

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***A VANILLOID RECEPTOR-1 (TRPV1) SZEREPE A HUMÁN
SZŐRTÜSZŐ BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK
SZABÁLYOZÁSÁBAN***

Bodó Enikő



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS -ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN
2004**

BEVEZETÉS

A szőrtüsző

A bőr szőrtüszői egyedülálló szerepet betöltő epidermális eredetű „mini-organumok”, melyek a konvencionálisan ismert funkciók (mechanikai védelem, érzékelés, hőtárolás, szociális és szexuális jelzések) mellett más, a bőr biológiáján is tovamutató szereppel bírnak. A szőrtüsző egyik legfontosabb tulajdonsága a folyamatos regenerációra való képesség, mely különböző eredetű (epithelialis, mesenchymalis) és működésű sejtek kommunikációja révén valósul meg. A folyamatok során figyelemre méltó a proliferációs, differenciálódási és apoptotikus mechanizmusok szigorúan ellenőrzött összhangja, melyet a szőrtüszőn belül és kívül termelődő növekedési faktorok, citokinek, neuropeptidek és adhéziós molekulák komplex szabályozó köre hoz létre.

A szőrtüsző funkcionális anatómiája

A szőrtüszőt első megközelítésben egy hagymához lehet hasonlítani, ahol a hagyma belső leveleinek a *dermális papilla (DP)* felel meg, amit a *belső és külső gyökérhüvely* (inner root sheath, *IRS*; outer root sheath, *ORS*) *keratinocyták* hengerei borítanak. A hagyma szára reprezentálja a folyamatosan növekvő hajszálat, melynek rétegeit a DP fölött elhelyezkedő keratinocyták hozzák létre, míg színét a follikuláris melanocyták pigmenttermelése határozza meg. A hajszál aktívan növekszik az alatta található IRS-sel együtt mozogva, melynek terminálisan differenciálódott keratinocytákból felépülő rétegei (Henle, Huxley, kutikula) borítják be és védik a hajszálat.

A lassú proliferációs rátával jellemezhető ORS alkotja a szőrtüsző következő rétegét, mely folyamatos kapcsolatban és sejtkecserelődésben van az epidermisszel. Az ORS látja el a szőrtüszőt, valamint a hajszálat oxigénnel, tápanyagokkal, sejtekkel (Langerhans-sejtek, keratinocyták), továbbá a hajciklus szabályozásában meghatározó szereppel bíró mediátorokkal.

A hajciklus

A szőrtüszőt az egész életen át váltakozó regressziós és regenerációs tevékenysége teszi egyedülállóvá a többi emlős szerv között. A regresszió és regeneráció ezen periódikus váltakozását nevezzük *hajciklus*nak, melynek három jellegzetes szakaszát különböztetjük meg.

Az *anagén* fázisban aktív növekedés és fejlődés történik, a szőrtüsző ebben a fázisban éri el maximális fejlettségét. Ekkor főként a proliferációs folyamatok dominálnak, ami elsősorban az epithelialis rétegeket érinti. Ennek során létrejön a fent említett struktúra, a hajszál hossznövekedése folyamatosan zajlik, összhangban a szőrtüsző járulékos elemeinek működésével. A *katagén* fázisban a szőrtüsző növekedése megáll, regressziós folyamatok indulnak be. Kiterjedt apoptózis zajlik a keratinocyták különféle rétegeiben, míg a DP sejteinek számában bekövetkező csökkenés a DP-ből való kivándorlás eredménye. A melanocyták programozott elhalása miatt csökken a pigment szemcsék mennyisége is. Az utolsó, nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagénre.

A hajciklus szabályozása

A hajátültetési kísérletek során már hosszú ideje megfigyelték, hogy a hajciklus egy úgynevezett „*belső órával*” rendelkezik, amely valószínűleg vagy a szőrtüsző közelében, vagy magában a szőrtüszőben helyezkedik el. Ma azt gondoljuk, hogy a „*belső óra*” valószínűleg maga a DP. Feltételezhető emellett, hogy a szőrtüszőt körülvevő, jelátviteli molekulák által biztosított millió irányított, gyors és lokális, ugyanakkor szigorú követelmények szerint szabályozott megváltozása okozza a ciklusban bekövetkező átalakulásokat.

Számos növekedési faktorról, citokinről, hormonról és egyéb molekuláról bizonyosodott be, hogy a hajciklus valamelyik pontján képes beavatkozni a fenti folyamatba. Ilyen például a hajciklus pozitív regulátoraként számon tartott hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), stem-cell

factor (SCF) és vascular endothelial growth factor (VEGF), amelyek az anagén meghosszabítását idézik elő. Ezzel szemben az fibroblast growth factor-5 (FGF5), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β_1 (TGF β_1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), neurotrophin-3 (NT-3), NT-4 és brain-derived neurotrophic factor (BDNF) molekulákról kiderült, hogy szerepük a katagén kialakításának elősegítése (negatív regulátorok).

Érdekes kiemelni a TGF β_2 szerepét a ciklus során. Ezen növekedési faktort elsőként mint a szőrtüsző fejlődésében a morfogenezist elősegítő kulcsmolekulát írták le. Kiderült ugyanakkor, hogy a TGF β_2 ellentétes szerepet játszik a hajciklus során, elősegítve a regresszió kialakulását.

A szőrtüsző biológiájának, valamint a hajciklus szabályozásának logikájába való mélyebb betekintés nagyfokú klinikai relevanciával bír. A hajnövekedés problémáinak legtöbbször ugyanis a normál hajciklus valamilyen megváltozására vezethető vissza, ami azt jelenti, hogy a funkcióképes szőrtüszők „biológiai órája” a kívántnál lassabban vagy gyorsabban jár.

A vanilloid (kapszaicin) receptor-1 (TRPV1) – a molekula szerkezete

A kapszaicin-receptor egy nem-specifikus kationcsatorna, melyet ma a nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekintünk.

A receptor klónozása és molekuláris karakterizálása Caterina és munkatársai nevéhez fűződik, akik patkány cDNS könyvtárat használva határozták meg a receptor pontos szerkezetét. A patkány TRPV1 egy 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje, melyet 2514 nukleotid kódol. Struktúrális sajátosságai alapján a TRPV1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptorcsalád egyik altípusának tekinthető. A receptorok közös jellemzője, hogy 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkeznek, és valószínűleg tetramer

formában vannak jelen a sejtekben. A TRPV1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy számos kötő- és szabályozóhellyel bír mind az intracelluláris, mind az extracelluláris oldalon. Bebizonyosodott emellett, hogy – hasonlóan a szenzoros neuronokon megtalálható TRPV1-hez – a klónozott TRPV1 is nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis csatornaként működik.

A TRPV1 exogén és endogén vanilloidok segítségével aktiválható

Az első vegyület, mely összefüggésbe hozható a TRPV1-gyel, a csípős paprikából (*Capsaicum annuum*) izolálható kapszaicin, mely a csípős paprika fogyasztását követő égő, fájdalmas érzést okozza. A kapszaicin tulajdonképpen már jóval a receptor leírását megelőzően ismert volt; részben nociceptív neuronokon való hatásait tanulmányozva jutottak arra a következtetésre, hogy léteznie kell egy olyan specifikus receptornak, ami a kapszaicin hatásait közvetíti. A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolása után azonnal kifejlődő *excitáció*, mely során megnő a sejtmembrán elsősorban Ca^{2+} -ra és Na^{+} -ra vonatkozó permeabilitása és ez a sejtek depolarizációjához vezet. Ezen változást követi a második jellemző folyamat, a *deszenzitizáció*, azaz a kapszaicin, valamint egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránti érzékenység-csökkenés. A kapszaicin nagy koncentrációban, illetve hosszú ideig alkalmazva a sejteken a harmadik jellegzetes folyamatot, a *neurotoxicitást* váltja ki, mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentrációnak ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), valamint ennek következtében kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható.

Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a TRPV1-et nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő endogén anyag („endovanilloidok”) is képes aktiválni. Ilyen például az alacsony küszöbű (~43 °C) hőmérséklet-emelkedés, a pH csökkenése (acidózis) és különféle,

leginkább gyulladássos mediátornak tekinthető molekula (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.). Ezen ágensek egyrészt közvetlenül (azaz a TRPV1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, másodlagos hírvivők) módosítása révén szabályozzák a TRPV1 működését. Ezen hatások leginkább a TRPV1 hőérzékenységi küszöbét csökkentik, így hozzájárulhatnak a termális/gyulladássos hyperalgesia jelenségének kialakulásához.

A TRPV1 nem kizárólag neuronális szöveteken fejeződik ki

A receptort autoradiográfiás, valamint különféle funkcionális vizsgálatok segítségével elsőként a primer szenzoros neuronok egy meghatározott al csoportjában írták le, melyek sejtteste a spinális hátsó gyöki és trigeminális szenzoros ganglionokban helyezkedik el. Ezen neuronok a kapszaicin és rokon vegyületeikkel szemben mutatott érzékenységük miatt a kapszaicin-szenzitív elnevezést kapták. A TRPV1-et kimutatták továbbá a gerincvelő hátsó szarvában, ahol a TRPV1-immunreaktivitás főleg az I. laminára lokalizálódott. A kötődési vizsgálatok során ugyanakkor olyan központi idegrendszeri struktúrák is jelölődtek, amelyek nincsenek egyértelműen leírt közvetlen kapcsolatban a primer szenzoros neuronokkal. Ilyen terület többek között a hipotalamusz, ahol a TRPV1 jelenlétét a kapszaicin hipotermiás hatásaival hozták összefüggésbe, valamint a cerebellum, cortex, striatum, bulbus olfactorius, híd, hippocampus és thalamus bizonyos részei.

A TRPV1-et vizsgáló kutatások egyik legizgalmasabb eredménye volt emellett annak leírása, hogy a receptor elhelyezkedése és működése nem csupán neuronális szövetekre korlátozódik. Bíró és munkatársai például kapszaicin segítségével a hátsó gyöki ganglionokéhoz nagyon hasonló, TRPV1-specifikus kalcium-beáramlást idéztek elő hízósejteken és glióma sejteken. További

kutatócsoportok emellett beszámoltak a kapszaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken, limfocitákon, timocitákon, bronchiális epitheliumon, valamint a húgyhólyag epitheliális, intersticiális és simaizomsejtjeiben.

A legújabb felfedezések egyike volt, amikor TRPV1-et immunhisztokémia segítségével kimutatták humán bőr epidermiszén és tenyésztett epidermális keratinocytákon, amit RT-PCR módszerrel is alátámasztottak. Kiderült az is, hogy a keratinocyták a receptor funkcionális formáját expresszálják, azaz a kapszaicin és a savas közeg ezeken a sejteken is aktiválta a receptort és megemelte az $[Ca^{2+}]_i$ -t. További vizsgálatok megmutatták, hogy az epidermális eredetű HaCaT keratinocytá sejtvonalon kapszaicin-kezelést követően megemelkedett a ciklooxygenáz-2 expressziója, valamint IL-8 és prosztaglandin-E2 felszabadulása, ami arra utalhat, hogy az epidermális keratinocytákon megtalálható TRPV1 is szerepet játszhat a bőr gyulladásos folyamatainak kialakításában, illetve szabályozásában.

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Azon kutatások, melyek a TRPV1 számos neuroektoderma vagy mezoderma eredetű, nem-neuronális szövetekben – köztük természetesen az epidermális keratinocytákon – való funkcionális (proliferációs, apoptotikus és differenciálódási folyamatok befolyásolása, citokintermelés szabályozása) megjelenéséről számoltak be; valamint az a tény, hogy a TRPV1 agonista kapszaicint már régóta alkalmazzák a klinikumban különböző bőrgyógyászati kórképek enyhítésére, azt sugallták, hogy a TRPV1 biológiai szerepe sokkal szélesebb körű, mint azt korábban gondoltuk. Az irodalomban hiányoznak ugyanakkor azok a leírások, amelyek felvilágosítást adhatnának a TRPV1 bőr és bőrfüggelékek biológiájában betöltött lehetséges szerepéről. Mindezek

irányították figyelmünket a TRPV1 bőr, illetve bőrfüggelékek biológiájában betöltött lehetséges szerepének vizsgálatára.

Kísérleteink első leíró részében éppen ezért az volt a célunk, hogy meghatározzuk a TRPV1 pontos lokalizációját a bőr különböző eredetű és működésű sejt-kompartmentjeiben, különös tekintettel a szőrtüszőre és a szőrtüsző eredetű sejtekre (pl. ORS keratinocyták). Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a szőrtüszőben tapasztalt esetleges TRPV1 expressziós mintázat változik-e a hajciklus eseményeivel (anagén-katagén transzformáció) párhuzamosan.

Ezt követően a receptor funkcionális szerepének megismerésére fektettük a hangsúlyt. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen hatással van a TRPV1 kapszaicinnal való aktiválása a folliculusok alapfunkciójára, a hajszáltermelésre, továbbá olyan sejt-folyamatokra, mint a folliculáris keratinocyták osztódása, differenciálódása, a melanintermelés, valamint morfológiai tulajdonságok. A következő lépésben a hasonló sejt-folyamatok vizsgálatát (apoptózis, proliferáció, differenciálódás, citokintermelés) tűztük ki célul a tenyésztett humán szőrtüsző-eredetű ORS keratinocyták szintjén. Végül szeretnénk volna felvilágosítást kapni a TRPV1 aktiválását követő események hatásmechanizmusáról is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése

A szőrtüszőket plasztikai sebészeti operációkból visszamaradó hajszálfejbőrrel izoláltuk. Az epidemiszt és a dermiszt nagy részét levágva a megmaradó szubkutiszból eltávolítottuk a szőrtüszőket. Az ép hajfollikulusokat kiegészített Williams' E médiumban 3 és 5 napon keresztül tenyésztettük. A szőrtüszők hossznövekedését naponta egyesével mértük, majd növekedési görbét készítettünk. A tenyésztés végén a szőrtüszőket beágyaztuk, majd belőlük

fagyasztott metszeteket készítettünk. A plasztikai sebészeti operációkból kapott bőrdarabok szolgálták a teljes bőrt reprezentáló fagyasztott és paraffinba ágyazott metszetek készítésére is.

Az ORS és HaCaT keratinocyták tenyésztése

Az ORS keratinocyták tenyésztése osztódásukban meggátolt fibroblasztok által kialakított tápláló rétegen történt, Ham's F12 és szérumentes keratinocytá médiumok 1:3 arányú kiegészített keverékében. A sejteket anagén VI stádiumban lévő folliculusokból nyertük 0,1% tripszin – 0,2% EDTA-val történő emésztési eljárás során. A HaCaT keratinocyták tenyésztése 10% embrionális borjúsavót, 2 mM L-glutamint és antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban (DMEM) történt.

Szövetteni és morfológiai vizsgálatok

A folliculusok morfológiai vizsgálatát hematoxin-eozin-festett 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteken végeztük. A szőrtüszők melanintartalmát a Fontana-Masson szövettani eljárás segítségével hasonlítottuk össze.

Immunhisztokémia és -citokémia

A TRPV1 humán bőrben történő kimutatására az avidin-biotin-komplex (ABC) eljárást alkalmaztuk. Ennek során a metszeteket, blokkolás után, kecskében termeltetett elsődleges TRPV1-ellenes antitesttel inkubáltuk, amit biotinilált kecske-ellenes másodlagos antitest hozzáadása következett. Az ABC-reagens alkalmazását követően a reakciót DAB, illetve VIP SK-4600 felhasználásával tettük láthatóvá. A humán bőrben történő kettős festések során, a TRPV1 kimutatásával párhuzamosan, a dermális hízósejteket a triptáz, míg az epidermális (dendritikus) Langerhans-sejteket a sejt-specifikus marker CD1a jelölésével azonosítottuk.

A TRPV1 izolált szőrtőszőn való kimutatására a tyramide-substrate amplification (TSA) és az alkalikus foszfatáz alapú, fent bemutatott, ABC módszereket használtuk. A TSA eljárás során a metszetek TRPV1 ellenes antitesttel inkubáltuk, majd másodlagos kecske/egér/nyúl-ellenes disznó IgG-vel és streptavidin-konjugált torma-peroxidázzal való kezelés következett. A reakció kimutatására TRITC-tyramidot használtunk.

A tenyésztett ORS sejtekben egy egyszerű immunfluoreszcens eljárást alkalmaztunk a TRPV1 kimutatására; azaz az elsődleges antitesttel való inkubációt a FITC-jelölt másodlagos antitesttel való inkubálás követte.

A tenyésztett szőrtüszőkön a proliferáció és az apoptózis egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést használtunk. A paraformaldehidben fixált metszeteket először reakciópuffer-terminális deoxinukleotidil transzferáz enzim 7:3 arányú elegyével inkubáltuk. A mintákat ezután egérben termeltetett Ki-67-ellenes antitesttel (proliferációs marker), majd a digoxigenin-jelölt DNS fragmentumok ellen termeltetett FITC-jelölt digoxigenin-ellenes antitessttel (apoptózis marker), végül rodamin-jelölt kecske-ellenes IgG-vel inkubáltuk.

A TRPV1 és a melanocita marker NKI/beteb párhuzamos immunfluoreszcens jelölése során TRPV1-ellenes antitesttel inkubáltuk a metszeteket, amit a rodamin-jelölt nyúl IgG hozzáadása követett. A melanocyták láthatóvá tételére először NKI/beteb (melanocita marker) ellenes elsődleges, majd a FITC-jelölt másodlagos antitesttel való inkubáció következett.

A $TGF\beta_2$, valamint a differenciálódási marker filaggrin immunhisztokémiai kimutatása során a metszeteket először megfelelő ($TGF\beta_2$ -, illetve filaggrin-ellenes) nyúlban termeltetett elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd kecskében termeltetett FITC-jelölt másodlagos antitestet alkalmaztunk a specifikus immunjel erősítésére.

Western (immuno) blot analízis

A homogenizált minták proteintartalmának meghatározása után SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) mintánként 20-30 µg proteint választottunk szét 7,5 %-os gélen, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt a blokkolási lépést követően a TRPV1-ellenes antitesttel inkubáltuk, amit a nyúlban termeltetett torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel való kezelés követett. Az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel tettük láthatóvá.

Szemi-kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR (RT-PCR)

A TRPV1 és a TGFβ₂ mRNS szintű meghatározására a bőrből, illetve a szőrtüszőből Trizol segítségével teljes RNS-t izoláltunk, majd specifikus primerek és megfelelő enzimek felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A TRPV1-specifikus mRNA kvantitatív meghatározását az 5' nukleáz módszer alkalmazásával végeztük. A PCR amplifikáció specifikus TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt, belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenázt felhasználva.

Intracelluláris kalciummérés

A fedőlemezre szélesztett sejteket 5 µM kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter (fura 2-AM) formájával töltöttük fel, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk az [Ca²⁺]_i változását. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép használatával, majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva fotoelektron-

sokszorozó segítségével. Az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat a Grynkiewicz és mtsai által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk.

A sejtproliferáció vizsgálata

A proliferáció nyomonkövetésére bróm-dezoxi-uridint (BrDU) felhasználó kolorimetriás assay-t végeztünk. A módszer lényege, hogy a timidin-analóg BrDU a proliferáló sejtek DNS-ébe épül be, melynek mértéke a timidin-analóg ellen termeltetett antitest Fab-fragmentjéhez kapcsolt peroxidáz enzim, valamint tetra-metil-benzidin szubsztrát alkalmazásával kolorimetriásan mérhető.

Áramlási citometria

A TRPV1-aktiváció sejtproliferációra, differenciálódásra, apoptózisra, valamint a szőrtüsző kialakulását és fejlődését szabályozó molekulák kifejeződésére gyakorolt hatását áramlási citometria segítségével elemeztük. A kontroll és kapszaicin kezelt ORS keratinocyták folyamat-specifikus markereinek jelölésére használt elsődleges antitestek alkalmazását követően a megfelelő FITC-konjugált másodlagos antitesteket alkalmaztuk. A Coulter EPICS XL-4 készülék segítségével antigénenként legalább 50000 sejtet használva meghatároztuk a teljes sejtszámra vonatkozó pozitív sejtek számát.

Statisztikai elemzések

Mérési eredményeinket átlag \pm SEM vagy átlag \pm SD formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szinttel dolgozva a Student-féle *t*-tesztet alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

1) A TRPV1 mind mRNS, mind fehérje szintjén kifejeződik a bőr számos epithelialis és mesenchymalis sejt típusán

Kísérleteink első részében – hajas fejbőről készült szövettani metszeteken TRPV1 immunhisztokémiát végezve – megállapítottuk, hogy jelentős TRPV1 immunreaktivitás (TRPV1-ir) található az epidermális keratinocytákban, főleg a bazális sejtrétegekben. Megállapítottuk továbbá, hogy a keratinocyták mellett a CD1a-pozitív epidermális Langerhans-sejtek is expresszálják a TRPV1-et. Kimutattuk emellett, hogy a dermisz számos kompartmentje is pozitívan festődött; az itt elhelyezkedő TRPV1-et expresszáló szenzoros idegrostok mellett erős TRPV1-ir-t találtunk a faggyúmirigyek és a verejtékmirigyek epitheliumán, az erek falában mind az endotheliumban, mind a simaizom rétegben, valamint a dermisz simaizom-kötegeiben. A triptáz-TRPV1 kettős festés során megállapítottuk továbbá, hogy a dermális hízósejtek is a TRPV1-et expresszáló sejtek közé sorolhatók. A TRPV1 jelenlétét emellett két további módszerrel, Western blottal és RT-PCR-rel is azonosítottuk humán bőrben. Fontos eredményünknek adódott, hogy az epidermális melanocyták és a kötőszöveti fibroblasztok nem mutattak TRPV1 pozitivitást.

2) Mind a bőrben in situ elhelyezkedő, mind az izolált és tenyésztett humán szőrtüszők számos sejtrétege kifejezi a TRPV1-et

A paraffinba ágyazott humán fejbőrben található szőrtüszők vizsgálata során bebizonyosodott az is, hogy a szőrtüsző számos sejtrétege ugyancsak kifejezi a TRPV1-et. Jelentős TRPV1-ir-t találtunk az ORS keratinocytákon, az IRS differenciálódott keratinocytáin, valamint kis mértékben a bulbus mátrix keratinocytáin is. A follikulust kívülről burkoló kötőszövetes burok (CTS) és a DP sejtjei – a bőr dermális fibroblasztjaihoz hasonlóan – ugyanakkor nem expresszálták a TRPV1-et.

A teljes bőrben készült festéssel azonos szöveti eloszlást mutatott a TRPV1 izolált, tenyésztett anagén VI fázisban lévő szőrtüszőkön is; vagyis igen kifejezett TRPV1-ir volt tapasztalható az ORS, IRS és mátrix keratinocyták rétegeiben (bár ebben az esetben az IRS TRPV1-pozitivitása talán kevésbé volt kifejezett, mint a bőrben *in situ*). Ezt megerősítendő, a TRPV1-et mRNS szinten is sikerült kimutatnunk Q-PCR technika alkalmazásával.

Az NKI/beteb-TRPV1 kettős jelölés során emellett kiderült, hogy a folliculáris melanocyták nagy valószínűséggel nem expresszálják a TRPV1-et. A DP és CTS területe ugyancsak TRPV1-negatívnak adódott.

Kimutattuk emellett, hogy a fent bemutatott TRPV1 expressziós mintázat jelentős mértékben változik a hajciklus eseményeivel párhuzamosan. Az interferon- γ -kezelt katagén folliculusokban a TRPV1-ir intenzitás mértéke ugyanis szignifikánsan, $32,3 \pm 6,8$ %-kal megemelkedett az ORS területén a kontroll (azaz anagén) folliculusok értékeihez viszonyítva.

3) A TRPV1-aktiváció dózisfüggően és specifikusan gátolja a hajszál hossznövekedését szőrtüsző szervkultúrában

A TRPV1 humán szőrtüszőben való jelenlétének leírása fölvetette azt a kérdést, hogy a receptor milyen funkcionális szerepet tölthet be a szőrtüsző különböző élettani folyamataiban. Izolált szőrtüsző szervkultúrát felhasználva megállapítottuk, hogy a TRPV1 agonista kapszaicin (5 napos kezelés) dózisfüggően, szignifikánsan csökkentette a hajszálak hossznövekedését. Kimutattuk azt is, a kapszaicin hatása specifikus, hiszen a TRPV1 antagonistá iodo-resiniferatoxin (I-RTX) alkalmazása teljes mértékben kivédte a kapszaicin gátló hatását. Mindezen adataink a TRPV1 hossznövekedést szabályozó specifikus szerepére utalnak.

4) A kapszaicin által kiváltott TRPV1-aktiváció gátolja a márix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál

Mivel a TRPV1 aktiválását követően a szőrszál hossznövekedése jelentősen lecsökkent, kíváncsiak voltunk, hogy a szőrszál előállításában meghatározó szereppel bíró mártix keratinocyták egyes sejtfolymatai (proliferáció és apoptózis) változnak-e a kezelés hatására. A kontroll és kapszaicin-kezelt metszeteken a proliferáló és apoptótikus sejtek egyidejű kimutatására szolgáló Ki-67/TUNEL festéseken vizsgáltuk az Auberth-vonal alatt elhelyezkedő mártix keratinocytákat. A kontroll, nem kezelt hajfollikulusok mártix keratinocytáiban számos aktívan proliferáló sejtet találtuk, míg az apoptótizált keratinocyták száma elhanyagolható volt. A TRPV1 aktiválását követően megfordult a proliferáló és apoptótikus sejtek aránya; azaz kapszaicin alkalmazása során a sejtek nagy hányada TUNEL-pozitív volt (vagyis programozott sejthalálon ment keresztül), míg az osztódó sejtek aránya a kontrollhoz képest jelentősen lecsökkent.

5) A TRPV1 stimulálása anagén-katagén transzformációra jellemző morfológiai változásokat okoz

A következő lépésben hematoxilín-eozin festett metszeteken tanulmányoztuk a kapszaicin-kezelt follikulusok morfológiáját. A vizsgált follikulosokat anagén és katagén csoportokba sorolva megállapítottuk, hogy a kontroll follikulusok nagy része az anagén VI stádiumban lévő szőrtüsző jellegzetes képét mutatta. A kapszaicin-kezelés eredményeként ugyanakkor számos, a korai regressziós, vagyis katagén fázisra jellemző szövettani változás lépett fel. Azaz a TRPV1-aktiválás hatására a DP elvékonyodott, a dermális fibroblasztok lefelé vándoroltak, majd orsó alakú formát vettek fel. A mártix keratinocyták rétege szintén elvékonyodott, a hajszál és a DP között így egy hídszerű sejtréteget alakult ki. Jellemző volt továbbá a pigmentáció jelentős csökkenése is a felhúzódott hajszálban.

Mint ahogy a kapszaicin-kezelést követően a szőrtüszőkben a korai katagén kialakulásával jelentős pigmentáció-csökkenést tapasztaltunk, szeretnénk volna kideríteni, hogy ez elsődlegesen a katagén-indukció, vagy a direkt TRPV1-stimuláció miatt következett-e be. Ezen kísérletet olyan szervkultúrán végeztük, melyben kapszaicin hatására még nem alakultak ki a katagénre utaló morfológiai változások. A szőrtüszőkön Fontana-Masson festést végezve azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen és kapszaicin-kezelt szőrtüszők melanintartalmában nem volt szignifikáns eltérés, tehát a melanin mennyiségének csökkenése nem vezethető vissza közvetlenül a TRPV1 aktiválására.

6) A TRPV1-aktiváció nem befolyásolja a differenciálódási marker filaggrin expresszióját

A kapszaicin hatására bekövetkezett morfológiai változások és katagén kialakulása felvetette annak a lehetőségét, hogy a TRPV1-aktiváció a keratinocytákban differenciálódási folyamatokat indíthat be. Ezen kísérletünk során kapszaicin-kezelt, de a katagén transzformáció jegyeit még nem mutató follikulusokat használva vizsgáltuk a differenciálódási marker filaggrin expressziós mintázatát kontroll és kezelt follikulusokban. Megállapítottuk, hogy a filaggrin kifejeződése mindkét esetben a differenciálódott ORS és IRS keratinocytákra lokalizálódott. A festések intenzitását denzitometriásan elemezve ugyanakkor azt figyeltük meg, hogy nem tapasztalható szignifikáns eltérés a filaggrin expressziójában a TRPV1-aktiváció hatására, vagyis a receptor feltehetőleg nem játszik szerepet a differenciálódási folyamatok irányításában.

7) A TGF β ₂ jelátviteli útvonal résztvehet a hajnövekedést gátló TRPV1 szignalizációban

A TGF β ₂ egy, a hajciklus negatív regulátoraként számon tartott molekula, mely a kapszaicin hatásához nagyon hasonló morfológiai változásokat okoz

szőrtüsző szervkultúrában. Mind immunhisztokémiai, mind RT-PCR módszerekkel megállapítottuk, hogy rövid idejű kapszaicin-kezelést követően a TGF β_2 szintje jelentősen megemelkedett nemcsak az ORS keratinocytákon, hanem a DP-ban és a mátrix keratinocytákban is. A TGF β_2 neutralizáló antitest jelenlétében elvégzett kísérlet során azonban kiderült, hogy az ellenanyag csak részben volt képes kivédeni a kapszaicin hossznövekedést gátló hatását; vagyis az általunk megfigyelt, a TRPV1-aktivációt követő jelenségeknek valószínűleg csak egy része a TGF β_2 felszabadításának közvetlen következménye.

8) A TRPV1 a tenyésztett ORS keratinocytákban is megtalálható és funkcionális Ca²⁺-csatornaként működik

A továbbiakban a TRPV1-stimuláció celluláris hatásait kívántuk tanulmányozni a receptor hatásmechanizmusával kapcsolatos kérdések tisztázására. Sejtszintű kísérleteinket a humán szőrtüsző ORS keratinocytáiból készített primer kultúrákon végeztük, párhuzamosan az immortalizált, epidermális eredetű, a TRPV1-et bizonyítottan expresszáló HaCaT keratinocytákkal. Western blot, immuncitokémia és Q-PCR alkalmazásával az irodalomban elsőként sikerült kimutatnunk a TRPV1 jelenlétét ORS keratinocytákban, a pozitív kontroll értékeivel összehasonlítható mennyiségben.

Funkcionális kalciummérés segítségével emellett megállapítottuk, hogy a kapszaicin-kezelés – hasonlóan a HaCaT keratinocytákban tapasztaltakhoz – dóziszfüggően megemelte az [Ca²⁺]_i-t ORS keratinocytákban. Bebizonyosodott továbbá, hogy a kapszaicin ezen hatása specifikus, hiszen a TRPV1 antagonistá I-RTX mindkét sejttípus esetében megakadályozta a kapszaicin által kiváltott [Ca²⁺]_i-növekedést. Mindezen adatok alapján elmondható, hogy a receptor funkcionális Ca²⁺-csatornaként működik ORS keratinocytákban is.

9) A TRPV1-aktiváció gátolja a proliferációt és apoptózist indukál tenyésztett ORS és HaCaT keratinocytákon

Az ORS és HaCaT keratinocyták proliferációjának BrdU ELISA módszerrel való nyomonkövetése során kiderült, hogy a kapszaicin szignifikánsan, dóziszfüggően, valamint specifikusan (azaz I-RTX adagolásával kivédhető módon) csökkentette az osztódó ORS és HaCaT keratinocyták számát magas (2 mM) Ca^{2+} -tartalmú tenyésztő oldatban. Ugyanezt a kísérletet alacsony (0,4 mM) Ca^{2+} -tartalmú oldatban is elvégezve azt tapasztaltuk, hogy ilyen körülmények között a kapszaicin proliferációt gátló hatása kevésbé érvényesül; azaz a TRPV1-stimulációt követő proliferáció-csökkenés valószínűleg az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése által valósul meg. Ezt támasztotta alá áramlásos citometriás megfigyelésünk is, mely a proliferációs markerek (PCNA, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67) mennyiségének csökkenéséről számolt be a TRPV1-aktiváció hatására. Kimutattuk emellett, hogy a kapszaicin-kezelés hatására jelentősen megemelkedett az ORS keratinocytákban az apoptotikus marker Annexin-V mennyisége, mely a programozott sejthalál TRPV1-mediált beindulására utal.

10) A TRPV1-aktiváció megváltoztatja a hajciklus szabályozó molekuláinak kifejeződését tenyésztett ORS keratinocytákban

Utolsó lépésként azon citokineket és növekedési faktorok kifejeződését vizsgáltuk, melyeket a hajciklus pozitív vagy negatív regulátoraiként ismerünk. ORS keratinocytá tenyészetek kapszaicin-kezelését követően megállapítottuk, hogy a TRPV1-aktiváció hatására szignifikánsan csökkent a pozitív szabályozó HGF, IGF-I és SCF faktorok kifejeződése, míg a negatív regulátor IL-1 β és a már említett TGF β_2 megnövekedett mennyiségben volt kimutatható. Az általunk kiválasztott további molekulák (FGF-5, IFN γ és TNF α) expressziójára a TRPV1-aktiváció nem gyakorolt mérhető hatást.

MEGBESZÉLÉS

1) A TRPV1 kifejeződése humán bőrben és a bőr függelékeiben

Vizsgálataink első részében a TRPV1-et sikerült kimutatnunk a korábban már jellemzett epidermális keratinocytákban, valamint, az irodalomban elsőként az epidermális Langerhans-sejtekben. A dermiszben elhelyezkedő szenzoros neuronokon kívül ugyanakkor számos más, nem-neuronális elem is megtaláltuk a receptort; úgymint a faggyúmirigyekben, verejtékmirigyek epitheliumán, az erek endotheliumában és simaizom sejtjeiben, a dermális simaizom kötegekben, valamint a dermális hízósejtekben. A bőr epidermális keratinocytáihoz hasonlóan a szőrtüsző (mind a bőrben *in situ*, mind a szervtenyészetekben) különféle keratinocytáiban is detektálható volt a receptor: mind az ORS, mind az IRS, valamint a mátrix keratinocyták is kifejezték a TRPV1-et, szemben a fibroblasztokkal (dermális, CTS, DP) és melanocytákkal. Fontos megjegyezni, hogy a mátrix, valamint gyökérhüvely keratinocyták esetében a TRPV1 expressziós mintázata szignifikáns módon megemelkedett a folliculusok INF- γ indukálta katagén transzformációját követően, mely arra utalhat, hogy a szőrtüszőben megfigyelhető ciklikus változások jelentős mértékben képesek a TRPV1 expressziójának szabályozására.

Eredményeink azt mutatják tehát, hogy a TRPV1 a bőr számos, akár eltérő eredetű és működésű sejtjén is jelen van. Ezzel tovább bővül a TRPV1-et expresszáló nem neuronális jellegű szövetek száma, hasonlóan más olyan receptorokhoz (pl. kolinerg, tachykinin, glutamát és kannabinoid receptorok), amelyeknek korábban csak idegrendszeri struktúrákban tulajdonítottak szerepet.

2) A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

A TRPV1 ilyen széleskörű kifejeződése a bőrben; az eltérő differenciáltsági fokú keratinocyták különböző expressziós mintázata; valamint

a follikulusok katagén transzformációját követően a TRPV1 megnövekedett mértékű kifejeződése rögtön fölvetette a következő kérdést: mi lehet a receptor szerepe ebben a rendszerben?

Szőrtüsző szervkultúrát használva, a follikulusokat a TRPV1 agonista kapszaicinnal kezelve azt tapasztaltuk, hogy a TRPV1 aktiválása dóziszfüggően és specifikus módon meggátolta a hajszál hossznövekedését. Ezzel párhuzamosan morfológiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a hossznövekedés csökkenése együtt járt a korai katagén stádiumhoz hasonló jegyek kialakulásával. Vagyis a hajszál képződésének lelassulását feltehetőleg egy olyan komplex folyamat kísérte, amely a szőrtüsző számos kompartmentjére kiterjedő változásokra vezethetők vissza. Mint arról már számos szerző beszámolt, a katagén létrejöttét a főleg keratinocytákra és melanocytákra kiterjedő programozott sejtelhalás kíséri. Hasonló jelenséget tapasztaltunk mi is kísérleteink során; vagyis a kapszaicin-kezelést követően a mátrix keratinocytákban számos TUNEL-pozitív, azaz apoptotizált sejtet detektáltunk, míg a proliferáló (Ki-67 pozitív) sejtek száma jelentősen lecsökkent. Ezen eredményünk összhangban van más kutatócsoportok által leírt megfigyelésekkel, miszerint a TRPV1 aktivációja *in vitro* apoptózis létrejöttét eredményezi számos sejttypusban, pl. glia sejtekben, timocitákon, stb.

Eredményeink alapján emellett úgy tűnt, hogy összefüggés lehet a hajciklust negatívan szabályozó $TGF\beta_2$ és a TRPV1 jelátviteli útvonala között. A kapszaicin-kezelt follikulusok esetében ugyanis igen jelentős $TGF\beta_2$ expresszió-növekedést tapasztaltunk. Mivel azonban a $TGF\beta_2$ -t neutralizáló antitest a kapszaicin növekedést gátló hatását csak részlegesen védte ki, azt kell feltételeznünk, hogy a $TGF\beta_2$ bár nagy valószínűséggel szerepet játszik a TRPV1 hatásainak közvetítésében, más jelátviteli útvonalak befolyásával is számolnunk kell. Mindazonáltal az irodalomban ez az első olyan megfigyelés, mely a $TGF\beta_2$ és a TRPV1 jelátviteli útvonalának konvergenciáját mutatja be. Ehhez hasonló, de más faktorok termelődését érintő összefüggésekről korábban

már többen is beszámoltak; a TRPV1 aktivációjának hatására citokinek és más növekedést befolyásoló molekulák (interleukinek, prosztaglandinok) szabadulnak fel pl. hízósejtekből, bronchialis epitheliumból és keratinocytákból.

Ezen megfigyelésünket erősítették a tenyésztett ORS keratinocytákkal kapott eredményeink is. Megállapítottuk, hogy az ORS sejtek kapszaicinnal való kezelése megváltoztatta számos, a hajciklus szabályozásában fontos szabályozó szerepet betöltő citokin és növekedési faktor kifejeződésének intenzitását. Szignifikánsan csökkent a pozitív szabályozó HGF, IGF-I és SCF faktorok termelése, míg a negatív regulátor IL-1 β és a már említett TGF β ₂ expressziója szignifikánsan megnőtt. Úgy tűnik tehát, hogy a TRPV1 aktivációja beavatkozik az ORS keratinocyták, így a hajfollikulusok citokinjeinek és növekedési faktorainak termelésébe, vagyis a TRPV1 a növekedés és fejlődés kulcsmolekulái expressziójának módosítása, valamint az apoptózis és proliferáció szabályozásán keresztül a szőrtüsző komplex biológiai folyamatainak is központi irányítója lehet.

Kísérleteink során a TRPV1 sejtszintű szerepét is vizsgáltuk, a fent említett ORS, illetve az epidermális immortalizált HaCaT keratinocytákat alkalmazva kísérleti modellként. A TRPV1 fehérjét, valamint a specifikus mRNS szakaszt sikerrel mutattuk ki tenyésztett ORS keratinocytákban, a pozitív kontrollként használt HaCaT keratinocytákéval összevethető mennyiségben; nem találtunk ugyanakkor immunreaktivitást a tenyésztett fibroblasztokon. Ezen kifejeződési mintázat jó összhangban volt a teljes bőrben, illetve szőrtüszőben látottakkal, ahol a különböző lokalizációjú keratinocytákban megtaláltuk a TRPV1-et, míg a fibroblasztok különféle populációiban nem.

A TRPV1 számos neuronális és non-neuronális sejten, többek között a HaCaT keratinocytákon is, funkcionális Ca²⁺-permeabilis csatornaként működik. Megállapítottuk, hogy az ORS keratinocytákon a kapszaicin koncentrációjával egyenesen arányosan nőtt az [Ca²⁺]_i mennyisége, sugallva, hogy a kapszaicin aktiválja a TRPV1-et, aminek Ca²⁺-beáramlás a következménye. Ezt látszik

alátámasztani az a megfigyelés is, hogy a kalciummentes térben történő mérések, illetve a TRPV1 antagonistá I-RTX alkalmazása során nem tapasztaltunk változást az $[Ca^{2+}]_i$ -ban. Megállapíthatjuk tehát, hogy az ORS keratinocyták is a receptor funkcionális formáját fejezik ki.

A proliferációs folyamatokat nyomon követve azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin-kezelés igen hatékonyan csökkentette a proliferáló ORS, valamint HaCaT keratinocyták számát. Ugyanezen kísérletet csökkentett kalciumtartalmú oldatban is elvégezve nem tudtuk reprodukálni az előzőekben tapasztaltakat, vagyis arra következtethetünk, hogy közvetlen összefüggés lehet a $[Ca^{2+}]_i$ növekedése és a TRPV1 agonista proliferációt gátló hatása közt. Ezzel feltehetően betekintést nyertünk a capszaicin lehetséges celluláris hatásmechanizmusába az ORS és HaCaT keratinocyták proliferációja során, mely szabályozás a follikulusok biológiai folyamataiban is fontos szerephez juthat.

Érdekes megfigyelésünknek adódott ugyanakkor, hogy – hasonlóan a follikulus szervkultúrában végzett kísérleteink eredményeihez – a TRPV1 aktiváció (és a következményesen kialakuló kalciumbeáramlás) nem befolyásolta a tenyésztett ORS keratinocyták terminális differenciálódási folyamatait, melyről korábban bebizonyosodott, hogy jelentős kalciumfüggést mutat. Ezen jelenséget az alábbiakkal magyarázhatjuk: (1) a TRPV1 aktivációt követő apoptózis indukciója, a katagén átalakulás beindítása, valamint a proliferáció gátlása hamarabb bekövetkezett, mint a differenciálódási markerek kifejeződésében megfigyelhető esetleges változások; (2) a szőrtüsző szervkultúra, valamint az ORS keratinocytá tenyészetek fenntartásához használt oldatok (szükségszerűen) igen magas kalciumtartalma már önmagában jelentős mértékben megemelte a differenciálódási markerek expresszióját, melyet a TRPV1 aktivációja által kialakított $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés tovább már nem volt képes növelni sem a follikulus szervkultúrában, sem tenyésztett ORS keratinocytákon; (3) mint az irodalmi és saját adatainkból kiderül, a kapszaicin hatása a különféle sejtfolyamatokra jelentős dózis- és sejtfüggést mutat; azaz a

TRPV1 aktivációja differenciált módon befolyásolja például a citokintermelést és -felszabadítást, a sejthalált, vagy a differenciálódást különféle sejteken; (4) végezetül nem kizárt, hogy a kapszaicin-kezelés hatására kialakuló, a szőrtüsző folyamatait szabályozó gének expressziós mintázatában bekövetkező komplex változások eredőjeként nem szükségszerűen indul be, illetve fejeződik be minden egyes, a TRPV1-aktiváció következményeként megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ által potenciálisan befolyásolt sejtfolymat.

3) A TRPV1 „kettős aktivációja” – Terápiás megfontolások

A bőrben található szenzoros neuronok, valamint nem-neuronális sejttypusok (főként a hízósejtek, epidermális keratinocyták, szőrtüsző sejtpopulációi) között szoros anatómiai kapcsolat van. Kimutatták, hogy ezen szenzoros neuronok szöveti excitációja különféle neuropeptidek (pl. P-anyag) felszabadítása révén a szomszédos nem-neuronális elemek aktivációját (pl. hízósejt degranuláció; citokinek felszabadítása) váltja ki. A termelt anyagok ezután visszahatnak a szenzoros neuronokra, kialakítva a különféle fiziológias és patológias bőrfolyamatokban központi szerepet játszó kétirányú neuronális – nem-neuronális sejtálózatokat.

A fenti szenzoros neuronokat aktiváló kapszaicint széles körben alkalmazzák bőrgyógyászati megbetegedésekben (psoriasis, prurigo nodularis, notalgia paresthetica, pruritus ani, urémiás pruritus, stb.) a krónikus gyulladás, a fájdalom, valamint a kapcsolódó viszketés csillapítására/gyógyítására. Mindezen alkalmazások során úgy gondolták, hogy a TRPV1 agonista a szenzoros neuronok deszenzitizációja, valamint az afferens végződés neuropeptid-tartalmának kiürítése révén fejt ki a kívánt hatást, mintegy „felfüggesztve” a fent említett kétirányú neuronális – nem-neuronális sejtálózat működését.

Jelen adataink ugyanakkor felvetnek egy jelentős klinikai relevanciával is bíró új hipotézist, amit nevezhetünk a TRPV1 „kettős aktivációjának”. Elképzelésünk szerint a bőr neuronális és nem-neuronális sejttypusain egyaránt

megtalálható TRPV1-en ható, terápiásan alkalmazott kapszaicin hatására a bőr szenzoros axonjaiból, valamint a TRPV1-et ugyancsak kifejező számos nem-neuronális sejtfeleségből *egyidejűleg* szabadulnak fel neuropeptidek, illetve más anyagok (pl. hisztamin, gyulladáshoz vezető mediátorok). Mivel a legtöbb felszabadult ágens receptora mind a neuronokon, mind a nem-neuronális elemeken is megtalálható, a hatás eredőjeként jelentősen felgyorsulhat a kétirányú funkcionális sejtálózat működése. A szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozását tekintve ez pl. eredményezheti azt, hogy a hajciklus szabályozásában szerepet játszó, a szenzoros neuronokból felszabaduló P-anyag, valamint a follikulus növekedését ugyancsak szabályozó TRPV1-pozitív hízósejtek együttesen jelennek meg, illetve aktiválódnak, ami további, TRPV1 és neurokinin receptorokon keresztüli hízósejt-degranulációt eredményezhet.

Bemutatott eredményeink, valamint a fent vázolt hipotézis tükrében úgy tűnik, hogy nagy jelentőséggel bírhat a TRPV1 non-neuronális expressziós mintázatának meghatározása különféle bőrbetegségekben. Ezt erősíti azon megfigyelés is, miszerint prurigo nodularisban – ahol az alkalmazott kapszaicin mind a kórkép vezető tünetének számító viszketést, mind a kialakuló bőrtüneteket hatásosan gyógyította – jelentősen megemelkedett az epidermális TRPV1 expressziója.

Végezetül megállapíthatjuk, hogy jelen eredményeink a szőrtüsző biológiai folyamatainak egy új, „tüzes” szereplőjét mutatják be, mely – a szőrnövekedést gátló természetéből fakadóan – különféle TRPV1-re ható szerek bőrgyógyászati alkalmazásának további potenciális lehetőségét sugallja (pl. TRPV1 agonisták adagolása hirsutismusban, illetve antagonisták kipróbálása effluviumban, valamint alopecia különféle formáiban). A TRPV1 exogén, avagy endogén aktivációja következményeként kialakuló anti-proliferatív hatás elemzése pedig olyan hiperproliferatív bőrgyógyászati kórképekben kecsegtet jó eredménnyel, mint pl. keratosisok, keratoacanthoma, vagy akár rosszindulatú bőrdaganatok (squamosus carcinoma).

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a vanilloid receptor-1 (TRPV1) funkcionális szerepét elemeztük a humán bőr és szőrtüsző biológiai folyamataiban. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 a humán bőr számos sejtípusában (epidermális keratinocyták és Langerhans-sejtek, dermális szenzoros neuronok, erek simaizma és az endothelium, dermális simaizomkötegek, hízósejtek, faggyúmirigyek és verejtékmirigyek epitheliuma) kifejeződik. A szőrtüszőkben szintén jelentős TRPV1 immunreaktivitást figyeltünk meg az ORS és IRS, illetve mártix keratinocytákon. Azonos expressziós mintázatot találtunk a tenyésztett anagén VI folliculusokban, ugyanakkor katagén szőrtüsző megemelkedett TRPV1 expressziót mutatott. Funkcionális kísérleteinkben megállapítottuk, hogy folliculus szervkultúrában a TRPV1 specifikus aktiválása az agonista kapszaicinnel a hajszál hossznövekedésének gátlását okozta. Bebizonyosodott az is, hogy ezen növekedés-gátlás együtt járt a folliculusok anagén-katagén transzformációjával, valamint a mártix keratinocyták apoptózisának indukciójával és proliferációjának csökkenésével. Ezen jelenségeket ugyanakkor nem kísérte a differenciálódási programok beindulása, illetve a pigmentképzés megváltozása. Kimutattuk azt is, hogy a kapszaicin-kezelést követően megemelkedett a hajciklus negatív regulátorának, a $TGF\beta_2$ szintje. A tenyésztett ORS keratinocytákon megállapítottuk, hogy a TRPV1 aktiválása lecsökkentette a sejtek proliferációját, apoptózist indukált, de nem befolyásolta a differenciálódási markerek szintjét. Kimutattuk emellett, hogy a kapszaicin hatására megváltozott számos, a hajciklus szabályozásában résztvevő molekula mennyisége (a pozitív regulátorok szintje csökkent, míg a szőrnövekedést gátló faktorok expressziója emelkedett). Végezetül bebizonyosodott, hogy ezen celluláris hatások nagy valószínűséggel az $[Ca^{2+}]_i$ TRPV1-függő növekedésén keresztül valósultak meg. Mindezen adataink a TRPV1 központi szerepére utalnak a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 1) **Bodó E**, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T: Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **123(2)**:410-413. **IF: 4,194**
- 2) **Bodó E**, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, Kovács L, Paus R: A “hot” new twist to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* 2004; (*in press*) **IF: 6,946**

TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 3) Papp H, Czifra G, **Bodó E**, Lázár J, Kovács I, Aleksza M, Juhász I, Ács P, Sipka S, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004; **61(9)**:1095-1105. **IF: 4,995**
- 4) Conrad F, Ohnemus U, **Bodó E**, Bettermann A, Paus R: Estrogens and human scalp hair growth-still more questions than answers. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **122(3)**:840-842. **IF: 4,194**
- 5) Conrad F, Ohnemus U, **Bodó E**, Bíró T, Tychsen B, Bosio A, Gerstmayer B, Schmidt-Rose T, Altgilbers S, Bettermann A, Meyer W, Paus R: Substantial sex-dependent differences in the response of human scalp hair follicles to estrogen stimulation in vitro advocate gender-tailored management of female versus male pattern balding. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2004; (*in press*); **IF: 0,867**

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

- 1) Bíró T, Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács L. Modification of protein kinase C alters proliferation and differentiation of immortalized human keratinocytes. *Rev. Oncol.* 2002; **4(1)**:82
- 2) Gönczi M, Papp H, **Bodó E**, Kovács L, Bíró T, Csernoch L. Effects of recombinant overexpression of PKC α and δ on receptor-coupled calcium handling in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **119(3)**:746

- 3) Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács L, Bíró T. Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* 2002; **89(1-3)**:348
- 4) Bíró T, Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács I, Gáspár K, Juhász I, Kovács L. Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* 2003; **121(1)**:218
- 5) Bíró T, Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács I, Gáspár K, Juhász I, Kovács L. Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Dermatol. Sci.* 2003; **32(2)**:A169
- 6) **Bodó E**, Géczy T, Lázár J, Kovács I, Czifra G, Bettermann A, Kovács L, Paus R, Bíró T. The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* 2003; **121(1)**:218, No. 823
- 7) **Bodó E**, Géczy T, Lázár J, Kovács I, Czifra G, Bettermann A, Kovács L, Paus R, Bíró T. The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Dermatol. Sci.* 2003; **32(2)**: 823
- 8) Bíró T, Czifra G, **Bodó E**, Lázár J, Tóth IB, Papp H, Kovács I, Juhász I, Kovács L. Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivo proliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **123(2)**:A21
- 9) Tychsen B, Conrad F, **Bodó E**, Kobayashi H, Bíró T, Paus R. Cyclosporin A Induces Anagen and Increases the Number of Dermal Papilla Fibroblasts in Nude(Foxn1^{nu/nu}) Mice. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **123(2)**:A76
- 10) Paus R, Ito N, Ito T, Peters E, **Bodó E**, Liotiri S, Bíró T, Arck P. Cutaneous neuroimmunology – lessons from the hair follicle. *Exp. Dermatol.* 2004 (*in press*)
- 11) **Bodó E**, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Lázár J, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, Kovács L, Paus R. A “hot twist” to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1) signalling in human hair growth control. *Exp. Dermatol.* 2004 (*in press*)