

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A tranziens receptor potenciál vanilloid ioncsatornák
élettani és farmakológiai jelentőségének vizsgálata
humán szórtüszőn**

Dr. Szabó Imre Lőrinc

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A tranziens receptor potenciál vanilloid-4 ioncsatorna élettani és farmakológiai jelentőségének vizsgálata humán szórtüszőn

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

Írta: Dr. Szabó Imre Lőrinc

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

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Szűts Viktória, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai
Intézet
2022. november 18. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gyulai Rolland, az MTA doktora
Dr. Juhász Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Szűts Viktória, PhD
Prof. Dr. Gyulai Rolland, az MTA doktora
Dr. Juhász Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati
Klinika Tanterme
2022. november 18. 13:00

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A szervezet külső szigetelő rétegeként szolgáló bőrben lévő megannyi specializálódott bőrfüggelék egyikeként a szőrtüszőnek fontos szerep jut a bőr barrier-feladataiban, illetve hormonális, pszichoszociális és szenzoros funkcióiban. A szőrtüsző egyedi életciklusa a repetitív módon ismétlődő, proliferatív (hajszálképző) és regresszív fázisok váltakozásából álló hajciklus. A hajciklus szabályozása rendkívül komplex folyamat, amelyben számos szisztémás hormonnak és parakrin mediátornak is szerepe van.

Kutatócsoportunk a bőr és az endokannabinoid rendszer (ECS), valamint az ezzel szorosan összekapcsolódó tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád tagjainak összefüggéseit kutatja. Emellett az ECS *Cannabis sativa* növény által termelt, úgynevezett fitokannabinoidokkal történő farmakológiai manipulálásának a bőrre kifejtett hatásait is vizsgáljuk. Korábbi eredményeink szerint a hajciklus szabályozásában szerepet játszik az ECS, ugyanis mind a TRP vanilloid 1 (TRPV1) és a TRPV3 ioncsatornák aktivációja, valamint a metabotróp CB1 kannabinoid receptor aktivációja is (regresszív) katagén fázist indukál. Ezek alapján feltételezzük, hogy a hajcikluson egy pro-katagén ECS-tónus van jelen. Értekezésemben egy másik TRP ioncsatorna, a TRPV4 expresszióját és hajciklusban játszott szerepét vizsgáltam humán szőrtüszőn.

Szintén munkacsoportunk korábbi eredményei alapján ismert, hogy egy nem-pszichoaktív fitokannabinoid, a kannabidiol (CBD) a faggyúmirigyen komplex anti-acne hatásokat fejt ki, így ígéretes ágens lehet az acne terápiájában is. Tekintve, hogy a szőrtüsző a faggyúmiriggyel való strukturális-funkcionális kapcsolatai miatt hozzájárul az acne kialakulásához, fontos a CBD hatásainak vizsgálatát kiterjeszteni

a szőrtüszőre is. Ezért tanulmányoztuk a CBD hajciklusra, valamint a szőrtüsző gyulladásos *in vitro* modelljében kifejtett hatását. Emellett vizsgáltuk, hogy aktiválja-e a CBD a szőrtüszőn jelenlévő potenciális receptorait, a TRPV4-et és az adеноzin receptorokat.

A szőrtüsző felépítése és változása a szőrtüsző életciklusa, a „hajciklus” során, a hajciklus szabályozása

A szőrtüsző morfológiailag és szerkezetileg (a központi hajszál körüli koncentrikus hám-rétegek elhelyezkedése miatt) is egy hagymához hasonlít, amely azonban a szőrtüsző sajátos életciklusa során némileg változik. A hajciklus repetitív, emiatt elkerülhetetlen, hogy regressziót követően az addig képzett hajszál elveszzen, de ugyanez adja meg a lehetőségét annak, hogy egy hajszál elvesztése után a hajciklus újra indulásával új hajszál képződjön. A hajciklust három fázisa közül az aktív az „anagén” fázis, mely a hajszál képződésének, növekedésének fázisa; ezután a regresszív „katagén” fázis jön, amelyet egy nyugalmi „telogén” fázis követ. A hajciklus különböző fázisainak során jellegzetesen változik a szőrtüsző morfológia, illetve a különböző kompartmentekben lezajló sejtfolyamatok. A szőrtüsző bizonyos részei, pl. az anagén fázisú szőrtüszőben intenzíven proliferáló és a hajszálat kialakító mátrix keratinociták (MK) a katagén szőrtüszőben apoptotizálnak. Ezzel ellentétben az MK ölelésében lévő dermális papilla (DP), a vaszkularizált és innervált központi szabályozó régió megmarad a hajciklusok váltakozásai során.

A hajciklus szabályozásában számtalan hormon részt vesz, azonban a humán szőrtüszők egymással nem szinkronizáltan váltanak a hajciklus fázisai között, ebből a szempontból minden szőrtüsző „külön életet él”. A különböző szőrtüszőn belüli kompartmentek közötti parakrin kommunikációnak így döntő szerepe van a hajciklus szabályozásában. A hajciklus szabályozásában eddig számos parakrin mediátort írtak le, főleg citokineket és növekedési faktorokat (pl. katagén irányba ható TGF- β és

EGF, valamint az anagén kialakításban fontos IGF).

Az adenzin némileg eltér az említett parakrin faktoroktól, ugyanis nem szekretált polipeptid, hanem az anyagcsere-folyamatok során keletkező purin nukleotid. Metabolikus szerepe mellett saját membrán-receptorain keresztül szignalizál, és ubikviter hatásai közül kiemelkedik általánosnak tűnő anti-inflammatorikus hatása. Az adenzin kezelés a szőrtüszőben expresszálódó adenzin-receptorok ($A_{1,2a-2b,3}$) közül az A_{2b} -n keresztül fokozza a szőrnövekedést, mely részben a DP sejteken keresztül valósul meg. Korábbi eredményeink szerint az ORSK-k is hozzájárulnak az adenzin hatásának közvetítéséhez a hajciklus szabályozó faktorok (pl. TGF- β 2, IGF, EGF) kifejeződésének anagén irányba történő eltolásával. A klinikumban sikeresen alkalmazott hajnövekedést fokozó szer, a minoxidil hatásának háttérében részben az adenzin felszabadítás áll.

A szőrtüsző biológiájának immunológiai vonatkozásai, gyulladás a szőrtüszőben

A bőr immunológiai jelentősége szintén barrier funkciójából fakad; jelentős számú rezidens immunsejt található benne, melyek száma bizonyos körülmények esetén sokszorosára nőhet. A veleszületett immunrendszer elemei jelen vannak a szőrtüszőben, nyugalomban is előfordulnak immunkompetens sejtek, emellett pl. a keratinociták is képesek immunfunkciókat ellátni. A mikrobákra – de az eukariótákra általában nem – jellemző molekuláris mintázatokat (pl. virális duplaszálú RNS-t) felismerő receptorok közé tartozó, úgynevezett „toll-like receptorok” (TLR) a bőrben bőségesen jelen vannak. Aktivációjuk esetén antimikrobiális hatású fehérjék expressziója fokozódik, illetve a pro-inflammatorikus hatású citokinek, pl. interleukin-6 (IL-6) szintje is nő. A lokálisan felszabaduló citokinek nem csak a pro-inflammatorikus hatásukat fejtik ki, hanem magára a szőrtüszőre is hatással vannak. Az IL-1 α és IL-1 β , valamint a TNF α is gátolja a humán szőrtüsző növekedését *in vitro*, és disztrófiás anagén fázis kialakulását eredményezik.

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád és az endokannabinoid rendszer általános jellemzése és a bőrben betöltött szerepük

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák szupercsaládja egy, az evolúció során jól konzervált kationcsatornákat magába foglaló csoport. Az emlősök TRP csatornái közé jelenlegi ismereteink szerint 28 tag tartozik, amelyek a vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), kanonikus (TRPC), polycystin (TRPP), mucolypin (TRPML) és ankyrin (TRPA) alcsaládokba sorolhatók. Érdekes módon az alcsoportokon átívelő tulajdonság a bizonyos TRP csatornákra jellemző hőérzékenység. Ezek a „termo-TRP”-csatornák ráadásul kiemelten fontosnak tűnnek a bőr élettani funkcióinak szabályozásában. A különböző termo-TRP csatornák közül a TRPA1 és TRPM7 hideg, a TRPV3 és TRPV4 meleg, a TRPV1 és TRPV2 a forró hőstimulussal aktiválható.

A TRPV4 ioncsatorna is egy non-szelektív Ca^{2+} -csatorna, strukturálisan négy, egyenként 6 TM-doménnel rendelkező alegységből felépülő tetramer-fehérje. Általában homotetramer formában fordul elő, de leírtak más TRP-receptor csatorna alegységekkel (pl. TRPC1, TRPP2) képzett heterotetramer fehérjét is. A TRPV4 csatorna többféle különböző modalitással aktiválható, ozmolaritás-változás, mechanikai deformáció is képes nyitni a TRPV4-et. A termo-TRP csatornák közé tartozó TRPV4-et a 25 °C feletti hőmérséklet aktiválja, de a küszöbhőmérséklet változhat. A hőérzékenységet befolyásolhatják különböző körülmények is (aktivált jelátviteli útvonalak, más ingerrel szenzitizáció, más termo-TRP csatornákkal heteromerizáció), így végsősoron a küszöbhőmérséklet akár testhőmérséklet közeli érték is lehet. A csatorna hőmérséklet-függése komplex, jellemző a deszenzitizáció miatti inaktív állapot és az akklimatizáció is. A TRPV4 hőingerrel való aktivációja tehát több tényezőtől függ, és bár izolált humán keratinocitákban nem vizsgálták ezt *in vitro*, eger keratinocitákban a TRPV4 aktivációs küszöb-hőmérséklet kb. 32 °C. Egyre inkább hozzák összefüggésbe a TRPV4-et a gyulladás kialakulásával, többek

között azért, mert a csatorna farmakológiai vagy genetikai gátlása mellett az LPS által kiváltott gyulladási citokin termelés elmarad vagy csökkent mértékű. Alacsony pH és különböző savak is képesek aktiválni a TRPV4-t, ezek pedig kísérhetik a gyulladási folyamatokat. Endogén ligandumok közül az endokannabinoid anandamid és metabolitja, az arachinoid-sav képes aktiválni a TRPV4-et.

A TRPV4 az epidermális barrier felépítésében is fontos szerepet játszhat, az eddigi eredmények alapján a sejt-sejt kapcsolatok kialakulásában van szerepe a zonula adherensben. Emellett a zonula occludens típusú kapcsolatok kialakításához is hozzájárul, ami szintén fokozza a barrier-funkciót, a bőr paracelluláris folyadék- és ionvesztését limitálva. A hőmérséklet emelése a károsodott barrier helyreállítását serkenti *in vivo* egérben és emberben is, mely hatást vélhetően a TRPV4 mediálja. A TRPV4-nek szerepe van a bőr ereinek vazodilatációjában, így a hőszabályozásban játszhat szerepet. A faggyúmirigyben kifejeződő TRPV4 aktivációja a sejtek proliferációját gátolja. A szőrtüszőben nem vizsgálták a TRPV4 kifejeződését, illetve az aktiváció hatását, de annyi ismerettel rendelkezünk egér bőrön végzett kísérletek eredményeiből, hogy a TRPV4 leginkább az ORS rétegben fejeződik ki, valamint a DP-ben nem tudták igazolni az mRNS-szintű kifejeződését.

Az endokannabinoid rendszer és szerepe a bőr élettani működésében

Endokannabinoid rendszernek (ECS) nevezzük szűkebb értelemben az endogén, vagyis a szervezet által termelt kannabinoid vegyületeket, az azok szintéziséhez és degradációjához szükséges enzim-apparátust és az endokannabinoidokra (eCB) érzékeny sejtfelszíni receptorokat. Két, a klasszikus értelemben vett ECS-hez köthető receptor a kannabinoid-receptor-1 és -2 (CB1 és CB2), de más „novel receptorok” is ismertek. Tágabb értelemben hozzá sorolunk még olyan, egyébként más rendszerekbe jobban illeszkedő receptorokat vagy enzimeket is, amelyeken

keresztül szintén képesek eCB-k hatást kifejteni.

Az ECS-nek a bőrben szerepe van többek között az epidermális barrier egyensúlyának beállításában, a melanogenezisben és immunfolyamatokban. A bőrfüggelékek közül a faggyúmirigyen kifejeződő CB2 lipidszintézist fokozó hatásokat közvetít, valamint a perifériás idegeken a fájdalom- és viszketésérzékelésben is szerepet játszik. A szőrtüsző kiemelt jelentőségét adja, hogy képes endokannabinoid (főleg anandamid) vegyületek termelésére is. A szőrtüszőn kifejeződő CB1 receptor aktivációja katagén indukcióhoz vezetnek *ex vivo* (a CB2 receptor nem fejeződik ki a szőrtüszőn). Emellett a prototípikus TRP receptor, a TRPV1 is kifejeződik a szőrtüszőn.

A növényi eredetű kannabinoid vegyületek (fitokannabinoidok) és ezek lehetséges alkalmazása a bőrgyógyászatban

A *Cannabis sativa* által termelt, növényi eredetű, vagyis fitokannabinoidok (FK) közül a legismertebb, annak pszichotróp hatásait felelős aktív hatóanyag a (-)-transz- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Mai ismereteink szerint a növényben azonosítható több ezer molekula közül kb. 120-150-et tekintünk FK-nak, ami képes hatást kifejteni az ECS-en keresztül. Míg a THC alkalmazását limitálja fent említett pszichoaktív volta, addig több egyéb FK is ígéretesnek tűnik klinikai alkalmazásra. Ezek közül a kutatások középpontjában a (-)-cannabidiol (cannabidiol, CBD) áll, amely mentes a THC-hoz kapcsolt pszichotróp hatásoktól. Jelenleg ellentmondásos eredmények miatt nincs egyetértés abban, hogy pontosan mi a CBD viszonya a CB-receptorokhoz, egyre inkább más receptorokhoz rendelik a CBD-re jellemző farmakológiai hatásokat. Sikeresen alkalmazzák a CBD-t szisztémásan neuro-pszichiátriai kórképekben, de további sokrétű intenzív kutatások zajlanak egyéb területeken történő klinikai alkalmazását illetően.

A CBD fokozza sebgyógyulásban is érintett keratinok expresszióját egerek bőrében *in vivo*, a fibroblasztokon citoprotektív, illetve, az UVA/B sugárzás hatását a bőrben képes antioxidáns és anti-inflammatórikus irányba befolyásolni. Számoltak már be helyileg alkalmazott CBD-tartalmú externák hatásosságáról is. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a CBD csökkenti a kórosan fokozott faggyútermelést *in vitro* immortalizált humán faggyúmirigy sejtvonalon. Ezen hatás hátterében TRPV4 és A_{2A}-receptor aktiváció állt, valamint ezáltal markáns antiinflammatorikus hatás is társult hozzá. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a CBD hatásos lehet a kóros faggyútermeléssel járó gyakori állapotokban, pl. acne-ben.

Célkitűzések

A TRPV4 funkcionális expressziójának vizsgálata szőrtüszőn

- Kifejeződik-e a TRPV4 a szőrtüszőn, és ha igen, pontosan milyen kompartmenteken?
- Milyen celluláris hatásokat vált ki a TRPV4 aktiváció az azt expresszáló sejteken?
- Milyen hatása van a TRPV4 aktivációnak a hajciklusra?

A CBD hatásainak, illetve a hatást közvetítő receptorok vizsgálata szőrtüszőn

- Milyen hatást fejt ki a CBD alkalmazása a hajciklusra?
- Milyen receptorok közvetítésével valósul meg a CBD hatása?
- Megnyilvánul-e a CBD ismert gyulladásgátló hatása is a szőrtüszőn?

Anyagok és módszerek

A kísérletek során a különböző kezelésekre felhasznált ágensek, tenyésztési körülmények

A későbbiekben ismertetett sejt-, illetve szervkultúrákat vizsgálataink során a TRPV4 aktiválásához a specifikus és szintetikus GSK1016790A-t (GSK), a TRPV4 gátlására HC067047 TRPV4-t használtunk. A TLR3 receptor aktiválására a természetes kettős szálú (virális) RNS szintetikus megfelelőjét, a poly-(I:C)-t alkalmaztunk, míg az adenzin receptorok gátlására az adenzin receptor „pán-antagonistaként” ismert CGS-15943-t alkalmaztuk. Az oldószer GSK1016790A, HC067047, CGS15943 esetén dimetil-szulfoxid (DMSO) volt, a CBD-t etanolban, a poly-(I:C)-t szűrt desztillált vízben oldottuk. A sejt- és szövettenyésztést 37°C-on, 5% CO₂ parciális nyomásra szupplementált, párásított légtérben végeztük.

A humán szőrtüsző szervkultúra

Az egészséges teljes vastagságú bőrmintákat a Helsinkii kritériumoknak megfelelően, a helyi etikai bizottság jóváhagyásával (etikai engedélyszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012) nyertük egészséges hajas fejbőr halánték- vagy tarkórégióból, amelyekből anagén VI. fázisban lévő szőrtüszőket izoláltunk. A tenyésztőmédium alapja William's E médium, amelyet kiegészítettünk 2 mL L-glutaminnal, 10 ng/ml hidrokortizonnal, 10 mg/ml inzulinnal és antibiotikumokkal.

Primer humán ORSK-k izolálása és tenyésztése

Önkéntes donorokból egyszerű epilációval nyert körülbelül 30 (nem intakt) szőrtüszőt három egymást követő alkalommal mostunk steril foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS). Ezután a sejteket tartalmazó szőrtüszőket egy órán át 0,1% tripszin-0,2% etilén-diamin-tetra-acetát (EDTA) tartalmú emésztőoldatban

inkubáltuk 37 °C-on. Az emésztőoldatot 10 (V/V)% embrionális borjúsérumot (FBS) tartalmazó oldattal inaktiváltuk. Az így nyert ORSK-kat ezután 0,4 µg/ml mitomycin-C oldattal előkezelt, osztódásában gátolt humán dermális fibroblaszt (HDF) tápláló sejtrétegre szélesztettük. A tenyésztés során tenyésztőoldatként Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) 1:3 arányú keverékét használtuk, illetve ezt az elegyet továbbá 10 (V/V)% Fetal Clone II (HyClone), koleratoxin, inzulin, hidrokortizon, adenin, trijód-tironin, EGF, aszkorbil-2-foszfát, Penicillin G, és gentamycin hozzáadásával egészítettük ki.

A TRPV4 ioncsatorna immunfluoreszcens jelölése humán szőrtüszőn és primer humán ORSK tenyészetben

VI. fázisban lévő szőrtüszőkből kriosztáttal 6 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Az így kapott szőrtüsző-metszeteket vagy fedőlemezen tenyésztett acetonnal fixált ORSK-kat 1:100 hígítású, nyúlban termelt TRPV4-ellenes primer antitesttel jelöltük, majd Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos, nyúl antitest Fc-fragment-ellenes antitesttel inkubáltuk. A sejtmagokat 40-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) festékkel jelöltük.

A szőrtüsző elongáció vizsgálata

24-lyukú kezelő lemezen fent részletezett módon tenyésztett szőrtüszőket mikroszkóppal fotodokumentáltuk a tenyészeteket, és mértük a szőrtüszők hosszát. A TRPV4 agonistával és antagonistával, illetve CBD-vel végzett kezeléseket minden nap elvégeztük. Az eredményeket a kezdeti hosszhoz viszonyított átlag növekedés (+/- SEM) formában ábrázoltuk az idő függvényében.

Hajciklus hisztomorfometriai analízise szőrtüszők gyorsfagyasztott metszetein

Az elongációs kísérletek végére a hat napig kezelt, kezdetben anagén VI szőrtüszőkből készült metszeteket rutin hematoxillin-eozin festés alapján

klasszifikáltuk a szőrtüszőket anagén, korai vagy kései katagén fázisokba.

A szőrtüszők mátrix keratinocitáinak proliferáció/apoptózis-vizsgálata – Ki-67/TUNEL kettős jelölés

A fagyasztva-metszett (6 µm) szőrtüszőket inkubáltuk 1% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten. A mintákat ezután rehidráltuk PBS-tal, majd előhűtött ethanol-acetát (2:1) oldatban -20°C hőmérsékleten fixáltuk. Az apoptotikus sejtek TUNEL-assay-vel való kimutatásához a metszeteket a terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT)-enzimet és digoxigenin-deoxy-UTP-t tartalmazó reagens oldatban egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. A proliferáló sejteket egérben termelt anti-humán Ki-67 primer antitesttel, majd kecskében termelt anti-egér másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 568 IgG, Invitrogen), a TUNEL+ sejteket FITC-konjugált antidigoxigenin antitesttel jelöltük (ApopTag Kit). Ezután a metszetek PBS-es mosása után DAPI-magfestést végeztünk. A felvételeket Image J alkalmazással analizáltuk, és a referencia-régiókban lévő apoptotikus és proliferáló sejteket a teljes sejtszám arányában adtuk meg százalékos formában (+/- SEM).

Valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A teljes RNS-t TRIzol felhasználásával izoláltuk, a gyártó protokolljának megfelelően DNáz kezelést követően. A teljes RNS 1 µg-jához a reverz transzkripció során 15 IU AMV reverz transzkriptázt, 1 IU rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitorot és 0,025 µg/µl random primert felhasználva cDNS-t állítottunk elő. A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük, a kész TaqMan univerzális PCR „master mix” elegy felhasználásával, minden reakciót triplikátumként, vagyis 3 technikai ismétléssel. A qRT-PCR vizsgálatokhoz Stratagene MXP3005p rendszert használtunk, belső kontroll génként glicerilaldehid—3-foszfát-dehidrogenáz használtuk. A TRPV4 expressziót a ΔC_t módszer felhasználásával adtuk meg. Amikor különböző kezelések hatására

bekövetkezett mRNS expressziós változását vizsgáltuk $\Delta\Delta\text{CT}$ módszert használtuk.

Mikrofluorimetriás intracelluláris Ca^{2+} -mérés

A fluoreszcens Ca^{2+} -méréseket probenecidet (2,5 mM) tartalmazó „Hank oldatban” végeztük, melyet BSA-val (végkoncentráció: 1 g/100 ml) egészítettünk ki. Kísérleteink során az ORSK-kat 96 lyukú tenyésztőlemezekre szélesztettük 20000 sejt/lyuk denzitásban. Hank oldatos öblítés után 1 μM Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal kezeltük az ORS keratinocitákat (1 óra, 37 °C), majd újabb három Hank oldatos öblítés következett, és félórás inkubáció. Ezt követően FlexStation III spektrofluoriméterrel mértük a fluoreszcencia intenzitást (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm), összesen 400 másodpercig. A mérés elején egy 35 másodperces alapjelet rögzítettünk, melynek átlagértékére, az alapvonalra „normalizálva” a különböző kezeléseket. Minden kezelést 4-6 ismétléssel végeztünk.

Hőstimulussal kiváltott Ca^{2+} -beáramlás mérése

Az ORSK-kat 35 mm-átmérőjű Petri-csészékben kezeltük a Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal 30 percig 37 °C-on, majd PCR reakció-lemezre szélesztettük 100000/lyuk denzitásban 10 μM HC067047 TRPV4 antagonistá jelenlétében vagy anélkül. A fluoreszcencia intenzitást Stratagene készülék FAM-szűrőjével (gerjesztési/emissziós hullámhossza 494 és 516 nm). Bizonyos lyukakban sejtek nem, csak a 2 μM Fluo4-AM festéket tartalmazó Hank oldat volt, amelyet festék-kontrollként használtunk. Kezdetben 25 °C-on inkubálva a sejteket, majd a hőmérsékletet 31 °C-ra emeltük a mérések végéig mértük a fluoreszcencia változást. A mérések során rögzített intenzitásokat a háttér fluoreszcencia változással csökkentve ábrázoltuk kezelési csoportonként (átlag+/-SEM formában).

Sejtproliferáció vizsgálata – CyQUANT-assay

A sejtproliferáció vizsgálatát CyQUANT assay kit felhasználásával végeztük a

gyártó protokolljának megfelelően, fluoreszcencia intenzitást mértünk 490 nm és 520 nm excitációs/emissziós hullámhosszak alkalmazásával FlexStation II384 segítségével. A relatív fluoreszcencia intenzitás kezelési csoportonkénti átlag (+/- SEM) értékeket a napi kontroll százalékos hányadában adtuk meg.

Életképesség vizsgálata – MTT-assay

Az ORSK-kat 10 000/lyuk denzitásban 96-lyukú lemezekre szélesztettük, majd GSK-val, CBD-vel, vagy oldószerrel kezeltük. Ezután a sejteket 0,5 mg/ml MTT reagenssel inkubáltuk 3 óráig 37 °C-on, majd a formazán kristályok szolubilizálása után abszorbanciát mértünk 565 nm-es spektrumon, FlexStation III segítségével, eredményeinket a CyQUANT módszernél leírtakhoz hasonlóan interpretáltuk.

Apoptózis vizsgálata – DilC-assay, Nekrózis vizsgálata – SYTOX-assay

Az apoptózis korai eseményeként bekövetkező mitokondriális potenciál csökkenést az ORSK-k tenyészetén a MitoProbe™ DilC1(5) Assay Kit felhasználásával vizsgáltuk. A SYTOX Green fluoreszcens festék a genomi DNS-hez kötődik a nekrózist kísérő membrán-fragmentációval korrelálva. Az ORSK-kat 10 000/lyuk denzitásban 96-lyukú lemezekre szélesztettük, majd GSK-val, CBD-vel vagy oldószereikkel kezeltük. A sejteket DilC1(5) festéket és SYTOX Green festéket tartalmazó munka-oldattal inkubáltuk, PBS-sel öblítettük, a fluoreszcencia intenzitást DiLC esetén 630 nm/670 nm, SYTOX esetén 490 nm/520 nm excitációs/emissziós hullámhosszak alkalmazásával.

Statisztikai analízis

Eredményeinket statisztikailag IBM SPSS Statistics 22.0 és Origin Pro Plus 6 szoftverekkel analizáltuk, χ^2 -tesztet, Fisher-egzakt tesztet, Student-féle kétmintás T-próbát, vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* tesztet alkalmaztunk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

1. A TRPV4 funkcionális expressziójának vizsgálata szőrtüszőn

A TRPV4 ioncsatorna kifejeződése és eloszlása a szőrtüsző kompartmentjeiben

A TRPV4 mRNS szinten kimutatható volt mind humán szőrtüszőkből, mind humán ORSK-k primer tenyészetéből. Az immunfluoreszcens jelölésen alapján az epiteliális kompartmentekben volt jelen jelentősebb mennyiségben TRPV4, főleg a ORS-rétegben, kisebb mértékben a belső gyökérhüvelyben. Az intenzíven proliferáló MK régióban sem volt látványos TRPV4 expresszió, sem a hajciklust szabályozó DP-ban. A MK régióban azok a rétegek mutattak pozitív TRPV4 immunreaktivitást, amelyek az ORS-sel folyamatosak, és tulajdonképpen az azt felépítő ORSK-k elődeinek tekinthetők. A kötőszövetes burookban elvétve volt detektálható pozitívitas. A primer ORSK sejtkultúrában a sejtek *in vitro* tenyésztés alatt is expresszálták a TRPV4 fehérjét.

A TRPV4 aktiváció gátolta az ex vivo szőrnövekedést és katagén fázist indukál humán szőrtüszőn

A TRPV4 kémiai aktivációja egy szintetikus, specifikus liganddal, a GSK106790A-val (GSK) a csak vivőanyagot tartalmazó kontroll médiumhoz képest szignifikánsan és dózis-függő módon gátolta az *ex vivo* szőrnövekedést. A magas (>100 nM) koncentrációban alkalmazott GSK kezelés esetén a szőrtüszők alig növekedtek, és már két nap kezelés elteltével markáns különbségek voltak a kezelési csoportok (n=18 szőrtüsző) között. Tekintettel arra, hogy az anagén fázisú szőrtüszők képesek a hajszál szintetizálására (és a kiindulásnál anagén VI. fázisban lévő szőrtüszőket szelektáltunk az elongációs kísérletekhez), a növekedésgátlást kiváltó hatást a katagén fázis felé terelés jelének is tekinthetjük. Az antagonistá együttes alkalmazása esetén a növekedés gátlását ki tudtuk védeni.

Az elongációs kísérletek során kezelt szőrtüszőket a szervkultúrában töltött 7. napon friss-fagyasztott metszeten, standard kritériumok alapján klasszifikáltuk anagén, korai katagén, illetve kései katagén fázisnak megfelelő szőrtüszőkre. A TRPV4 aktivátor kezelés alkalmazott dóziséval korrelálva a korai/kései katagén fázisú szőrtüszők felé tolódott el a szőrtüszők aránya. A 6 napig tartó kezelés után látványos eltolódás alakult ki a GSK-val kezelt szőrtüszők esetén, így 100 nM koncentrációjú kezelés esetén alig, míg 1 μ M-lal kezelt szőrtüsző esetén nem maradt anagén fázisú szőrtüsző.

A TRPV4 aktiváció hatására a szőrtüsző mátrix keratinocitáinak proliferációs, illetve apoptotikus folyamatai a katagénre jellemző irányba változtak

Az anagén szőrtüszők mátrixában lévő keratinociták intenzíven osztódnak, amelynek eredménye a hajszál növekedése. A TRPV4 aktivátor kezelést nem kapott szőrtüszők mátrix régiójában lévő intenzív proliferációt jelölő (vörös) Ki67-immunreaktivitás szépen kirajzolta magát a MK régiót, a sejtek többsége (kb. 60-70%) Ki67-pozitív volt, vagyis éppen osztódott. A mátrix keratinociták osztódása fokozatosan csökkent a TRPV4-aktivátor kezelés emelkedő dóziséval. Ezzel párhuzamosan, a TRPV4 agonista kezelés esetén az egyébként anagén fázisban nem, vagy csak elvétve volt látható apoptotikus TUNEL pozitív (zöld immunreaktivitás) sejtek száma fokozódott, amely szintén a katagén szőrtüszőkre jellemző. A kísérleteink megerősítése céljából végzett TRPV4 antagonistá HC067047 kezelés képes volt kivédeni a proliferáció csökkenést.

A TRPV4 működés vizsgálata az ORSK-k Ca^{2+} -homeosztázisára

A TRPV4 nem-specifikus Ca^{2+} -permeábilis kationcsatorna, vagyis képes Ca^{2+} -okat is a pórusformáló régió keresztül a sejtmembránon átengedni, ha aktivált állapotba kerül. Elsőként az aktivációt kémiai stimulussal, a korábban is alkalmazott GSK1016790A-val teszteltük. Primer humán ORSK-k tenyészetét Fluo-4

fluoreszcens Ca^{2+} -méréssel vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a TRPV4 aktivátor koncentrációfüggő módon fokozta az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$). A reprezentatív fluoreszcens mérések során a TRPV4 aktivátor kezelés után szinte azonnal emelkedett a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$. A TRPV4 funkcionalitása mellett a TRPV4 antagonistá HC067047 hatásosságát is teszteltük, eredményeink szerint sejtszinten képes volt a 10 nM GSK1016790A hatását teljesen kivédeni, de magasabb koncentrációban alkalmazott agonista kezelés esetén is képes szignifikánsan csökkenteni a TRPV4 aktivációt. Megállapítható tehát, hogy a korábban látható, TRPV4 aktivátor kezelést követően a szőrtüszőn bekövetkezett változások valóban a TRPV4 működés miatt alakultak ki, illetve a TRPV4 valóban funkcionális Ca^{2+} -csatornaként működik az emberi szőrtüsző ORSK-in.

A TRPV4 részt vesz az ORSK-k hőstimulusra adott Ca^{2+} -beáramlásának közvetítésében in vitro

A leginkább relevánsnak tűnő egerek keratinocitáiból származó ismeretek alapján 31 °C-kal kezeltük a sejteket, miután 25 °C-on inkubáltuk azokat. Az ORSK-kon mért fluoreszcencia folyamatosan emelkedett a hőmérsékletváltozás után, vagyis a sejtek képesek voltak a hőstimulusra *in vitro* fokozatosan $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ növekedésével reagálni. A TRPV4 hozzájárult ehhez a hatáshoz, mert az antagonistá jelenlétében szignifikánsan csökkent a Ca^{2+} -beáramlás.

A TRPV4 aktiváció nem befolyásolta az ORSK-k életképességét, de apoptózist indukált in vitro

A szőrtüszőkön látott mátrixban mért hatások (proliferáció csökkenése és fokozott apoptózis) a katagén indukciót kísérő vagy követő jellegzetességek. A TRPV4 azonban az ORS réteg keratinocitáin expresszálódik és funkcionál. A TRPV4 aktiváció hatására eredményeink szerint a sejtek életképessége nem változott (MTT-

assay) és a nekrozist jelző membránon fragmentációval korreláló SyTOX-assay magfestésében sem tapasztaltunk különbséget. Ellenben a TRPV4 aktivátor koncentráció-függő módon csökkentette az apoptózis korai jelének tartott mitokondriális membránpotenciált, illetve az azzal korreláló DiIC1(5)-fluoreszcencia intenzitást.

2. A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira

Kísérleteink második felében a CBD hatásait vizsgáltuk a szőrtüszőre *ex vivo* szervkultúrában. A hajciklusra gyakorolt hatások mellett, mivel – részben a korábban ismertetett eredmények alapján – a potenciális cél-spektrumba tartozó receptorok (TRPV4, adenosin receptorok) jelen vannak a szőrtüszőn, ezekre gyakorolt hatását is vizsgáltuk ORSK-n.

A CBD alacsony koncentrációban tendenciózusan fokozta, magas koncentrációban szignifikánsan gátolta a szőrnövekedést ex vivo

Magas (10 μM) koncentrációban alkalmazva a CBD szignifikánsan és szinte teljesen gátolta a szőrnövekedést, azonban a legalacsonyabb koncentrációban alkalmazva (0,1 μM) kis mértéken fokozta az elongációt (ez a hatás ugyanakkor nem minden donor esetén bizonyult szignifikánsnak). CBD hatására kialakuló növekedés-gátlás hamar, már a második mérés idejére kialakult. Méréseink alapján az 1 μM -os CBD kezelés a kontroll közelében helyezkedett el.

A CBD magas koncentrációban ex vivo katagén fázist indukált, és arra jellemzően befolyásolja a mátrix keratinociták apoptózisát, és gátolta a proliferációt

Vizsgálataink alapján a CBD alacsony dózisban nem mutatott különböző hatást a kontroll csoporthoz (vivő anyaggal kezelt szőrtüszőkhöz) képest, vagyis a kezdeti anagén VI. fázisú szőrtüszők kb. ugyanolyan mértékben maradtak ebben a fázisban, míg kis részük korai (1 μM dózisban 1 szőrtüsző kései) katagén fázisba került. Ezzel

szemben 10 μM CBD kezelés hatására drámai mértékben csökkent az anagén fázisban lévő szörtüszők száma és aránya. Ezen eredményünk összecseng az elongációs kísérlet során tapasztaltakkal, ugyanis a katagén szörtüszők nem termelnek hajszálat. Ebben a kezelési csoportban a kései katagén szörtüszők aránya dominált.

A CBD kezelés koncentráció függő módon csökkentette a mátrixban zajló proliferációs folyamatokat, mely 1 μM koncentráció esetén szignifikáns, de 10 μM CBD alkalmazása esetén már drámai volt. Ezzel párhuzamosan az anagén VI. fázisú szörtüszőben alig megfigyelhető apoptotikus folyamatokat a 10 μM dózisban alkalmazott CBD szignifikánsan fokozta, igaz, alacsony koncentrációban (tendenciózus mértékben) csökkentette.

A CBD magas koncentrációban csökkentette az ORSK-k életképességét és proliferációs potenciálját

A genomi DNS mennyiségi meghatározásán alapuló CyQUANT-assay-vel következtethetünk a sejtszámra és proliferációra gyakorolt hatásra is. Eredményeink alapján a CBD 3 órás kezeléssel még nem gyakorolt szignifikáns hatást az ORSK-kra. Azonban 24 óra elteltével már szignifikánsan és koncentráció-függő módon csökkentette a sejtszámot. Ezek a hatások 48, illetve 72 óra elteltével fokozódtak, 10 μM koncentrációjú kezelésnél már elérte a CBD a maximális hatását, míg az 5 μM kezelés kevésbé, de szignifikánsan befolyásolja a sejtszámot. Alacsony, 1 μM -nál kisebb koncentrációan a CBD kezelésnek nem volt hatása a sejtszámra.

A CBD kombinált módon, apoptózist és nekrozist kiváltva gátolta az ORSK-k életképességét magas koncentrációban

Az 3 órás kezelés során csak az 50 μM koncentrációban alkalmazott CBD-kezelés esetén tapasztaltunk szignifikáns mértékű sejtszámcsökkenést. Ennek tükrében a

CBD-kezelés 50 μM -os koncentrációjában mért DiLC-SYTOX fluoreszcencia intenzitás értékek a többi kezelési csoportból származó méréshez képest szignifikánsan kevesebb sejtből származik, amely befolyásolja az eredmények értelmezését. A CBD 10 μM koncentráció felett okoz nekrozist, és már kismértékben 1 μM koncentráció esetén is apoptózisra jellemző mitokondriális membránpotenciál-csökkenéshez vezet. Ez alatti koncentrációban (0,1 μM) nem volt semmilyen vizsgált, korai apoptotikus/nekrotikus folyamatokra jellemző változás.

A CBD alkalmazása magas koncentrációban döntően TRPV4 mediált Ca^{2+} -beáramláshoz vezetett az ORSK-kon

A CBD-kezelés képes volt koncentráció-függő módon fokozni az ORSK-k $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ -t, ez pedig 10 μM koncentráció felett szignifikánsnak bizonyult. Amennyiben TRPV4 antagonistá jelenlétében vizsgáltuk az 50 μM CBD hatását, azt találtuk, hogy ez esetben a CBD által okozott Ca^{2+} -beáramlás szignifikánsan csökkent.

A CBD alacsony koncentrációban gátolta a szórtüszők által termelt, indukált gyulladási citokinek mRNS szintű kifejeződését, amelynek háttérében adenosin receptor aktiváció állt

A TLR3 aktivátor poly-(I:C) kb. 3-10 szerez szintre fokozta a kontrollhoz képest az IL-1 β , IL-6 és TNF- α gyulladási citokinek, illetve a kemokin IL-8 mRNS szintű expresszióját. Az együttes, alacsony, 0,1 μM koncentrációjú CBD kezelés hatására ez szignifikánsan csökkent minden vizsgált citokin és kemokin esetén, sőt, a TNF- α és az IL-8 szintje gyakorlatilag normalizálódott. Az adenosin receptorok mindegyikét gátolni képes CGS 15493 alkalmazása esetén a CBD hatása (az IL-8 kemokin esetét leszámítva) nem tud érvényesülni.

Megbeszélés

A TRPV4 szerepe a hajciklus szabályozásában

A TRPV4-et a bőrben már korábban is fontos funkciókkal hozták összefüggésbe. Az epidermisz keratinocitáiban hozzájárul a sejt-sejt kapcsolatok molekuláris szintű kialakításához, amely a bőr mechanikai és egyéb barrier funkcióinak egyik alapja. A TRPV4 bőrben betöltött szerepéről szóló eddigi ismereteinket egészíti ki a TRPV4 szőrtüszőben jelen értekezésemben részletezett funkciója. A korábbi rágszálókból származó eredményekkel összhangban eredményeink szerint a TRPV4 a szőrtüsző döntően epiteliális sejtjeiben, főként az ORS-ben van jelen.

A TRPV4 feltárt funkcionális jelenléte jól illeszkedik a korábban karakterizált TRP csatornák (TRPV1 és TRPV3) közé, amelyek szintén katagén induktornak bizonyultak. A TRPV4 szelektív agonista a hajszál növekedését csökkentette; ennek hátterében a korai katagén fázisra jellemző, a hajszálat képző mátrix keratinocitákban bekövetkezett drámai proliferáció-csökkenés állt. A mátrix keratinociták apoptózisa nem feltétlenül direkt hatás, vagyis nem a rajtuk lévő TRPV4 csatorna aktiváció közvetlen következménye volt, hanem valószínűleg a katagén átmenet jól ismert mozzanata. Azonban a TRPV4 aktiváció közvetlenül is képes volt apoptózist indukálni vizsgálataink szerint a szőrtüsző fő TRPV4-expresszáló sejt típusán, az ORS-rétegből származó keratinocitákon. Valószínűleg a TRPV4 hatása főként ezeken a sejteken keresztül alakul ki, mivel egyértelműen itt a legnagyobb a TRPV4 immunoreaktivitás, illetve ezeken a sejteken a TRPV4 aktiváció egyéb hatásait is sikerült tetten érni. Vizsgálataink alapján a kémiai TRPV4 aktiváció koncentrációfüggő módon, illetve a szőrtüszőn a fenti hatásokat kiváltó dózis-tartományban fokozta az ORSK-k $[Ca^{2+}]_{ic}$ -t. Eredményeink alapján összességében a TRPV4 főként az ORS-ben van jelen, aktivációja hatására

sejtszinten Ca^{2+} -beáramlás történik, amely apoptotikus folyamatokat indít be. Ez az egész szőrtüszőre nézve – csakúgy, mint a pl. TRPV3 esetén – regresszív folyamatok beindulásával jár, így katagén átmenetet indukál.

Érdekes elképzelés az is, hogy esetleg a TRPV4 nem egyszerűen kiegészíti a többi, szőrtüszőn kifejeződő TRPV receptor jelenlétét, hanem esetleg heterotetramerként komplexeket is képez velük. Bár elméletileg bármely három, szőrtüszőn már leírt TRP-csatorna képes heteromert formálni, olyan eredmények is vannak, miszerint a TRPV1-4 ioncsatornák együttes expresszió inkább homotetramereket formálnak. Az epidermális keratinocitákban a TRPV4 az intercelluláris kapcsolatok kialakítása révén szerepet játszik a barrier fenntartásában, és ebben a hőmérsékletnek is van szabályozó szerepe. Az epidermisz mellett a TRPV4 hőstimulus hatására szabályozza a bőr ereinek átmérőjét, így a hőháztartásban is szerepet játszik. Egér keratinocitákban a TRPV4 mért aktivációs küszöbhőmérséklete $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt, és a mi kísérletes elrendezésünkben is egy ehhez hasonló, $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleti stimulus képes volt Ca^{2+} -beáramlást kiváltani az ORSK-kon. Az egyébként effektív TRPV4 antagonistá HC067047 még viszonylag magas, $10\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációban is csak részlegesen volt képes kivédeni az ORSK-kon megvalósuló Ca^{2+} -beáramlást. Ezen eredményeink alapján a TRPV4 hozzájárul a hőingerre bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ növekedéshez az ORSK-kban.

Érdekes kérdés, hogy eredményeink alapján feltételezett hőérzékenység megnyilvánulhat-e *in vivo* körülmények között is. Eddig is több ízben sikerült *in vitro* hőingerrel aktiválni a TRPV4-et bőrből származó sejteken. Továbbá a TRP csatornák kinetikájára általánosan jellemző, hogy az aktiváló hőmérséklet tartós fennállása az ioncsatorna inaktivációjához vezethet, hiszen a hőstimulus csupán az amúgy feszültségfüggő csatornák (aktivációs, ill. egyaránt inaktivációs) feszültség-küszöbét tolja el. Még az is felmerülhet ezek alapján, hogy a tartósan az aktivációs

hőmérsékleti tartomány közelében lévő bőrben a TRPV4 inaktív, ugyanakkor hideghatásra ismét aktiválható állapotba kerül.

A hajciklus és a szőrzet mennyiségének, minőségének évszakokkal és a hőmérséklettel összefüggő változása az állatvilágban jól ismert. Emberben ilyen jelenség nem ismert, azonban a szőrtüsző körüli hőmérséklet változtatása a klinikai gyakorlatban jelentős is lehet. Egyrészt sikerrel csökkentik a hajas fejbőr hűtésével a kemoterápiát kísérő hajhullás mértékét, másrészt a szelektív fototermolízis elvén működő kezelés hatásos és tartós szőrtelenítést biztosít. Ezen hőhatásra a szőrtüszőben kialakuló jelenségek hátterében a jelenlévő TRP csatornák esetleges szerepét még nem vizsgálták.

Több, a gyulladási folyamatok során akár egyszerre jelenlévő inger (hő, mechanikai deformáció, pH) is aktiválhatja a TRPV4-et, és az ismert, hogy a gyulladás – valamint *in vitro* több gyulladási mediátor önmagában is – a hajszál elvesztéséhez vagy katagén fázis kialakulásához vezethet. Felmerül, hogy a TRPV4 is hozzá járul a gyulladást kísérő hajvesztéshez.

Végül, a TRPV4 lehetséges *in vivo* aktivátorai után kutatva az endokannabinoid anandamid is felmerül lehetséges endogén ligandként, ráadásul a szőrtüsző képes főként anandamidot termelni, amely bár szintén katagén induktor, ezen hatásait a CB1 receptoron keresztül fejti ki.

Eredményeink szerint tehát a TRPV4 jól illeszkedik az endokannabinoid-TRP rendszer szőrtüszőn eddig leírt tagjai közé, hiszen mind a CB1 metabotróp receptor, mind a TRPV1,3-4 ioncsatornák aktivációja emberi eredetű *ex vivo* szőrtüsző szervkultúrán katagén fázist indukál. Figyelemre méltó a szőrtüszőn belül a TRP csatornák expressziós mintázatának hasonlósága; dominál az ORS rétegben a

kifejeződés, de a DP sejtekben nem igazolt egyik jelenléte sem. Ugyanakkor különbségek is vannak az általuk mediált hatásokban; így az ORSK-k TRPV3 aktivációja apoptózisra és nekrozisra jellemző változásokat is beindít, addig a TRPV4 aktiváció eredményeink szerint pusztán apoptózist. A későbbiekben – a TRPV4 farmakológiai célbavétele mellett – érdemes további kutatásokat folytatni a TRPV4 szőrtüszőn megnyilvánuló hatásainak *in vivo* karakterizálására, illetve a TRPV4 szerepét vizsgálni lehetséges endogén aktivátorok (pl. hő, gyulladás) hatásának hátterében.

A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira

A CBD korábbi eredményeink szerint a pilosebáceus egység (PSU) másik tagján, a faggyúmirigyen ígéretes acne ellenes hatásokat mutat, melyet részben TRPV4 és adenosin receptor aktiváció közvetít. A két „mini-szerv” közelsége, valamint az acne és más kórállapotok kialakulásában betöltött közös szerepük megkívánja egy potenciálisan terápiás reménnyel kecsegtető hatóanyag vizsgálatát a PSU mindkét elemén. A CBD ismert receptorai közül több expressziója is a közelmúltban vált ismertté a szőrtüszőn is. Ezek között viszont bizonyos receptorok ellentétes hatásokat közvetíthetnek, például a TRPV4 inkább katagén irányba befolyásolja a hajciklust, az adenosin-receptorok pedig anagén irányba.

Eredményeink szerint a CBD koncentrációtartománytól függően különböző, akár ellentétes hatásokat képes beindítani, és ennek hátterében több receptor aktiválása áll. Az *ex vivo* szőrnövekedést alacsony 0,1 μM koncentrációban inkább fokozta (bár nem szignifikáns módon), anélkül, hogy a hajciklusra vagy a mátrix keratinociták folyamataira (apoptózis/proliferáció) bármilyen szignifikáns hatása lenne. Az alacsony koncentrációjú CBD-kezelésnek nem volt hatása az ORSK-k Ca^{2+} -homeosztázisára sem. Ebben az alacsony koncentráció-tartományban kb. 1 μM -ig alkalmazva biztonságosnak tűnik, a TRPV4 aktiválása nélkül, nincs hatása az

ORSK-k életképességére és apoptózist vagy nekrozist sem indukál.

A CBD magas, 10 μM -os koncentrációban ugyanakkor gátolta a szőrnövekedést *ex vivo* és a MK-régióban apoptotizáló sejtek aránya az elenyésző néhány százalékról kb. 15 %-ra emelkedett. Ennek megfelelően a hajciklust is drámai mértékben a katagén irányba terelte. Fontos, hogy ebben a (10 μM feletti) koncentráció-tartományban már az ORSK-k $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ -jét is szignifikánsan emeli, valamint, hogy a CBD által okozott Ca^{2+} -beáramlás szignifikáns módon kivédhető a TRPV4 antagonistá HC067047 együttes alkalmazásával. A CBD az ORSK-k életképességére ennek megfelelően hasonló hatást mutat, mint a TRPV4 aktiváció esetén, vagyis képes apoptózist indukálni, azonban ehhez nekrotikus hatás is társul. A CBD ebben a koncentrációban gátolja a sejtek proliferációját és életképességét is.

A CBD alacsony koncentrációban amellet, hogy biztonságosnak tűnik, vagyis nincsenek az előzőekben ismertetett TRPV4 mediált hatásai, gyulladásgátló hatásának is bizonyult. Modellünkben a TLR3 receptor aktivációjával indukáltunk *in vitro* gyulladást környezetet szőrtüsző-szervkultúrában, amely során sikerült a teljesen kezeletlen szőrtüszők citokin termelését fokozni, így az IL-1, IL-6, IL-8 és TNF α expressziója kb. 3-10-szeresére fokozódott. A CBD képes volt ezt a gyulladást minimalizálni vagy kivédeni együttes alkalmazás esetén, és ezt a hatást valószínűleg adenosin receptorok aktiválásával fejtette ki. Eredményeink szerint a CBD kellően alacsony dózisban alkalmazva, amelyben a TRPV4-et még nem aktiválja érdemben, képes az adenosin receptorokat serkentve anti-inflammatorikus hatást kifejteni. Ez megmagyarázza azt, hogy a CBD ebben a dózisban nem-szignifikáns módon képes a hajszálnövekedést is fokozni.

Részben gyulladáscsökkentő hatása alapján a CBD-t a bőrbetegségek közt klinikai vizsgálatban először acnéban kezdték vizsgálni. A placebo-kontrollált, kettősvak,

randomizált vizsgálat (NCT03573518) eredményeit még nem ismerjük, azonban az előzetes eredmények alapján a vizsgálati alanyok a napi kétszeri helyi kezelést jól tolerálták. A CBD acne-ellenes hatása mögött részben a korábban munkacsoportunk által leírt, faggyúmirigyen megnyilvánuló komplex gyulladásgátló, antiproliferatív és szebosztatikus hatás állhat. Tekintve, hogy az ORS réteg fokozott proliferációja is szerepet játszik a betegség kialakulásában, a CBD ORSK-kon kifejtett antiproliferatív és gyulladásgátló hatásai is hozzájárulhatnak a terápiás sikerhez. Jelenleg több más bőrbetegségben is vizsgálják a helyi és szisztémás CBD kezelés hatását (NCT040451191, NCT03824405 NCT03693833). A topikális CBD kezelés iránt mutatott intenzív érdeklődés nem véletlen, ugyanis a gyulladásgátló hatású szerekre nagy szükség van a gyakori, immun-mediált bőrbetegségek kezelésében. Emellett a szisztémásan is biztonságos CBD helyi kezelés esetén még szűkebb mellékhatás-profillal járhat.

Összességében humán *in vitro* és *ex vivo* eredményeink illeszkednek a CBD-ről eddig felhalmozott kutatási eredmények közé, amelyek alapján a CBD a bőrgyógyászatban továbbra is ígéretes hatóanyagjelölt. Továbbá, eredményeink közelebb visznek a CBD hatása mögött álló komplex mechanizmusok megismeréséhez is.

Összefoglalás

Jelen vizsgálataink során az ECS szőrtüszőn betöltött élettani szabályozó szerepéről szóló ismereteinket kívántuk bővíteni és egy új TRP csatornáról bizonyítottuk be, hogy szerepe lehet a hajciklus szabályozásában. Eredményeink szerint a TRPV4 ioncsatorna kifejeződik humán szőrtüszőn, főként az ORS rétegben. Az ORS keratinocitákon a TRPV4 Ca^{2+} -csatornaként funkcionál, és *in vitro* hőstimulussal is aktiválható. A TRPV4 kémiai stimulálása az ORSK-k apoptózisához vezet, az intakt, humán szőrtüszők TRPV4 aktivációja pedig katagén fázist indukál, valamint gátolja a szőrnövekedést *ex vivo*.

Továbbá vizsgálatuk a CBD humán szőrtüszőre kifejtett hatásait és az azok háttérében álló receptorokat. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott CBD kezelésnek koncentrációtól függően eltérő, ellentétes hatásai vannak. Alacsony koncentrációban alkalmazva elhanyagolható módon befolyásolja a hajciklust, a szőrnövekedést is csak inszignifikáns módon fokozza. Ráadásul, ebben az alacsony koncentrációban alkalmazva adenosin receptor mediált anti-inflammatórikus hatást fejt ki. Magas koncentrációban alkalmazva azonban a CBD képes a TRPV4 csatornákat aktiválni, amely dominálja szőrtüszőn kifejtett hatásait; így a CBD gátolja a szőrnövekedést, a mátrix keratinociták proliferációját és katagén morfológiát indukál. A szőrtüszőn TRPV4-et leginkább kifejező ORSK-kon pedig apoptózis és nekrozis kialakulásához vezet a TRPV4 aktivációjával és Ca^{2+} -beáramlással.

Vizsgálataink amellet, hogy új információval szolgálnak az ECS-TRP rendszer, valamint a CBD hajbiológiai hatásairól, jól illeszkednek a korábban felhalmozott ismeretek közé. Eredményeink szerint a TRPV4 hozzájárulhat a TRPV1 és TRPV3, valamint a CB1 által a hajcikluson fenntartott pro-katagén ECS-tónushoz. Ezenfelül jellemeztük CBD összetett szőrbológiai hatásait, és azonosítottuk az ezeket mediáló célpontokat, úgymint az ORSK-kon kifejeződő TRPV4 és adenosin receptorokat.



Nyilvántartási szám: DEENK/321/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Imre Lőrinc
Neptun kód: BHLFWC
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, I. L.**, Herczeg-Lisztes, E., Béke, G., Tóth, K. F., Paus, R., Oláh, A., Bíró, T.: The phytocannabinoid (-)-cannabidiol (CBD) operates as a complex, differential modulator of human hair growth: anti-inflammatory submicromolar versus hair growth inhibitory micromolar effects.
J. Invest. Dermatol. [Epub ahead of print], 1-11, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>
IF: 6.29 (2018)
2. **Szabó, I. L.**, Herczeg-Lisztes, E., Szegedi, A., Nemes, B. Á., Paus, R., Bíró, T., Szöllősi, A. G.: TRPV4 Is Expressed in Human Hair Follicles and Inhibits Hair Growth In Vitro.
J. Invest. Dermatol. 139 (6), 1385-1388, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.020>
IF: 6.29

További közlemények

3. Herczeg-Lisztes, E., Tóth, I. B., Bertolini, M., **Szabó, I. L.**, Zákány, N., Oláh, A., Szöllősi, A. G., Paus, R., Bíró, T.: Adenosine promotes human hair growth and inhibits catagen transition in vitro: role of the outer root sheath keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. "Accepted by Publisher", 2019.
IF: 6.29 (2018)
4. Steinhoff, M., Oaklander, A. L., **Szabó, I. L.**, Stander, S., Schmelz, M.: Neuropathic itch.
Pain. 160 (Suppl.), S11-S16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001551>
IF: 6.029 (2018)





5. Szöllősi, A. G., McDonald, I., **Szabó, I. L.**, Meng, J., Bogaard, E. v. d., Steinhoff, M.: TLR3 in Chronic Human Itch: a Keratinocyte-Associated Mechanism of Peripheral Itch Sensitization. *J. Invest. Dermatol. [Epub ahead of print]*, 1-35, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.04.018>
IF: 6.29 (2018)
6. Steinhoff, M., Schmelz, M., **Szabó, I. L.**, Oaklander, A. L.: Clinical presentation, management, and pathophysiology of neuropathic itch. *Lancet Neurol.* 17 (8), 709-720, 2018.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30217-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30217-5)
IF: 28.755
7. **Szabó, I. L.**, Kenyeres, A., Szegedi, A., Szöllősi, A. G.: Heme Oxygenase and the Skin in Health and Disease. *Curr. Pharm. Design.* 24 (20), 2303-2310, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612824666180717155953>
IF: 2.412
8. Steuer-Hajdu, K., Sawhney, I., **Szabó, I. L.**, Irinyi, B., Herédi, E., Úr, F., Remenyik, É., Szegedi, A., Gáspár, K.: Atópiás dermatitis klinikai alcsoportjai. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (3), 102-107, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.3>
9. **Szabó, I. L.**, Ócsai, H., Kiss, B. K., Kékedi, K., Kósa, P., Várvölgyi, T., Kun, E., Kenyeres, A., Szöllősi, A. G., Remenyik, É., Emri, G.: BRAF-mutáció pozitív áttétes melanoma célzott gyógyszeres kezelése. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (4), 160-167, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.4.4>
10. Haslam, I. S., Jadkauskaite, L., **Szabó, I. L.**, Staeger, S., Hesebeck-Brinckmann, J., Jenkins, G., Bhogal, R. K., Lim, F. L., Farjo, N., Farjo, B., Bíró, T., Schäfer, M., Paus, R.: Oxidative Damage Control in a Human (Mini-) Organ: Nrf2 Activation Protects against Oxidative Stress-Induced Hair Growth Inhibition. *J. Invest. Dermatol.* 137 (2), 295-304, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.035>
IF: 6.448

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 68,804

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,58

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

Debrecen, 2019.09.16.

