja a humán epidermális keratinociták proliferációját és differenciációját hosszabb távú (48 és 72 órás) kezelések során.

Első lépésként CyQUANT proliferációs assay segítségével megvizsgáltuk, hogy a 14 μM -ban alkalmazott FX miként befolyásolja a HaCaT keratinociták sejtszámát. Azt tapasztaltuk, hogy 48 órás kezelést követően a farmakon csökkentette a sejtek proliferációját, mely hatás reprodukálható volt primer hámsejtek felhasználásával is.

A látottak klinikai relevanciájának megerősítésére 3D epidermisz-ekvivalens kultúrákat 48 órás FX kezelésnek vetettünk alá, majd a mintafeldolgozást követően Ki-67 jelölést alkalmaztunk, mely a proliferáló sejtek egy jellemző markere. Bár a

Ki-67+ sejtmagok arányának kontrollcsoporton belüli erőteljes donorfüggése miatt a hatás minimálisan a szignifikancia határ alatt maradt ($P=0,0554$), azt találtuk, hogy a FX mindhárom donorban látványosan csökkentette a Ki-67+ sejtek arányát. Ezzel összhangban az egyes donorok szintjén végzett Fisher-féle egzakt teszt kimutatta, hogy a FX hatása mindhárom donor esetében erősen szignifikáns volt. Adataink tehát amellet szoltak, hogy a FX gyulladást és viszketést csökkentő hatása egy hosszabb idóskálán antiproliferatív aktivitással társulhat.

A következókben azt vizsgáltuk meg, hogy a FX milyen hatással van az epidermális keratinociták differenciációjára és ezáltal a sejtek barrierformáló képességére. Bár a FX-kezelt 3D modelleken a hematoxilin-eozin festés elemzése nem mutatott ki semmilyen változást az epidermisz vastagságában, mélyebb betekintést szeretttünk volna nyerni az FX hatásaiba, ezért RNS szekvenálást végeztünk. A szekvenálás során három csoportból származó RNS mintát elemeztünk: prekonfluens (azaz aktívan proliferáló), valamint posztkonfluens, differenciálódó HaCaT keratinocitákat, amelyeket 14 μM FX-nel vagy annak oldószerevel kezeltünk magas Ca^{2+} -tartalmú közegben („ Ca^{2+} -switch”) 24 órán keresztül a konfluencia elérése után.

A főkomponens elemzés kimutatta, hogy a FX-kezelésnek nem volt jelentős hatása a génextpressziós mintázat differenciációval összefüggő megváltozására, hiszen a posztkonfluens tenyészetek esetében az oldószerevel, illetve FX-nel kezelt csoportok lényegében nem különböztek egymástól az összes különbség 85,7%-áért felelős 1. főkomponens szerint. Ezt erősíti az is, hogy alacsony volt azoknak a géneknek a száma, amelyeket a FX szignifikáns mértékben (≥ 2 -szeres változás [„fold-change”], $P < 0,05$) szabályozott bármelyik irányba: csupán 46 up-, illetve 38 down-regulált gén felelt meg a fenti kritériumoknak. Érdekes módon azonban - a korábban tárgyalt proliferációs eredményeket kiegészítve és egyben indirekten meg is erősítve - az útvonalelemzés során azt találtuk, hogy a „mitotikus sejtciklus folyamat”-ra a FX jelentős hatást fejtett ki, ami amellet szól, hogy a FX-kezelés valóban befolyásolja a keratinociták proliferációját.

A folytatásban korai differenciációs markerek (K1 és K10) mRNS-szintű expresszióját vizsgáltuk három különböző donorból származó primer keratinocita tenyészet felhasználásával, és azt találtuk, hogy a FX 24 órás kezelése során nem

csökkentette a K1 és a K10 differenciáció-indukálta up-regulációját. Hogy ezt fehérje szinten is ellenőrizzük, ismét a 3D epidermisz-ekvivalenseket használtuk, és szemikvantitatív immunhisztomorfometriával elemeztük a K1 és K10 expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy a FX-nek 48 órás kezelést követően sem volt jelentős hatása az epidermális differenciálódásra. Ezzel összhangban NHEK-k felhasználásával kimutattuk azt is, hogy a FX nem csökkentette egy másik fontos differenciációs marker, a tight junction barrier kialakításában fontos OCLN differenciáció-indukálta fokozott mRNS-szintű kifejeződését sem.

Végezetül a FX keratinociták barrierformáló képességére gyakorolt hatását is ellenőriztük. Ehhez funkcionális vizsgálatokat végeztünk, amely során HaCaT keratinociták elektromos impedanciáját követtük nyomon valós időben TEER segítségével. A mérés során ismét „Ca²⁺-switch-et” alkalmaztunk a konfluens állapot (plató fázis) elérésekor. Adataink azt mutatták, hogy a FX nem változtatta meg a megemelt Ca²⁺-szint által kiváltott, differenciációhoz kapcsolható jelemelkedést, azaz vélhetőleg nem befolyásolta negatívan a differenciáció során kialakuló sejtközötti kapcsolatok integritását.

Kísérleteink zárásaként egy LY-alapú („*outside-in*”) festékpenetrációs vizsgálatot is elvégeztünk a 3D epidermisz ekvivalensek felhasználásával. Összhangban a korábbiakkal, ez a vizsgálat is azt mutatta, hogy a 14 µM-ban alkalmazott FX nem károsította az epidermisz ekvivalens modellekben kialakuló barrier integritását, hiszen a fluoreszcens LY egyetlen esetben sem terjedt be a stratum corneum alá, így a differenciációra és barrierformálási képességre irányuló kísérleteink alapján elmondható, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja valószínűleg nem károsítja az epidermális keratinociták ezen funkcióját.

Összefoglalva, adataink amellet szólnak, hogy a korábban közölt gyulladás- és lehetséges viszketéscsökkentő hatása mellett, melyet a pikkelysömör kialakulásában is szerepet játszó PI3K útvonal gátlásán keresztül fejt ki, a FX csökkentheti az epidermális keratinociták proliferációját úgy, hogy eközben a differenciációra és a barrierképzésre nincs negatív hatással. Ezek alapján elképzelhető, hogy helyileg alkalmazva jótékony hatást fejthet ki a hiperproliferatív gyulladós bőrbetegségekben, így például a pikkelysömörben.

Összegzés

A disszertáció első felében részletezett kísérleteink során az emberi szőrtüszőkben is jelenlévő TRPM5 ioncsatorna a kifejeződését és funkcionális szerepét vizsgáltuk humán SZ95 szebocitákon. Bár eredményeink azt mutatják, hogy a TRPM5 funkcionálisan aktív formában nem fejeződik ki szebocitákon, azonban antagonistája, a TPPO képes jelentősen fokozni a sejtek faggyúlipid-termelését, mely hatás az Akt szignalizáció és az EGFR közvetítésével, a DGAT2 Akt-függő up-regulációján keresztül alakul ki. Emellett a TPPO összetett hatást fejt ki a szebociták immunfenotípusára: EGFR- és p38 α MAPK-függő módon fokozza az IL-6 expresszióját, valamint csökkenti az IL-8 felszabadulását és több gyulladáscitokin mRNS-szintű kifejeződését is. Adataink arra utalnak, hogy a specifikus TRPM5 modulátorok használata valószínűleg nem eredményez közvetlen, faggyúmiriggyel kapcsolatos mellékhatásokat, de a TPPO, illetve biztonságos funkcionális analógjai TRPM5-független módon befolyásolhatják a faggyúmirigyek biológiai folyamatait.

Kísérleteink második felében a FX bizonyítottan hatékony gyulladásgátló koncentrációjának (14 μ M) hatását vizsgáltuk humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára. Megállapítottuk, hogy a FX antiproliferatív hatást fejt ki az epidermális keratinocitákban, de nem befolyásolja az epidermisz vastagságát, és az általunk vizsgált differenciációs markerekre sem volt szignifikáns hatással, illetve nem károsította a hámsejtek barrierformálási képességét sem. Összefoglalva, korábbi és jelenlegi adataink azt mutatják, hogy az antidepresszáns FX bőrgyógyászati repozicionálása lehetséges: 14 μ M-ban alkalmazva a gyulladáscsökkentő hatás mellett a humán epidermális keratinociták proliferációját is gátolhatja anélkül, hogy negatívan befolyásolná differenciációjukat és barrierformáló képességüket.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának **prof. dr. Csernoch László** professzor úrnak, aki biztosította a PhD munkámhoz szükséges feltételeket, és korábbi témavezetőmnek, **prof. dr. Bíró Tamásnak**, aki lehetőséget adott, hogy elkezdjem PhD tanulmányaimat a kutatócsoportjában. Hálás köszönöttel tartozom jelenlegi témavezetőm **dr. Oláh Attila** támogatásáért, aki mind szakmai, mind emberi oldalról kiemelkedő kutató, oktató, tutor és kolléga. Köszönöttel tartozom közvetlen munkatársaimnak, **Arany Józsefnek**, **dr. Lisztes Erikának**, **Barotáné Kovács Mónikának** és volt kollégáimnak **Volascsekné dr. Tóth Kinga Fanninak** és **dr. Markovics Arnoldnak**. Sokat tanultam Tőletek, és mindig önzetlenül segítettetek, vagy tettekkel vagy ha arra volt szükség, egy-egy biztató szóval.

Köszönettel tartozom a **kutatócsoport és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóinak, PhD hallgatóinak**, akikhez bármikor fordulhattam, ha tanácsra, segítségre volt szükségem. Közöttük is különösen köszönöm **dr. Tóth István Balázs**, **dr. Szöllösi Attila Gábor**, **dr. Czifra Gabriella**, **dr. Deák-Pocsai Krisztina**, **dr. Telek-Haberberger Andrea**, **dr. Szabó László** és **Hollósi Erika** segítségét. Az évek alatt több **TDK hallgatóval** is együtt dolgozhattam, ez idő alatt nem csak én tanítottam, hanem sokat tanulhattam is. Köszönöm a közös munkát és az együtt elért eredményeket, **Pető Orsolya**, **Tolvaj Beatrix**, **Nyitrai Tamara** és **Nitu Devi**! Köszönöm a lehetőséget a hollandiai Radboud University, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Experimental Dermatology Laboratory vezetőjének, **prof. dr. Ellen van den Bogaard**-nak, hogy egy hónapig náluk tanulhattam, és hálás vagyok nijmegeni tutoromnak, **dr. Hanna Niehues**-nak, aki a tanulmányút során rengeteg dolgot tanított nekem, és adott egy másik szemléletet a laboratóriumi munkához. Köszönettel tartozom kollaborációs partnereink, **prof. dr. Christos C. Zouboulis**, **prof. dr. Christoph Abels**, **dr. Michael Soeberdt**, **dr. Pór Ágnes**, **dr. Váradi Judit**, **dr. Póliska Szilárd**, **dr. Kolozsi Péter** és **dr. Tóth Dezső** felbecsülhetetlen értékű segítségéért.

Köszönöm a **Barátaimnak**, hogy végig mellettem álltak az egyetemi és PhD-s éveim alatt, bátorításukra mindig számíthattam. Végezetül, a legnagyobb hálával a **Családomnak** tartozom, köszönöm **Anyukámnak**, **Apukámnak**, **Testvéremnek** és **Nagyszüleimnek**, hiszen nélkülük nem jutottam volna el idáig. Külön hálás vagyok a **Férjemnek** a türelméért, megértéséért és támogatásáért. Köszönöm, hogy mindig számíthatok Rátok!

A doktori disszertáció alapjául szolgáló kísérletek a *GINOP-2.3.2-15-2016-00050 (PEPSYS)*, az *EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009* „Az orvos-, egészségügyi- és gyógyszerészeti tudományos műhelyeinek fejlesztése”, az *EFOP-3.6.1-16-2016-00022*, az *NKFIH „FK” (134235 és 134725)* és a *Kulturális és Innovációs Minisztérium (TKP2021-NKTA-34)* pályázatait, valamint a *DE ÁOK „Momentum proof-of-concept”* alap támogatásával készültek. A fluoxetin biológiai hatásainak vizsgálatát ipari kollaborációs partnerünk (*Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel*; Bielefeld, Németország) is támogatta.

Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/190/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ádám-Nagy Dorottya
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10063659

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Póliska, S., Váradi, J., Kolozsi, P., Tóth, D., Niehues, H., van den Bogaard, E. H., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-proliferative effect in human epidermal keratinocytes.
Arch Dermatol Res. 317 (1), 1-6, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-024-03711-9>
IF: 1.8 (2023)
- Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Pető, O., Nyitrai, T., Tóth, I. B., Póliska, S., Zouboulis, C. C., Oláh, A.: The TRPM5 antagonist triphenylphosphine oxide (TPPO) increases sebaceous lipogenesis and modulates immune phenotype of human sebocytes in a TRPM5-independent manner.
Exp. Dermatol. 34 (5), 1-13, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.70115>
IF: 3.5 (2023)

További közlemények

- Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Arany, J., Ramirez, Y. A., Bíró, T., Drake, J. I., O'Mahony, A., Szöllősi, A. G., Póliska, S., Kilic, A., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-inflammatory effects on human epidermal keratinocytes and suppresses their endothelin release.
Exp. Dermatol. 33 (1), 1-15, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14988>
IF: 3.5 (2023)





4. Lőrincz, E. B., Tóth, G., Spolárics, J., Herczeg, M., Hodek, J., Zupkó, I., Minorics, R., **Ádám, D.**, Oláh, A., Zouboulis, C. C., Weber, J., Nagy, L., Ostorházi, E., Bácskay, I., Borbás, A., Herczegh, P., Bereczki, I.: Mannich-type modifications of (-)-cannabidiol and (-)-cannabigerol leading to new, bioactive derivatives.
Sci. Rep. 13 (1), 19618, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-45565-7>
IF: 3.8
5. **Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Tóth, I. B., Szöllősi, A. G., Oláh, A.: Opioidergic Signaling: a Neglected, Yet Potentially Important Player in Atopic Dermatitis.
Int. J. Mol. Sci. 23 (8), 4140, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084140>
IF: 5.6
6. Markovics, A., Angyal, Á., Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Péntes, Z., Magi, J., Pór, Á., Kovács, I., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: GPR119 is a potent regulator of human sebocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 140 (10), 1909-1918, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.011>
IF: 8.551
7. Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Bíró, T., Oláh, A.: Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "c(ut)annabinoid" system.
Molecules. 24 (5), 918, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050918>
IF: 3.267

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30,018

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,3**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.05.08.

